

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İRAK'TA DÜŞÜK YAPMIŞ BİR GRUP KADINDA İNSAN
SİTOMEGALOVİRÜSÜ TARAFINDAN ÜRETİLEN MİKRORNA'LARIN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ali Nadhim Shndiwe KHIKANI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2024**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ali Nadhim Shndiwe KHIKANI tarafından hazırlanan “**İrak'ta Düşük Yapmış Bir Grup Kadında İnsan Sitomegalovirüsü Tarafından Üretilen MikroRNA'ların Moleküler Karakterizasyonu**” adlı tez çalışması 16/12/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT

Eş Danışman : Prof. Dr. Zaytoon Abdulrida Ighewish AL-KHAFAJI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Pınar ARSLAN YÜCE
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Çevre Sağlığı Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mustafa Sencer KARAGÜL
Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü
Kocaeli Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Emre ÖZAN
Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ersoy YILMAZ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **“Irak'ta Düşük Yapmış Bir Grup Kadında İnsan Sitomegalovirüsü Tarafından Üretilen MikroRNA'ların Moleküler Karakterizasyonu”** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (16/12/2024).

Ali Nadhim Shndiwe KHIKANI

ÖZET

Doktora Tezi

IRAK'TA DÜŞÜK YAPMIŞ BİR GRUP KADINDA İNSAN SİTOMEGALOVİRÜSÜ TARAFINDAN ÜRETİLEN MİKRORNA'LARIN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ali Nadhim Shndiwe KHIKANI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT

Eş Danışman: Prof. Dr. Zaytoon Abdulrida Ighewish AL-KHAFAJI

İnsan sitomegalovirüsü (HCMV), toplumda yaygın seyreden bir herpesvirüstür. Sağlıklı bireylerde tipik olarak asemptomatik olsa da, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ve hamilelerde önemli riskler oluşturur. Hamilelik sırasında insan sitomegalovirüs (HCMV) enfeksiyonu, spontan düşük dahil olmak üzere olumsuz sonuçlara yol açabilir. HCMV'nin plasentayı geçerek fetüsü enfekte ettiği ve potansiyel olarak gelişimsel anormalliklere ve fetal ölüme neden olduğu bilinmektedir. HCMV'nin gebeler üzerindeki etkisinin anlaşılması, virüsü dikey bulaşmanın önlenmesi ve anne ile fetüsün sağlığı üzerindeki etkilerinin azaltılmasına yönelik stratejiler geliştirmek için çok önemlidir. İnsan Sitomegalovirüsü (HCMV) enfeksiyon sırasında viral ve konak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli roller oynayan mikroRNA'ları (miRNA'lar) eksprese eder. Bu viral miRNA'lar, viral replikasyonu kolaylaştırmak, konakçı bağışıklık tepkilerinden kaçınmak ve latens oluşturmak için hücresel süreçleri manipüle eder. HCMV miRNA'larının incelenmesi, viral patogeneze ve antiviral tedaviler için potansiyel hedefler hakkında bilgi sağlar. Bu çalışmaya 15/2/2023 tarihinde Bayblon Sağlık Müdürlüğü'ne bağlı Babil Kadın Doğum ve Çocuk Eğitim Hastanesi ve Al-Hashimiya Genel Hastanesi'nin kadın doğum ve jinekoloji bölümlerine başvuran hastalardan kan örnekleri alınarak başlanmıştır. Bu çalışma, düşük yapan 140 kadından HCMV yönünden seropozitif olan 50'si (%35,7) için vaka kontrol çalışması olarak gerçekleştirilmiştir. Düşük yapan kadınlarda CMV antikoru pozitifliği; CMV IgM 3 (%6,0), hem CMV IgM hem de IgG 8 (%16,0) ve CMV IgG 39 (%78,0) olarak bulunmuştur ve sonuç anlamlıdır. Kırsal alandaki düşük yapan kadınlarda CMV IgM pozitifliği 9 (%18), P-değeri (0,0001**) yüksek derecede anlamlı ve kırsal alandaki düşük yapan kadınlarda CMV IgG pozitifliği 33 (%66), P-değeri (0,0001**) yüksek derecede anlamlı bulunmuştur. CMV viral yükü RT-PCR ile ölçülmüştür. Mir-UL148D, Mir-UL22A-3P, Mir-UL36-3P, Mir-UL36-5P için rölatif gen ekspresyonu RT-PCR ve Güney Kore'den bu çalışma için özel olarak tasarlanmış primerler ile ticari hizmet alınarak yapılmıştır. Çalışmamız hcmv-miR-UL36-5P için kat değişimi ve eğri altında kalan alanda artış olduğunu ortaya koymuştur, kontrol grubu kat değişimi $1 \pm 0,0$ ile karşılaştırıldığında kat değişimi 3,11 ve eğri altında kalan alan $0,97 \pm 0,32$ idi ve sonuç anlamlıydı, ayrıca hcmv-miR-UL36-3P için

kat değişimi 21,16 ve eğri altında kalan alan $0,94\pm0,1$ kontrol grubuna kıyasla kat değişimi $1\pm0,0$ idi ve sonuç anlamlıydı ve hcmv- miR-UL22A-3P kontrol grubuna kıyasla kat değişimi 2,92 ve eğri altında kalan alan $0,94\pm0,1$ kontrol grubuna kıyasla kat değişimi $1\pm0,0$ olarak bulunmuştur ve hcmv-mir-UL148D kontrol grubuna kıyasla kat değişimi 2,66 ve eğri altında kalan alan $0,94\pm0,4$ ile kat değişimi $1\pm0,0$ olarak bulunmuştur. Çalışmada nükleotid dizileri elde edilmiş olan B1-B4 rneklerinin nükleik asit dizilerinin HCMV5'in en homolog referans dizileri (GenBank acc. no. U88704.1) ile hizalanması, bu referans dizilerde bulunmayan dört yeni nükleik asit varyantının (B1'de 155C>T, B3'te 160T>C ve 161T>C ve B4'te 177T>G) varlığını ortaya koymuştur. Bu varyantların evirisi, 155C>T'nin GP55 kodlu p.59Ser>Phe proteini üzerinde yanlış anlamlı bir etki sergilediğini göstermiştir. Benzer şekilde, hem 160T>C hem de 161T>C, glikoprotein B değişken bölgesi üzerinde p.61Phe>Pro'nun yanlış anlam etkisinin uygulanmasına katkıda bulunmuştur. nc varyant 177T>G ise kodlanan glikoprotein üzerinde p.65Gly='nin sessiz bir etkisini sergilemiştir. p.59Ser>Phe mutasyonu, 59. pozisyonda polar yüksüz serinin hidrofobik fenilalanine dönüşümünü içerir. Bu değişikliğin proteinin 3D yapısını önemli ölçüde değiştirmesi, katlanma stabilitesini ve konak reseptör ile etkileşimleri etkilemesi beklenmektedir. Benzer şekilde, p.61Phe>Pro mutasyonu, hidrofobik fenilalanini 61. pozisyonda siklik ve sert proline dönüştürerek, genel katlanma ve stabilizeyi potansiyel olarak etkileyen bükülmeler ve kıvrımlar dahil olmak üzere beklenen yapısal değişikliklere yol açabilir.

2024, 131 sayfa

ANAHTAR KELİMELEER: HCMV, hcmv-microRNAs, CMV DNA, Gen ekspresyonu, Gerçek Zamanlı PCR, CMV genotipleme

ABSTRACT

PhD Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MICRORNAS PRODUCED BY THE HUMAN CYTOMEGALOVIRUS IN A GROUP OF ABORTED WOMEN IN IRAQ

Ali Nadhim Shndiwe KHIKANI

Çankırı Karatekin University
Institute of Graduate Studies
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Müge FIRAT

Co-Advisor: Prof. Zaytoon Abdulrida Ighewish AL-KHAFAJI

Human cytomegalovirus (HCMV) is a herpesvirus that is common in the community. Although typically asymptomatic in healthy individuals, it poses significant risks in immunocompromised patients and pregnant women. Human cytomegalovirus (HCMV) infection during pregnancy can lead to adverse outcomes, including spontaneous abortion. HCMV is known to cross the placenta and infect the foetus, potentially causing developmental abnormalities and foetal death. Understanding the impact of HCMV on pregnant women is crucial for developing strategies to prevent vertical transmission of the virus and to reduce its impact on maternal and foetal health. Human Cytomegalovirus (HCMV) expresses microRNAs (miRNAs) that play important roles in the regulation of viral and host gene expression during infection. These viral miRNAs manipulate cellular processes to facilitate viral replication, evade host immune responses and establish latency. The study of HCMV miRNAs provides insights into viral pathogenesis and potential targets for antiviral therapies. This study was initiated on 15/2/2023 by collecting blood samples from patients admitted to the obstetrics and gynaecology departments of Babil Obstetrics and Gynaecology Teaching Hospital and Al-Hashimiya General Hospital under the Bayblon Health Directorate. This study was carried out as a case-control study for 50 (35.7%) of 140 women who were seropositive for HCMV. CMV antibody positivity was found to be CMV IgM 3 (6.0%), both CMV IgM and IgG 8 (16.0%) and CMV IgG 39 (78.0%) in women who had miscarriage and the result was significant. CMV IgM positivity in rural women with miscarriage was 9 (18%), P-value (0.0001**) highly significant and CMV IgG positivity in rural women with miscarriage was 33 (66%), P-value (0.0001**) highly significant. CMV viral load was measured by RT-PCR. Relative gene expression for Mir-UL148D, Mir-UL22A-3P, Mir-UL36-3P, Mir-UL36-5P was performed by RT-PCR and commercial service from South Korea with primers specially designed for this study. Our study revealed an increase in fold change and area under the curve for hcmv-miR-UL36-5P, the fold change was 3.11 and area under the curve was 0.97 ± 0.32 compared with the control group fold change 1 ± 0.0 and the result was significant, also the fold change for hcmv-miR-UL36-3P was 21.16 and area under the curve was 0.94 ± 0.32 , 1 fold change compared to the control group was 1 ± 0.0 and the result was significant and hcmv- miR-UL22A-3P fold change compared to

the control group was 2.92 and area under the curve was 0.94 ± 0.1 and fold change compared to the control group was 1 ± 0.0 and hcmv- miR-UL148D fold change compared to the control group was 2.66 and area under the curve was 0.94 ± 0.4 and fold change compared to the control group was 1 ± 0.0 . Alignment of the nucleic acid sequences of samples B1-B4, whose nucleotide sequences were obtained in the study, with the most homologous reference sequences of HCMV5 (GenBank acc. no. U88704.1) revealed the presence of four new nucleic acid variants (155C>T in B1, 160T>C and 161T>C in B3 and 177T>G in B4) that were not present in these reference sequences. Translation of these variants showed that 155C>T exhibited a missense effect on the GP55-encoded p.59Ser>Phe protein. Similarly, both 160T>C and 161T>C contributed to the implementation of a missense effect of p.61Phe>Pro on the glycoprotein B variable region. The third variant 177T>G exhibited a silent effect of p.65Gly= on the encoded glycoprotein. The p.59Ser>Phe mutation involves the conversion of polar uncharged serine to hydrophobic phenylalanine at position 59. This change is expected to significantly alter the 3D structure of the protein, affecting folding stability and interactions with the host receptor. Similarly, the p.61Phe>Pro mutation can convert hydrophobic phenylalanine to cyclic and rigid proline at position 61, leading to expected structural changes including kinks and folds potentially affecting overall folding and stability.

2024, 131 pages

Keywords: HCMV, hcmv-microRNAs, CMV DNA, Gene expression, Real Time PCR, CMV genotyping

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT’a sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Ali Nadhim Shndiwe KHIKANI

Çankırı, Aralık 2024



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1 Çalışmanın Amacı.....	3
1.2 Çalışmanın Hedefleri	3
2. LİTERATÜR İNCELEMESİ	5
2.1 Sitomegalovirüse (CMV) Genel Bakış	5
2.2 Sitomegalovirüs CMV'nin Tarihçesi.....	7
2.3 Sınıflandırma HCMV	8
2.4 HCMV'nin Yapısı ve Genomu	8
2.4.1 HCMV Kapsidi.....	9
2.4.2 HCMV Tegumenti.....	10
2.4.3 HCMV Zarfı	10
2.5 CMV'nin Çoğalma Döngüsü	11
2.6 CMV Patogenezi.....	13
2.7 Konjenital Enfekte Hastalarda Sitomegalovirüsün Klinik Belirtileri	14
2.8 CMV Epidemiyolojisi	16
2.9 HCMV Tanısı ve Virolojik Yöntemler.....	17
2.10 HCMV için Latentlik ve Reaktivasyon Mekanizmaları.....	18
2.11 Konjenital Enfekte Hastalar (cCMV)	19
2.12 HCMV'nin Önlenmesi	20
2.14 HCMV MikroRNA'ları	22
2.15 HCMV-miRNA'larının Biyogenezi	23
2.16 HCMV Genomu ve HCMV miRNA'larının Genomdaki Dağılımı	24

2.17 miRNA'lar ve Viral Enfeksiyonlar	25
2.18 Viral miRNA'lar.....	25
2.19 HCMV Tarafından Kodlanan miRNA'lar ve Viral DNA Replikasyonundaki Rollerini.....	26
2.20 hcmv-mir-UL148D.....	27
2.21 hcmv-mir-UL36-3P/5P.....	28
2.22 hcmv-mir-UL22A-3P	28
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1 Materyal.....	30
3.1.1 Örnekler.....	30
3.1.2 Laboratuvar ekipmanı	32
3.1.3 Ticari kitler ve kimyasal malzemeler.....	33
3.2 Yöntem	33
3.2.2 Kan örneğinden genomik DNA ekstraksiyonu	37
3.2.3 DNA saflığının ve konsantrasyonunun tahmini.....	38
3.2.4 Real Time-PCR ile CMV viral yük tayini	38
3.2.5 Primerlerin sulandırılması ve seyreltilmesi	40
3.2.6 PCR optimizasyonu	40
3.2.7 Agaroz jel elektroforezi	41
3.2.8 RNA ekstraksiyonu.....	42
3.2.11 qPCR (kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu)	46
3.2.13 Nükleotid dizileme reaksiyonu ve analizler	49
3.2.14 İstatistiksel Analiz	50
4. BULGULAR.....	52
4.1 Düşük Yapan Kadınlar Arasında CMV'nin Görülme Sıklığı	52
4.2 Düşük yapan Kadınlarda CMV IgM ve IgG Sonuçları	52
4.3 Düşük Yapan Kadınların Düşük Yaptığı Aya ve Yaş Gruplarına Göre Dağılımı	57
4.4 Real Time-PCR ile CMV için Viral Yük Sonuçları	58
4.5 Mikro RNA'ların Gen İfadesi	59
4.5.1 Çalışma gruplarında miR-UL36-5P geninin ifadesi.....	60
4.5.2 Çalışma gruplarında miR-UL36-3P geninin ifadesi.....	61
4.5.3 Çalışma gruplarında miR-UL22A-3P geninin ifadesi	62

4.5.4 Çalışma Gruplarında miR-UL148D Geninin İfadesi	63
4.6 CMV Antikoru ve Viral Yük ile Tüm MikroRNA Türleri Arasındaki Korelasyon Katsayısı (Pearson r korelasyon matrisi)	65
4.7 CMV IgM ve IgG için Özgüllük ve Duyarlılık	67
4.8 Mikro RNA Tipleri ve CMV Viral Yükünün Özgüllüğü ve Duyarlılığı	67
4.9 Nükleotid Dizileme Sonuçları	69
5 TARTIŞMA VE SONUÇ	84
5.1 Düşük Yapan Kadınlarda CMV Seroprevalans Sonuçları	84
5.3 CMV IgM ve IgG Pozitif Olan Düşük Yapan Kadınların Yaş Gruplarına Göre Dağılımı	86
5.4 Düşük Yapan Kadınlarda Pozitif CMV IgM ve IgG Sonuçları ve Fetal Yaş..	87
5.5 CMV IgM ve IgG Pozitif Olan Düşük Yapan Kadınların İkamet Ettikleri Bölgelere Göre Dağılımı	88
5.6 Düşük Yapan Kadınlarda mikroRNA Ekspresyon Profili ve Sitomegalovirüs (HCMV) Enfeksiyonu ile İlişkisi	89
5.6.1 hcmv-miRUL36-5P	91
5.6.2 hcmv-miRUL36-3P	92
5.6.3 hcmv-miRUL22A-3P	93
5.6.4 hcmv-miRUL148D	95
5.7 qPCR Tabanlı Test ile CMV Viral Yük Ölçümü	97
5.8 CMV DNA Dizilemesi	99
KAYNAKLAR	104
EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER DİZİNİ

-	Çıkarma
%	Yüzde
()	Parantezler
/	Eğik Çizgi
:	Kolon
+	Artı
=	Eşit
>	Daha büyük
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
nm	Nanometre
°C	Santigrat
α	Alfa
β	Beta
Mg	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ mol	Mikromol

KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS	Edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromu
AUC	Eğri altında kalan alan
Bp	Baz çifti
cCMV	Konjenital sitomegalovirüs
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit
CID	Sitomegalik inklüzyon hastalığı
CMV	Sitomegalovirüs
CN	Kontrol negatif
Ct	Çevrim eşiği
DdH ₂ O	Çift damıtılmış su
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
gB	Glikoprotein
gCI, gCII, and gCIII	Glikoprotein kompleksi I,II,III
gm	Gram
GP155	Glikoprotein 155
HCMV	İnsan sitomegalovirüs
HHV-1,2	Herpes simpleks virüsü
HHV-3	Varicella-Zoster virüsü
HHV-4	Epstein Barr virüsü
HIG	Hiperimmün globulin
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
IE	Ani erken
IFN- γ	İnterferon gama
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
IL-10	İnterlökin-10
IRL	Dahili ters çevrilmiş tekrarlar
IRS	İç tekrar dizileri
IU	Uluslararası Birim
IUGR	İntrauterin büyüme kısıtlaması
kb	Kilobayt
MCPs	Ana kapsid proteinleri
MRI	Manyetik rezonans
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ORFs	Açık okuma çerçeveleri
PC	Kontrol pozitif
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu

qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
SCPs	En küçük kapsid proteinleri
SNHL	Sensörinöral işitme kaybı
TAE	Tris-asetat-EDTA
TRL	Terminal ters çevrilmiş tekrarlar
UL	Benzersiz uzun
US	Benzersiz kısa
US	Ultrason
USTLP	Evrensel kök ilmek primeri



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Sitomegalovirüs yapısı (Makker vd. 2016).....	9
Şekil 2.2 Sitomegalovirüsün yaşam döngüsü (Crough ve Khanna 2009).....	13
Şekil 2.3 Dünya genelinde insanlarda 2005'ten 2015'e kadar olan ve 16 ila 50 yaş arasındaki kişileri inceleyen çalışmalar dahil HCMV seroprevalans oranları (Adland vd. 2015).....	17
Şekil 2.4 miRNA biyogenezi Hcmv-miRNA (Yu vd. 2022).....	24
Şekil 2.5 HCMV genomu ve HCMV miRNA'larının genomik dağılımı (Zhang vd. 2020).....	25
Şekil 3.1 Bu çalışmanın tasarımı.....	31
Şekil 3.2 M: DNA merdiveni, 1-10: PCR ürünleri (bant boyutu 418 bp).....	42
Şekil 4.1 Düşük yapan kadınlar arasında CMV prevalansı (*:Anlamlı ($P<0.05$)).....	52
Şekil 4.2 Düşük yapan kadınlarda pozitif CMV IgM ve IgG sonuçları (*:Anlamlı ($P<0.05$); **: anlamlı ($P<0.01$)).....	53
Şekil 4.3 Çalışma gruplarındaki ortalama CMV IgM düzeyleri (NS: Anlamlı Değil) ...	54
Şekil 4.4 Çalışma gruplarında ortalama CMV IgG düzeyleri.....	56
Şekil 4.5 Viral yük CMV için standart eğri RT-PCR	58
Şekil 4.6 Çalışma gruplarında CMV viral yük konsantrasyonu	59
Şekil 4.7 A: U6'nın gerçek zamanlı pcr analizinde eşik döngüsü (Ct) değerleri, B: RT-PCR'de U6'nın erime eğrisi	59
Şekil 4.8 A: miR-UL36-5P'nin Gerçek Zamanlı PCR Analizinde Eşik Döngüsü (Ct) değerleri, B: miR-UL36-5P'nin RT-PCR'da Erime Eğrisi	60
Şekil 4.9 A: miR-UL36-3P'nin Gerçek Zamanlı PCR Analizinde Eşik Döngüsü (Ct) değerleri, B: miR-UL36-3P'nin RT-PCR'da Erime Eğrisi	61
Şekil 4.10 A: miR-UL22A-3P'nin Gerçek Zamanlı PCR Analizinde Eşik Döngüsü (Ct) değerleri, B: miR-UL22A-3P'nin RT-PCR'da Erime Eğrisi	62
Şekil 4.11 A: miR- miR-UL148D'nin gerçek zamanlı PCR analizinde eşik döngüsü (Ct) değerleri, B: miR-UL148D'nin RT-PCR'de erime eğrisi	64
Şekil 4.12 Korelasyon katsayısı (Grup 1'in Pearson r korelasyon matrisi Mavi renk $r>0$, pozitif korelasyon, kırmızı renk $p<0$, negatif) CMV antikoru ile Viral yük ve tüm Mikro RNA türleri arasında	66
Şekil 4.13 CMV antikoru IgM ve IgG için ROC eğrisi analizi (Wilson/Brown yöntemi) Duyarlılık% ve 1-Özgüllük%. $p<0,05$ Düşük yapan kadınlarda	67
Şekil 4.14 ROC eğrisi analizi (Wilson/Brown yöntemi) MikroRNA'lar (hcmv-Mir-UL36-5P, hcmv-Mir-UL36-3P, hcmv-Mir-UL22A-3P, hcmv-Mir-UL148D) için % Duyarlılık ve %1-Özgüllük, Düşük yapan kadınlarda $p<0,05$	68
Şekil 4.15 Çalışmada çoğaltılan araştırılmış örneklerin tam konumu. Bu konum HCMV5 içindeki GP55 gen dizilerinin bir kısmını kapsamaktadır	69
Şekil 4.16 B1 varyantı için siyah oklarla nükleik asit polimorfizminin tespit edildiği yerler gösterilmiştir	74

Şekil 4.17 B3 varyantı için, siyah oklarla nükleik asit polimorfizminin tespit edildiği yerler gösterilmiştir	75
Şekil 4.18 B4 varyantı için, siyah oklarla nükleik asit polimorfizminin tespit edildiği yerler gösterilmiştir	76
Şekil 4.19 59. ve 61. pozisyonlarında Ser ve Phe bulunan vahşi tip HCMV glikoproteininin (dal A), 59. pozisyonunda Phe bulunan mutant HCMV glikoproteininin (dal B) ve 61. pozisyonunda Pro bulunan mutant HCMV glikoproteininin (dal C) 3D yapı gösterimi	79
Şekil 4.20 Dört HCMV5 örneği için GP55 fragmanlarının kapsamlı dikdörtgen kladogram filogenetik ağacı. Siyah renkli üçgen analiz edilen viral dizileri ifade ederken, kareler ve daireler sırasıyla HCMV5 suşlarını ve izolatlarını temsil etmektedir. Belirtilen tüm numaralar, atıfta bulunulan her türün GenBank erişim numarasına atıfta bulunmaktadır. Ağacın üst kısmındaki sayılar, ağaçta kategorize edilen kapsamlı organizmalar arasındaki ölçek aralığının derecesini ifade etmektedir.....	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Sitomegalovirüsün sınıflandırılması (Roizman vd. 1981).....	8
Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan laboratuvar cihazlarının listesi	32
Çizelge 3.2 Bu çalışmada kullanılan cam eşyalar ve plastik ekipmanlar	32
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ticari kitler	33
Çizelge 3.4 Kimyasal malzemeler.....	33
Çizelge 3.5 Bu çalışmada kullanılan primerlerin dizilimi	40
Çizelge 3.6 Her optimizasyon süreci için başlangıç PCR reaksiyon bileşenleri konsantrasyonu.....	41
Çizelge 3.7 Isısal döngü koşulları	41
Çizelge 3.8 QuantiFluor® RNA Sistemi kitinin bileşenleri	44
Çizelge 3.9 cDNA için reaksiyon bileşenleri	45
Çizelge 3.10 cDNA için ısısal döngü koşulları.....	46
Çizelge 3.11 MikroRNA dizilerinin eldesi için kullanılan primerler	48
Çizelge 3.12 Her optimizasyon süreci için başlangıç PCR reaksiyon bileşenleri konsantrasyonu.....	48
Çizelge 3.13 MikroRNA'ları tespit etmek için optimum ısısal döngü koşulları.....	48
Çizelge 4.1 Çalışma gruplarının CMV-IgM pozitifliğine göre dağılımı.	53
Çizelge 4.2 CMV IgM pozitif olan kadınlarda yaş gruplarına göre dağılım	54
Çizelge 4.3 CMV IgM'si pozitif olan Düşük yapan kadınların ikamet yerine göre dağılımı.....	55
Çizelge 4.4 Çalışma gruplarının pozitif CMV-IgG'ye göre dağılımı.....	55
Çizelge 4.5 CMV IgG'si pozitif olan Düşük yapan kadınların yaş gruplarına göre dağılımı.....	56
Çizelge 4.6 CMV IgG pozitif olan Düşük yapan kadınların ikamet yerine göre dağılımı	57
Çizelge 4.7 Düşük yapan kadınların düşük yaptıkları aylara ve yaş gruplarına göre dağılımı.....	58
Çizelge 4.8 Düşük yapan kadın grubu ile kontrol grubu arasında karşılaştırılan hcmv- mir-UL36-5P ekspresyon seviyesi	61
Çizelge 4.9 Hasta grubu ile kontrol grubu arasında karşılaştırılan hcmv-mir-UL36-3P ekspresyon seviyesi	62
Çizelge 4.10 hcmv-mir-UL22A-3P ekspresyon seviyesi düşük yapan kadınlar ve kontrol grubu arasında karşılaştırma.....	63
Çizelge 4.11 hcmv-mir-UL148D ekspresyon düzeyi düşük yapan kadınlar ve kontrol grubu arasında karşılaştırma.....	64
Çizelge 4.12 Tüm miRNA tipleri (Mir-UL22A-3P, Mir-UL36-3p, Mir-UL36-5p, Mir- UL148D) ile CMV IgM, IgG ve CMV Viral yükünün Pearson korelasyon matrisinin P. Değeri.....	66

Çizelge 4.13 Duyarlılık, Özgüllük, %95 güven aralığı, Alan (Ortalama±SE) ve olasılık ile verilen Düşük yapan kadınların ROC eğrisi analizi.....	68
Çizelge 4.14 HCMV5 virüsü genomik dizileri (GenBank acc. no. U88704.1) içinde G55 geninin kodlama dizilerinin bir kısmını çoğaltmak için kullanılan 418 bp PCR ampikonlarının konumu ve uzunluğu	70
Çizelge 4.15 Dört HCMV örneğinin karşılık gelen referans dizileri ile nükleik asit dizisi hizalaması (GenBank acc. no. U88704.1). "ref" sembolü NCBI referans dizisini ifade etmektedir. "B" harfi incelenen örnekleri ifade etmektedir.....	1
Çizelge 4.16 Glikoprotein B değişken bölgesinin çoğaltılmış bölgelerinde (dal A) ve tüm proteinde (dal B) tespit edilen varyasyonların amino asit kalıntıları hizalaması. Gri vurgular, amino asit kalıntılarının çoğaltılmış bölgesini ifade etmektedir. Camgöbeği ve sarı renkler sırasıyla tüm protein dizisi üzerindeki amino asit yanlış ve sessiz etkisini ifade eder	77
Çizelge 4.17 Şu anda oluşturulan filogenetik ağaçtaki HCMV-5 dizilerine dahil edilen organizmaların ayrıntıları.....	82

1. GİRİŞ

İnsan sitomegalovirüsü (HCMV), *Orthoherpesviridae* ailesine dahil bir virüstür ve küresel olarak en yaygın insan enfeksiyon etkenlerinden birisidir (Gelemanović vd. 2016). CMV, çift sarmallı DNA'dan oluşan bir genoma sahiptir ve bireyin yaşamı boyunca devam eden gizli bir enfeksiyon oluşturma yeteneğine sahiptir, virüsün periyodik reaktivasyonları enfekte bireyin yaşam süresi boyunca meydana gelir. CMV, 250 nm çapında ve 150'den fazla proteini kodlayan bir genoma sahiptir. Genom, her bir segmentin terminal tekrarlarla çevrili olduğu farklı uzun ve kısa segmentlere bölünmüştür (Martí-Carreras ve Maes 2019). HCMV yaygın bir beta herpesvirüstür ve enfeksiyon, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde mononükleozdan semptomatolojinin düzenlenmesine yol açabilir. HCMV ayrıca konjenital doğum kusurlarının önde gelen viral nedenidir. Litik replikasyon, çok sayıda patolojiye yol açan farklı kinetiğe ve etkinliğe sahip birçok hücre tipi tarafından desteklenmektedir (Mokry vd. 2024).

CMV bulaştıktan ve birincil enfeksiyon temizlendikten sonra virüs miyeloid hücrelerde uykuda bekler. Replikasyon ve reaktivasyon öncelikle sitotoksik T-hücre bağışıklığı ile gerçekleşir. Bununla birlikte, reaktivasyon meydana geldiğinde, virionlar kan dolaşımına ve diğer vücut sıvılarına salınır ve ağırlıklı olarak bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda semptomların ortaya çıkmasına neden olur (Nosotti vd. 2018, Faith vd. 2018). Enfeksiyon birincil enfeksiyon, yeniden enfeksiyon veya reaktivasyon olarak ortaya çıkabilir. CMV'nin bulaşması çeşitli şekillerde gerçekleşebilir: kan ürünleri (transfüzyonlar, organ nakli), emzirme, yakın temas ortamlarında viral dökülme, perinatal ve cinsel yolla bulaşma. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda reaktivasyon görülür ve bu durum yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (Bartlett vd. 2018, Zheng vd. 2019).

Konjenital CMV viral enfeksiyonu, dünyadaki tüm canlı doğumlar arasında yaklaşık %0,5 ila %2'lik bir prevalans oranı göstermektedir (Hamilton vd. 2014, Zammarchi vd. 2023) Sekellerin önde gelen nedenleri arasındadır ve konjenital sensörinöral işitme kaybı vakalarının %25'inden, serebral palsi vakalarının %10'undan ve ciddi nörolojik

anormalliklerden, görme kaybından ve büyüme geriliğinden sorumludur (Kenneson ve Cannon 2007). Konjenital CMV enfeksiyonu en yaygın konjenital enfeksiyondur ve erken çocukluk döneminde sensörinöral işitme kaybının ve zeka geriliğinin başlıca nedenidir (Barber vd. 2020).

CMV seroprevalansının düşük olduğu bölgelerde yaşayan seronegatif kadınlarda enfeksiyon oranı %1-3 olabilir, ancak bu vakalarda plasental geçiş %30-50'dir (Coppola vd. 2019). Genellikle hamilelik sırasında annede aktif bir viral durumun neden olduğu konjenital CMV enfeksiyonları, plasentadan fetüse geçebilir (Cannon vd. 2010). Konjenital enfeksiyonlarla doğan bebeklerin çoğu asemptomatikken, yaklaşık %5-10'u semptomatiktir (Navti vd. 2021). Komplikasyonlar bazen semptomatik bebeklerde erken ölüme yol açar (%4), ancak tipik olarak nörolojik kusurlarla sonuçlanır (Manicklal vd. 2013). İn-utero (transplasental olarak) veya doğum sırasında bulaşan bu enfeksiyonların etkileri, enfeksiyonların zamanlamasına bağlıdır. Bunlar abortus (genellikle gebeliğin çok erken dönemindeki enfeksiyonlarda), konjenital malformasyonlar (enfeksiyonların organogenez sırasında ortaya çıktığı durumlarda) ve morbidite (gebeliğin geç dönemlerinde, doğum sırasında veya doğumdan sonra ortaya çıkan enfeksiyonlarda) arasında değişmektedir (Al Baloushi vd. 2024). Perikonsepsiyonel dönemde ve gebeliğin ilk üç ayında serokonversiyon gösteren hamile kadınların yüksek doz Val asiklovir (8 g/gün) ile tedavisine ilişkin umut verici çalışmalar, seroloji ve tedavi yoluyla doğum öncesi bakımda hastalığa ilişkin aktif araştırma kılavuzlarını değiştirmiştir (Zammarchi vd. 2023).

HCMV tarafından kodlanan mikroRNA'lar (hcmv-miRNA'lar), çok sayıda hücresel geni hedef alan ve virüsün konağın sinyal yollarını modüle etmesine izin vererek viral replikasyonu destekleyen, kodlamayan ve immünojenik olmayan moleküllerdir. Çeşitli fizyolojik süreçlerde yer alarak insan genlerini susturma kapasiteleri göz önüne alındığında, bu hcmv-miRNA'lar potansiyel bir klinik biyobelirteç olarak da önem kazanmıştır (Fernández-Moreno vd. 2021). Viral miRNA'lar konakçıların ömür boyu enfekte edebilir ve hastalık belirtileri göstermeden uykuda kalabilir. Bu miRNA'lar, virüsün latensi ve reaktivasyonunun yanı sıra enfekte hücrelerin bağışıklıktan kaçınması, hayatta kalması ve çoğalması için çok önemli olan viral ve/veya konak genlerin

ekspresyonunu kontrol etmek için viral proteinlerle birlikte çalışmaktadır (Li vd. 2011, Bernier ve Sagan 2018). Mir-RNA148D'nin konak hücrelerde hücrel reseptör ACVR1B'nin (aktif reseptör tip-1B) hedeflenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir, bu da HCMV'nin latentlik başarısını sağlar. miR-UL148D, latent enfeksiyon sırasında gözlemlenen en yaygın ifade edilen viral miRNA'lardan birisidir; hem latent olarak enfekte olmuş monositler hem de CD34 + hücreleri bu miRNA'yı ifade etmektedir (Lau vd. 2016a). miR-UL36-5P ve miR-UL36-3P'nin aşırı ekspresyonu HCMV DNA sentezinde artışa neden olur (Huang vd. 2013). miR-UL22A, immün modülasyonda önemli bir düzenleyici rol oynamaktadır. CMV bağlamında, belirli konakçı bağışıklık faktörlerini inhibe edebilir ve viral kalıcılığı teşvik edebilir (Hancock vd. 2020). Yine, bu miRNA'nın konakçı tarafından kodlanıp kodlanmadığı veya viral bir miRNA olup olmadığını açıklığa kavuşturmak önemlidir. Konakçı tarafından kodlanan miRNA'lar viral genleri hedefleyebilir ve viral replikasyonu inhibe edebilir. Bunu yaparken, konağın antiviral savunmasına katkıda bulunurlar (Picarda ve Benedict 2018, Yu vd. 2022).

1.1 Çalışmanın Amacı

Çalışmanın amacı, düşük yapan kadınlarda HCMV-MikroRNA'larının gen ekspresyonunu kontrol grubuna kıyasla ölçmek ve HCMV-MikroRNA'larının gen ekspresyonu ile düşük oluşumu arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemektir.

1.2 Çalışmanın Hedefleri

- 1- VIDAS teknolojisini kullanarak serolojik testler CMV IgM ve CMV IgG ile serumdaki antikor seviyesini ölçerek düşük yapan kadınlara HCMV tanısı koymak.
- 2- Düşük yapan kadınlar ve kontrol grubu için CMV viral yükünün RT-PCR ile ölçülmesi.
- 3- Düşük yapan kadınlarda kontrol grubuna kıyasla HCMV-MikroRNA'lar (Mir-UL148D, Mir-UL36-3P, Mir-UL36-5P, Mir-UL22A-3P) için gen ekspresyonunun (kat değişimi) RT-PCR ile ölçülmesi ve her genin dizilenmesi

için spesifik yeni primerler tasarlanması. Düşük yapan kadınlarda genlerin rolünün araştırılması.

- 4- CMV DNA'sının dizilenerek CMV nükleotid dizilerinin belirlenmesi, genetik mutasyonların tanımlanması, filogenetik ağaç oluşturulması, protein dizilerinin belirlenmesi ve izolatların NCBI'ya kaydedilmesi.



2. LİTERATÜR İNCELEMESİ

2.1 Sitomegalovirüse (CMV) Genel Bakış

Sitomegalovirüs (CMV), herpesvirüs ailesinin diğer üyeleri gibi, birincil enfeksiyondan sonra ömür boyu süren bir latens dönemi oluşturan ve monositler ile granülositlerde latent hale gelen zarflı bir DNA virüsüdür (Kenneson ve Cannon 2007). CMV enfeksiyonu, kontamine vücut salgılarıyla (idrar, tükürük, genital salgılar ve anne sütü gibi) temas yoluyla bulaşır ve genellikle bağışıklığı güçlü bireylerde az sayıda belirtiyeye neden olur, ancak fetüsler de dahil olmak üzere bağışıklığı baskılanmış bireylerde ciddi hasara neden olabilir (Zuhair vd. 2019).

CMV gebelik prognozu, ilk 20-21 haftadan sonra amniyotik sıvı örneklerinde virüs DNA'sının tespitine göre belirlenebilir (Carlson vd. 2010). Enfeksiyonun devamlılığı için plasental bulaşma gereklidir, ancak CMV doğumda serviks yoluyla veya doğum sonrası anne sütü yoluyla da yayılabilir. Semptomları olan bebekler, semptomları olmayanlara kıyasla daha yüksek komplikasyon riski altındadır (Pass vd. 2006).

CMV, enfekte olmuş hücrenin genişlemesine (sitomegali) ve farklı inklüzyon cisimciklerinin oluşumuna neden olma kabiliyetine dayanarak adlandırılmıştır (Blut 2010). Birincil enfeksiyondan sonra insan sitomegalovirüsü, konakçıda ömür boyu süren bir latentlik ve ara sıra reaktivasyonlarla karakterize edilir (Gelemanović vd. 2016). Birincil HCMV enfeksiyonu, sağlığı yerinde olan kişilerde genellikle asemptomatiktir ve bunu kalıcı bir enfeksiyon takip eder. HCMV, bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda çoklu organ hastalığının önemli bir nedenidir ve aynı zamanda konjenital enfeksiyonun birincil kaynağıdır (Paradowska vd. 2016).

Sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu her yaştan insanı etkileyebilen yaygın bir hastalıktır, CMV enfeksiyonlarının çoğu hafiftir ve kendiliğinden düzelir, ancak organ nakli sonrası hastalar veya kanserli kişiler gibi bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde ciddi enfeksiyonlar ortaya çıkabilir (Rinaldi vd. 2023). Konjenital sitomegalovirüs

(cCMV) enfeksiyonu bebeklerde merkezi sinir sistemine zarar verebilir (Torii vd. 2023). Hamilelik sırasında konjenital sitomegalovirüs (cCMV) enfeksiyonu fetal ve neonatal morbidite ve mortalite için önemli bir risk faktörüdür, yavruda CMV tespiti geleneksel ultrason (US) ve MRI (manyetik rezonans) yaklaşımına dayanmaktadır (Rybak-Krzyszowska vd. 2023). İnsan sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu, gelişmiş ülkelerde konjenital malformasyonun önde gelen genetik olmayan etiyolojisidir ve önemli fetal nörolojik hasara neden olur (Egilmezer vd. 2024). Tekrarlayan enfeksiyon, uykuda olan (latent) bir virüs tekrar aktif hale geldiğinde (endojen) veya yeni bir enfeksiyon edinildiğinde (eksojen) ortaya çıkabilir, CMV'ye özgü antikorların kan ürünlerinin kullanımı veya immün globulin infüzyonu yoluyla pasif olarak verilebileceği kabul edilmektedir (Ljungman vd. 2016). Sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu dünya çapında en yaygın konjenital enfeksiyon olup, tüm canlı doğumların %0,7 ila %1'ini etkilemektedir. Enfekte yenidoğanların yaklaşık %11'i doğumda semptomatiktir ve bunların %30 ila %40'ı uzun vadeli nörolojik sekel geliştirme riski altındadır (Pontes vd. 2024).

Sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonu, her yaştan insanı etkileyen yaygın ve potansiyel olarak ciddi bir viral durumdur, ancak hamilelik sırasında bulaştığında özellikle endişe verici olabilir çünkü bu durumda enfeksiyonun ana komplikasyonları nörolojik bozukluk ve sensörinöral işitme kaybıdır (SNHL) (Sartori vd. 2023). Enfeksiyon, virüsün enfekte anneden transplasental yolla, doğum sırasında ve sonrasında bulaşması sonucu ortaya çıkar; fetal enfeksiyon, primer maternal enfeksiyondan sonra veya daha önce aşılanmış bir hamile kadında virüsün yeniden enfeksiyonu veya yeniden aktivasyonu sonrasında ortaya çıkabilir (Simonazzi vd. 2017). İntrauterin enfeksiyon en yüksek ciddi nörolojik komplikasyon riskine sahiptir, %90 enfeksiyon asemptomatik olabilir ve yaklaşık %10 bebek IUGR, ventriküler dilatasyon veya asimetri, kalsifikasyonlar, mikrosefali, hepatosplenomegali ve koryoretinit gibi semptomlar gösterebilir (Novelli vd. 2022).

CMV'nin replikasyonu karmaşıktır ve üç grup viral transkriptin senkronize ve ardışık ekspresyonunu gerektirir. Latentliğin başlatılması ve virüsün reaktivasyonu da dahil olmak üzere viral genlerin ekspresyonu, virüs tarafından kodlanan proteinler ile konakçıdaki hücreler ve transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşimler tarafından

kontrol edilir. CMV'nin replikasyon döngüsü zamansal olarak üç kontrollü faza ayrılır: Ani erken (IE) faz, erken faz ve geç faz. Ani erken (IE) mRNA konak hücreyi enfekte ettikten kısa bir süre sonra, genellikle birkaç saat içinde transkribe edilir, IE mRNA, kapsamlı uç birleştirme (splicing) nedeniyle birçok formda olan IE proteinlerini üretir, bu proteinler hem konak hem de viral genlerin ekspresyonunu düzenleme yeteneğine sahiptir (Cheng vd. 2017).

2.2 Sitomegalovirüs CMV'nin Tarihçesi

1881 yılında Ribbert (Ribbert 1904) tarafından, frengili ölü doğmuş bir bebeğin böbrek kesitlerinde ve gençlerin parotis bezinde genişlemiş hücrelerin varlığının gözlemlendiği bildirilmiştir. Ribbert'in grubundaki araştırmacılara göre, otuz yeni doğandan dördünün parotis bezlerinde bu hücreler bulunmaktadır ve bunlar yaygın intranükleer inklüzyon içeren sitomegalik hücrelerin ilk tanımları gibi görünmektedir (Lipschütz 1921, VonGlahn ve Pappenheimer 1925). Araştırmacılar, herpes zoster ve herpes genitalis hastası bireylerin lezyonlarında intranükleer inklüzyon içeren hücreler bulmuşlardır. Bu nedenle, bu atipik hücrelerin virüsler tarafından oluşturulduğuna inanmışlar ve protozoalar ile bağlantılarını sorgulamışlardır. Bu bulgular, intranükleer inklüzyonlu hücrelerin *Herpesviridae* olarak bilinen bir virüs ailesi ile ilişkili olabileceğine dair ilk ipucu olarak bildirilmiştir (Farber ve Wolbach 1932). Çeşitli nedenlerle postmortem olarak değerlendirilen 183 çocuktan 26'sının tükürük bezlerinde inklüzyonlara sahip hücreler keşfedildiği, bunun CMV enfeksiyonunun oldukça yaygın olduğu gerçeğinin ilk tahmini olduğu, 1932 yılına kadar peteşi, hepatosplenomegali ve intraserebral kalsifikasyon varlığı ile karakterize edilen nadir ve ölümcül bir konjenital hastalığın toplam 25 vakasının belgelendiği ve bunların her birinde karakteristik intranükleer inklüzyonlar sergileyen hücreler olduğu bildirilmiştir (Wyatt vd. 1950). Viral neden hakkında bilgi eksikliğine rağmen "genelleştirilmiş sitomegalik inklüzyon hastalığı (CID)" terimi önerilmiştir ve böbrek tübülleri tutarlı bir şekilde etkilenen tek hücreler olup durumu yaşayan bireylerde inklüzyon içeren hücreler için idrar sedimentlerini inceleyerek tanımlama yapılabileceği önerilmiştir (Fetterman 1952). Şüpheli bir vakanın idrar sedimentinden sitolojik bir örnek oluşturulmuş ve CID'nin ilk intravitreal tanısı elde edilmiştir. Elektron mikroskopisi, bir CID vakasında pankreas hücrelerinin intranükleer

inklüzyonunu çevreleyen şeffaf alanda virüs gibi 199 nm'lik partiküllerin varlığını ortaya çıkarmış, insan CMV'si insan hücreleri düzenli olarak kültüre edilene kadar kültüre edilememiştir (Enders vd. 1949).

2.3 Sınıflandırma HCMV

İnsan sitomegalovirüsü (CMV) çift sarmallı bir DNA virüsü ailesi olan *Orthoherpesviridae* ailesi içinde sınıflandırılmaktadır (Demmler-Harrison 2019). ICTV (2024) taksonomide en güncel olarak *Cytomegalovirus humanbeta5* ismi verilmiştir (Esquivel-Fariña vd. 2024). Tükürük bezlerini enfekte etmeyi tercih etmesi, hücre kültürlerinde yavaş çoğalması ve diğer hayvan türlerini enfekte etme yeteneğinin sınırlı olması nedeniyle *Betaherpesviridae* alt ailesine dahil edilmiştir (Çizelge 2.1). İnsan sitomegalovirüsün adı, virüsün enfekte hücrelerin büyümesine neden olmasından ileri gelmektedir (cyto=hücre, mega=büyük). *Orthoherpesviridae* ailesinin, *Betaherpesvirinae* alt ailesinde, *Cytomegalovirus* cinsinde yer almaktadır. İlk olarak 1956 yılında izole edilmiştir. Terim, enfekte hücrenin genişlemesine (sitomegali) ve ayırt edici inklüzyon cisimciklerinin oluşumuna neden olma kabiliyetinden türetilmiştir. Kan dolaşımı içinde çoğunlukla granülositler ve makrofajlarla ilişkili olarak bulunmaktadır (Schottstedt vd. 2010).

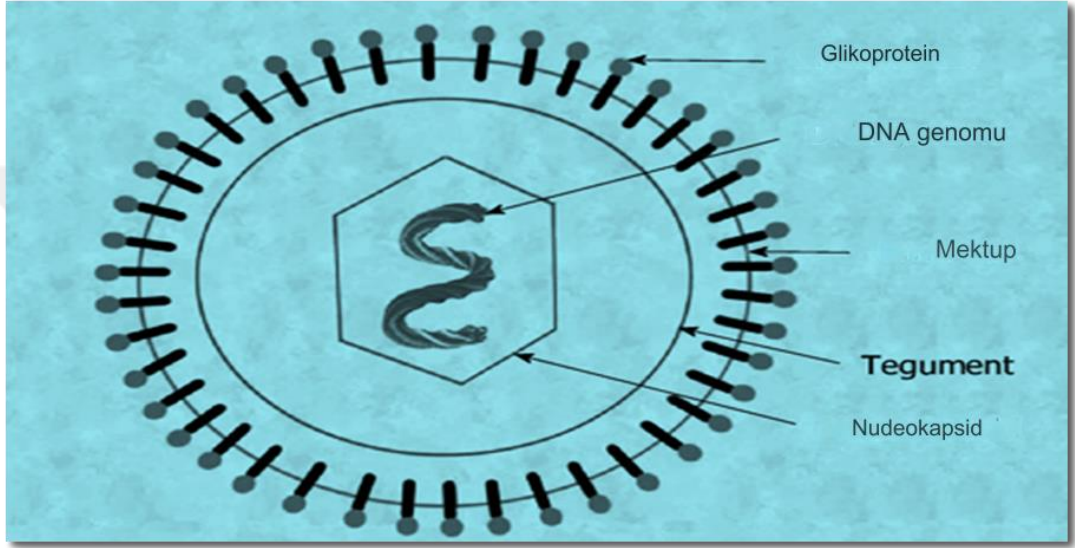
Çizelge 2.1 Sitomegalovirüsün sınıflandırılması (Roizman vd.1981)

Grup	Grup 1 (ds DNA)
Aile	Herpesviridae
Alt aile	Betaherpesviridae
Cins	Sitomegalovirüs

2.4 HCMV'nin Yapısı ve Genomu

İnsan sitomegalovirüs (HCMV) glikoprotein B (gB), viral giriş için gerekli olan bir sınıf III membran füzyon proteinidir (Sponholtz vd. 2024). İnsan sitomegalovirüsü (HCMV) karmaşık bir yapıya sahiptir (Kowalik 2014). Olgun viral partikül 150-200 nm çapındadır. Herhangi bir insan virüsünün en büyüğü olan genomu yaklaşık 235 kb boyutundadır ve

masif, doğrusal, çift sarmallı DNA'dır (Plosa vd. 2012). CMV virüsü ikozahedral bir morfolojiye sahiptir ve zarflıdır (Makker vd. 2016). DNA genomu, ikozahedral bir şekle sahip bir protein kapsidinin içinde bulunur, bu kapsid daha sonra tegument adı verilen bir protein tabakası ile çevrelenir ve son olarak bir lipid zarf bulunur (Şekil 2.1). CMV viral zarfı hücresel membranlardan elde edilir, yaklaşık sekiz farklı viral glikoprotein lipid çift katmanına entegre edilmiştir (Johnson ve Baines 2011).



Şekil 2.1 Sitomegalovirüs yapısı (Makker vd. 2016)

CMV genomu, iç tekrar dizileri (IRS) tarafından benzersiz uzun (UL) bölge ve benzersiz kısa bölge (US) olarak bilinen iki farklı bölgeye bölünmüştür (Plosa vd. 2012). Sitomegalovirüsün (CMV) 166'dan fazla olan genleri, bulundukları genomun spesifik bölgesine karşılık gelen bir ön ek ile belirtilmiştir, ayrıca HCMV virionunun, büyük olasılıkla tegument tabakasında bulunan yaklaşık 70 hücresel protein içerdiği gösterilmiştir, bu hücresel tegument proteinlerinin spesifik işlevleri tam olarak araştırılmamıştır. Buna ek olarak, hem viral hem de hücresel RNA'lar virionların ve yoğun cisimlerin içinde, büyük olasılıkla tegument tabakasında bulunmaktadır (Kalejta 2008)

2.4.1 HCMV Kapsidi

Viral kapsid, genomu çevreleyen bir katman sağlar. T üçgenleme sayısı 16 olan ve 60 asimetric birim içeren ikozahedral bir yapıdır (Chen vd. 1999, Wang ve Zhao 2020). Her birimde 16 büyük kapsid proteini (MCP'ler), 16 en küçük kapsid proteini (SCP'ler), 5 tripleks (Ta, Tb, Tc, Td ve Te) ve 1/3 Tfs bulunur. Beş ya da altı MCP bir penton ya da hekzon oluşturur ve bu sonuncusu farklı konumların bir sonucu olarak P (peripentonal), C (merkez) ve E (kenar) hekzonlarına ayrılır. MCP'nin üst alanının yakınında SCP bulunur. Tripleksler Tri1, Tri2A ve Tri2B'den oluşan heterotrimerlerdir (Yu vd. 2017). HCMV genom boyutu, herpes simpleks virüs tip 1 (HSV-1) genomundan yaklaşık %50 daha uzundur. HSV-1 ve HCMV kapsidinin çapı sırasıyla yaklaşık 125 ve 130 nm'dir (Butcher vd. 1998, Wang and Zhao 2020). HCMV'nin kapsid hacmi HSV-1'den biraz daha büyüktür (yaklaşık %17) (Bhella vd. 2000). HCMV genom boyutundaki önemli artış, biraz daha büyük kapsid hacmi ile ilişkili değildir (Bhella vd. 2000). Dolayısıyla, HCMV genomu kapsid kabuğu içinde sıkıca paketlenir ve kapsid tarafından korunur. Genomun bu basınçlı paketlenmesi, nükleokapsidin kapsid içindeki iç basınçtan yararlanarak viral genomu çekirdeğe iletmesi için makul bir stratejidir (Yu vd. 2017, Brandariz-Nuñez vd. 2020).

2.4.2 HCMV Tegumenti

Tegument, nükleokapsid ve dış zarfı birbirine bağlayan bir tabakadır. Çoğunlukla belirli bir yapıya sahip görünmeyen çeşitli proteinlerden oluşur. Tegumentin bileşenleri hemen konakçının sitoplazmasına sokularak yeni enfekte olmuş virüsün yeni hücrel çevreye alışması sağlanır. Öte yandan, yeniden aktive olan virüs tegument proteinlerini kolayca kullanmaz, bu da ilk enfeksiyon ile yeniden aktivasyon arasında bir ayrım olduğunu düşündürür. Bu nedenle, virüsün dış katmanında bulunan ve ilk enfeksiyonda rol oynayan bazı proteinler aslında virüsün yaşam döngüsünün ilerleyen aşamalarında üretilir ve reaktif virüsün erken evresinde herhangi bir işlevleri yoktur. Ana enfeksiyondan sorumlu olmaları beklenmemektedir (Terhune vd. 2004).

2.4.3 HCMV Zarfı

İnsan sitomegalovirüsü epitel hücreleri, fibroblastlar, lenfositler, monositler ve makrofajlar gibi çeşitli hücre tiplerini enfekte edebilmektedir ve bu geniş tropizm karakterizasyonu tanıma, bağlanma ve füzyonda rolleri olduğuna inanılan zarf proteinlerine atfedilmektedir. Farklı hücre tiplerine giriş, zarf proteinlerinin farklı kombinasyonlarından kaynaklanan eşzamanlı etkilerle ilişkili olabilir. HCMV zarfında glikoprotein kompleksi I, II ve III (gCI, gCII ve gCIII) olarak adlandırılan üç kompleks bulunur. gCI, furin proteaz tarafından parçalanmış glikoprotein B'nin (gB) ürünleri olan gp58 ve gp116 olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. 160 kDa'lık bir öncül olan gB'nin, izin veren hücrelere viral girişte ve nötralize edici antikorların hedefi olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Tabata vd. 2019). İntegrinleri tanıyan bir disintegrinlik alanı içerir ve integrin sinyallerinin füzyonu teşvik etmesi muhtemeldir, çünkü gB disintegrin benzeri peptid varlığında pp65'in iletimi artar, ancak bağlanma etkilenmez, gB'nin bağlanması ayrıca konak sinyal yollarının değişmesini tetikler (Reeves vd. 2012). Zarf, tegument tabakasını çevreleyen ve tüm virionu sağlam tutan bir lipid çift tabakasıdır. Hedef hücrelerde konak hücre membranı ile etkileşime girer ve böylece virüsün bağlanması ve girişi sırasında önemli bir rol oynar. HCMV ve konakçı tarafından kodlanan transmembran glikoproteinler membranın içine gömülüdür. Viral glikoproteinler gpUL55 (gB), gpUL73 (gN), gpUL74 (gO), gpUL75 (gH), UL100 (gM), gpUL115 (gL) ve gL, gH ve UL128-131'den oluşan pentamerik kompleksin virüs girişinde hücreden hücreye yayılma ve virion olgunlaşmasında önemli roller oynadığı bilinmektedir (Ryckman vd. 2008).

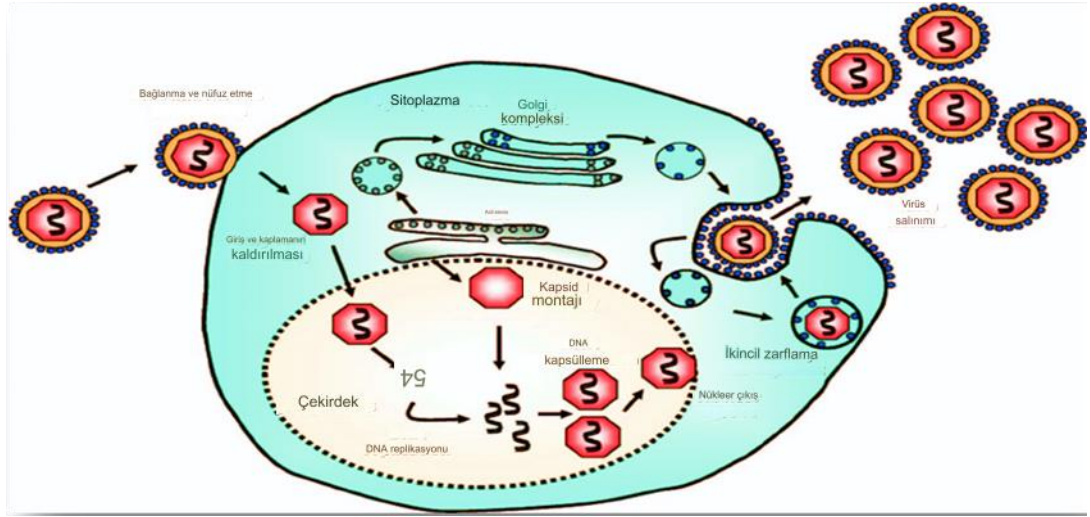
2.5 CMV'nin Çoğalma Döngüsü

HCMV, toplum genelinde dikey bulaşma da dahil olmak üzere çeşitli yollar ile yayılmaktadır. Bu bulaşma şekli, virüsün enfekte bir anneden çocuğuna transplasental ve intrapartum bulaşmanın yanı sıra emzirme yoluyla geçmesini içerir. Diğer bir bulaşma yöntemi ise enfekte bir organın organ nakli veya tükürük, anne sütü ve idrar gibi enfekte vücut salgılarıyla temas yoluyla gerçekleşen yatay bulaşmadır (Jackson and Sparer 2018). HCMV, bezlerin ve mukozal dokunun epitel hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre türlerini enfekte etme ve çoğaltma yeteneğine sahiptir. Bu yetenek, virüsün insan vücudu

içinde sistemik olarak yayılmasına ve konakçılar arasında bulaşmasına katkıda bulunmaktadır (Jean Beltran ve Cristea 2014).

HCMV replikasyon döngüsünün latent dönem ve aktif dönem olmak üzere iki bölümü vardır. Latentlik sırasında virüs aktif değildir ve üretken döngü aktive edildiğinde yeni virionlar üretilir (Gruffat vd. 2016). Endositik yol ve doğrudan füzyon, HCMV'nin insan hücrelerine nüfuz etmesinin iki yoludur (Crough ve Khanna 2009). HCMV genomunun işlevsel proteinler üretebilecek yaklaşık 192 açık okuma çerçevesine (ORF) sahip olduğu bildirilmiştir (Jean Beltran ve Cristea 2014). Virüsün çoğalması ve yayılması için öncelikle viral glikoproteinler (gB ve gH gibi) ve spesifik yüzey reseptörleri (trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi) arasındaki etkileşimler yoluyla bir hücreye bağlanması gerekir. Bir sonraki adım virüs zarfının hücre zarıyla kaynaşması ve nükleokapsidlerin sitoplazmaya salınmasıdır (Crough ve Khanna 2009). Virüs ve konakçı arasındaki bu dinamik etkileşimler esastır (Şekil 2.2).

Nükleokapsidler, viral DNA'nın salındığı çekirdeğe taşınır (Crough ve Khanna 2009). Tegument proteinleri konak hücre reaksiyonlarını kontrol eder ve viral ani erken (IE) genlerin, ardından viral genom replikasyonunu başlatan gecikmiş erken (DE) genlerin ve geç (L) genlerin sıralı aktivasyonunu tetikler (Jean Beltran ve Cristea 2014). Bu süreç, çoğaltılmış viral DNA'nın kapsid adı verilen koruyucu protein kılıflarına paketlenmesini içerir ve bunlar daha sonra çekirdekten sitoplazmaya taşınır. İkincil zarflama sitoplazma içinde, yani endoplazmik retikulum (ER) ve Golgi ara bölmesinde gerçekleşir. Daha sonra, plazma membranında ekzositoz yoluyla virüs partikülünün serbest bırakılmasıyla sonuçlanan karmaşık iki aşamalı bir son paketlenme ve hücreden çıkış süreci vardır (Gruffat vd. 2016).



Şekil 2.2 Sitomegalovirüsün yaşam döngüsü (Crough ve Khanna 2009)

2.6 CMV Patogenezi

İnsan sitomegalovirüsü (HCMV) insanlarda ömür boyu enfeksiyon oluşturabilen bir beta-herpes virüsüdür. Sağlıklı bireylerde, birincil HCMV enfeksiyonları genellikle asemptomatiktir ancak kalıcı veya latent enfeksiyonlara yol açabilir. Bununla birlikte, organ nakli alıcıları ve edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS) olanlar gibi bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler, HCMV patojenitesinden kaynaklanan ciddi ve potansiyel olarak ölümcül hastalık riski altındadır (Chong vd. 2023).

HCMV çok çeşitli hücre ve organları enfekte etme yeteneğine sahiptir. HCMV enfeksiyonunun neden olduğu yüksek stres seviyeleri zararlı tıbbi sonuçlara da neden olabilir. Ek olarak HCMV enfeksiyonunun, aynı ailedeki diğer herpes virüsleriyle ilişkili kronik hastalıklar geliştirme tehlikesi vardır (Reed vd. 2019). HCMV doğum anormalliklerinden ve bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde hayati organlarda yıkıcı işlev bozukluğu oluşumuna kadar değişebilen ciddi zorluklardan sorumlu ana viral faktördür (Stern vd. 2019, Riis vd. 2020). AIDS hastalarında, nörosensöriyel hastalıklarda, transplant alıcılarında, yoğun bakım ünitelerine bağlı kişilerde ve bir dereceye kadar yaşlı hastalarda yüksek risk ve hayati tehlike taşıyan HCMV enfeksiyonu sağlıklı bireylerde genellikle asemptomatiktir (Oiknine-Djian vd. 2019). HCMV'nin neden olduğu enfeksiyonlar çoğunlukla zararsızdır (Jean Beltran ve Cristea 2014). Henüz

anne karnındayken HCMV enfeksiyonu geçiren bebekler yaygın HCMV enfeksiyonu ile doğabilir ya da gelişimlerini etkileyen nörolojik bozukluklar yaşayabilir. Gelişmekte olan plasental sinir sistemindeki nöronlar ve glial hücreler virüs tarafından enfekte edilir ve anneden bebeğe bulaşma şekillenir (Vanarsdall ve Johnson 2012). Virüs; enfekte bir bireyin orofarinks akıntısı, idrar, vajina, meni, süt ve kan bileşenleri dahil olmak üzere çeşitli salgılarında bulunabilir. Virüsün bulaşması, enfekte olmuş bir bireyle doğrudan temasın yanı sıra anneden fetüse dikey bulaşma ve kan nakli, organ bağıışı ve kemik iliğı naklini içeren parenteral bulaşma yoluyla da gerçekleşir (Polz-Dacewicz vd. 2013). CMV enfeksiyonu latent (üretken olmayan), litik (üretken), asemptomatik veya semptomatik olarak ortaya çıkabilir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda CMV enfeksiyonunun yaygın semptomları arasında düşük beyaz kan hücresi sayısı olsun ya da olmasın 38°C'nin üzerinde uzun süreli ateşin yanı sıra hepatit, pankreatit, gastrointestinal bozukluklar, ağrının eşlik ettiğı ateş, yemek borusu iltihabı, yutma güçlüğü, Candida enfeksiyonu ile bağlantılı olabilecek durumlar, interstisyel pnömoni, kalp kası iltihabı, mesane iltihabı ve AIDS hastalarında sıklıkla görülen retina iltihabı yer almaktadır (Boeckh ve Geballe 2011).

2.7 Konjenital Enfekte Hastalarda Sitomegalovirüsün Klinik Belirtileri

Konjenital enfeksiyon semptomatik veya asemptomatik olarak sınıflandırılabilir; hafif semptomatik konjenital sitomegalovirüs (cCMV), orta şiddette ve kısa süreli bir veya iki izole semptom sergileyen yenidoğanları ifade eder. İzole sensörinöral işitme kaybı (SNHL) olan asemptomatik konjenital sitomegalovirüslü (cCMV) bebekler, işitme kaybı dışında fark edilebilir herhangi bir klinik belirti göstermeyen bebeklerdir (Foulon vd. 2008).

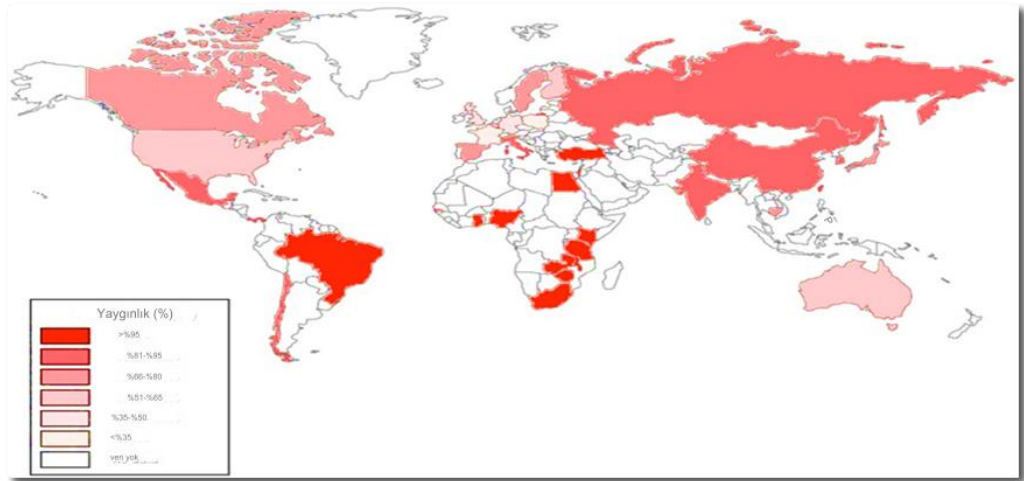
Klinik belirtiler belirsiz semptomlar veya klinik bulgulardan oluşur. Bununla birlikte, akut CMV enfeksiyonu geçiren kişilerde genellikle herhangi bir belirti görülmez. Doğum öncesi dönemde CMV'ye yakalanan bebekler genellikle doğum sonrasında asemptomatik kalır. Bununla birlikte, yenidoğanların yaklaşık %10-15'ini oluşturan bir alt grup, bebekliklerinin ilerleyen dönemlerinde belirtiler gösterir ve semptomlar geliştirir. Konjenital CMV enfeksiyonu; sensörinöral işitme kaybı, peteşi, doğumda sarılık,

hepatosplenomegali, büyümenin kısıtlanması, mikrosefali, letarji ve/veya hipotoni, emzirme güçlükleri, koroid ve retinal inflamasyon, konvülsiyonlar, hemolitik anemi ve pnömoni gibi bir dizi klinik semptomla karakterizedir (Dreher vd. 2014).

Sensorinöral işitme kaybı doğumdan itibaren tespit edilebilir, ancak hastaların %30'undan fazlasında başlangıç gecikmiştir. İşitme kaybı ile ilişkili konjenital CMV'li çocukların %71'inde bilateral işitme kaybı vardır. Semptomatik konjenital CMV için göz muayenesi genellikle çeşitli oküler anormalliklerin değerlendirilmesini içerir ve en yaygın olanı koryoretinittir. Diğer sık görülen bulgular arasında retinal skarlaşma, optik atrofi, merkezi görme kaybı ve şaşılık sayılabilir. Endokrinolojik semptomlar arasında Graves hastalığı, diabetes insipidus ve nefrotik sendrom gibi böbrek hastalıkları yer alır. Konjenital sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonları, uzun vadeli nörogelişimsel sorunların birincil nedenidir. Ayrıca, bu enfeksiyonlar gastrointestinal sistem dahil olmak üzere diğer organ sistemlerini de etkileyebilir ve Menetrier hastalığı gibi durumlara yol açabilir. Semptomatik yenidoğanlarda konjenital CMV belirtileri arasında asit, miyokardit, kardiyomiyopati, ventriküler trabekülasyonlar ve enterokolit yer almaktadır (Jin vd. 2017). HCMV, konjenital viral enfeksiyonların en yaygın nedenidir. HCMV ile doğuştan enfekte olan çocukların yalnızca %5-10'u doğumda semptomatik olsa da, asemptomatik olanların %10-15'inde 5 yaşına kadar uzun süreli nörolojik hastalık gelişmektedir (Hamilton vd. 2014). Ayrıca, semptomatik yenidoğanların %50-90'ında büyüme geriliği, zihinsel kusurlar, işitme kaybı ve görme kaybı gelişir ve ağır enfekte olanlar arasında ölüm oranı %10'dur. Annenin hamileliğin ilk üç ayında enfekte olması durumunda hastalığın şiddetinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Picone vd. 2013). Diğer semptomlar arasında ateş, döküntü, pnömoni, hepatomegali, sarılık, splenomegali, anemi, trombositopeni ve gastrointestinal enfeksiyonlar yer almaktadır (Halwachs-Baumann 2018). Doğuştan enfekte olan bebeklerin yaklaşık %10-15'i doğumdan itibaren hastalık belirtileri gösterir ve bunların yaklaşık yarısı uzun vadeli sonuçlar sergiler (Thigpen 2020).

2.8 CMV Epidemiyolojisi

CMV enfeksiyonu herhangi bir mevsimsel değişiklik göstermez. CMV'nin küresel prevalansı genel popülasyonda %83 ve doğurganlık çağındaki kadınlarda %86'dır (Swanson ve Schleiss 2013, Lanzieri vd. 2014). Düşük sosyoekonomik gruplarda HCMV seropozitifliği daha yüksektir. Gebe kadınlarda serokonversiyon oranı, genel popülasyondaki CMV prevalansından daha yüksektir. Birincil CMV enfeksiyonu, daha yüksek dikey bulaşma olasılığı ve daha yüksek ciddi konjenital enfeksiyon riski ile karakterizedir. İlk enfeksiyonu takiben virüs uzun bir süre hareketsiz kalabilir ve daha sonra tekrar aktif hale gelebilir (birincil enfeksiyon yok/reaktivasyon olarak bilinir). Alternatif olarak, aynı kişi virüsün farklı bir türüyle enfekte olabilir (Lanzieri vd. 2014, Kenneson ve Cannon 2007). Dünya çapında CMV'li yenidoğanların çoğunluğu daha önce enfekte olmuş kadınlardan doğmaktadır (primer olmayan enfeksiyon). Bu durum, CMV vakalarının yüksek prevalansına sahip bir popülasyonun, enfeksiyonun her üç formuna da yakalanma olasılığını artırdığını göstermektedir (Zuhair vd. 2019). Yoksul ülkelerde, gençler arasında seroprevalans oranları %90'ı, genç yetişkinler arasında ise %95'i aşmaktadır. Primer enfeksiyonu olmayan hamile kadınlarda konjenital CMV enfeksiyonu prevalansının yüksek olması, bu yüksek insidansa bağlanabilir. Buna karşılık, Amerika Birleşik Devletleri'nde 12-40 yaşı arasındaki kişiler arasında tahmini seroprevalans oranı %40 ila %60 arasında değişmektedir (Lanzieri vd. 2014). Daha önce virüse maruz kalmış kadınlarda yeni bir suşla yeniden enfeksiyon oranı %18-30 civarındadır (Şekil 2.3). Bu durum, yeniden enfeksiyonun birincil olmayan enfeksiyonlarda önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Coppola vd. 2019). Brezilya'da, CMV seropozitifliği prevalansının yüksek olduğu bir mahallede yaşıyan hamile kadınlarda serokonversiyon riskini değerlendirmek için bir çalışma yürütölmüştür. Daha önce bağışık olmayan kişiler de dahil olmak üzere serokonversiyon oranı %13,9'dur. Konjenital CMV enfeksiyonu insidansı, primer enfeksiyonu olan hamile kadınların doğurduğu yenidoğanlar arasında %2,8 ve gebelik öncesinde zaten seropozitif olanlarda %0,5'tir (Mussi-Pinhata vd. 2018).



Şekil 2.3 Dünya genelinde insanlarda 2005'ten 2015'e kadar olan ve 16 ila 50 yaş arasındaki kişileri inceleyen çalışmalar dahil HCMV seroprevalans oranları (Adland vd. 2015)

2.9 HCMV Tanısı ve Virolojik Yöntemler

a- Antijenemi tahlili: Bu tanı tekniği, önemli bir süre boyunca kan örneklerinde HCMV ile enfekte hücrelerin tanımlanması için yaygın olarak kullanılmıştır. Bu teknikte, ayrılan ve sitospotlara veya smearlara yerleştirilen lökositler immüno Floresan boyama ile muamele edilir. Bu işlemde HCMV'lerin tegument proteini pp65'i hedef alan antikorlar ve ardından bir florofor ile bağlanmış ikincil antikorlar kullanılır. Bu teknik, granülositlerde pp65'in varlığını tanımlar, ancak virüsü aktif olarak oluşturan hücrelerin varlığını doğru bir şekilde göstermez. Viral partikül Pp65'i granülositlere taşır, ancak HCMV bu hücrelerin içinde çoğalmaz. Bu prosedürün uygulanması çok basit ve oldukça ucuzdur. Pp65-pozitif lökositlerin varlığı hastalık riski ile ilişkilidir. Bununla birlikte, hastalık olasılığını gösteren spesifik lökosit miktarı klinik tabloya bağlı olarak değişmektedir (Boeckh ve Boivin 1998).

b- Enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), hastaların kanında veya plazmasında HCMV'ye özgü IgG veya IgM antikorlarının varlığını serolojik olarak araştırmak için kullanılır. HCMV IgG antikorlarının varlığı, bir enfeksiyonun meydana gelip gelmediğini gösterir. Mevcut bir enfeksiyonun veya çok yeni bir enfeksiyonun durumunu belirlemek için, aynı dönemde yenidoğanlarda CMV için IgM tespiti de düşünülebilir (Pontes vd.

2024). Buna ek olarak, HCMV IgG antikoru için bir avidite testi, özellikle akut enfeksiyon vakalarında, HCMV enfeksiyonunun yeni mi yoksa eski mi olduğu konusunda fikir verebilir. Yeni bir enfeksiyon daha düşük IgG aviditesi ile sonuçlanır. Enfeksiyon zaman içinde ilerledikçe, üretilen antikorların aviditesi giderek artacaktır (Grangeot-Keros vd. 1997).

c- Virüs kültüründe izolasyon: HCMV'nin klinik örneklerden izolasyonu en güvenilir yaklaşım olmaya devam etmektedir, ancak izolasyon kültürdeki viral kopyaların miktarına bağlı olarak 3 ila 6 gün veya muhtemelen birkaç hafta sürebilir. Klinik materyal fibroblast hücrelerinde kültüre edilir ve daha sonra HCMV varlığının göstergesi olan bir sitopatik etki veya plak oluşumu takip edilir. Viral plakların oküler tespiti için kullanılan yaklaşımın HCMV IE proteini için immün boyama ile birleştirilmesi HCMV'nin tespiti için gereken süreyi azaltabilir (Gleaves vd. 1984).

d-PCR (polimeraz zincir reaksiyonu), klinik laboratuvarlarda kan veya plazmadaki viral DNA kopyalarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Hassasiyeti, özgüllüğü ve hızlı kantifikasyonu nedeniyle, bu yaklaşım son zamanlarda birçok laboratuvarı birden fazla numuneyi işlemek için otomatik hale getirilmiştir (Gimeno vd. 2008).

2.10 HCMV için Latentlik ve Reaktivasyon Mekanizmaları

Konakçı tarafından üretilen proteinler ile virüs arasındaki etkileşim, HCMV'nin latent durumda kalması ya da virüsün aktive edilmesi için esastır. Doğal bir enfeksiyonun latent dönemiyle ilgili temel mekanizmalar anlaşılmaya başlanmıştır. Major ani erken (Immediate-Early), HCMV genlerinin çoğu transkripsiyonu uyaran bir trans-aktivatör olarak görev yapar. Virüsün çoğalması ve enfeksiyonun litik fazına geçmesi için gereklidir. Latentlik sırasında Major Immediate-Early promotörü Ets2 Represör Faktörü ve HP1 gibi hücresel proteinler tarafından transkripsiyonel olarak baskılanır (Bain vd. 2003, Murphy vd. 2002, Wright vd. 2005). Ayrıca, bu kimyasallar MIE geni etrafındaki kromatini baskılayarak litik döngü fazının baskılanmasına ve enfeksiyonun latent fazının korunmasına yardımcı olur. Ön araştırmalar, latentlik sırasında HCMV genomunun

transkripsiyonu için bir mekanizma olmadığını göstermiştir. Daha ileri testler, latentlik döneminde yalnızca sınırlı sayıda genin transkribe edildiğini ortaya koymuştur. Deneylerde CD34+ pozitif hücrelerin enfeksiyonunu inceleyen hücre kültürü modelleri, latentlik ve belirli proteinlerin üretimiyle ilişkili transkriptlerin varlığını göstermiştir. UL138 gen ürününün varlığı, viral latensin kurulması ve sürdürülmesi için gereklidir. HCMV-LUNA ve UL138 proteinleri, HCMV enfeksiyonunun hem latent hem de litik aşamaları boyunca sürekli olarak üretilir (Bego vd. 2005). CD4+ T hücrelerini aktive ederek IL-10 ve IFN- γ üretimine yol açar. IL-10 immünosupresif özelliklere sahipken, IFN- γ immün uyarıcı etkilere sahiptir. Bu, uykuda olan HCMV'nin çoğalmasını ve canlanmasını uyarır. IFN- γ üretimi muhtemelen makrofajların farklılaşmasını teşvik ederek HCMV'nin reaktivasyonuna ve replikasyonunun artmasına yol açabilir (Jenkins vd. 2008).

HCMV, viral latentlik durumundayken bağışıklık sistemini etkin bir şekilde baskılamak için UL111a genini kullanır. Bu gen, güçlü immünosupresif etkileri olan işlevsel bir IL-10 homologunu kodlar. Enfeksiyonun latent fazı sırasında UL111a, latentlikle bağlantılı bir cmvIL-10 transkriptinin oluşmasına yol açacak şekilde alternatif eklemeye uğrar. Bu transkript, insan immünosupresif sitokin IL-10'un işlevini taklit eden bir protein sentezler, bu da kontamine hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından tespit edilmekten ve ortadan kaldırılmaktan kaçınmasını sağlar (Jenkins vd. 2008). HCMV farklılaşmış hücrelerde viral replikasyon gösterirken, bazı farklılaşmamış hücrelerde izin vermeyen bir durumda kalır (Sissons vd. 2002). Makrofajlar aktif bir enfeksiyonu teşvik eder, ancak monositler bunu yapmaz. HCMV, monositler makrofajlara veya dendritik hücrelere farklılaşana kadar latent bir durumda devam eder, bu aşamada virüs aktif hale gelir ve replikasyona uğrar. Bu nedenle, dormant gen aktivasyonunun düzenlenmesinin hücresel transkripsiyonel ortamdan etkilenmesi çok muhtemeldir (Poole vd. 2011).

2.11 Konjenital Enfekte Hastalar (cCMV)

Bu enfeksiyonun yaygınlığı Çin'de %2, Polonya'da %12,5, Amerika Birleşik Devletleri'nde %45 ve daha yeni bir Polonya araştırmasında %50 oranıyla farklı ülkeler arasında değişiklik göstermektedir (Rycel vd. 2015). Asemptomatik hastalara kıyasla

semptomatik konjenital enfekte bireylerde HCMV gN genotipleri ile hastalığın şiddeti arasında bir bağlantı gözlenmemiştir. Doğuştan enfekte bireyler üzerinde yapılan karşılaştırmalı araştırmalar, HCMV gN-1 suşunun, iyi ve kötü hastalık sonuçlarındaki farklılıklarda görüldüğü gibi, diğer genotipik suşlara kıyasla daha düşük virülansa sahip olduğunu göstermiştir (Pignatelli vd. 2003, Pignatelli vd. 2004). Konjenital olarak enfekte olmuş bireyler arasında gN genotiplerinin dağılımında kayda değer bir farklılık yoktur. (Pignatelli vd. 2003). Bununla birlikte, önemli sayıda hastayı değerlendirme avantajına sahip olan sonraki bir çalışma, gN-1'e ek olarak gN-3a'nın da daha az zararlı bir tür olduğunu keşfetmiştir. Ayrıca, gN-4 grubunun daha ciddi bir hastalık sonucuyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Pignatelli vd. 2010). İspanya'da konjenital enfeksiyonlarla doğan yenidoğanlar üzerinde yapılan bir çalışma, popülasyonun %50'sinin doğum sırasında semptomlara sahip olduğunu ortaya koymuştur. Gözlemlenen semptomlar arasında vakaların %83,3'ünde sensörinöral işitme kaybı ve %66,7'sinde nörolojik sorunlar yer almıştır. Çalışmada gB2 ve gN1 genotipleri ile hastalığın ortaya çıkması arasında güçlü bir korelasyon bulunmuş, ancak gB4 genotipi daha olumlu bir hastalık prognozu ile ilişkilendirilmiştir (Brañas vd. 2015). Bir başka çalışmada, doğumdan önce veya sonra enfekte olan bebeklerde gH1 ile HCMV enfeksiyonunun şiddeti arasında bir bağlantı olduğu ayrıca, gH2'nin işitme kaybı yaşama olasılığının azalmasıyla bağlantılı olduğu öne sürülmüştür (Paradowska vd. 2014).

2.12 HCMV'nin Önlenmesi

Gebelik sırasında CMV enfeksiyonunu önlemek, teşhis etmek ve kontrol etmek için uygun hijyen, ultrason muayenesi (US), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), amniyosentez, hiper immünoglobulin (HIG) ve valasiklovir (VACV) dahil olmak üzere çeşitli tekniklerin kullanılmaktadır (Rybak-Krzyszowska vd. 2023).

CMV'nin bulaşmasının önlenmesi zorluğunu korumaya devam etmektedir. Aşılama teknikleri konusunda yapılan çalışmaların umut verici doğasına rağmen, şu anda hamile kadınlarda CMV enfeksiyonunu önlemek için ticari olarak mevcut bir CMV aşısı bulunmamaktadır (Krause vd. 2013). Ayrıca, CMV hiperimmün globülin (HIG) kullanılarak fetal enfeksiyonun önlenmesi veya azaltılması üzerine yapılan araştırmaların

sonuçları tutarsız sonuçlar göstermiştir. Çok sayıda deneysel ve randomize olmayan araştırma, CMV hiperimmün globulinin (HIG), hamileyken primer CMV enfeksiyonu geçiren kadınlarda CMV'nin uterus içinde bulaşmasını etkili bir şekilde engelleyebileceğini göstermiştir (Nigro vd. 2005). Bununla birlikte, primer CMV enfeksiyonu olan hamile kadınlara CMV HIG verilmesine ilişkin yakın zamanda yapılan randomize bir çalışmadan elde edilen bulgular fetal enfeksiyonda önemli bir azalma göstermemiştir ve CMV HIG etkinliğini değerlendirmek için Amerika Birleşik Devletleri'nde büyük bir çok merkezli randomize deney yürütülmektedir (Revello vd. 2014).

2.13 HCMV'nin Tedavisi

Gansiklovir, valgansiklovir, cidofovir ve foskarnet dahil olmak üzere CMV'ye karşı antivirallerin gebe olmayan yetişkinlerde etkili olduğu gösterilmiştir. Farmakolojik olarak, bu ilaçlar çeşitli süreçlerle hücresel düzeyde CMV replikasyonunu inhibe etmektedir (Pontes vd. 2024). Viral enfeksiyonları erken evrelerde önlemek veya yönetmek için şu anda çoklu antiviral yaklaşımlar mevcuttur ve uygulanmaktadır. Bununla birlikte, yan etkilerden kaynaklanan sınırlamalar ve ilaç direncinin başlaması, özellikle uzun süreli tedaviler için etkinliklerinin önünde bir engeldir. Yeni antiviral moleküller ve yenilikçi yaklaşımlar (örneğin genetik düzenleme ve RNA interferans) ile ilgili *in vitro* ve *in vivo* gerçekleştirilen çalışmalar umut verici sonuçlar vermektedir. HCMV latent enfeksiyon oluşturabilen ve bunun sonucunda reaktivasyon riski taşıyan bir virüs olduğundan, enfeksiyon yönetimi, bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler ve seronegatif hamile kadınlar gibi kritik hastalar için önleyici tedaviden fayda sağlayabilir (Bottino vd. 2023).

Semptomatik enfeksiyon, primer immün yetmezlik veya konjenital CMV enfeksiyonuna bağlı izole işitme kaybı olan asemptomatik enfeksiyonu olan yenidoğanlarda tedaviye yaşamlarının ilk ayında başlanması tavsiye edilmektedir. İntravenöz olarak uygulanan gansiklovir ve oral olarak erişilebilen ön ilacı valgansiklovir, konjenital CMV hastalığının tedavisi için uygundur, ayrıca gansiklovir, anne sütü ile geçerel perinatal CMV enfeksiyonu olan bebekler için bir tedavi olarak kullanılabilir. Edinilmiş CMV

enfeksiyonlarının tedavisi, tam zamanında ve doğum sonrası erken dönemde olan, bağışıklık sistemi zayıflamış asemptomatik yenidoğanlarda endike değildir ve gansiklovir ile antiviral tedavi uygulanması tavsiye edilir. CMV viremisi olan bağışıklık sistemi baskılanmış çocuklara, son organ hastalığı belirti veya semptomları olmasa bile antiviral ilaç uygulanmalıdır. Kantitatif PCR testinin pozitif sonuç verdiği veya viral yükün arttığı vakalar da buna dahildir. Bağışıklık sistemi baskılanmış çocuk hastalarda CMV hastalığının yönetimi, yetişkinlerde kullanılan tedavi yaklaşımıyla karşılaştırılabilir şekilde gansiklovir ve oral valgansiklovir uygulanmasını içerir. Tipik tedavi, ortalama 4-6 hafta süreyle intravenöz gansiklovir veya oral valgansiklovir uygulanmasını içerir (Åsberg vd. 2010).

2.14 HCMV MikroRNA'ları

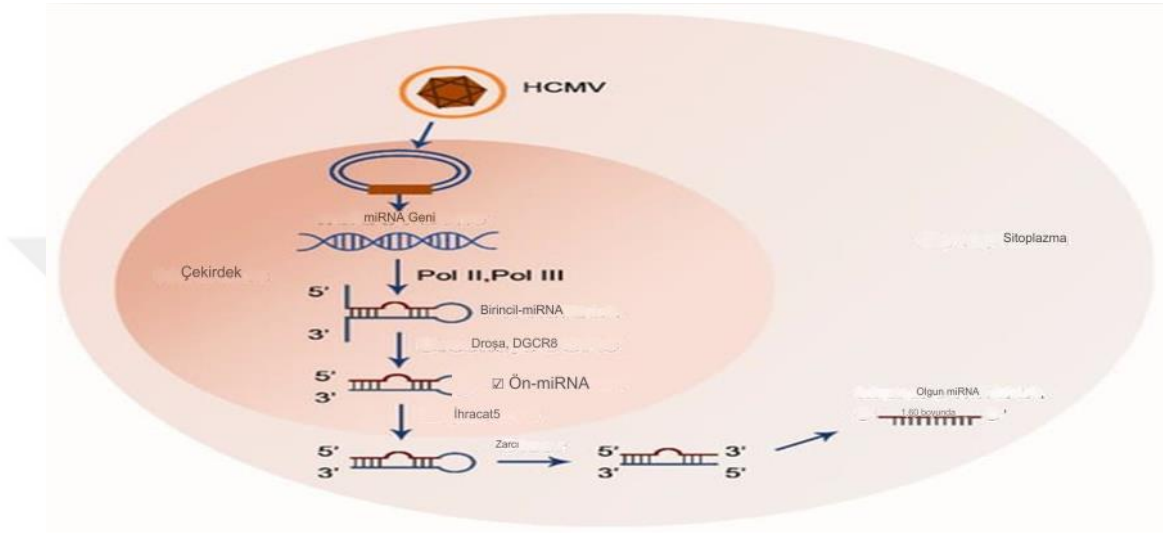
MikroRNA'lar (miRNA'lar) 22 nükleotid uzunluğunda kısa RNA molekülleridir. Ökaryotlar ve virüsler tarafından üretilirler ve gen ifadesini kontrol etme yeteneğine sahiptirler. Lee ve meslektaşları 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta ilk miRNA'yı keşfetti. O zamandan beri araştırmacılar en az 48.000 olgun miRNA bulmuşlardır (Kozomara vd. 2019). Tipik olarak miRNA genleri bir arada gruplanır ve polikistronik genlerden üretilirler (Cullen 2009). Olgun mikroRNA'lar, bir RNA-indüklenmiş susturma kompleksinin (RISC) montajında yer alır. RISC ile yüklenen miRNA, hedef mRNA'ların içindeki belirli bir diziye bağlanır. miRNA'nın dizisi ile bağlanma bölgeleri arasındaki tam tamamlayıcılık mRNA'nın bozulmasına neden olur. Bir miRNA hedef mRNA ile yalnızca kısmen eşleştğinde çeviri engellenir (Griffiths-Jones vd. 2011). Virüsler, hem konak hücrelerin hem de virüslerin gen ifadesini kontrol eden miRNA'lara sahiptir. Bu, daha avantajlı bir hücre ortam yaratmak veya konağın immünolojik tepkisini bastırmak için yapılır (Fruci vd. 2017). İnsan sitomegalovirüsü (HCMV); hücre döngüsünün ilerlemesi, apoptoz ve bağışıklıktan kaçınma gibi sayısız hücresel süreci ve ayrıca viral gen ifadesini düzenleyen mikroRNA'lar (miRNA) kodlar. HCMV miRNA'ları konak hücre işlevlerini düzenlemede viral proteinlerle birlikte veya onlara karşı hareket edebilir (Diggins vd. 2021).

MikroRNA'lar (miRNA'lar) bir dizi hastalık için hücre dışı bağlamlarda çok kalıcı biyobelirteçlerdir. Hücre dışı mikroveziküller (MV'ler) içinde bulunan bazı miRNA'lar, hücreler arası iletişimin önemli ajanları olarak kabul edilmiştir ve hücreden hücreye iletişimde gen ifadesinin yenilikçi düzenleyicileri olarak hareket ederler. Araştırmacılar insan kan dolaşımında HCMV tarafından kodlanmış miRNA'ları keşfetmişlerdir, dolaşımdaki HCMV tarafından kodlanmış birkaç miRNA, kaynağı bilinmeyen çeşitli bozukluklarda farklı ifade modelleri göstermiştir. İnsan sitomegalovirüsü (HCMV) tarafından kodlanan mikroRNA'lar (miRNA'lar), konak genlerinin düzenlenmesini etkin bir şekilde kontrol etme yeteneğine sahiptir ve hastalık gelişiminde rol oynamaktadır (Wang vd. 2013).

2.15 HCMV-miRNA'larının Biyogenezi

Hcmv-miRNA'larının biyogenezi, insan sitomegalovirüsü (HCMV) tarafından kodlanan mikroRNA'ları ifade eder. miRNA'ların biyogenezi, insan miRNA'larına (h-miRNA'lar) benzer bir model izler ve çok sayıda ardışık aşama içerir (Ha ve Kim 2014). Biyogenez, RNA polimeraz II'nin miRNA genlerini transkribe ettiği ve saç tokası benzeri bir yapıya sahip olan birincil miRNA (primiRNA) olarak bilinen birincil transkripti verdiği çekirdek içinde başlar. Pri-miRNA daha sonra, transkriptin kalan kısmından saç tokası yapısını çıkarmaktan sorumlu olan DroshaDGCR8 enzim kompleksi tarafından işleme tabi tutulur. Bu aşamada, yaklaşık 70 nükleotitten oluşan bir öncü miRNA (pre-miRNA) oluşur. Pre-miRNA daha sonra çekirdekten sitoplazmaya aktarılır ve burada başka işlemler gerçekleşir. Sitoplazma içinde, DICER enzimi düzenlemeyi tanımlar ve pre-miRNA saç tokasının üst halkasını kopararak, olgun miRNA dubleksini oluşturan neredeyse tamamlayıcı iki iplikten oluşan küçük bir yapının oluşmasına yol açar. İpliklerden biri bozunmaya uğrarken, diğer iplik kılavuz iplik olarak görev yapar. Kılavuz iplik daha sonra miRNA-AGO kompleksini oluşturmak için Argonaute proteinine (AGO) eklenir. Kompleks, kılavuz ipliği bir mRNA hedefine doğru yönlendirmek için tamamlayıcı nükleotidleri kullanır. mRNA hedef bölgesi genellikle 3' çevrilmemiş bölgede (UTR) bulunurken, tohum dizisi olarak bilinen miRNA üzerindeki karşılık gelen dizi 2-8 nükleotidlerinde yer alır. Bu dizi yaygın olarak en sağlam hedef konum olarak kabul edilmektedir. Nükleotid 13-16'dan oluşan 'tamamlayıcı alan', tohuma ek olarak

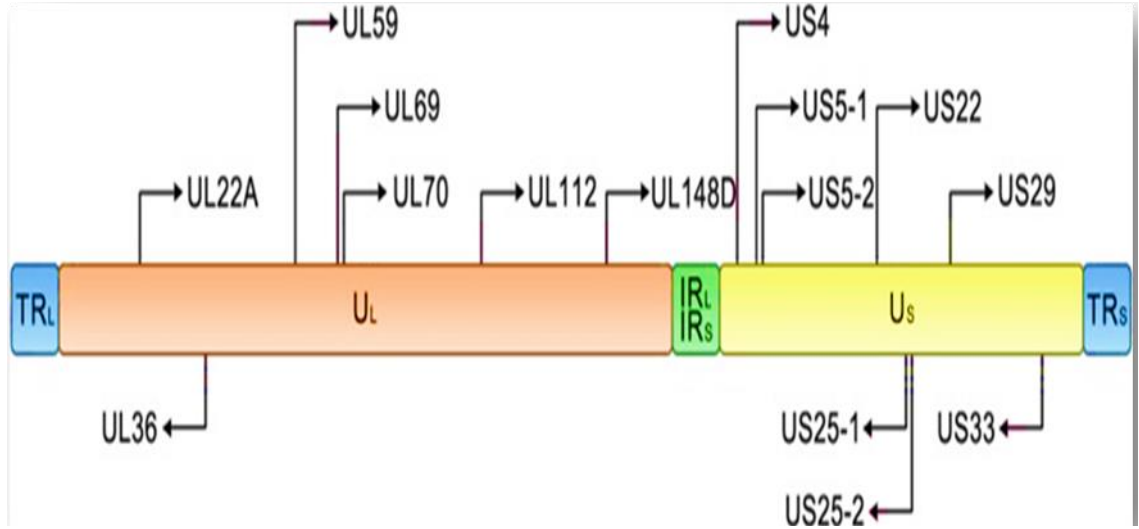
hedef tanımlamaya potansiyel olarak yardımcı olabilir. miRNA-AGO kompleksi, miRNA tohum dizisi aracılığıyla bir hedef mRNA ile etkileşime girerek translasyonun baskılanmasına ya da yok edilmesine yol açar. Öte yandan, 3' ucuna çok fazla eşleşme olduğunda, kompleksi zayıflatır. Bu, miRNA'nın boşaltılmasına ve hedefin bölünmesine ve bozulmasına yol açar (Barbu vd. 2020, Gebert ve MacRae 2019, Zhang vd. 2020)



Şekil 2.4 miRNA biyogenezi Hcmv-miRNA (Yu vd. 2022)

2.16 HCMV Genomu ve HCMV miRNA'larının Genomdaki Dağılımı

HCMV'nin genomu benzersiz uzun (UL) ve benzersiz kısa (US) bölgeler olarak adlandırılan ayrı parçalara bölünmüştür. Genom, bu bölümlerin hem uçlarında (terminal ters çevrilmiş tekrarlar, TRL ve TRS) hem de içlerinde (iç ters çevrilmiş tekrarlar, IRL ve IRS) bulunan ters çevrilmiş tekrarlarla çevrilidir (Şekil 2.5). HCMV pre-miRNA'larının genomik konumları Şekil 2.5'de gösterilmiştir (Zhang vd. 2020, Diggins vd. 2021).



Şekil 2.5 HCMV genomu ve HCMV miRNA'larının genomik dağılımı (Zhang vd. 2020)

2.17 miRNA'lar ve Viral Enfeksiyonlar

miRNA'ların neredeyse tüm biyolojik süreçlerde önemli düzenleyiciler olduğu düşünülmektedir. RNA susturma, viral enfeksiyonlara karşı savunmaya yardımcı olan önemli bir mekanizmadır (Ding ve Voinnet 2007). HCMV gibi birçok virüs, RNA susturmadan sorumlu hücresel mekanizmayı bloke ederek RNA susturmanın antiviral etkilerini engellemek için stratejiler geliştirmiştir. Memelilerde viral enfeksiyonların düzenlenmesinde RNA interferansının (RNA) kesin işlevi henüz iyi anlaşılmamıştır, ancak kısa RNA'ların memelilerde viral enfeksiyonlarda bir işlevi olabileceği, RNA işlemede yer alan bir protein olan Dicer'in ortaya çıkarıldığı bildirilmiştir (Otsuka vd. 2007).

2.18 Viral miRNA'lar

MiRNA'lar, virüslerin kendi genlerinin ve konakçının genlerinin ekspresyonunu kontrol etmeleri için çok uygundur ve bağışıklık tepkisini tetikleyebilecek viral proteinlerin üretilmesini sağlar. Bu kısa miRNA'lar dikkate değer bir uyarlanabilirliğe sahiptir, çünkü küçük değişiklikler bile hedef seçiciliğini önemli ölçüde değiştirebilir. premiRNA saç tokalarında hatalı ve kanonik olmayan baz eşleşmesinin varlığı, viral miRNA'ların optimum pro-viral etkilere sahip olması için önemli bir potansiyel sağlar. Virüsler

milyonlarca yıl boyunca konakçılarıyla birlikte evrim geçirmiştir, viral mikroRNA'lar (miRNA'lar) sadece bilim camiasının değil, aynı zamanda klinik tıp ve ilaç sektörü alanlarının da dikkatini çekmektedir, bunun nedeni antiviral ilaçlar için yeni hedefler olma potansiyeline sahip olmalarıdır. Poliomavirüs, adenovirüs ve belki de HIV gibi çeşitli virüsler miRNA üretir. Bununla birlikte, herpesvirüsler çok sayıda miRNA üretmeleri nedeniyle bu konuda öne çıkmaktadır (Gottwein and Cullen 2008). Herpesvirüsler, dizi homolojilerine ve farklı biyolojik özelliklerine göre a-, b- ve c- herpesvirüsler olmak üzere üç alt ailede sınıflandırılabilir, insanları enfekte edebilen sekiz farklı herpesvirüs vardır, bunlardan herpes simpleks virüs 1 ve 2 (HSV-1 ve -2) ile HCMV'nin çok sayıda miRNA ürettiği bildirilmiştir (Tang vd. 2008).

2.19 HCMV Tarafından Kodlanan miRNA'lar ve Viral DNA Replikasyonundaki Roller

Betaherpesvirüs alt ailesinin bir üyesi olan HCMV, bağışıklık sistemi zayıflamış bireylerde ve kemik iliği veya organ nakli yapılmış kişilerde hastalığın birincil nedenidir. Aynı zamanda yeni doğanlarda görülen doğum anormalliklerinin de ana nedenidir. HCMV ile enfekte fibroblastlardan küçük RNA klonlama ve dizileme çalışmaları sonucunda, dokuz HCMV miRNA'sı tanımlanmıştır (Stark vd. 2012).

miRNA'lar yeni proteinlerin üretimini engelleme kapasitesine sahiptir, ancak hücrelerdeki mevcut proteinlerin miktarlarını değiştiremezler, viral latentlik sırasında üretilen viral mikroRNA'lar (miRNA'lar) viral latentliğin kurulması ve sürdürülmesi için daha avantajlı bir ortam yaratmak için yeterli zamana sahip olmalıdır, bunu protein seviyelerine ve stabilitelere bakılmaksızın genleri spesifik olarak hedefleyerek yaparlar. Bununla birlikte, CMV miRNA'ları, nispeten kısa litik replikasyon döngüsü sırasında hücresel etkileri hızla azaltmak için ya enfeksiyon sırasında tetiklenen genlerin ekspresyonunu engellemeli ya da kısa ömürlü proteinlerin üretimini baskılamalıdır (Stern-Ginossar vd. 2007).

HCMV genomları, konak hücrelerin enfeksiyonu üzerine çekirdek içinde epizomlar olarak bulunur. Viral gen ekspresyonu temel olarak ani erken (IE), erken (E) ve geç (L)

gen ekspresyonu olarak kategorize edilir, MIEP virüsteki erken genlerin aktivasyonu için gerekli ana transkripsiyonel aktivatörler olan IE1 ve IE2 genlerinin transkripsiyonunu tetikler, bu genler bağışıklıktan kaçınma ve viral replikasyon için çok önemlidir (Møller vd. 2018). Viral DNA replikasyonuna, kapsid montajı ve virion salınımı için çok önemli olan geç gen ekspresyonunu da aktive eden erken genler aracılık etmektedir (Shan vd. 2020).

Apoptoz, virüsle enfekte olan hücreleri ortadan kaldırarak virüslere karşı bir savunma mekanizması olarak hizmet eden hücresel bir süreçtir, bu süreç virüsün yayılmasını sınırlamaya ve uzun süreli enfeksiyonu önlemeye yardımcı olur (Babu vd. 2014). HCMV, konak hücrelerin programlanmış hücre ölümünü engellemek için miR-UL36-5p ve miR-UL148D gibi apoptozu önleyen miRNA'ların ekspresyonunu artırır, bu etkileşim proapoptotik protein Bax'ın stabilizasyonuna karşı koyarak mitokondriyal bağımlı apoptozu inhibe eder, ayrıca miR-UL36-5p özellikle adenin nükleotid translokator 3 (ANT3) mRNA'sını hedefler. ANT3 proteini mitokondrinin iç zarında yer alır ve apoptozu kontrol eden mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneginin (MPTP) temel bir unsuru olarak görev yapar (Guo vd. 2015).

2.20 hcmv-mir-UL148D

HCMV-miR-UL148D, insan sitomegalovirüsü (HCMV) tarafından üretilen, HCMV ile enfekte olmuş hücrelerde keşfedilmiş ve üzerinde çalışılan viral bir miRNA'dır. HCMV miR-UL148D'yi litik replikasyon döngüsü boyunca transkribe eder ve miR-UL148D'nin viral enfeksiyonda çeşitli işlevlere sahip olduğu, gen ekspresyonunu kontrol etmek ve hücresel süreçleri etkilemek için konak hücre mRNA'larını seçici olarak hedefleyebildiği gösterilmiştir (Dass vd. 2023). Hücrelerdeki belirli genlerin ifadesini azaltarak veya bozulmasına neden olarak HCMV'nin klinik suşlarının hastalığa neden olma kabiliyetine katkıda bulunması mümkündür (Wang vd. 2013). miR-UL148D'yi hedefleyen özel bir inhibitörün, miR-UL148D'nin neden olduğu RANTES azalmasını önlediği doğrulanmıştır. HCMV-miR-UL148D, ifadesini azaltmak için özellikle IEX-1'in (hemen erken gen X-1) 3'UTR bölgesi ile etkileşime girer. İnsan embriyonik böbrek 293 hücrelerinin apoptozuyla sonuçlanan HCMV'nin konak hücrelerdeki hücresel reseptör

ACVR1B'yi (aktivin reseptörü tip-1B) hedeflemedeki belirgin rolünün, latensin etkili bir şekilde kurulmasına yardımcı bulunduğu bildirilmiştir (Lau vd. 2016a).

MiRNA'lar HCMV latentliğinde önemli bir rol oynamaktadır ve miRUL148-D özellikle konakçının genlerini hedef alarak HCMV enfeksiyonunun latentlik evresine katkıda bulunmaktadır. Konak hücresel ani erken yanıt geni 5 (IER5) miRUL-148D için bir hedef olarak tanımlanmıştır, Araştırmalar miRUL-148D'nin gizli bir viral enfeksiyon sırasında IER5 sentezini başarılı bir şekilde baskılayabileceğini göstermiştir, bu baskılama CDC25B ve CDK1'in aktivitelerini koruyarak transkripsiyonun düzenlenmesine yardımcı olur (Pan vd. 2016). miRUL-148D'nin ifadesine UL-150 geni aracılık eder ve klinik suşlarda görülebilir, ancak zayıflatılmış AD169 suşunda (bir laboratuvar suşu) mevcut değildir, HCMV UL-150 geni, UL-148D olarak bilinen yeni bir küçük geni kodlayan bir gen ailesinin üyesidir. UL-148D geni viral bir glikoprotein kodlanmasından sorumludur, bu glikoprotein viral tropizmin belirlenmesinde çok önemli bir rol oynar ve HCMV enfeksiyonu için önemli olan glikoprotein O'nun (gO) gelişimini kolaylaştırır. TB40/E suşunda UL-148D geninin bozulması, virüsün epitel hücrelerini enfekte etme kabiliyetinde önemli bir artışa yol açmaktadır (Golshan vd. 2021).

2.21 hcmv-mir-UL36-3P/5P

2005 yılında mir-UL36'nın stem-loop dizisi ve dört ek dizi ilk olarak klonlanmıştır (Grey vd. 2005). HCMV, mir-UL36 adı verilen tek bir intron miRNA'ya sahiptir ve bu miRNA, stem-loop bölgesinden iki adet tamamen işlevsel miRNA (miR-UL36-3P ve miR-UL36-5P) üretir. Daha sonra, HCMV-mir-UL36'nın birçok potansiyel hedefi tanımlanmıştır (Petrucelli vd. 2009). HEK293 hücrelerinde miR-UL36-5p'nin aşırı ekspresyonunun HCMV DNA sentezinde bir artışa neden olduğu görülmüştür. Ayrıca HCMV UL138 proteininin ekspresyonunu azalttığı ve HCMV'nin replikasyonuna yardımcı olduğu bildirilmiştir. miR-UL36-5P, HCMV replikasyonuna yardımcı olan viral bir miRNA olabilir, ancak miR-UL36-5P ve miR-UL36-3P'nin fizyolojik etkilerinin daha detaylı olarak araştırılmalarına ihtiyaç vardır (Huang vd. 2013).

2.22 hcmv-mir-UL22A-3P

miR-UL22A'nın ilk klonlanması sırasında miR-UL22A tarafından düzenlenen hedef genler; interferon 18 reseptör öncüsü ve histon 3 olarak bulunmuştur (Meshesha vd. 2012). 2015 yılında yapılan bir çalışmada ise, makrofajların alternatif polarizasyonunda rol oynayan bir reseptör olan BMP2'nin potansiyel olarak miR-UL22A tarafından düzenlenen hedef genlerden birisi olabileceği keşfedilmiştir (Lisboa vd. 2015)

Buna ek olarak, miR-UL22A'nın bu spesifik mikroRNA ile transfekte edilen MRC-5 fibroblastlarındaki farklı proteinlerin konsantrasyonlarını değiştirdiği bildirilmiştir. Bu proteinlerden birisi, HSP70 ısı şoku proteinleri ailesinin bir üyesi olan HSPA8'dir. HSPA8'in CMV'ye özgü T hücrelerinin çoğalmasında ve organ nakli yapılan bireylerde viral replikasyonun ortadan kaldırılmasında rol oynadığı bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan bir araştırma, enfekte CD34+ hematopoietik progenitör hücrelerde bulunan miR-UL22A'nın, latentlik durumunu sürdürmek için TGF- β sinyal yolunun önemli bir bileşeni olan SMAD3'ün ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. Bu veriler miR-UL22A'nın immünolojik düzenlemede önemli bir düzenleyici işlevi olduğunu düşündürmektedir (Hancock vd. 2020). hcmv-miR-UL22A'nın protein düzeyindeki etkileri araştırılırken, hcmv-miR-UL22A transfeksiyonunun antijen işleme ve sunumunda yer alan çeşitli proteinlerin ifade modelini dolaylı olarak değiştirdiği, konak hücresel bağışıklığı modüle eden bir düzenleyici olduğu ve hcmv-miR-UL22A'nın klinik bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği bulunmuştur (Fernández-Moreno vd. 2021).

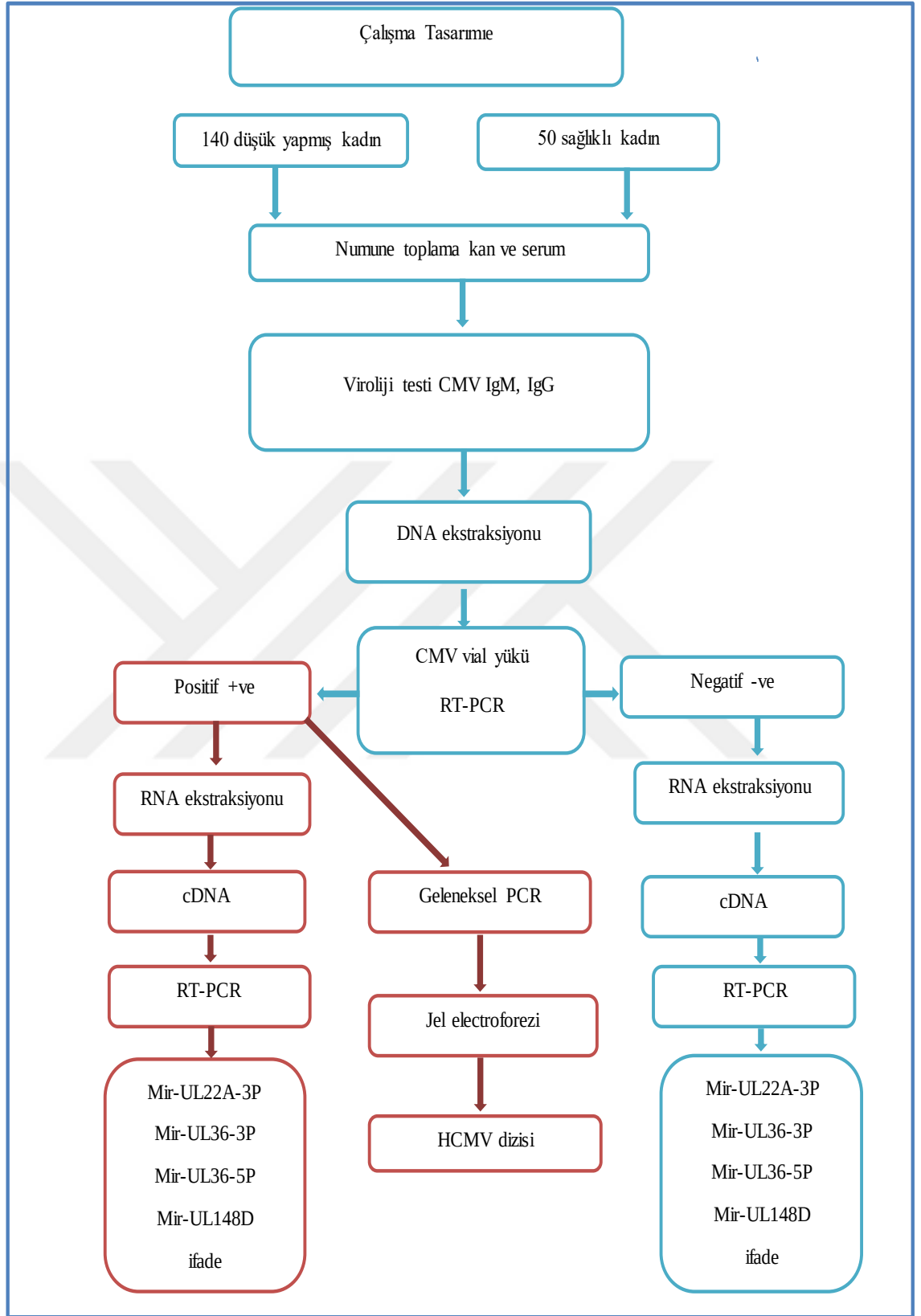
3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Örnekler

Bu araştırma Şubat 2023 ve Ağustos 2023 tarihleri arasında Irak Babil Kadın Doğum ve Çocuk Eğitim Hastanesi ve Al-Hashimiya Genel Hastanesi'nin Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümlerinde yürütülmüştür. Bu vaka-kontrol çalışması 18-41 yaş arası üreme çağındaki kadınlardan oluşmaktadır ve düşük yapan 140 kadını rastgele içerecek şekilde tasarlanmış olup, yüksek viral yüke sahip bireylerden örnek alınmıştır. Ayrıca daha önce düşük yapmamış sağlıklı hamile kadınlardan oluşan 50 kişilik bir kontrol grubu da çalışmaya dahil edilmiştir. Kronik hastalığı olan, HCMV viral yükü 108 kopya/mL'den az olan düşük yapan kadınlar (CT değeri > 40) ve diğer etkenlerle enfekte olup düşük yapan kadınlar ile bağışıklık sistemi baskılanmış kadınlardan örnek alınmamıştır.Örnekleme yapılmadan önce her düşük yapan kadından sözlü onam alınmıştır. Bu çalışma için Irak Sağlık Bakanlığı Babil Sağlık Müdürlüğü Yayın Etik Kurulu tarafından Etik Onay verilmiştir (EK 1 ve EK 2).

Düşük yapan grup ve kontrol grubundan (sağlıklı kadınlar) beş mL taze venöz kan toplanmıştır. İki mL'si EDTA'lı tüpte tutularak insan sitomegalovirüsü DNA'sının ekstraksiyonu için kullanılmış ve bir mL kan mikroRNA gen ekspresyonu için üç mL'lik trizol tüpüne alınmış, diğer iki mL kan ise pıhtılaşana kadar jel tüpünde tutulmuştur. (2500 rpm'de 15) dakika santrifüj edildikten sonra serum ayrılmış ve CMV IgM ve IgG, VIDAS testleri ve RT-PCR ile CMV viral yükünün ölçülmesi için kullanılabileceğine kadar (-20°C)'de muhafaza edilmiştir. Çalışmanın algoritması Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Bu çalışmanın tasarımı

3.1.2 Laboratuvar ekipmanı

Çalışmanın laboratuvar çalışmaları boyunca kullanılan cihazların listesi Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan laboratuvar cihazlarının listesi

No.	Öge	Şirket	Ülke
1	Applied Biosystems™ ProFlex™ PCR Sistemi	Fisher Scientific	ABD
2	Biyolojik Güvenlik Kabini	Thermo Scientific	Almanya
3	Santrifüj	Hettich	Almanya
4	Yatay Jel Elektforezi	Biorad	Japonya
5	Isıtıcı tabla	Medico	ABD
6	İnkübatör	Incucell	Almanya
19	MicroFuge	BioLabs	Çin
7	Mikropipetler, (2- 20µl), (5-50µl) (20-200µl), (100-1000µl)	Slamed	Almanya
8	Nanodrop spektrofotometre	Fisher Scientific	ABD
9	Yazıcı	Epson	Endonezya
20	Quantus™ florometre	Promega	A.B.D.
10	Soğutmalı santrifüj	Hettich	Almanya
11	Buzdolabı	Concord	İtalya
12	SaCycler-96 Gerçek Zamanlı PCR sistemi	Sacace	İtalya
13	Hassas denge terazi	Sartorius	Almanya
14	UV- trans aydınlatıcı	Cleaver	İngiltere
15	VIDAS® SİSTEM	BioMerieux	Fransa
16	Vorteks çalkalayıcı	Stuart	Almanya
17	Su banyosu	Hibe	İngiltere
18	Distile su cihazı	GFL	Almanya

Çalışmada, Çizelge 3.2'de listelenen cam eşya ve tek kullanımlık malzemeler kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Bu çalışmada kullanılan cam eşyalar ve plastik ekipmanlar

No	Ekipman	Şirket	Ülke
1	Tek Kullanımlık Steril Şırıngalar, 5 ml	Yunus	Suriye
2	EDTA tüpleri	Afco	Ürdün
3	Ependrof Tüpler 1,5 ml	Biyobazik	Kanada
4	Jel Tüp10 ml	AL-Jawaher	Ürdün
5	Test Tüpü Rafı	Himedia	Hindistan
6	Uçlar 100,200,500,1000µl	BAG Sağlık Hizmetleri	Almanya

3.1.3 Ticari kitler ve kimyasal malzemeler

Çalışmada kullanılan ticari kitler Çizelge 3.3'te listelenmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan ticari kitler

No	Ekipman	Şirket	Köken
1	AccuZoL™	Bioneer	Kore
2	CMV IgG VIDAS test kiti	Biomereux	Fransa
3	CMV IgM VIDAS test kiti	Biomereux	Fransa
4	EasyScript® cDNA Sentez SuperMix	Tran	Çin
5	FavorPrep Total RNA Mini Kiti	Favorgen	Kore
7	PerfectStar® Green qPCR SuperMix	Tran	Çin
8	RealBest DNA CMV viral yük kiti	En iyisi	Rusça
9	RNA Quantus™ Florometre RNA sistemi	Promega	ABD
10	Viral Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti	Geneaid	Birleşik Krallık

Bu çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler Çizelge 3.4'te listelenmiştir.

Çizelge 3.4 Kimyasal malzemeler

No	Malzeme	Şirket	Köken
1	6X Yükleme boyası	Intron	Kore
2	Absolut etanol	BioMerieux	Fransa
3	Agaroz	Carl Roth	Almanya
4	Kloroform	Ocon Kimyasalları	İrlanda
5	DNA yükleme boyası	Promega	Kore
6	Etanol	Ocon Kimyasalları	İrlanda
7	Nükleazlardan arı su	Cyntol	Rusya
8	Merdiven100 bp	Promega	ABD
9	MikroRNA ve viral için primer	Makrojen	Kore
10	Kırmızı güvenli boyama solüsyonu	Intron	Kore
11	TAE tamponu10 X	Carl Roth	Almanya

3.2 Yöntem

3.2.1 VIDAS sistemi ile sitomegalovirüs IgM ve IgG tayini

VIDAS (Vitek Immune Diagnostic Assay System), BioMerieux tarafından geliştirilmiş otomatik bir immunoassay sistemidir. VIDAS sistemi; virüsler, bakteriler, parazitler ve çeşitli sağlık belirteçleri dahil olmak üzere çeşitli bulaşıcı hastalıkları hızlı ve hassas bir şekilde tespit etmek için tasarlanmıştır. VIDAS'ın prensibi, enzime bağlı immünosorbent testinden (ELISA) farklı olarak enzime bağlı floresan test (ELFA) teknolojisine dayanmaktadır.

a-Prensip: Test prensibi, iki aşamalı bir enzim immünoassay sandviç yöntemini floresan saptama (ELFA) ile birleştirir. Katı Faz Alıcısı (SPR), katı fazın yanı sıra tahlil için pipetleme cihazı olarak da hizmet vermektedir. Test için reaktifler kullanıma hazırdır ve mühürlü reaktif şeritlerinde önceden dağıtılmıştır. Tüm tahlil adımları cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ortamı SPR'ye birkaç kez girip çıkmaktadır. IgG ve romatoid faktör adsorpsiyonundan sonra, numune belirli bir süre boyunca SPR'nin içinde ve dışında çevrilmiştir. Numunede bulunan Anti-CMV IgM ve IgG antikorları SPR'nin iç kısmını kaplayan CMV antijenine bağlanır ve bağlanmayan bileşenler yıkama adımları sırasında elimine edilir. Alkalın fosfataz etiketli bir fare monoklonal anti-insan IgM antikoruna SPR'nin içine ve dışına çevrilir ve SPR üzerine kaplanmış insan anti-CMV'ye bağlanır. Son bir yıkama adımı ile bağlanmamış bileşenler giderilir. Son tespit adımı sırasında, substrat (4-metil-umbelliferil fosfat) SPR'nin içine ve dışına çevrilir. Konjugat enzim, bu substratın hidrolizini floresansı 450 nm'de ölçülen floresan bir ürüne (4-metil-umbelliferil fosfat) katalize eder. Testin sonunda sonuçlar, bellekte saklanan kalibrasyon eğrisine göre cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanmış ve ardından yazdırılmıştır.

b-VIDAS sisteminin dahil olduğu süreç:

1. Numune hazırlama ve inkübasyon: İlk adım; kan, serum, plazma, idrar veya diğer vücut sıvıları olabilen hasta numunesinin hazırlanmasını içerir. Bu numune toplanır ve doğru test sonuçlarını sağlamak için uygun şekilde işlenir. Hazırlanan numune VIDAS cihazına verilir ve burada bir inkübasyon adımından geçer. Inkübasyon sırasında numunedeki hedef analit (örn. antijen veya antikor) katı faz mikro veya boncuklar üzerine immobilize edilmiş spesifik antikora bağlanır.

2. Yıkama aşaması: İnkübasyondan sonra, katı fazlı mikro partiküller yıkanarak bağlanmamış maddeler uzaklaştırılır ve geriye sadece mikro partiküllere bağlı spesifik antijen-antikor kompleksleri kalır.

3. Enzim işaretli antikorlarla reaksiyon: VIDAS sistemi daha sonra hedef analizi tanıyabilen ve ona bağlanabilen enzim etiketli antikorları devreye sokar. Bu enzim etiketli antikorlar aynı zamanda mikro partiküller üzerinde immobilize edilmiş antijen-antikor kompleksleri ile de reaksiyona girer.

4. Yıkama adımı: Kısa bir inkübasyon süresinden sonra, bağlanmamış enzimle işaretlenmiş antikorlar, spesifik olmayan bağlanmaları gidermek için yıkanır.

5. Substrat eklenmesi: Sisteme enzime özgü bir substrat eklenir. Mikro partiküller üzerindeki enzim, substrat ile bir reaksiyonu katalize ederek floresan sinyalin üretilmesine neden olur.

6. Ölçüm: VIDAS cihazı enzimatik reaksiyonun yaydığı floresanı tespit eder ve ölçer. Floresan miktarı, hastanın numunesindeki hedef analitin konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

7. Sonuçların yorumlanması: Elde edilen floresan sinyaline dayanarak, VIDAS sistemi sonuçları yorumlar ve hedef analit için kantitatif veya kalitatif bir sonuç sağlar. Sonuçlar cihazın arayüzünde görüntülenir ve genellikle hızlı bir şekilde kullanılabilir. CMV IgM ve IgG için VIDAS tahliliyle elde edilen sonuçların yorumlanması, bu testlerin veya ölçtükleri antikorların farklı doğası nedeniyle önemli ölçüde farklılık gösterebilir:

A. VIDAS kullanılarak yapılan CMV IgG antikor testi, hastanın kan örneğinde sitomegalovirüse karşı IgG antikorlarının varlığını ve konsantrasyonunu ölçer. CMV IgG antikor testinin sonuçlarının yorumlanması, numuneden elde edilen floresan sinyaline dayanmaktadır. Test sonucu negatif, eşdeğer ve pozitif olmak üzere üç ana yorumda kategorize edilebilir:

1. **Negatif:** Test sonucu belirlenen kesme değerinin (genellikle < 4 AU/mL) altında bir floresan sinyali gösteriyorsa, CMV'ye karşı saptanabilir IgG antikorları olmadığını gösterir. Bu durum ya daha önce CMV'ye maruz kalınmadığını ya da tespit edilebilir düzeyde IgG antikorları üretmek için yetersiz bir bağışıklık tepkisi olduğunu gösterir.
2. **Eşdeğer:** Test sonucu belirli bir aralık içindeyse (tipik olarak ≥ 4 ila < 6 AU/mL), eşdeğer kabul edilir. Bu, floresan sinyalinin kesme değerine yakın olduğu ve CMV IgG antikorlarının varlığının belirsiz olduğu anlamına gelir. Bu gibi durumlarda, durumu doğrulamak için ek veya tekrar test yapılması önerilebilir.
3. **Pozitif:** Test sonucu belirlenen kesme değerine (genellikle ≥ 6 AU/mL) eşit veya üzerinde bir floresan sinyali gösteriyorsa, hastanın kanında CMV IgG antikorlarının varlığına işaret eder. Pozitif bir sonuç, bireyin geçmişte CMV'ye maruz kaldığını ve bağışıklık sisteminin virüse karşı spesifik IgG antikorları geliştirdiğini gösterir.

B. CMV IgM antikor testi, sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonlarını teşhis etmek için kullanılan bir diğer önemli serolojik testtir, Sonuçların yorumlanması aşağıdaki gibidir:

1. **Negatif:** Test sonucu 0,70'den düşükse negatif olarak kabul edilir ve hastanın kanında saptanabilir CMV IgM antikorları olmadığını gösterir. Bu, bireyin yakın zamanda birincil CMV enfeksiyonuna maruz kalmadığını gösterir.
2. **Eşdeğer:** Test sonucu $\geq 0,70$ ila $< 0,90$ aralığında ise, eşdeğer olarak kabul edilir. Bu, CMV IgM antikor seviyelerinin gri bir alanda olduğu ve enfeksiyonun mevcut olup olmadığının kesin olmadığı anlamına gelir. Sonucu doğrulamak için ek testler veya test tekrarı gerekebilir.
3. **Pozitif:** Test sonucu 0,90 veya daha yüksekse pozitif olarak kabul edilir ve hastanın kanında CMV IgM antikorlarının varlığına işaret eder. Bu, bireyin yeni veya aktif bir CMV enfeksiyonuna sahip olduğunu gösterir.

3.2.2 Kan örneğinden genomik DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA, İngiltere'den temin edilen Geneaid Genomik DNA Saflaştırma Kiti kullanılarak tam kandan ve şirket tarafından sağlanan aşağıdaki talimatlar izlenerek elde edilmiştir.

1. İlk adım, pıhtılaşmayı önlemek için bir EDTA tüpünde toplanan kan örneğinin hafifçe karıştırılmasını içerir. Pıhtılaşma DNA ekstraksiyon işleminin sonraki adımlarını etkileyebileceğinden önemlidir. Kan örneği iyice karıştırıldıktan sonra 300 µL kan 1,5 mL'lik bir mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

2. Bu adımda, kan örneğini içeren mikro santrifüj tüpüne 20 µL Proteinaz K eklenmiştir. Karıştırmadan önce Proteinaz K'ya ddH₂O (çift damıtılmış su) eklendiğinden emin olmak çok önemlidir. Proteinaz K eklendikten sonra tüp 10 saniye boyunca vortekslenerek düzgün karışım sağlanmıştır. Tüp daha sonra 60°C'de en az 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında tüpün her 3 dakikada bir ters çevrilmesi önerilir. Proteinaz K kan örneğinde bulunan proteinlerin parçalanmasına yardımcı olarak DNA ekstraksiyonunu kolaylaştırır.

3. Bu adımda, kan numunesi ve Proteinaz K karışımını içeren mikro santrifüj tüpüne 200 µL GB Tamponu eklenmiştir. Önceki adımlara benzer şekilde, 10 saniye boyunca vortekslleme GB Tamponunun numune ile düzgün şekilde karışmasını sağlar. Tüp daha sonra 70°C'de en az 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında tüpün her 3 dakikada bir ters çevrilmesi berrak bir örnek lizatının korunmasına yardımcı olur. Bu sırada, Elüsyon Tamponunun (numune başına 200 µL) daha sonra 7. Adımda DNA elüsyonunda kullanılmak üzere 70°C'ye kadar önceden ısıtılması gerekmektedir.

4. İki yüz mikrolitre mutlak etanol eklenerek ve kuvvetlice çalkalanarak hemen karıştırılmıştır. Ardından GD Kolonu 2 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş, karışım GD Kolonuna aktarılmış ve 2 dakika boyunca 14-16.000 x g'de santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası sıvı içeren 2 mL'lik toplama tüpü atılmış ve ardından GD Kolonu yeni bir 2 mL'lik tüpe yerleştirilmiştir.

5. GD Kolonuna 400 mikrolitre W1 Tamponu eklenmiş ve 14-16.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiştir; sıvı atılmış ve ardından GD Kolonu 2 mL'lik toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.

6. GD Kolonuna 600 mikrolitre Yıkama Tamponu (etanollü) eklenmiş ve ardından 14-16.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiş, sıvı atılmış ve GD Kolonu tekrar 2 mL toplama tüpüne yerleştirilmiş ve kolon matrisini kurutmak için 14-16.000 x g'de 3 dakika tekrar santrifüj edilmiştir.

7. Kurutulmuş GD Kolonu temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve önceden ısıtılmış 100 µL Elüsyon Tamponu kolon matrisinin merkezine yerleştirilmiş, ardından Elüsyon Tamponunun tamamen emilmesine izin vermek için en az 3 dakika bekletilmiş ve saflaştırılmış DNA'yı elüe etmek için 30 saniye boyunca 14-16.000 x g'de santrifüj edilmiştir.

8. DNA, CMV viral yük ölçümü ve dizileme reaksiyonu için -20°C'de dondurularak saklanmıştır.

3.2.3 DNA saflığının ve konsantrasyonunun tahmini

Tüm numunelerin DNA konsantrasyonu, konsantrasyon tespiti (mg/µL) için ekstrakte edilen DNA'nın (1 µL) yerleştirilmesiyle Nanodrop spektrofotometresi kullanılarak değerlendirilmiş ve numune proteininin safsızlığını tespit etmek için optik yoğunluk (OD) oranına (260/280) dikkat edilerek ölçüm yapılmıştır.

3.2.4 Real Time-PCR ile CMV viral yük tayini

1. Test ve kontrol numunelerini sayılarak (kalitatif test için 1 negatif kontrol-NC ve 1 pozitif kontrol-PC ve kantitatif test için 1 CN ve 1 CP) tüpler hazırlanmıştır.
2. Tüpler, her bir test ve kontrol numunesi için Hızlı Moleküler Yöntem (tüpler) ile etiketlenmiştir (etiketler, optik film temiz kalacak şekilde tüplerin yan tarafına uygulanmalıdır).
3. Filtreli yeni bir pipet ucu kullanılarak her tüpe 50 µL ekstrakte edilmiş DNA çözeltisi eklenmiştir. Tüpler daha sonra optik kalitede PCR filmi kullanılarak sıkıca kapatılmıştır. (PCR plakası plaka çalkalayıcı üzerinde 1200-1800 rpm'de en az 1 dakika boyunca çalkalanmıştır).
4. Tüpler gerçek zamanlı (real time) PCR cihazına yerleştirilmiştir.
5. Gerçek zamanlı PCR döngüleyici programı aşağıdaki gibi belirlenmiştir:
 - a- Aşama 1: 50 °C - 2 dakika.
 - b- Aşama 2: 95 °C - 2 dakika.
 - c- Aşama 3: 50 döngü (94 °C - 10 sn; 60 °C - 20 sn).
 - d- Floresanın 60 °C'de ölçümü.
 - e-
6. Algılama kanallarını seçilmiştir:
 - a- FAM kanalında IC (internal kontrol) DNA'sının amplifikasyon sinyalini tespit eder.
 - b- ROX kanalında CMV DNA'sının amplifikasyon sinyali tespit edilir.
7. Program çalıştırılmıştır.
8. CMV DNA miktar tayini yapılmıştır: Hesaplanan CMV DNA konsantrasyonu 300 ila 10^8 IU CMV DNA/mL aralığındaysa sonuç pozitif olarak kabul edilmiş ve CMV DNA konsantrasyonu IU/mL cinsinden belirtilmiştir. Hesaplanan CMV DNA konsantrasyonu

300 IU/mL'den az ise sonuç pozitif, "ROX" kanalındaki Ct (döngü eşiği) 40'ın üzerindeyse veya belirlenememişse numune negatif olarak kabul edilmiştir

3.2.5 Primerlerin sulandırılması ve seyreltilmesi

Çizelge 3.5'de bildirilen primerlerin çalışma stoğunu elde etmek için tekrar kullanılacak bir ana stok elde etmek üzere her bir primere nükleazlardan ari su eklenmiştir. Primerlerin sulandırılması ve seyreltilmesi için aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. Kapaklar açılmadan önce liyofilize primerleri içeren tüpler kısa süreli spinlenmiştir.
2. Nükleazlardan ari suyu, 100 Pico mol/ μ L (Ana Stok) elde etmek için üreticinin yönergelerine göre tüplere eklenmiş ve tüpler vortekslenmiştir.
3. Her bir primer stoğundan 10 μ L'lik bir hacim, 90 μ L steril, nükleaz içermeyen su içeren 1,5 mL'lik bir Eppendorf tüpüne aktararak çalışma stoğu hazırlanmıştır.
4. Ana stok ve çalışma stoğu -20 °C'de saklanmıştır. Çalışma stoğu, PCR'da kullanılmadan önce buz üzerinde çözdürülmüş ve vortekslenmiş ve ardından tekrar -20 °C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.5 Bu çalışmada kullanılan primerlerin dizilimi

Primer	Sıra	Primer dizisi (5' - 3')	Tm (°C)	GC (%)	Ürün boyutu (bp)
Glikoprotein g	F	TCTGCCAAAATGACCGCTACT	60.00	47.62	418
	R	ACCAGGCTTCTGCGATTTGT	60.25	50.0	

* Primer referansı (bu çalışma tarafından tasarlanmıştır)

3.2.6 PCR optimizasyonu

PCR optimizasyonu Çizelge 3.6'daki bileşenler ve Çizelge 3.7'deki ısısal döngü koşulları denenerek ile yapılmıştır.

Çizelge 3.6 Her optimizasyon süreci için başlangıç PCR reaksiyon bileşenleri konsantrasyonu

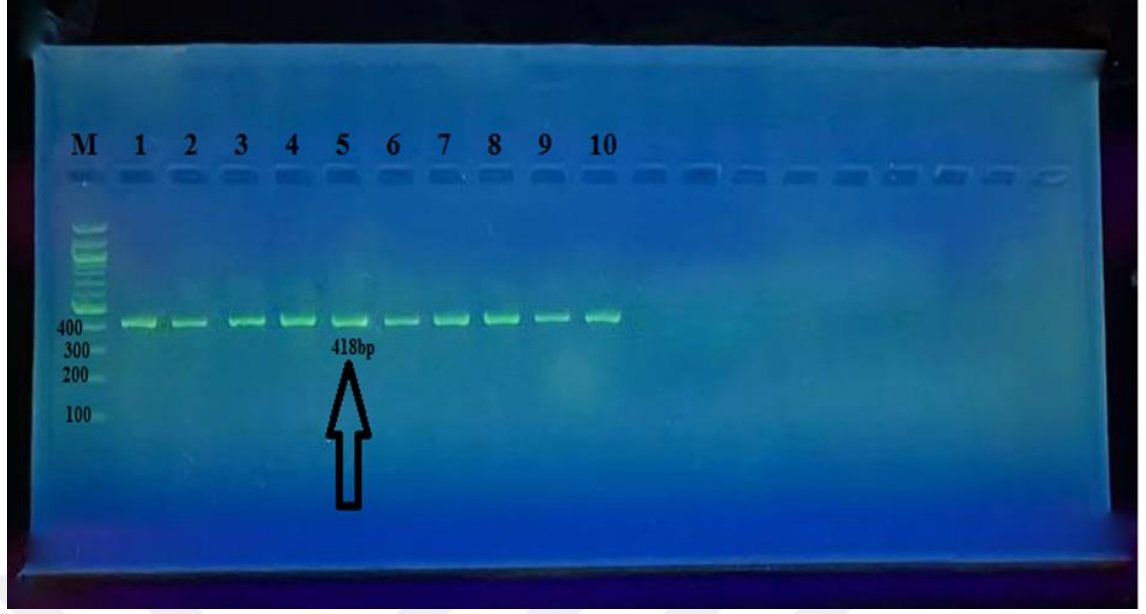
Bileşen	25 µL (Nihai hacim)
Ana karışım	12.5 µL
İleri (F) primer	10 pikomol/µL (1 µL)
Ters (R) primer	10 pikomol/µL (1 µL)
DNA	5 µL
Nükleaz içermeyen su	5,5 µL
Toplam	25 µL

Çizelge 3.7 Isısal döngü koşulları

	Aşama	Tm (°C)	Zaman	Döngü sayısı
1	İlk Denatürasyon	94°C	30 dakika	1 döngü
2	Denatürasyon -2	94°C	5 saniye	45 döngü
3	Bağlanma	60°C	35 saniye	
4	Uzama-1	60°C	35 saniye	
5	Uzama-2	72°C	15 dakika	1döngü

3.2.7 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel 100 mL 1x TAE tamponuna 2 g agaroz eklenerek %2'lik hazırlanmıştır. Çözelti, tüm jel partikülleri çözülene kadar su banyosunda kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Çözelti 50-60° C arasında soğumaya bırakılmış ve 0,3µg/mL Red safe (kırmızı güvenli) boya çözeltisi ile karıştırılmıştır. Bu boya agaroz jellerde DNA'ya bağlandığında yeşil floresan yaymaktadır. Döküm tepsisinin uçları iki kat bantla kapatılmıştır. Tarak, DNA örneğinin yüklenmesi için kullanılan kuyuların oluşturulması için tepsinin bir ucuna sabitlenmiş, ardından agaroz tepsiye hafifçe sürülmüş ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır. Tarak daha sonra yavaşça tepside çıkarılmıştır. Tepsi, jel yüzeyini kaplayan (1X) TAE tamponu ile doldurulmuş bir elektroforez tankına yerleştirilerek 5 µL DNA örneği mikropipet ile agaroz jeldeki kuyucuklara nazikçe aktarılmıştır. PCR ürünlerinin DNA bantlarının boyutunu tahmini olarak ölçmek için bir kuyucuğa 5 µL DNA merdiveni (50-1500 bp) eklenmiştir. Agaroz jel elektroforezi 70V, 65Amp'de 1 saat sürede tamamlanmıştır. Bant 320 nanometre dalga boyunda bir UV ışık kutusu (UV trans aydınlatıcı) ile gözlenmiş ve elektronik kamera sistemi ile fotoğraflanmıştır. Bu çalışmada aranan bandı (418 baz çifti-bp) veren PCR ürünlerinin, jel elektroforezi tamamlandıktan sonraki jel görüntüsü şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 M: DNA merdiveni, 1-10: PCR ürünleri (bant boyutu 418 bp)

3.2.8 RNA ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu AccuZol™ reaktif protokolüne göre yapılmıştır. İlk adım numune lizizidir. Bu adımda numune süspansiyonuna bir hacim AccuZol™ reaktif eklenir. AccuZol™ reaktifinin numuneye oranı 3:1'dir (her 250 µL numune için 750 µL AccuZol™). Numunedeki hücreler daha sonra süspansiyon bir pipetten birkaç kez geçirilerek veya vortekslenerek lize edilir. Bu parçalama adımı hücre membranlarını bozar ve RNA dahil olmak üzere hücresel bileşenleri serbest bırakır. Numune parçalandıktan sonra, bir sonraki adım üç fazlı ayırmadır. Bu süreçte yer alan adımlar aşağıdaki gibidir:

1. 1 mL AccuZol™ başına 200 µL kloroform eklenmiştir: Bu adımda AccuZol™ reaktifine belirli bir oranda kloroform eklenmiştir. Kloroformun amacı santrifüjleme sırasında farklı fazların ayrılmasını kolaylaştırmaktır.
2. 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalanmıştır: Kloroform eklendikten sonra karışım kısa bir süre boyunca kuvvetlice çalkalanmıştır. Bu çalkalama bileşenlerin iyice karışmasını sağlamaya yardımcı olur.

3. Karışım 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir: Çalkalama adımının ardından karışım belirli bir süre buz üzerinde inkübe edilmiştir. Karışımın soğutulması RNA'nın stabilize edilmesine ve bozulmasının önlenmesine yardımcı olur.
4. 4°C'de 15 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüjlenmiştir: İnkübasyon adımından sonra karışım belirli koşullarda santrifüj işlemine tabi tutulur. Santrifüjleme, bileşenleri yoğunluklarına göre ayırır ve daha ağır bileşenler dibe çöker.
5. Alt organik faz, interfaz ve üst sulu faza ayırma: Santrifüjleme sonucunda karışım üç farklı faza ayrılır. Kloroformun varlığı nedeniyle genellikle yeşil renkli olan alt faz, proteinler ve lipitler gibi organik bileşikler içerir. Ara faz, alt organik faz ile üst sulu faz arasında yer alır ve bazı kalıntı kirleticiler içerir. Üst sulu faz renksizdir ve RNA içerir.
6. Sulu faz yeni bir 1,5 mL'lik tüpe aktarılmıştır: Bu son adımda RNA içeren sulu faz, diğer fazlardan kaynaklanabilecek herhangi bir kontaminasyondan kaçınarak dikkatlice yeni bir tüpe aktarılır.
7. Daha sonra RNA çökeltme aşamasına geçilir. RNA çökeltme, RNA örneğine eşit hacimde izopropil alkol eklenmesidir. İzopropil alkol bu işlemde yaygın olarak kullanılır çünkü RNA moleküllerinin çözüldüğüden çökmesine neden olur. İzopropil alkol ilavesi su molekülleri ve RNA arasındaki hidrojen bağına bozarak bir çökelti oluşturur. İzopropil alkol eklendikten sonra, iyice karışmasını sağlamak için tüp 4-5 kez ters çevrilir. Bu adım, tüm RNA moleküllerinin izopropil alkolle temas etmesini sağlayarak etkili çökelmeyi teşvik eder. Karıştırmanın ardından tüp -20°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilir. Bu düşük sıcaklıkta inkübasyon RNA moleküllerinin stabilize edilmesine yardımcı olur ve çökelmelerini kolaylaştırır. İnkübasyondan sonra tüp 4°C'de 10 dakika boyunca yüksek hızda (12.000 rpm) santrifüjlenir. Santrifüjleme, daha ağır RNA moleküllerinin tüpün dibinde çökmesine neden olarak bir pelet oluşturur. Diğer biyomolekülleri ve safsızlıkları içeren süpernatant, peleti bozmadan dikkatlice çıkarılabilir.

RNA çökeltmesinden sonraki adım RNA peletinin etanol ile yıkanmasını içerir. Etanol genellikle yıkama maddesi olarak kullanılır çünkü artık kirleticilerin ve safsızlıkların giderilmesine yardımcı olur. Peleti yıkamak için tüpe 1 mL %80 etanol eklenir ve karışım

ters çevrilerek veya vorteksenerek iyice karıştırılır. Tüp 4°C'de 5 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüjleme, etanolün ve RNA peletinden kalan safsızlıkların giderilmesine yardımcı olur. Santrifüjlemeden sonra, süpernatant dikkatlice çıkarılır ve geride RNA peleti bırakılır. Pelet daha sonra etanol kalıntılarını gidermek için havada kurutulur. Havayla kurutma, tüpü bir laminar akış kabuğunda açık bırakarak veya bir vakum yoğunlaştırıcı kullanarak gerçekleştirilebilir. RNA'nın kontaminasyonunu ve bozulmasını önlemek için peletin tamamen kurummasını sağlamak önemlidir. RNA çökeltmesinden sonraki adım, kurutulmuş RNA peletinin çözünürleştirilmesidir. İki yaygın yöntem RNA'nın RNaz içermeyen suda çözülmesi veya çözeltinin bir pipet ucundan geçirilmesidir. İlk yöntemde RNA peleti 50 µL RNaz içermeyen suda çözülür. İzole edilen RNA'nın bozulmasını önlemek için suda ribonükleaz (RNA'yı bozan enzimler) bulunmamalıdır. Alternatif olarak, çözeltiyi bir pipet ucundan birkaç kez geçirmek peletin parçalanmasına yardımcı olabilir ve çözünmesini kolaylaştırabilir. Çözünmeden sonra, çözeltinin 10 dakika boyunca 55 ila 60°C'de inkübe edilmesi çözünürleşmeye daha fazla yardımcı olabilir.

3.2.9 RNA konsantrasyonu ve saflığının kontrolü

RNA konsantrasyonu ve saflığının kontrolü QuantiFluor® RNA Sistemi ile yapılmıştır. Sistemde bulunan floresan RNA bağlayıcı boya (492 nmEx/540 nmEm), yüksek oranda saflaştırılmış numunelerde eser düzeydeki RNA'nın bile hassas bir şekilde ölçülmesini sağlar. Kit içeriği Çizelge 3.8'de listelenmiştir.

Çizelge 3.8 QuantiFluor® RNA Sistemi kitinin bileşenleri

Ürün	Boyut	Miktar	Bileşen	Konsantrasyon
QuantiFluor® RNA Sistemi	1mL	25 mL	20X TE Tampon (pH 7,5)	-
		1 mL	QuantiFluor® RNA Boyası	-
		100 µg	RNA Standardı	100 µg/mL

Quantus™ Florometre, beş numunedan oluşan rastgele bir örnekten miRNA konsantrasyonu ve saflık ölçümleri kullanılarak kalibre edilmiştir. Bu amaçla önce 1X TE tamponu yapmak için, 20X TE tamponu (pH 7.5) nükleaz içermeyen su ile

seyreltilerek 1X elde edilmiştir. Örneğin, 4 mL 1X TE tamponu yapmak için 200 µL 20X TE tamponu 4 mL nükleaz içermeyen su ile birleştirilmiştir. QuantiFluor® Boyasının 1X TE tamponundaki çalışma çözeltisi 3,990 µL nihai hacme seyreltilmiş ve 10 µL QuantiFluor® boyası eklenmiştir. Referans DNA veya RNA standardı 0,5 mL'lik bir PCR tüpünde sentezlenmiştir. Talimat kılavuzları takip edilerek 200 µL çalışma reaktifine 5 µL standart ve numune eklenmiştir. Blank tüpü sadece 200 µL çalışma reaktifi eklenerek hazırlanmıştır. Karışım yavaşça pipetlenerek üç kez karıştırılmış, tüpler 10 saniye boyunca yüksek ayarda vorteks ile karıştırılmış ve ışıktan korunarak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. RNA, cihaz ayarına bağlı olarak ölçülmüş ve konsantrasyon µL başına ng olarak kaydedilmiştir.

3.2.10 cDNA (tamamlayıcı DNA) sentezi

Bu yöntemde tüm miRNA'ların cDNA sentezi için evrensel kök döngü primeri (USTLP) kullanılmıştır. cDNA sentezinin gerçekleştirilmesinde kullanılan bileşenler Çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9 cDNA için reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Miktar
Kök lop (USTLP)	1 µL
2×ES Reaksiyon Karışımı	10 µL
Easy Script ®RT/RI Enzim Karışımı	1 µL
Elüe edilmiş mRNA	5 µL
RNaz içermeyen Su	3 µL
Toplam	20 µL

Her numune için yeni bir steril 0,2'lik tüp hazırlanarak Çizelge 3.9'daki bileşenler eklenmiştir. Karışım 65°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon iyice karıştırılmış ve PCR tüplerinin dibindeki çözeltileri toplamak için kısa bir süre santrifüj edilmiş ve daha sonra ışıktan korunarak buz üzerinde saklanmıştır. Hazırlık tamamlandıktan sonra tüpler Çizelge 3.10'da gösterildiği gibi programlanmış olan ısısal döngü cihazına yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.10 cDNA için ısısal döngü koşulları

qPCR Adımları	Sıcaklık.	Zaman	Döngü(ler)
İlk aktivasyon	95°C	1 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15saniye	45
Bağlanma	60 °C	30 saniye	45
Extension	72°C	30 sec	45

3.2.11 qPCR (kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu)

Sağlanan protokol, SYBR Green adı verilen bir floresan boya kullanılarak tamamlayıcı belirli bir DNA dizisinin çoğaltılmasını ve miktarının belirlenmesini içerir. Protokol birkaç adımdan oluşur: primer ekleme, cDNA ekleme, karıştırma ve qPCR programını çalıştırma. İlk adımda, qPCR plakasının her bir kuyusuna bir μL ileri primer ve bir μL evrensel ters primer eklenir. Primerler, hedef DNA bölgesine tamamlayıcı kısa DNA dizileridir ve qPCR sırasında DNA amplifikasyonunu başlatmak için gereklidir. Daha sonra, Syb içeren qPCR plakasının her bir kuyucuğuna beş μL cDNA (tamamlayıcı DNA) eklenir. Cdna qPCR'de DNA amplifikasyonu için şablon görevi görür. Primerler ve cDNA eklendikten sonra, her bir kuyucuğun içeriği vorteks veya benzer bir yöntemle karıştırılarak uygun dağılım sağlanır. Karıştırıldıktan sonra plaka qPCR cihazına yüklenmiştir. qPCR programı DNA denatürasyonu, primer bağlanması ve DNA sentezi için birkaç sıcaklık adımına sahiptir. Sağlanan protokolde özetlenen program aşağıdaki gibidir:

- a. **İlk Denatürasyon:** Örnekler 95°C'de 5 dakika boyunca inkübe edilerek çift sarmallı DNA'nın tek sarmallı hale gelmesi sağlanır ve böylece daha sonra amplifikasyon gerçekleştirilebilir.

- b. Denatürasyon:** DNA ipliklerini ayırmak için sıcaklık kısa bir süre için (tipik olarak 5 saniye) 95°C'ye yükseltilir.
- c. Bağlanma:** Sıcaklık kısa bir süre için (tipik olarak 5 saniye) 55°C'ye düşürülerek primerlerin tek sarmallı DNA şablonu üzerindeki tamamlayıcı dizilerine spesifik olarak bağlanmaları sağlanır.
- d. Uzatma ve Floresan Tespiti:** DNA polimeraz enziminin primerleri uzatmasına ve yeni DNA ipliklerini sentezlemesine izin vermek için sıcaklık DNA sentezi için uygun bir seviyeye (genellikle 72°C) yükseltilir. Bu adım sırasında Sybr Green boyası yeni sentezlenen DNA'ya karışarak floresan oluşturur.
- e. Döngü:** Hedef DNA'yı üssel olarak çoğaltmak için b-d adımları belirli sayıda döngü (bu protokolda 40 döngü) boyunca tekrarlanır. Her döngü mevcut DNA miktarını iki katına çıkararak floresanda önemli bir artışa neden oluşturur.
- f. Son Uzatma:** Döngüden sonra, kalan tamamlanmamış DNA ipliklerinin tamamen uzatılmasını sağlamak için 72°C'de 1 dakika boyunca son bir uzatma adımı gerçekleştirilir. Son olarak, daha fazla analiz veya depolama öncesinde numunelerin soğumasını sağlamak için sıcaklık 1 dakika süreyle 25°C'ye düşürülür.

3.2.12 Nükleotid dizileme reaksiyonu öncesinde kullanılan primerler ve PCR

Bu çalışmada nükleotid dizileme reaksiyonuna hazırlık için kullanılan primerler Çizelge 3.11'de listelenmiştir. Primerler ücretsiz mirbase primer tasarlama aracı kullanılarak tasarlanmıştır (Mirbase 2024a, Mirbase 2024b, Mirbase 2024c, Mirbase 2024d).

Çizelge 3.11 MikroRNA dizilerinin eldesi için kullanılan primerler

Primer	Sıra	Primer dizisi (5' - 3')	Tm(°C)	GC%
hcmv-miR-UL22A-3P	Kök Döngü	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACTGGATACGACCTACAA	75.8	54
	F	CGCGCCTCACCAGAATGC	64.3	67
hcmv-miR-UL148D	Kök Döngü	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACTGGATACGACCGGTGA	78.3	58
	F	CACGCATCGTCCTCCCCTT	66	63
hcmv-miR-UL36-3P	Kök Döngü	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACTGGATACGACGCACGT	77.5	58
	F	CGCGCGTTTCCAGGTGTTT	63.3	58
hcmv-miR-UL36-5p	Kök Döngü	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTCGCACTGGATACGACTCTTTC	75.3	54
	F	CGCGCGTCGTTGAAGACA	62.5	61
Evrensel R		CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA	68.2	65
U6	F	CACTAGGCGCTCACTGTTCTC	62	57
	R	AATCCGTTGACTCCGACCTT	61.4	50

Primer referansı (bu çalışmaya göre tasarım)

PCR optimizasyonu, Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13'te en iyi bağlanma sıcaklığını ve en iyi amplifikasyon döngüsü sayısını tespit etmek için birkaç deneme ile yapılmıştır.

Çizelge 3.12 Her optimizasyon süreci için başlangıç PCR reaksiyon bileşenleri konsantrasyonu

Bileşen	20µL (Nihai hacim)
2xPerfectStar® Green qPCR süper Karışımı	10 µL
İleri primer	10 pikomol/µL (1 µL)
Evrensel Ters primer	10 pikomol/µL (1 µL)
cDNA	5 µL
Nükleaz içermeyen su	3 µL
Toplam	20 µL

Çizelge 3.13 MikroRNA'ları tespit etmek için optimum ısısal döngü koşulları

No.	Aşama	Tm (°C)	Zaman	Döngü sayısı
1	İlk Denatürasyon	94°C	10 dakika	1 döngü
2	Denatürasyon -2	94°C	20 saniye	45 döngü
3	Bağlanma	60°C	30 saniye	
4	Uzama-1	72°C	30 saniye	
5	Uzama-2	72°C	10 dakika	1 döngü

3.2.13 Nükleotid dizileme reaksiyonu ve analizler

PCR ampliconları, hizmet satın alınarak Macrogen Inc. Geumchen, Seul, Güney Kore’de dizilenmiştir. Sadece ABI (Applied Biosystem) sekans dosyalarından elde edilen net kromatograflar daha fazla analiz edilerek, açıklama ve varyasyonların PCR veya sekanslama artefaktlarından kaynaklanmadığından emin olunmuştur. İncelenen viral örneklerin gözlenen nükleik asit dizileri ile alınan nükleik asit dizileri karşılaştırılarak, alınan PCR parçalarının sanal konumları ve diğer ayrıntıları tanımlanmıştır

Hedeflenen parçaların PCR ürünlerinin nükleotid dizi sonuçları, BioEdit Sekans Hizalama Editörü Yazılımı Sürüm 7.1 (DNASTAR, Madison, WI, ABD) kullanılarak referans veritabanındaki ilgili nükleotid dizilerden faydalanılarak düzenlenmiş, hizalanmış ve analiz edilmiştir. Dizilenen her numunede gözlenen varyasyonlar, PCR ampliconlarının yanı sıra referans genom içindeki karşılık gelen pozisyonlarında numaralandırılmıştır. Gözlenen nükleik asitler PCR ampliconlarında ve referans genom içindeki karşılık gelen pozisyonlarında numaralandırılmıştır. Viral diziler içinde tespit edilen her varyant SnapGene Viewer ver. 4.0.4 (<https://www.snapgene.com>) ile açıklanmıştır. Dizilenen her numunede gözlenen varyasyonlar, PCR ampliconlarının yanı sıra referans genom içindeki karşılık gelen pozisyonlarında numaralandırılmıştır. Hedeflenen proteinlerin amino asit dizileri protein veri bankasından alınmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Tanımlanan yanlış anlamlı varyantların etkisi, mutasyondan önce ve sonra proteinin 3D yapısında ayrıca değerlendirilmiştir. NCBI-protein web sunucusu, tüm viral proteinin amino asit dizilerini elde etmek için kullanılmıştır. Daha sonra, HCMV glikoprotein B değişken bölgesinin 3D yapısı, tanımlanan varyantların proteinin üçüncül yapısı üzerindeki konumunu değerlendirmek için oluşturulmuştur. Doğal dizilerin 3D yapısı Swiss model web sunucusu tarafından oluşturulmuştur (Biasini vd. 2014). Mutant proteinler ise PyMOL aracı sürüm 7.0.1 (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC.) mutagenез betiği kullanılarak oluşturulmuştur. PyMOL aracı vasıtasıyla doğal ve mutant amino asit kalıntıları kırmızı çubuklar olarak gösterilmiş ve doğal protein ile mutant muadilleri için 3D yapılar görselleştirilerek karşılaştırılmıştır.

Daha sonra, tanımlanan varyantın protein yapısı ve işlevi üzerindeki etkisini değerlendirmek için HOPE tahmin aracı kullanılmıştır (Venselaar vd. 2010). Bu araç, 3D protein yapısı üzerindeki hesaplamalar, UniProt'taki sekans ek açıklamaları ve Reprof yazılımından tahminler gibi çeşitli kaynaklardan yapısal verileri toplar. HOPE, belirli bir mutasyonun protein yapısı üzerindeki etkisini değerlendirmek için bu ayrıntıları entegre eder. Araç, varyantın neden olduğu yapısal değişiklikleri, doğal halindeki proteininkilerle karşılaştırarak tahmin eder. HOPE, kapsamlı sonuçlar, görseller ve animasyonlar sunan kullanıcı dostu bir çevrimiçi hizmettir ve <https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/> adresinden erişilebilir. İncelenen ve analiz edilen tüm nükleotid diziler GenBank erişim numarası elde etmek üzere NCBI Bankit portalına gönderilmiş ve portal tarafından açıklanan tüm talimatlar sunucu tarafından açıklandığı şekilde takip edilmiştir (Benson vd. 2012).

Ayrıca komşu birleştirme (neighbor joining) protokolüne göre spesifik bir kapsamlı ağaç oluşturulmuştur. Gözlenen varyantlar NCBI-BLASTn sunucusu kullanılarak komşu homolog referans dizileri ile karşılaştırılmıştır (Zhang vd. 2000, Ye vd. 2012). Ardından, gözlemlenen varyantı da içeren tam kapsamlı bir ağaç, komşu birleştirme yöntemiyle oluşturulmuş ve iTOL takımı kullanılarak dikdörtgen bir kladogram olarak görselleştirilmiştir (Letunic and Bork 2019). Kapsamlı ağaçtaki her bir birleşik viral kladın dizileri, birbirlerinden ayırt edilebilmeleri için uygun bir renkle renklendirilmiştir (Alwan vd. 2023).

3.2.14 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9.0 yazılımı ve SPSS istatistik yazılımı (sürüm 16.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. miRNA konsantrasyonları ortalamalar ve standart hatalar (Ortalama $\pm$ SEM) olarak verilirken, diğer klinik değişkenler Ortalama $\pm$ SD veya Medyan (çeyrekler arası aralık) olarak gösterilmiştir. Veri analizi, Ki-kare testi ve Pearson korelasyon matrisi analizleri dahil olmak üzere parametrik istatistiksel yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. P-değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Her miRNA ve CMV IgM, IgG antikorları ve CMV'ye karşı viral yük için bir alıcı işletim karakteristiği (ROC) eğrisi oluşturulmuştur. HCMV tanısı

için özgüllük ve duyarlılık, eğri altında kalan alan (AUC) değerleri ve %95 güven aralığı (CI) hesaplanarak belirlenmiştir (Cary 2012).

İfade (ΔCT) ΔCT , hedef genin (hcmv-miR-UL22A-3p, hcmv-miR-UL148D , hcmv-miR-UL36-3p ve hcmv-miR-UL36-5p) ve referans genin (U6 geni) eşik döngüsü (CT) değerindeki farkı temsil eder. Her gruptaki gen ifadesinin başlangıç seviyesini ölçer. $\Delta CT = Ct(\text{hedef}) - Ct(\text{U6 geni})$.

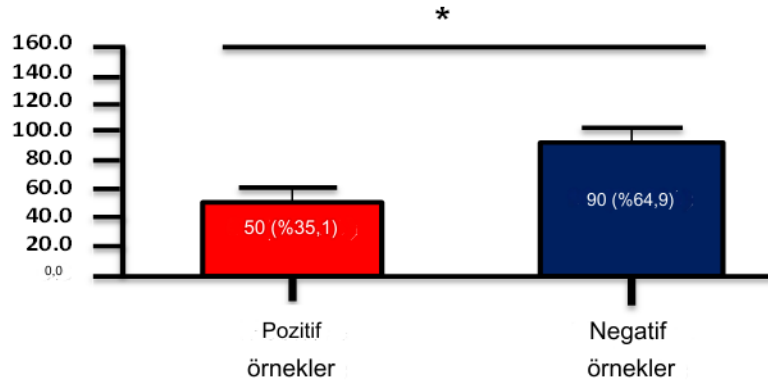
$\Delta\Delta CT$, Kontrol ve Hasta grupları arasındaki ΔCT değerlerindeki farktır. Referans gene göre iki grup arasında gen ifadesindeki değişikliği gösterir. $\Delta\Delta CT = \Delta CT - \text{ortalama } \Delta CT (\text{kontrol})$.

Kat değişimi, Hasta grubu ile Kontrol grubu arasındaki gen ifadesinin oranını temsil eder. Hasta grubunda gen ifadesinin kontrol grubuna kıyasla kaç kat arttığını (kat değişimi > 1) veya azaldığını (kat değişimi < 1) gösterir. $\text{kat değişimi} = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

4. BULGULAR

4.1 Düşük Yapan Kadınlar Arasında CMV'nin Görülme Sıklığı

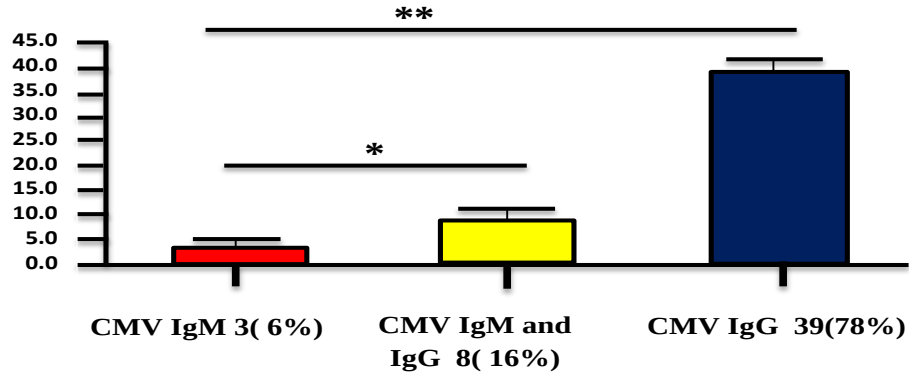
Bu vaka-kontrol çalışmasında, Şubat-Ağustos 2023 tarihleri arasında Irak Babil Kadın Doğum ve Çocuk Eğitim Hastanesi ile Al-Hashimiya Genel Hastanesi'nin kadın doğum ve jinekoloji bölümlerine başvuran düşük yapan kadınlardan 140 kan örneği toplanmıştır. düşük yapan kadınların yaş aralığı (18-41), yaş ortalaması ise (26,4) idi. Bu çalışma, Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, düşük yapan 140 hastadan 50'sinin (%35,1) CMV için seropozitif olduğunu, 90'ının (%64,9) ise CMV için seronegatif olduğunu ve iki grup arasında anlamlı bir fark olduğunu ($P<0,05$) ortaya koymuştur.



Şekil 4.1 Düşük yapan kadınlar arasında CMV prevalansı (*:Anlamlı ($P<0.05$))

4.2 Düşük yapan Kadınlarda CMV IgM ve IgG Sonuçları

Düşük yapan kadınlarda CMV IgM ve IgG için serolojik sonuçlar, şekil 4.2'de gösterildiği gibi, 3 (%6,0) örneğin CMV IgM için seropozitif olduğunu, 8 (%16,0) örneğin hem CMV IgM hem de IgG için seropozitif olduğunu ve 39 (%78,0) örneğin CMV IgG için seropozitif olduğunu ve oldukça anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir ($p<0,01$).



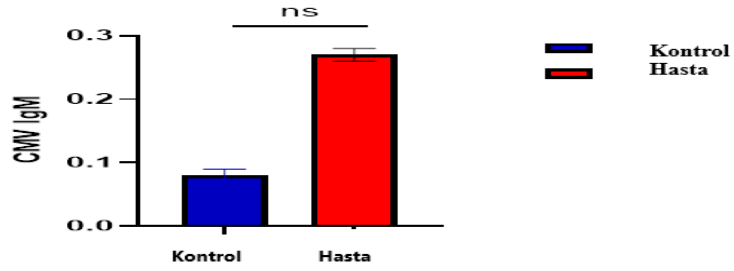
Şekil 4.2 Düşük yapan kadınlarda pozitif CMV IgM ve IgG sonuçları (*:Anlamlı ($P<0.05$); **: anlamlı ($P<0.01$))

Mevcut çalışmanın sonuçları, düşük yapan kadınların 11'inin (%22) CMV IgM pozitif olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi, düşük yapan kadın grubu ile kontrol grubu arasındaki P-değeri yatay ve dikey olarak sırasıyla (0.0001**, 0.0001**, 0.0001**, 0.0261*) oldukça anlamlı farklılıklar göstermiştir.

Çizelge 4.1 Çalışma gruplarının CMV-IgM pozitifliğine göre dağılımı.

Test		Kontrol (n=50)	CMV Seropozitif Hastalar (n=50)	P-değeri
CMV-IgM (%)	Pozitif (+)	0(0.00%)	11(22.00%)	0.0001**
	Negatif (-)	50(100%)	39(78.00%)	0.0261*
	P-değeri	0.0001 **	0.0001 **	---
	* ($P\leq 0,05$), ** ($P\leq 0,01$).			

Düşük yapan kadın grubunda ortalama CMV IgM seviyesinin (0,2792), kontrol grubunda ise (0,081) olduğunu ve iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur ($p>0,05$) (Çizelge 4.3).



Şekil 4.3 Çalışma gruplarındaki ortalama CMV IgM düzeyleri (NS: Anlamlı Değil)

Çizelge 4.2'deki sonuçlar, CMV IgM için en yüksek pozitiflik sayısı ve yüzdesinin (20-29) yaş grubunda 9 (%30) olduğunu ve diğer yaş gruplarıyla arasında oldukça anlamlı bir fark olduğunu ($p=0,0013^{**}$), CMV IgM için en düşük pozitiflik sayısı ve yüzdesinin ise (<20) yaş grubunda ve (30-39) yaş grubunda 1 (%2.0) ve (30-39) yaş grubunda, diğer yaş gruplarıyla oldukça anlamlı bir farkla ($p=0,029^*$, $p=0,0001^{**}$), sırasıyla (<20) yaş grubunda ve (>39) yaş grubunda CMV IgM için pozitiflik sayısı ve yüzdesinin oldukça anlamlı bir farkla ($p=0,0001^{**}$) 0(%0,0) olduğunu ortaya koymuştur. Düşük yapan kadın grubunun (pozitif) ve kontrol grubunun (negatif) yaşları arasındaki dikey P-değeri, sırasıyla oldukça anlamlı farklılıklar ($p=0.0011^{**}$, $p=0.001^{**}$) ortaya koymuştur.

Çizelge 4.2 CMV IgM pozitif olan kadınlarda yaş gruplarına göre dağılım

Yaş Gruplarına Göre CMV IgM Pozitif Toplam Örneklerin Ki-Kare Testleri							
IgM Yaş grupları	Pozitif		Negatif		Toplam		P.değeri
	no.	%	no.	%	no.	%	
< 20 Yıl	1	2	3	6	4	8%	0.029 *
20 - 29 Yıl	9	18	25	50	34	68%	0.0013**
30 - 39 Yıl	1	2	9	18	10	20%	0.0001**
> 39 Yıl	0	0	2	4	2	4%	0.0001**
Toplam	11	22	39	78	50	100%	---
P.değeri	0.0011**		0.001**				
*(P≤0.05), ** (P≤0.01)							

Çizelge 4.3'teki sonuçlar, kırsal bölgelerde yaşayan düşük yaşayan kadınlarda pozitif CMV IgM'in en yüksek sayıda ve yüzde olarak 9 (% 18) olduğunu ve bu farkın oldukça anlamlı olduğunu ($p=0.0001^{**}$) göstermiştir. Şehirlerde yaşayan düşük yaşayan kadınlarda ise pozitif CMV IgM'in en düşük sayıda ve yüzde olarak 2 (% 4) olduğunu ve bu farkın da oldukça anlamlı olduğunu ortaya koymuştur ($p=0.0001^{**}$). Kırsal ve kentsel bölgelerdeki seropozitif CMV IgM için pozitif ve negatif durumlar arasındaki p-değeri sırasıyla (0.0004^{**} , 0.0001^{**}) olarak bulunmuş ve bu fark oldukça anlamlıdır.

Çizelge 4.3 CMV IgM'si pozitif olan Düşük yapan kadınların ikamet yerine göre dağılımı

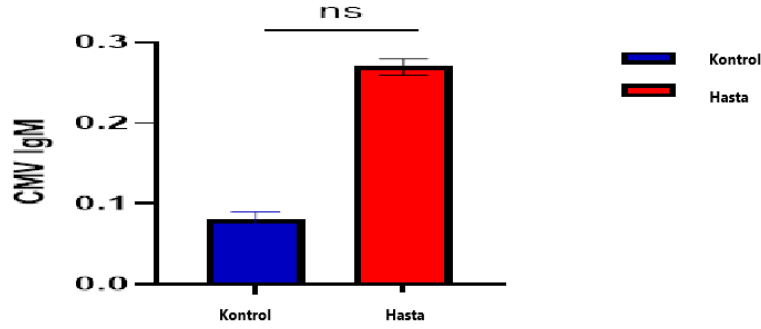
CMV IgM'si pozitif olan kadınların ikamet yerine göre yanlış sıralanmasına ilişkin ki-kare testi							
IgM Yerleşim	Pozitif		Negatif		Toplam		P-değeri
	No.	%	No.	%	No.	%	
Kırsal	9	18	39	78	48	96%	0.0001**
Kentsel	2	4	0	0	2	4 %	0.0001**
Toplam	11	22	39	78	50	100%	---
P-değeri	0.0004**		0.0001**		---		---
** (P≤0.01).							

Bu çalışmanın sonuçları, Düşük yapan kadınların 46'sının (%92) CMV IgG pozitif olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi, düşük yapan grup ile kontrol grubu arasındaki P-değeri yatay ve dikey olarak sırasıyla (0.0001^{**} , $0.0001^{**}0.0001^{**}$, 0.0001^{**}) oldukça anlamlı farklılıklar göstermiştir.

Çizelge 4.4 Çalışma gruplarının pozitif CMV-IgG'ye göre dağılımı

Test		Kontrol (n=50)	Hastalar (n=50)	P-değeri
CMV-IgG: (%)	Pozitif (+v)	0 (0.00%)	46 (92.00%)	0.0001 **
	Negatif (-)	50 (100%)	4 (8.00%)	0.0001 **
	P-değeri	0.0001 **	0.0001 **	---
** ($P \leq 0.01$).				

Düşük yapan kadın grubunda ortalama CMV IgG seviyesinin (98,10), kontrol grubunda ise (14,76) olduğunu ve iki grup arasında anlamlı bir fark olduğunu ortaya koymuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Çalışma gruplarında ortalama CMV IgG düzeyleri

Çizelge 4.5'teki sonuçlar, CMV IgG için en yüksek pozitiflik sayısı ve yüzdesinin 30(%60) ile (20-29) yaş grubunda olduğunu ve diğer yaş gruplarıyla arasında oldukça anlamlı bir fark olduğunu (0.0001**), CMV IgM için en düşük pozitiflik sayısı ve yüzdesinin ise 2(%4.0) ile (>39) yaş grubunda olduğunu ve diğer yaş gruplarıyla arasında oldukça anlamlı bir fark olduğunu ($p=0.0001^{**}$) göstermektedir. Düşük yapan kadın grubunun (pozitif) ve kontrol grubunun (negatif) yaşları arasındaki dikey P-değeri, sırasıyla oldukça anlamlı farklılıklar ortaya koymuştur ($p=0.0002^{**}$, $p=0.0001^{**}$).

Çizelge 4.5 CMV IgG'si pozitif olan Düşük yapan kadınların yaş gruplarına göre dağılımı

Yaş Gruplarına Göre CMV IgG Pozitif Toplam Örneklerin Ki-Kare Testleri							
IgG Yaş grupları	Pozitif		Negatif		Toplam		P-değeri
	no.	%	no.	%	No.	%	
< 20 Yıl	4	8	0	0	4	8%	0.0001**
20 - 29 Yıl	30	60	4	8	34	68%	0.0001**
30 - 39 Yıl	10	20	0	0	10	20%	0.0001**
> 39 Yıl	2	4	0	0	2	4%	0.0001**
Toplam	46	92	4	8	50	100%	---
P-değeri	0.0002**		0.0001**				
**(P≤0.01).							

Çizelge 4.6'daki sonuçlar, kırsal bölgelerde yaşayan düşük yaşayan kadınlarda pozitif CMV IgG'nin en yüksek sayıda ve yüzde olarak 33 (% 60) olduğunu ve bu farkın oldukça anlamlı olduğunu ($p=0.0001^{**}$) göstermiştir. Şehirlerde yaşayan düşük yaşayan

kadınlarda ise pozitif CMV IgG'nin en düşük sayıda ve yüzde olarak 12 (% 24) olduğunu ve bu farkın da oldukça anlamlı olduğunu ortaya koymuştur ($p=0.0001^{**}$). Kırsal ve kentsel bölgelerdeki seropozitif CMV IgG için pozitif ve negatif durumlar arasındaki p-değeri sırasıyla (0.0007^{**} , 0.0001^{**}) olarak bulunmuş ve bu fark oldukça anlamlıdır.

Çizelge 4.6 CMV IgG pozitif olan Düşük yapan kadınların ikamet yerine göre dağılımı

Ki-kare testi Pozitif CMV IgG'si olan kadınların dağılımları ikamet yeri.							
IgG Yerleşim	Pozitif		Negatif		Toplam		P.değeri
	no.	%	no.	%	no.	%	
Kırsal	33	66	5	10	38	76%	0.0001**
Kentsel	12	24	0	0	12	24%	0.0001**
Toplam	45	90	5	10	50	100%	---
P.değeri	0.0007**		0.0001**				
**(P≤0.01).							

4.3 Düşük Yapan Kadınların Düşük Yaptığı Aya ve Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

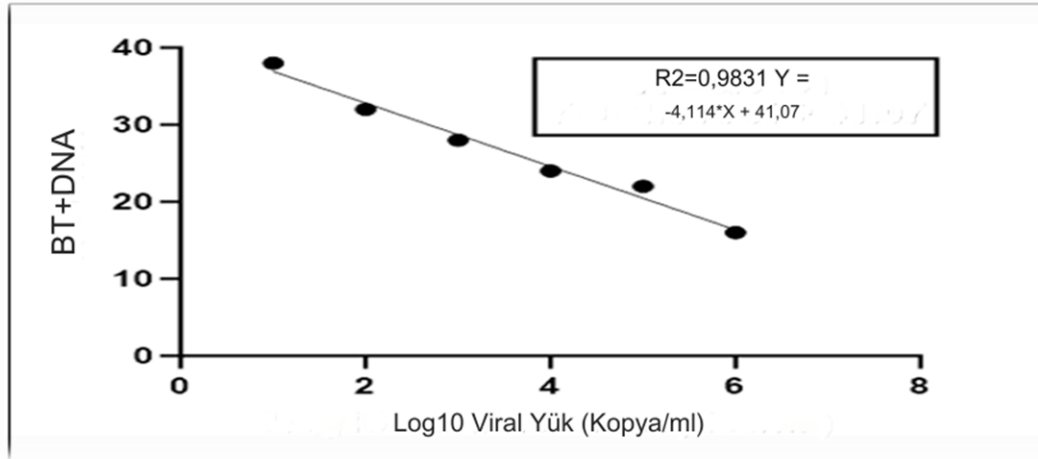
Çizelge 4.7'de en yüksek sayıda ve yüzdede 34 (% 68) düşük yaşayan kadının 20-29 yaş grubunda olduğunu ve bu farkın anlamlı olmadığını ($p=0.202$) göstermiştir. Bu yaş grubunda düşüklerin dağılım oranı, ilk ayda 3 (% 6), ikinci ayda 14 (% 28) ve üçüncü ayda 17 (%34) olarak belirlenmiştir. En düşük sayı ve yüzde ise 2 (% 4) ile >39 yaş grubunda olup, bu fark da anlamlı bulunmamıştır ($p=0.871$). Bu yaş grubundaki düşüklerin dağılım oranı, ilk ayda 0 (% 0), ikinci ayda 1 (% 2) ve üçüncü ayda 1 (% 2) olarak saptanmıştır. Yaş grupları ve düşüklerin ilk, ikinci ve üçüncü aylar arasındaki p-değerleri sırasıyla (0.0001^{**} , 0.0001 , 0.0001) olarak bulunmuş ve bu farklar oldukça anlamlıdır. Sonuçlar, yaş grupları (<20, 20-29, 30-39, >40) ve düşüklerin ilk üç ayında anlamlı bir fark bulunmadığını ($p= 0.202$, 0.119 , 0.198 , 0.871) göstermiştir.

Çizelge 4.7 Düşük yapan kadınların düşük yaptıkları aylara ve yaş gruplarına göre dağılımı

Kadınların düşük yaptıkları aylara ve yaşa göre ki-kare testleri									
Ay kürtajı Yaş grupları	İlk ay		İkinci ay		Üçüncü ay		Toplam		P.değeri
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
< 20 Yıl	0	0	2	4	3	6	5	10%	NS0202.
20 - 29 Yıl	3	6	14	28	17	34	34	68%	0,119 NS
30 - 39 Yıl	0	0	4	8	5	10	9	18%	0,198 NS
> 39 Yıl	0	0	1	2	1	2	2	4%	0,871 NS
Toplam	3	6	21	42	26	52	50	100%	---
P.değeri	0.0001**		0.0001**		0.0001**		---		
NS: Anlamlı Değil, ** (P≤0,01).									

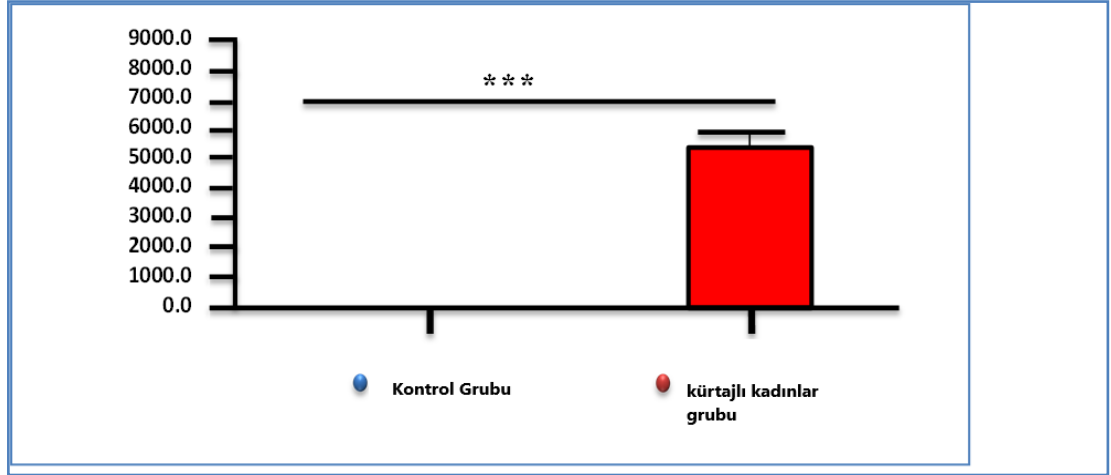
4.4 Real Time-PCR ile CMV için Viral Yük Sonuçları

Şekil 4.5 viral DNA miktarını belirlemek için kullanılan standart eğriyi göstermektedir. Bilinen miktarlarda viral DNA çoğaltılarak her numune için bir standart eğri elde edilmiştir. Ardışık altı dilüsyon (dilüsyon faktörü 1:10) 10^1 ila 10^6 kopya/reaksiyon içerecek şekilde hazırlanmıştır. Örneklerdeki viral DNA miktarları, Ct değerlerinin standart eğri üzerine çizilmesiyle elde edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Viral yük CMV için standart eğri RT-PCR

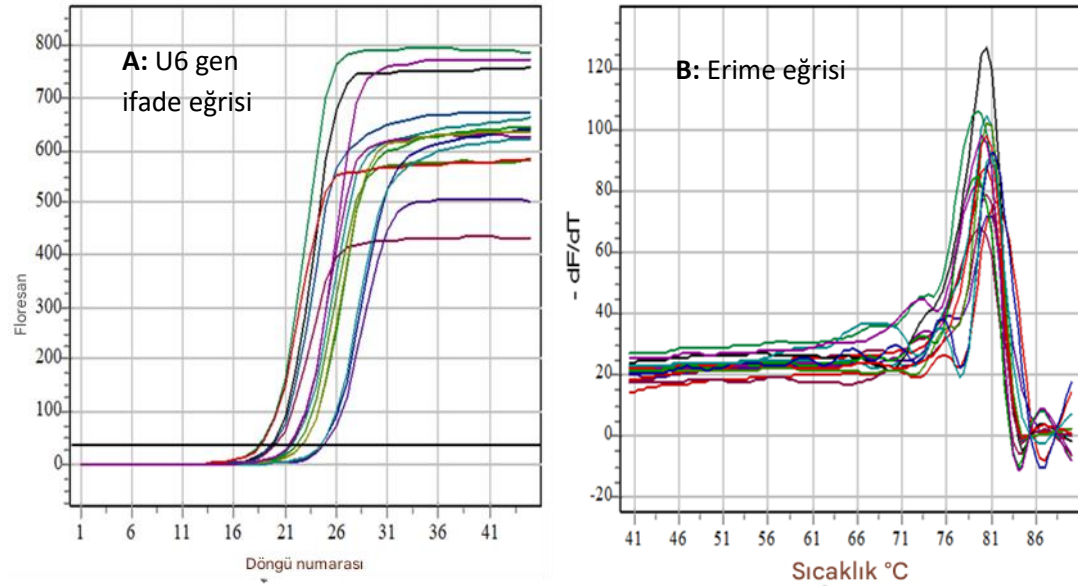
Düşük yapan kadınlarda ortalama viral yük CMV konsantrasyonunun (5431.92), kontrol grubunda ise (0.00) olduğunu ve iki grup arasında oldukça anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir ($p<0.001$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Çalışma gruplarında CMV viral yük konsantrasyonu

4.5 Mikro RNA'ların Gen İfadesi

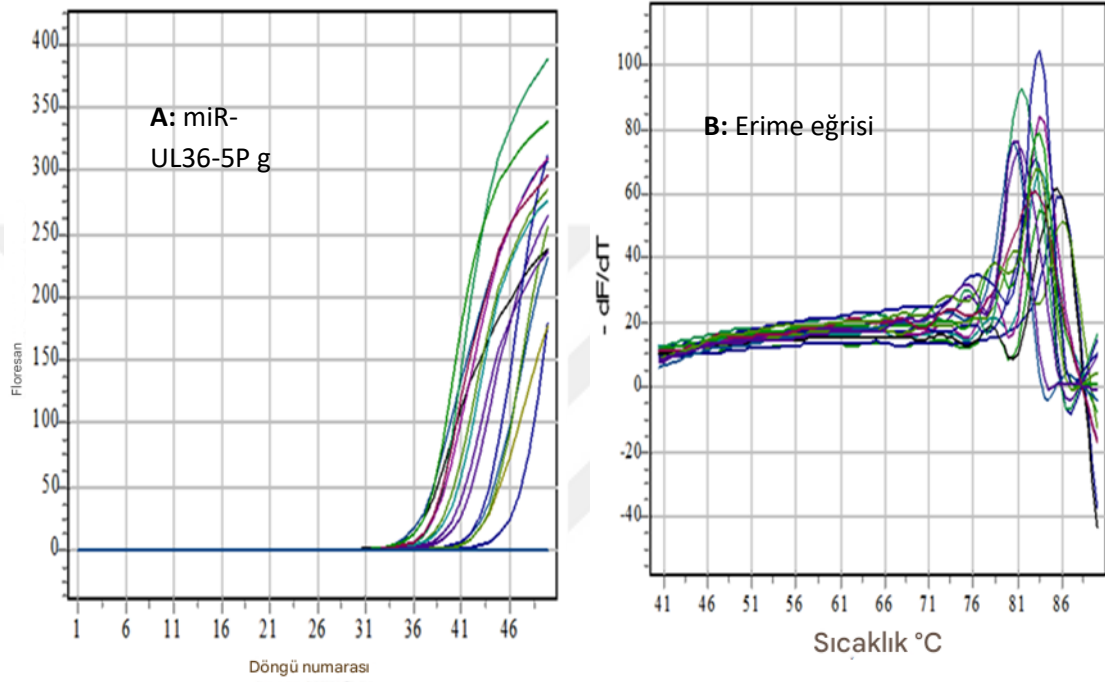
Housekeeping gen (U6 geni) ifadesinin seviyesine normalizasyondan sonra hedef mikroRNA'ları değerlendirmek için göreceli gen ifadesinin kullanıldığı housekeeping gen (U6 geni) ifadesini göstermektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 A: U6'nın gerçek zamanlı pcr analizinde eşik döngüsü (Ct) değerleri, B: RT-PCR'de U6'nın erime eğrisi

4.5.1 Çalışma gruplarında miR-UL36-5P geninin ifadesi

Real Time-PCR amplifikasyon programındaki göreceli gen ifadesi, üreticinin simülasyon programına göre değerlendirilen tüm gen ifadeleri için erime eğrisi analizi kullanılarak yapılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 A: miR-UL36-5P'nin Gerçek Zamanlı PCR Analizinde Eşik Döngüsü (Ct) değerleri, B: miR-UL36-5P'nin RT-PCR'da Erime Eğrisi

hcmv- miR-UL36-5P ekspresyonunun düşük yapan kadınlarda (3,11) kat değişiklik ve kontrol grubunda (1±0,0) olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, düşük yapan kadınlarda hcmv- miR-UL36-5P gen ifadesinin ortalama±SE (Thershod döngüsü) değerinin (33,51±5,6) olduğunu ve bu değer kontrol grubuna (35,78±4,6) kıyasla anlamlı olmayan bir farkla en yüksek ifade olduğunu ortaya koymuştur (P= 0,73NS). Sonuçlar ayrıca, düşük yapan kadınlar için ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerinin (3.011±0.78) kontrol grubuna (1.23±0) kıyasla anlamlı bir farkla (p=0.033*) daha yüksek olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.8).

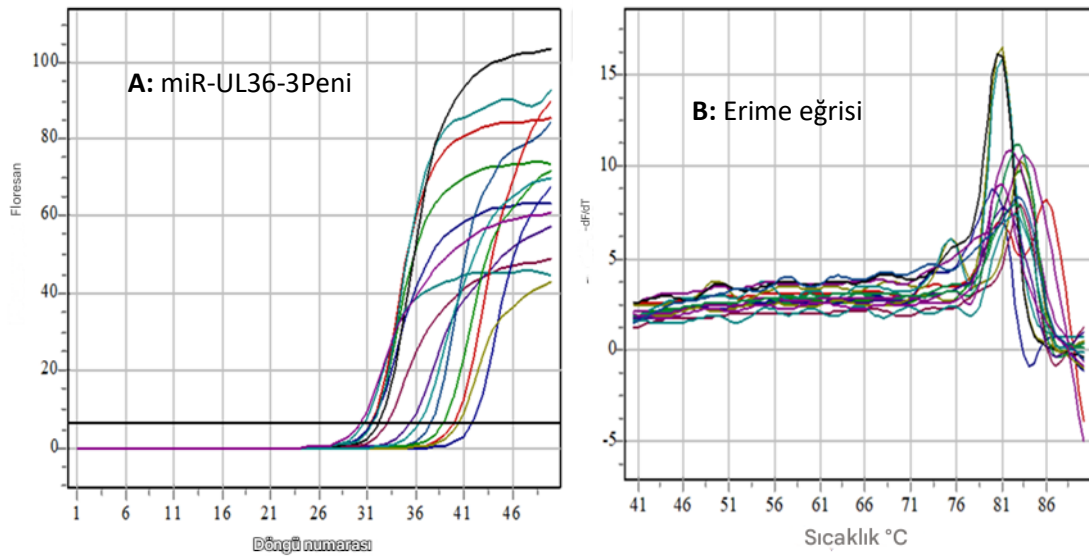
Çizelge 4.8 Düşük yapan kadın grubu ile kontrol grubu arasında karşılaştırılan hcmv-mir-UL36-5P ekspresyon seviyesi

	Ortalama±SE					
Gruplar	U6 CT	CT	ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}	Kat değişimi
Kontrol	20.8±2.7	35.78±4.6	14.68±2.2	-0.02±0	1.23±0	1±0.0
Hasta	20.28±2.1	33.51±5.6	13.526±3.2	-0.184±0.01	3.011±0.78	3.11
P. Değer	0,99 NS	0,73 NS	0,44 NS	0.021 *	0.033 *	----

NS: Anlamli değil; *:Anlamli (p<0.05); göreceli gen ifadesi kat değışimi (Deney/Kontrol) kullanılarak hesaplanmıştır, değerler (ortalama±SE) ile verilmiştir.

4.5.2 Çalışma gruplarında miR-UL36-3P geninin ifadesi

Real Time-PCR amplifikasyon programındaki göreceli gen ifadesi, üreticinin simülasyon programına göre değeriendirilen tüm gen ifadeleri için erime eğrisi analizi kullanılarak yapılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 A: miR-UL36-3P'nin Gerçek Zamanlı PCR Analizinde Eşik Döngüsü (Ct) değeri, B: miR-UL36-3P'nin RT-PCR'da Erime Eğrisi

hcmv- miR-UL36-3P ekspresyonunun düşük yapan kadınlarda (21.16) kat değışiklik ve kontrol grubunda (1±0.0) olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, Düşük yapan kadınlarda hcmv- miR-UL36-3P gen ifadesinin ortalama±SE (Thershod döngüsü) değeri (34,152±4,3) olduğunu ve bu değeri kontrol grubuna (38,02±4,1) kıyasla anlamli

olmayan bir farkla en yüksek ifade olduğunu ortaya koymuştur ($P= 0,12NS$). Sonuçlar ayrıca, Düşük yapan kadınlar için ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerinin (19.58 ± 3.7) kontrol grubuna (1.179 ± 0.03) kıyasla oldukça anlamlı bir farkla ($p=0.000^*$) yüksek olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.9).

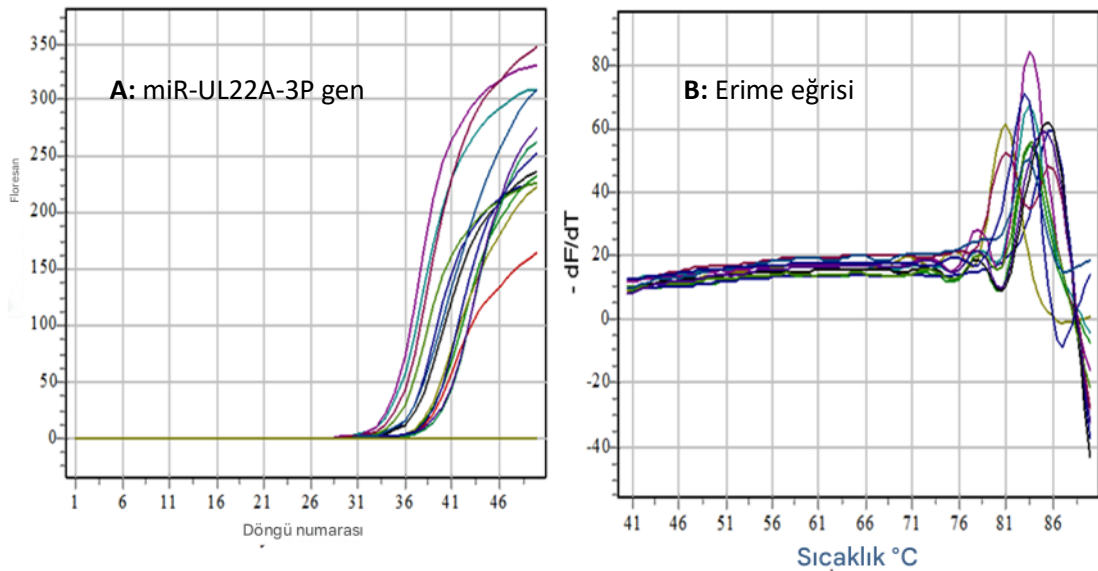
Çizelge 4.9 Hasta grubu ile kontrol grubu arasında karşılaştırılan hcmv-mir-UL36-3P ekspresyon seviyesi

Ortalama $\pm$ SE						
Gruplar	U6 CT	CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Kat değişimi
Kontrol	20.8 $\pm$ 2.7	38.02 $\pm$ 4.1	15.72 $\pm$ 2.9	0.0199 $\pm$ 0	1.179 $\pm$ 0.03	1 $\pm$ 0.0
Hasta	20.28 $\pm$ 2.1	34.152 $\pm$ 4.3	13.768 $\pm$ 2.3	-2.73 $\pm$ 0.2	19.58 $\pm$ 3.7	21.16
P. Değer	0,82 NS	0,12 NS	0,66 NS	0.001 *	0.000 **	----

NS: Anlamlı değil; *:Anlamlı ($p<0.05$); **: anlamlı ($p<0.01$), göreceli gen ifadesi kat değişimi (Deney/Kontrol) kullanılarak hesaplanmıştır, değerler (ortalama $\pm$ SE) ile verilmiştir.

4.5.3 Çalışma gruplarında miR-UL22A-3P geninin ifadesi

Real Time-PCR amplifikasyon programındaki göreceli gen ifadesi, üreticinin simülasyon programına göre değerlendirilen tüm gen ifadeleri için erime eğrisi analizi kullanılarak yapılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 A: miR-UL22A-3P'nin Gerçek Zamanlı PCR Analizinde Eşik Döngüsü (Ct) değerleri, B: miR-UL22A-3P'nin RT-PCR'da Erime Eğrisi

Çizelge (4.10), hcmv- miR-UL22A-3P ekspresyonunun düşük yapan kadınlarda (2,92) kat değişiklik ve kontrol grubunda ($1\pm0,0$) olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, düşük yapan kadınlarda hcmv miR-UL22A-3P gen ekspresyonunun ortalama $\pm$ SE (Thershod döngüsü) değerinin ($32,41\pm3,6$) olduğunu ve kontrol grubuna ($35,28\pm3,6$) kıyasla anlamlı olmayan bir farkla en yüksek ekspresyon olduğunu ortaya koymuştur ($P= 0,412$ NS). Sonuçlar ayrıca, düşük yapan kadınlar için ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerinin (2.77 ± 0.78), kontrol grubuna (0.7197 ± 0.02) kıyasla oldukça anlamlı bir farkla ($p=0.011^*$) yüksek olduğunu göstermiştir.

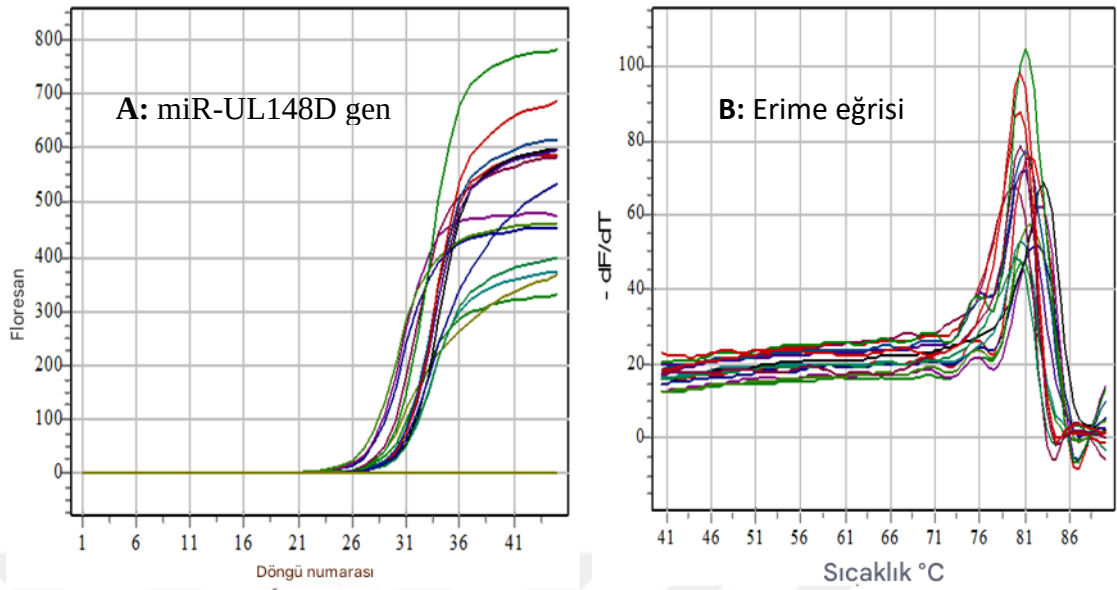
Çizelge 4.10 hcmv-mir-UL22A-3P ekspresyon seviyesi düşük yapan kadınlar ve kontrol grubu arasında karşılaştırma

Ortalama $\pm$ SE						
Gruplar	U6 CT	CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Kat değişimi
Kontrol	20.8 ± 2.7	35.28 ± 3.6	12.286 ± 3.1	0.676 ± 0.01	0.7197 ± 0.02	1 ± 0.0
Hasta	20.28 ± 2.1	32.41 ± 3.6	12.028 ± 1.6	-1.272 ± 0.2	2.77 ± 0.78	2.92
P. Değer	0,981 NS	0,412 NS	0,44 NS	0.041 *	0.011 *	----

NS: Anlamlı değil; *:Anlamlı ($p<0.05$); göreceli gen ifadesi kat değişimi (Deney/Kontrol) kullanılarak hesaplanmıştır, değerler (ortalama $\pm$ SE) ile verilmiştir.

4.5.4 Çalışma Gruplarında miR-UL148D Geninin İfadesi

RT-PCR amplifikasyon programındaki göreceli gen ifadesinin, üreticinin simülasyon programına göre değerlendirilen tüm gen ifadeleri için erime eğrisi analizi kullanılarak yapıldığını göstermektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 A: miR- miR-UL148D'nin gerçek zamanlı PCR analizinde eşik döngüsü (Ct) değerleri, B: miR-UL148D'nin RT-PCR'de erime eğrisi

hcmv-miR-UL148D ekspresyonunun düşük yapan kadınlarda (2,66) kat değişiklik ve kontrol grubunda (1±0,0) kat değişiklik olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, düşük yapan hcmv miR-UL148D gen ifadesinin ortalama±SE (Thershod döngüsü) değerinin (27,38±2,5) olduğunu ve bu değer kontrol grubuna (27,67±3,6) kıyasla anlamlı olmayan bir farkla en yüksek ifade olduğunu ortaya koymuştur (P= .624NS). Sonuçlar aynı zamanda düşük yapan kadınlar için ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerinin (2,76±0,44) kontrol grubuna (1,172±0,01) kıyasla anlamlı olmayan bir farkla (p=0.041*) daha yüksek olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.11).

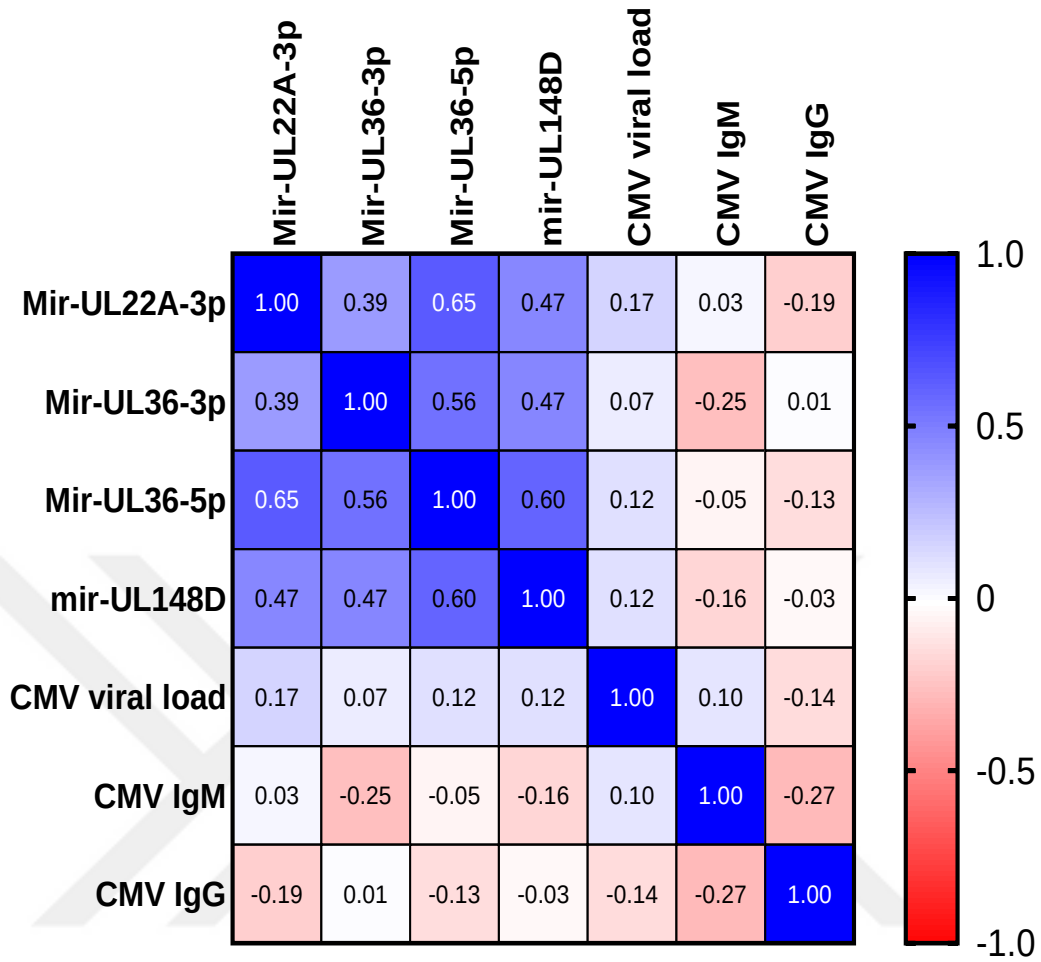
Çizelge 4.11 hcmv-mir-UL148D ekspresyon düzeyi düşük yapan kadınlar ve kontrol grubu arasında karşılaştırma

Ortalama±SE						
Gruplar	U6 CT	CT	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Kat değişimi
Kontrol	20.8±3.7	27.67±3.6	5.67±2.1	-0.033±0	1.172±0.0	1±0.0
Hasta	20.28±2.1	27.38±2.5	5.796±1.7	-0.314±0.01	2.76±0.44	2.66
P. Değer	0,891 NS	0,624 NS	0,841 NS	0,441 NS	0.041 *	---

NS: Anlamlı değil; *:Anlamlı (p<0.05); göreceli gen ifadesi kat değişimi (Deney/Kontrol) kullanılarak hesaplanmıştır, değerler (ortalama±SE) ile verilmiştir.

4.6 CMV Antikoru ve Viral Yük ile Tüm MikroRNA Türleri Arasındaki Korelasyon Katsayısı (Pearson r korelasyon matrisi)

Şekil 4.12 ve Çizelge 4.12'de sunulan veriler, CMV IgM, IgG, viral yük ve Mikro-miRNA tipleri arasındaki pozitif ve negatif ilişkiyi gösteren Pearson r korelasyon matrisini özetlemektedir. Grup 1: Mavi renk $r > 0$ = pozitif korelasyonu, kırmızı renk $p < 0$ = negatif korelasyonu, pozitif korelasyonu (doğru orantılı) göstermiştir. Mir-UL22A-3P ve Mir-UL363P, Mir-36-5P, Mir-UL148D ile CMV viral yükü ve CMV IgM arasında (sırasıyla 0,39,0,65,0,47,0,17,0,03) pozitif bir korelasyon ($p=0,0051^{**}, 4,16,0,0005^{**}, 0,251,0,810,$) varken CMV IgG ile ($p=0,184$) anlamlı olmayan negatif bir korelasyon ($-0,19$) vardı. Mir-UL36-3P ve Mir-UL22A-3P, Mir-UL36-5P, Mir-UL148D ile CMV viral yükü, CMV IgG (0.39,0.56,0.47,0.07,0.01,) arasında sırasıyla pozitif korelasyon ($p=0.0051^{**}, 2.85, 0.000^{**}, 0.611, 0.611, 0.941$) varken CMV IgM ile negatif korelasyon (-0.25) vardı ($p=0.07$). Sonuçlar ayrıca Mir-UL36-5P ve UL22A-3P, Mir-UL36-3P, Mir-UL148D ile CMV viral yükü (0.65,0.56,0.60,0.12) arasında sırasıyla ($p=4.16, 2.85, 3.38, 0.412$) pozitif bir korelasyon gösterirken, CMV IgG, CMV IgM ($p=0.748, 0.353$) ile negatif bir korelasyon ($-0.05, -0.13$) olduğunu göstermiştir. Mir-UL148D ile UL22A-3P, Mir-UL36-3P, Mir-UL36-5P ve CMV viral (0.47,0.47,0.60,0.12) arasında sırasıyla pozitif korelasyon ($p=0.0005^{**}, 0.000^{**}, 3.38, 0.407$) varken, CMV IgM, CMV IgG ile negatif korelasyon ($-0.16, -0.03$) vardı ($p=0.254, 0.831$).



Şekil 4.12 Korelasyon katsayısı (Grup 1'in Pearson r korelasyon matrisi Mavi renk $r > 0$, pozitif korelasyon, kırmızı renk $p < 0$, negatif) CMV antikorları ile Viral yük ve tüm Mikro RNA türleri arasında

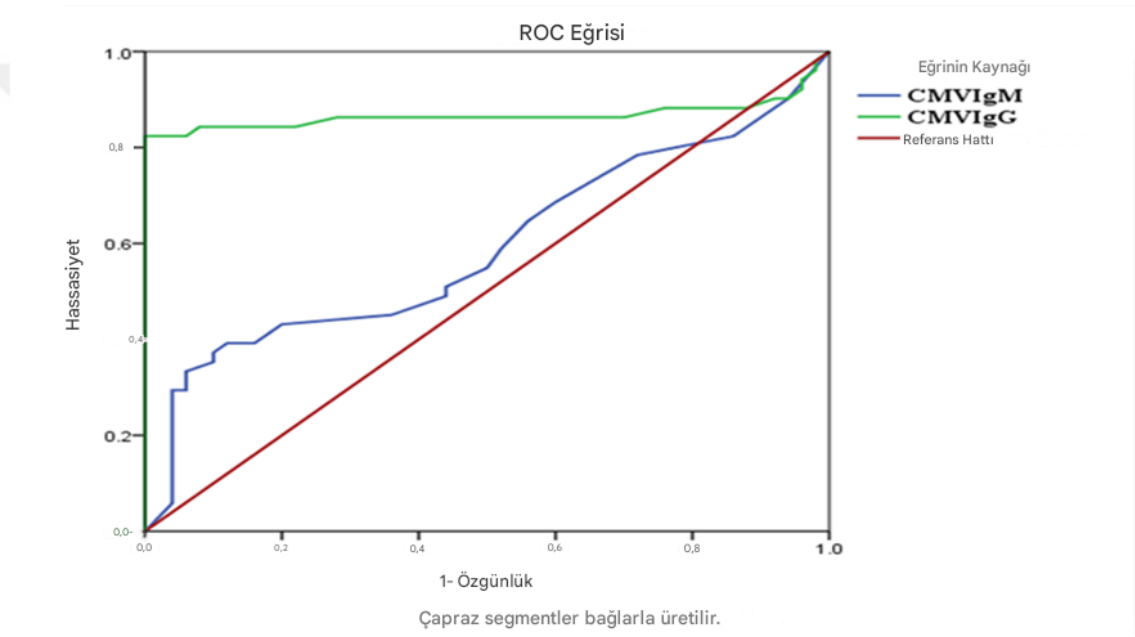
Çizelge 4.12 Tüm miRNA tipleri (Mir-UL22A-3P, Mir-UL36-3p, Mir-UL36-5p, Mir-UL148D) ile CMV IgM, IgG ve CMV Viral yükünün Pearson korelasyon matrisinin P. Değeri

	Mir-UL22A-3p	Mir-UL36-3p	Mir-UL36-5p	Mir-UL148D	CMV viral yükü	CMV IgM	CMV IgG
Mir-UL22A-3p	1.00	0.0051**	4.16	0.0005**	0.251	0.810	0.184
Mir-UL36-3p		1.00	2.85	0.000**	0.611	0.07	0.941
Mir-UL36-5p			1.00	3.38	0.412	0.748	0.353
Mir-UL148D				1.00	0.407	0.254	0.831
CMV viral yükü					1.00	0.489	0.332
CMV IgM						1.00	0.054
CMV IgG							1.00

Anlamli değil $p > 0,05$; **: anlamlı ($p < 0,01$)

4.7 CMV IgM ve IgG için Özgüllük ve Duyarlılık

CMV IgG için elde edilen ROC eğrileri analizinin sonuçlarını özetlemektedir (Duyarlılık %: 94, Özgüllük %: 92, güven aralığı: 0,77 ila 0,95, eğri altında kalan alan (AUC)±SE: 0,87±0,09, kesim değeri: 25.5, oldukça anlamlı bir farkla (P=0.001**) ve CMV IgM Duyarlılık % 49, Özgüllük %: 55, güven aralığı: 0.47 ila 0.70, eğri altında kalan alan (AUC)±SE: 0.59±0.23, kesme değeri: 0.221, anlamlı olmayan bir farkla (P=0.118NS) (Şekil 4.13, Çizelge 4.13).

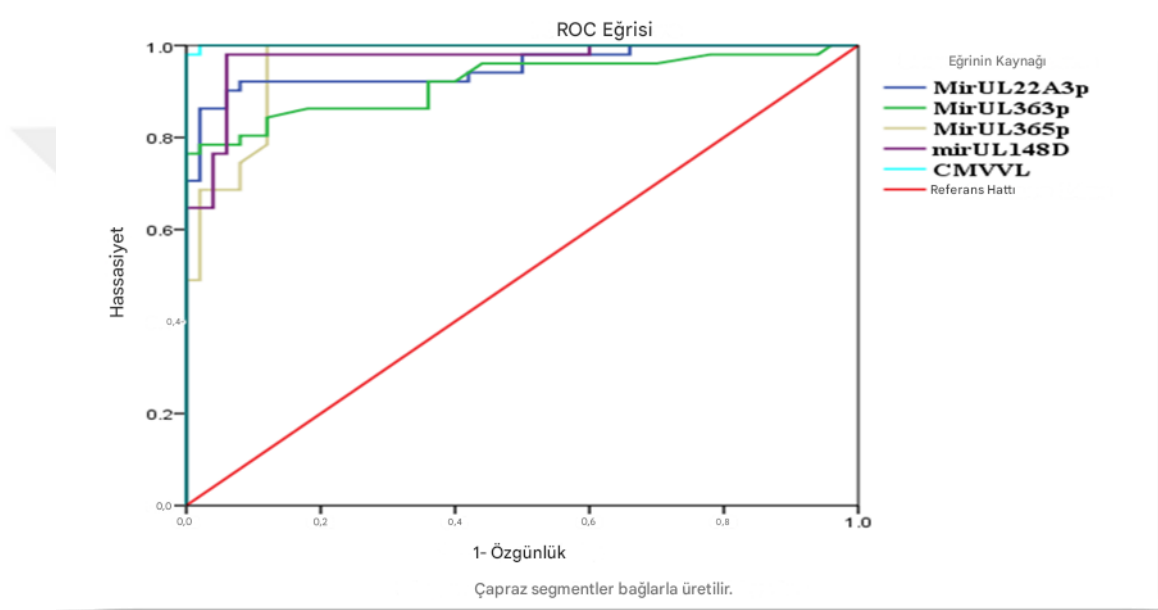


Şekil 4.13 CMV antikoru IgM ve IgG için ROC eğrisi analizi (Wilson/Brown yöntemi) Duyarlılık% ve 1-Özgüllük%. $p < 0,05$ Düşük yapan kadınlarda

4.8 Mikro RNA Tipleri ve CMV Viral Yükünün Özgüllüğü ve Duyarlılığı

Şekil 4.16 ve Çizelge 4.13'teki ROC eğrisi, hcmv-mikroRNA'ların enfekte grupta potansiyel önemli tanı belirteçleri olduğunu göstermiştir. hcmv-Mir-UL148D için Duyarlılık %96, Özgüllük %98, güven aralığı 0,92 ila 1,0 ve eğri altında kalan alan AUC±SE (0,94±0,4), kesme değeri (2,0 pg/mL) olup oldukça anlamlı bir farka sahiptir (P=0,000**). hcmv-Mir-UL22A-3P için Duyarlılık %92, Özgüllük %98, güven aralığı 0,88 ila 1,0, eğri altında kalan alan (AUC)±SE (0,91±0,3), kesim değeri (1,1 pg/mL),

oldukça anlamlı bir farkla ($P=0.000^{**}$), hcmv-Mir-UL36-3P için Duyarlılık %91, Özgüllük %87, güven aralığı 0,83 ila 0,97, alan (0,94±0,1), kesim değeri (1,3 pg/mL) iken, oldukça anlamlı bir farkla ($P=0.000^{**}$) ve hcmv-Mir-UL36-5P için duyarlılık %99, özgüllük %98, güven aralığı (1.00±0.0), alan (1.00±0.0), kesim değeri (2.0 pg/mL), oldukça anlamlı bir farkla ($P=0.000^{**}$) ve son olarak CMV Viral yükü için Duyarlılık %100, Özgüllük %99, güven aralığı (1.00±0.0), alan (1.00±0.0) ve kesme değeri (116 pg/mL) olup oldukça anlamlı bir fark ($P= 0.000^{**}$) söz konusudur.



Şekil 4.14 ROC eğrisi analizi (Wilson/Brown yöntemi) MikroRNA'lar (hcmv-Mir-UL36-5P, hcmv-Mir-UL36-3P, hcmv-Mir-UL22A-3P, hcmv-Mir-UL148D) için % Duyarlılık ve %1-Özgüllük, Düşük yapan kadınlarda $p<0,05$

Çizelge 4.13 Duyarlılık, Özgüllük, %95 güven aralığı, Alan (Ortalama±SE) ve olasılık ile verilen Düşük yapan kadınların ROC eğrisi analizi

Analit	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	95 güven aralığı 95% CI	Eğri altında kalan alan (AUC) ± SE	Kesme değeri (pg/mL)	P. Değer
CMV IgG	94	92	0,77 ila 0,95	0.87±0.09	22.5	0.001**
CMV IgM	49	55	0,47 ila 0,70	0.59±0.23	0.221	0.118NS
hcmv-miR-UL148D	96	98	0,92 ila 1,0	0.94±0.4	2.0	0.000**
hcmv-miR-UL22A-3p	92	98	0,88 ila 1,0	0.91±0.3	1.1	0.000**
hcmv-miR-UL36-3p	91	87	0,83 ila 0,97	0.94±0.1	1.3	0.000**
hcmv-miR-UL36-5p	99	98	0,99 ila 1,0	0.97±0.32	2.0	0.000**
Viral yük CMV	100	99	1.00 ila 1.0	1.00±0.0	116	0.000**

4.9 Nükleotid Dizileme Sonuçları

Bu çalışmaya toplam dört örneği (B1, B2, B3 ve B4 olarak atanmış) dahil edilmiştir. Bu örnekler GP55 gen dizilerini kısmen çoğaltmak için taranmıştır. Böylece, bu GP55 dizilerinin varyasyonu, GP55 dizilerinin değişken genetik çeşitliliğe uyum sağlama kabiliyeti nedeniyle bu viral türlerin tanımlanması için kullanılabilir (Topalis vd.2016). Dizileme reaksiyonları, bu PCR amplikonları için NCBI blastn gerçekleştirdikten sonra tam özdeşliği göstermiştir. NCBI BLASTn motoru, dizilenen B1 - B4 örneği ile HCMV referans hedef dizileri (GenBank acc. U88704.1) arasında yaklaşık %99 homoloji gösterdi ve alınan PCR parçalarının doğru konumları ve diğer ayrıntıları belirlendi. Hedeflenen lokusların toplam uzunluğu NCBI sunucusunda lokalize edilmiş ve hedeflenen lokusun başlangıç ve bitiş pozisyonları da en homolog viral hedef içinde doğrulanmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 Çalışmada çoğaltılan araştırılmış örneklerin tam konumu. Bu konum HCMV5 içindeki GP55 gen dizilerinin bir kısmını kapsamaktadır

418 bp'lık amplikonların dizileri HCMV5 virüslerinin genomik dizileri içinde konumlandırıldıktan sonra, dizilerinin ayrıntıları vurgulanmış ve amplifiye edilen amplikonların toplam uzunluğu da Çizelge 4.15'te belirlenmiştir.

Çizelge 4.14 HCMV5 virüsü genomik dizileri (GenBank acc. no. U88704.1) içinde G55 geninin kodlama dizilerinin bir kısmını çoğaltmak için kullanılan 418 bp PCR amplikonlarının konumu ve uzunluğu

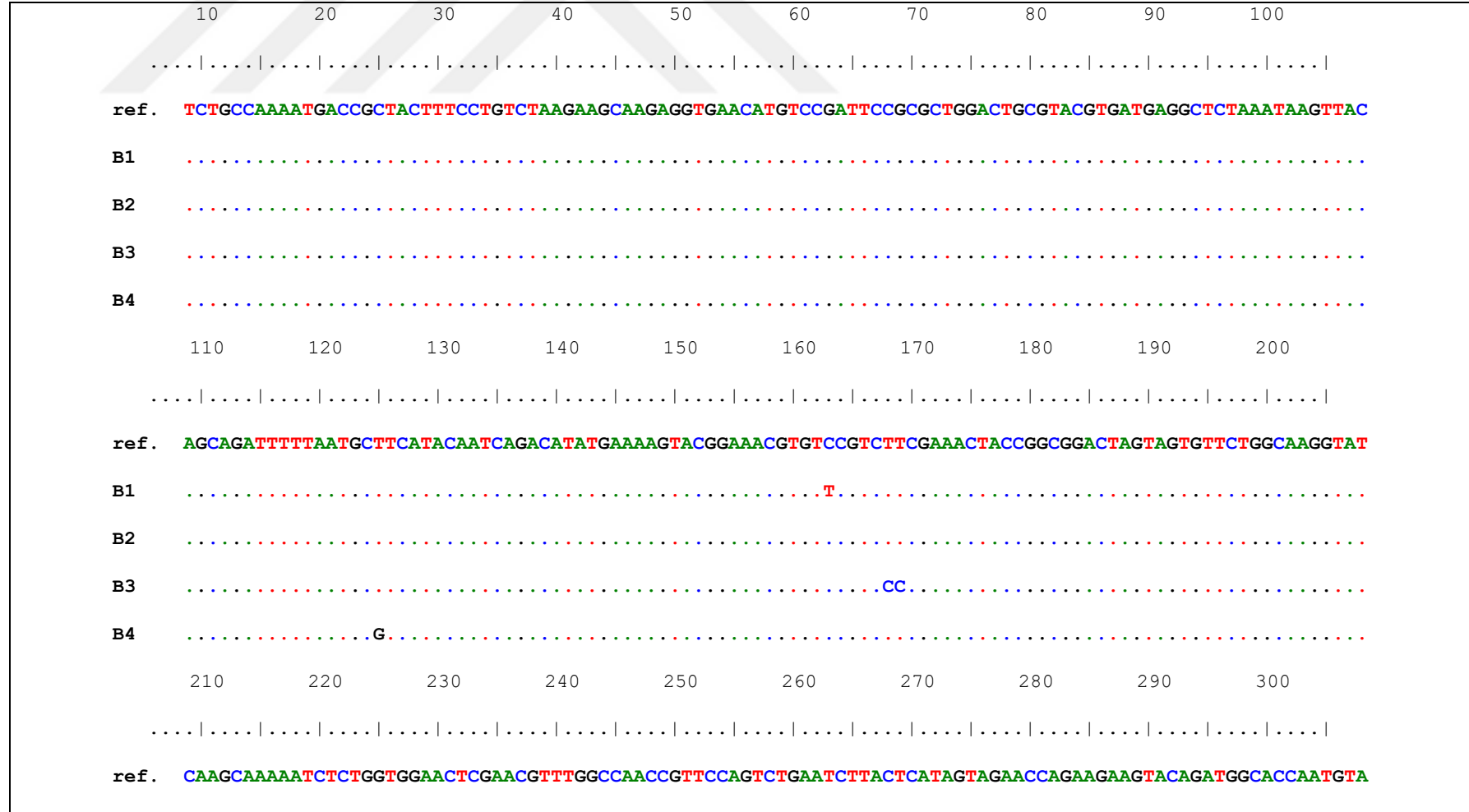
locus	5'-3' dizisi	PCR amplikon uzunluğu
GP55 geni	*TCTGCCAAATGACCGCTACTTTCCTGTCTAAGAAGCAAGAGGTGAACATGTCCGATTCCGC GCTGGACTGCGTACGTGATGAGGCTCTAAATAAGTTACAGCAGATTTTAAATGCTTCATACA ATCAGACATATGAAAAGTACGGAAACGTGTCCGTCTTCGAAACTACCGGCGGACTAGTAGT GTTCTGGCAAGGTATCAAGCAAAAATCTCTGGTGGAACCTCGAACGTTTGGCCAACCGTTCCA GTCTGAATCTTACTCATAGTAGAACCAGAAGAAGTACAGATGGCACCAATGTAACCTATTTA TCTAATATGGACTCGGTACACAATCTGGTCTACGCCCAGCTGCAGTTCACCTACGACACGTT GCGCGGCTACATCAACCGGGCGTTGACACAAATCGCAGAAAGCCTGGT**	418 bp

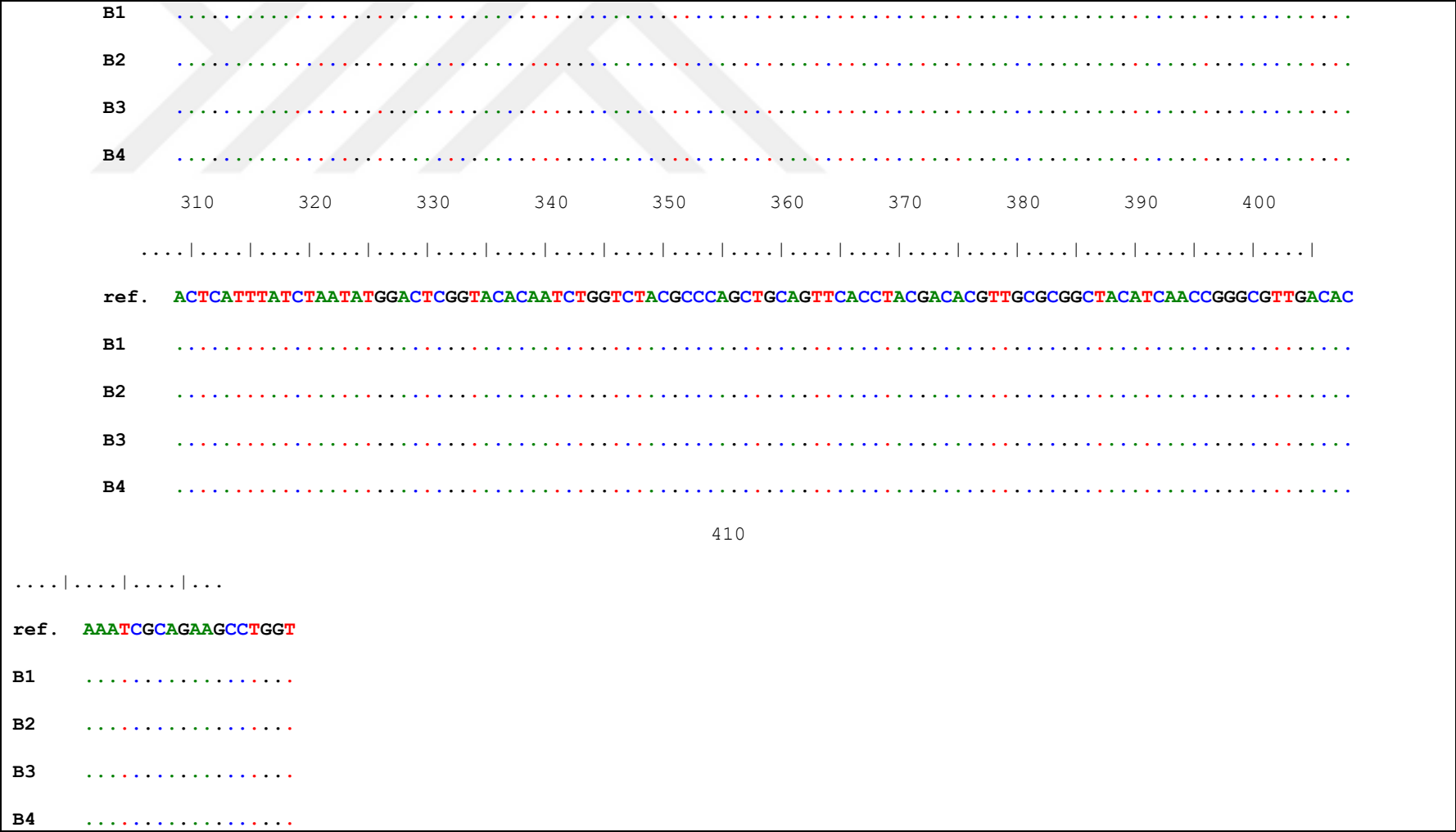
* ileri yönde yerleştirilmiş ileri primer

** Ters kompleman yönünde yerleştirilmiş ters primer

İncelenen örneklerin hizalanması, Çizelge 4.15'te gösterildiği gibi, en benzer referans nükleik asit dizileri ile karşılaştırıldığında dört nükleik asit varyasyonunun varlığını göstermiştir.

Çizelge 4.15 Dört HCMV örneğinin karşılık gelen referans dizileri ile nükleik asit dizisi hizalaması (GenBank acc. no. U88704.1). "ref" sembolü NCBI referans dizisini ifade etmektedir. "B" harfi incelenen örnekleri ifade etmektedir





Bu çalışmada tanımlanan varyasyonları doğrulamak için, incelenen örneklerin sekanslama kromatogramlarının yanı sıra ayrıntılı açıklamaları doğrulanmış ve belgelenmiş ve sekanslarının kromatogramları HCMV5 rnekleri için PCR amplikonlarındaki konumlarına göre gösterilmiştir. Bu varyantların her birinin varlığı orijinal kromatogramında doğrulanmış ve olası herhangi bir teknik hatanın olmadığı da teyit edilmiştir. Sekanslama sonuçları, HCMV5'in referans sekanslarıyla (GenBank acc. no. U88704.1) karşılaştırıldığında B1 rneğinde tanımlanan bir nükleik asit varyantının (155C>T) tespit edildiğini doğrulamıştır (şekil 4.16). Sekanslama reaksiyonu, B2 numunesinin referans sekanslarıyla herhangi bir varyasyon sergilemediğini göstermiştir. Sekanslama sonuçları ise HCMV5'in referans sekanslarıyla (GenBank acc. no. U88704.1) karşılaştırıldığında B3 numunesinde tanımlanan iki yeni nükleik asit varyantının (160T>C ve 161T>C) varlığını doğrulamıştır (şekil 4.17). Sekanslama reaksiyonları ayrıca B4 rneğinde tanımlanan bir yeni nükleik asit varyantının (177T>G) aynı referans sekanslarla (GenBank acc. no. U88704.1) karşılaştırılarak tanımlandığını doğrulamıştır (şekil 4.18).

ATGTC CGATTCCGCGCTGGACTGCGTACGTGATGAGGCTCTAAATAAGTTACAGCAGATTTTAAATGG
50 60 70 80 90 100 110

C>T
↓

TTCATACAATCAGACATATGAAAAGTACGGAAACGTGTTCTCTTCGAAACTACCGGCGGACTAGTA
120 130 140 150 155 160 170 180

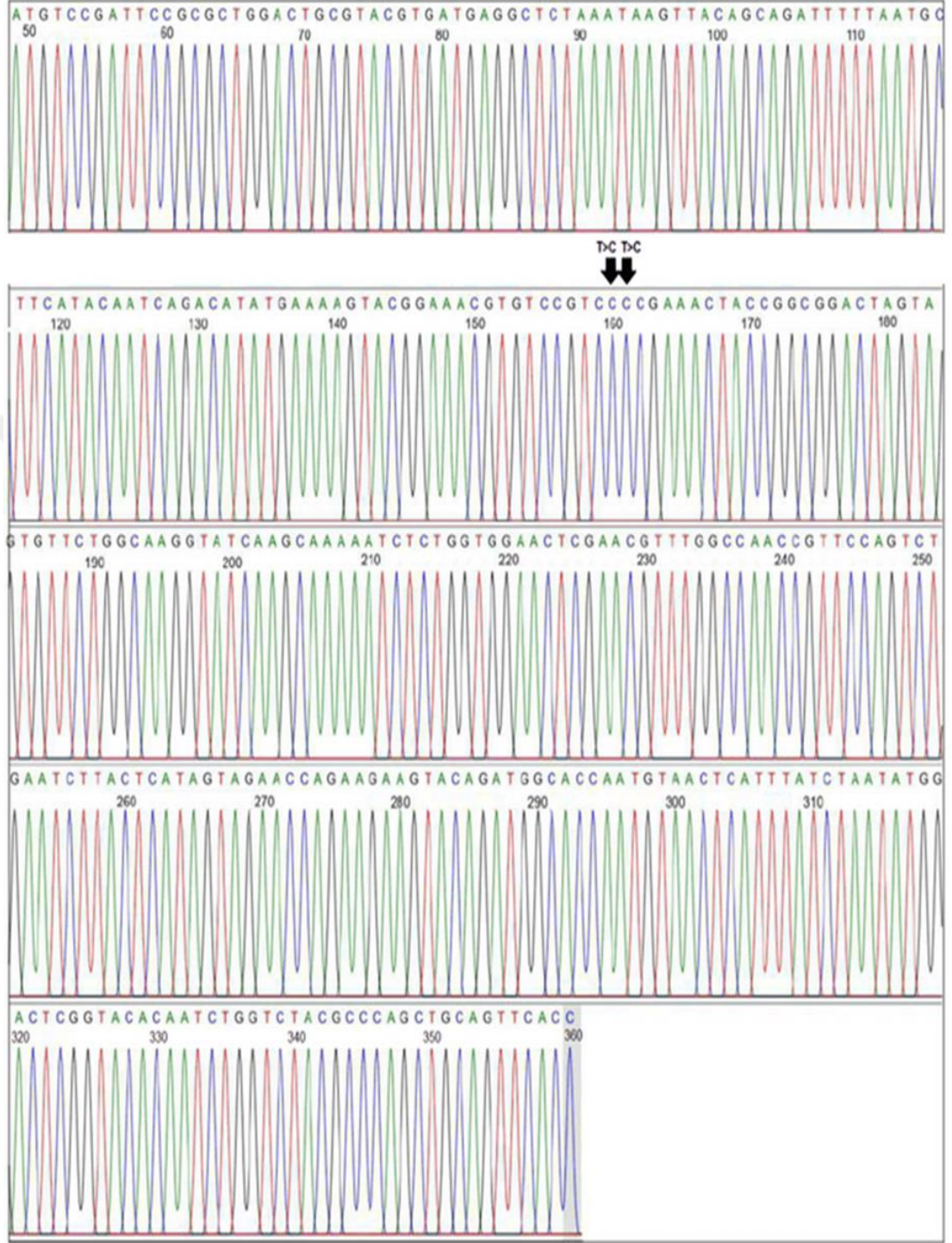
GTGTTCTTGGAAGGTATCAAGCAAAATCTCTGGTGGAACTCGAACGTTTGGCCAACCGTTCAGTCT
190 200 210 220 230 240 250

GAACTCTTACTCATAGTAGAACCAGAAGAAGTACAGATGGCACCAATGTAACCATTTATCTAATATGG
260 270 280 290 300 310 320

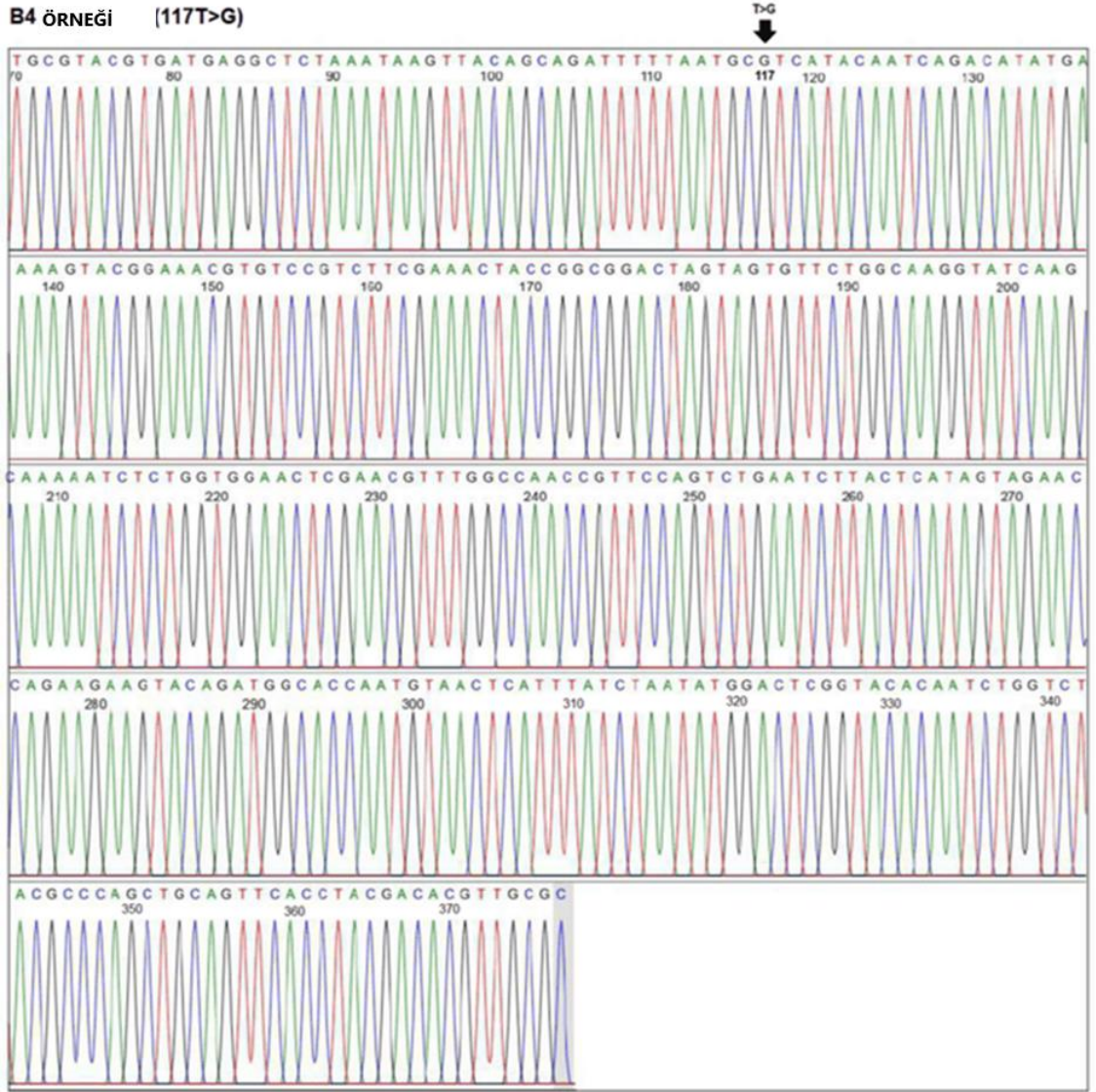
ACTCGGTACACAATCTGGTCTACGCCGAGCTGCAGTTACCTACGACACGTTGCGCGGGCTAC
330 340 350 360 370 380

74

B3 ÖRNEĞİ (160T>C, 161T>C)



Şekil 4.17 B3 varyantı için, siyah oklarla nükleik asit polimorfizminin tespit edildiği yerler gösterilmiştir



Şekil 4.18 B4 varyantı için, siyah oklarla nükleik asit polimorfizminin tespit edildiği yerler gösterilmiştir

Hali hazırda analiz edilen örneklerde gözlemlenen bu farklılıklar, bu dizilerin karşılaştırıldığı ilgili referans dizilerde (GenBank acc. no. U88704.1) bulunmamıştır. İncelenen GP55 dizileri NCBI web sunucusunda depolanmış ve analiz edilen diziler için erişim numaraları elde edilmiştir. GenBank OR965963, OR965964, OR965965 ve OR965966 erişim numaraları alınarak sırasıyla B1, B2, B3 ve B4 örnekleri NCBI'de depolanmıştır.

Gözlemlenen nükleik asit varyasyonları, bu tür ikamelerin çevrilen ürünlerdeki karşılık gelen pozisyonlarında olası değişikliklere neden olup olmadığını belirlemek için ayrıca

analiz edilmiştir. B1 - B4'ün tüm nükleik asit dizileri Expasy translate paketi (<https://web.expasy.org/translate/>) kullanılarak karşılık gelen amino asit dizilerine çevrilmiştir. GP55 geninin çoğaltılmış ürünlerinin glikoprotein B değişken bölgesi içinde 140 amino asit kalıntısını kapsadığı bulunmuştur (Çizelge 4.16a). Tanımlanan 155C>T, 160T>C, 161T>C ve 177T>G varyantlarının doğrudan nükleik asit çevirisinden elde edilen sonuçlar protein üzerinde farklı etkiler göstermiştir. Nükleik asit varyantlarının kodlanan proteindeki karşılık gelen pozisyonlarına çevrilmesi, 155C>T'nin p.59Ser>Phe'nin yanlış anlam etkisini sergilediğini göstermiştir. Benzer şekilde, hem 160T>C hem de 161T>C, glikoprotein B değişken bölgesi üzerinde p.61Phe>Pro'nun yanlış anlam etkisini paylaşmıştır. Üçüncü varyant 177T>G ise kodlanan protein üzerinde p.65Gly= sessiz bir etki sergilemiştir. Buna göre, sonuçlar ampikonlar ve tüm protein içindeki konumlarında temsil edilmiştir (Çizelge 4.16b).

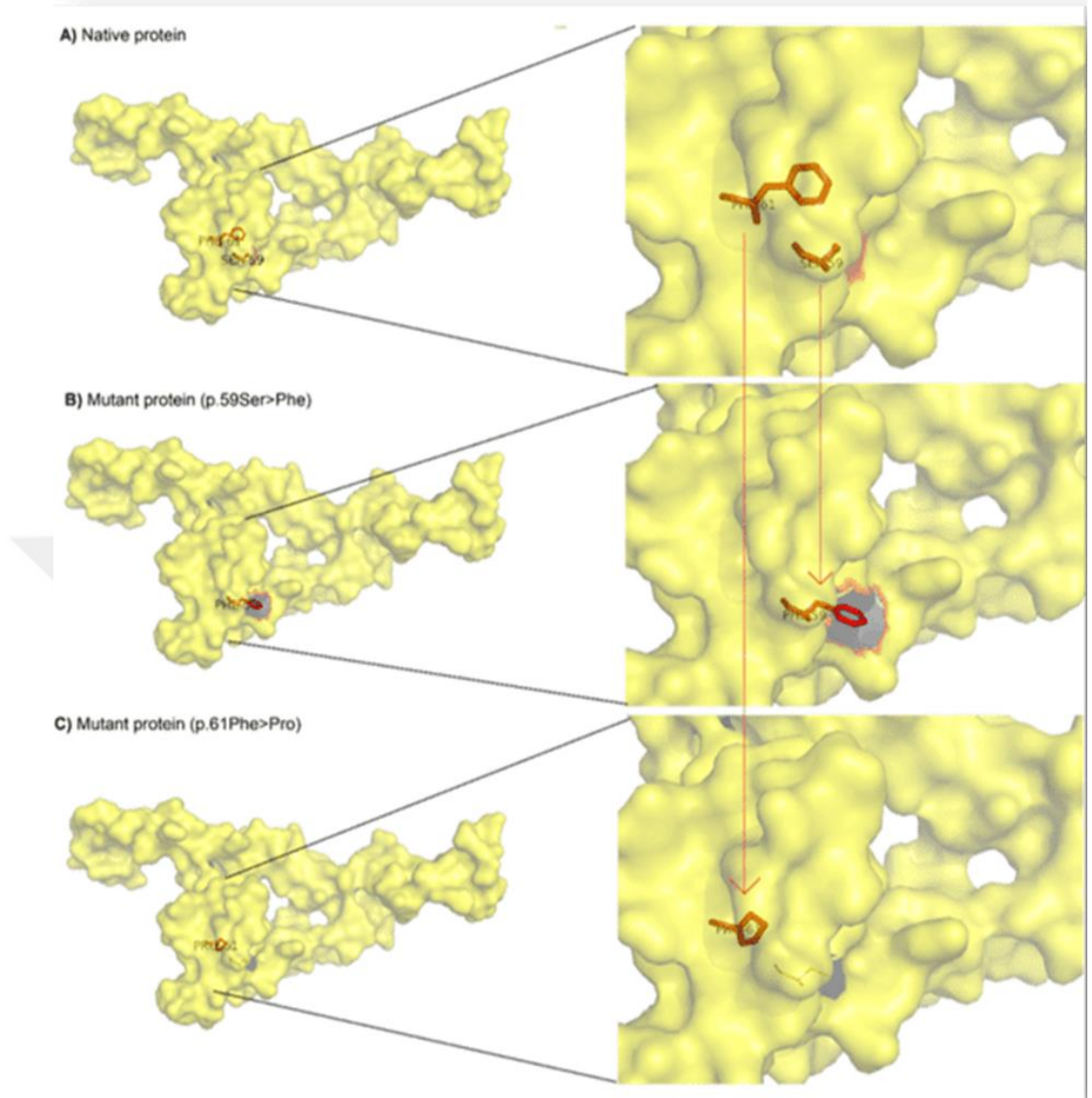
Çizelge 4.16 Glikoprotein B değişken bölgesinin çoğaltılmış bölgelerinde (dal A) ve tüm proteinde (dal B) tespit edilen varyasyonların amino asit kalıntıları hizalaması. Gri vurgular, amino asit kalıntılarının çoğaltılmış bölgesini ifade etmektedir. Camgöbeği ve sarı renkler sırasıyla tüm protein dizisi üzerindeki amino asit yanlış ve sessiz etkisini ifade eder

A: PCR ampikonlarındaki varyantların pozisyonları									
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
ref.	SAKMTATFLSKKQ	EVNMSDSALDCVRDEALNKLQ	QIFNASYNQTYE	KYGNVSVFETT	GGLVVF	WQGIKQKSLV	ELERLANRSS	LNLT	HSRTRRST
NV									
B1									
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
B2									
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
B3									
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
B4									
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
110	120	130	140						
ref.	THLSNMDSVHNLVYAQLQFTYD	TLRGYINRALTQIAEAWC							
B1									
B2									
B3									
B4									
B: Varyantların proteinin tamamındaki konumları									
glikoprotein B değişken bölgesi (protein ID AAB48528.1)									
EESYHFSSAKMTATFLSKKQEVNMSDSALDCVRDEALNKLQQIFNASYNQTYEKYGNVSVFETTGGGLV									
VFWQGIKQKSLVELERLANRSSLNLT									
HSRTRRSTDGTNVTHLSNMDSVHNLVYAQLQFTYD									
TLRGYINRALTQIAEAWCVDQRRTLEVFKELSKINPSA									
LSAI									

B1 ve B3 örneklerinde p.59Ser>Phe ve p.61Phe>Pro yanlış anlamlı mutasyonlarının varlığı nedeniyle, bu yeni varyantların glikoprotein B değişken bölgesinin doğal 3D yapısının konak reseptör ile bağlanması açısından olası bir etkisi beklenmektedir. Buna göre, bu mutasyonlara sahip örnekler, bu varyasyonları tahmin etmek için vahşi tip suşlarla karşılaştırılmıştır (Şekil 19a).

p.59Ser>Phe ile ilgili olarak, polar yüksüz amino asit Serin, tüm protein uzunluğunun 59. pozisyonunda hidrofobik amino asit Fenilalanine dönüştürülmüştür (Şekil 19b). HOPE aracı, bir proteinin diziliminde serin'in fenilalanin'e mutasyonunun proteinin 3D yapısında önemli değişikliklere neden olabileceğini öngörmüştür. Serin ve fenilalanin kimyasal özellikleri, boyutları ve yapıları bakımından farklılık gösterir. Serin, bir hidroksil grubuna sahip polar bir amino asit iken, fenilalanin büyük bir yan zincire sahip polar olmayan aromatik bir amino asittir. Serin fenilalanine mutasyona uğradığında, proteinin katlanma modelinde, stabilitesinde ve konak reseptör ile etkileşimlerinde değişikliklere yol açabilir.

Fenilalaninin serine kıyasla daha hacimli ve hidrofobik yapısı, yerel ortamı etkileyebilir ve protein yapısı içindeki hidrojen bağlanma modellerini bozabilir. Bu mutasyon proteinin işlevini de etkileyebilir ve potansiyel olarak işlev veya aktivite değişikliğine yol açabilir. p.61Phe>Pro ile ilgili olarak, hidrofobik amino asit Fenilalanin, tüm protein uzunluğunun 61. pozisyonunda siklik ve sert amino asit proline dönüştürülmüştür (Şekil 19c).



Şekil 4.19 59. ve 61. pozisyonlarında Ser ve Phe bulunan vahşi tip HCMV glikoproteininin (dal A), 59. pozisyonunda Phe bulunan mutant HCMV glikoproteininin (dal B) ve 61. pozisyonunda Pro bulunan mutant HCMV glikoproteininin (dal C) 3D yapı gösterimi

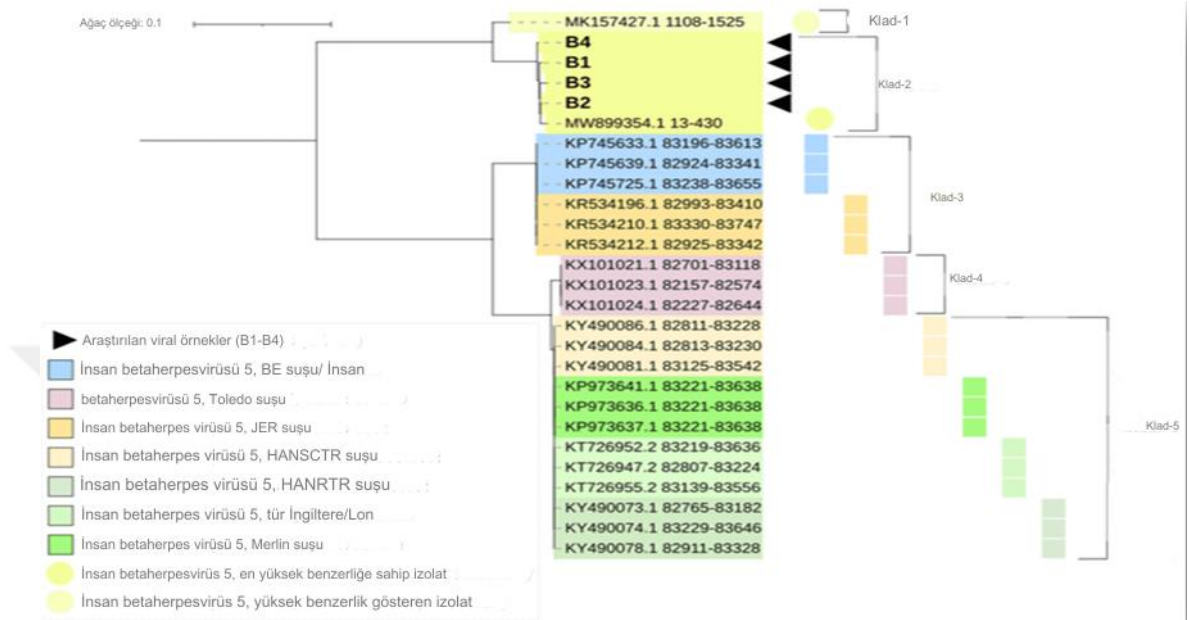
HOPE aracı ayrıca, bir protein dizisinde fenilalanin proline mutasyona uğratıldığında, proteinin 3D yapısında çeşitli yapısal değişikliklerin beklendiğini öngörmüştür. Fenilalanin, büyük bir hidrofobik yan zincire sahip aromatik bir amino asit iken, prolin, sertlik sağlayan döngüsel bir yan zincire sahip benzersiz bir amino asittir. Prolin, kısıtlı döngüsel yan zinciri nedeniyle protein yapılarında bükülmeler ve kıvrılmalar meydana getirmesiyle bilinir. Viral glikoproteinde fenilalaninin prolin ile yer değiştirmesi, proteinin genel katlanma modelinde değişikliklere yol açabilir. Fenilalanin hidrofobiktir

ve genellikle protein çekirdeği içindeki hidrofobik etkileşimlerin stabilize edilmesinde rol oynar. Daha az hidrofobik olan prolin ile değiştirilmesi, bu stabilize edici etkileşimlerin kaybına neden olarak proteinin stabilitesini potansiyel olarak etkileyebilir. Fenilalanin genellikle alfa sarmallarında ve beta tabakalarında bulunur. Düzenli ikincil yapıları bozan prolin ile değiştirilmesi, bu yapısal elemanların düzeninde değişikliklere yol açabilir. Fenilalaninin hacimli yan zinciri, protein içindeki belirli yerel etkileşimlere katılabilir. Prolinin eklenmesi bu etkileşimleri değiştirebilir ve mutasyon bölgesi etrafındaki yerel yapıyı etkileyebilir. Ayrıca, 3D yapıdaki değişikliklerin, konak reseptörlerle etkileşime girme kabiliyetini etkileme potansiyeli nedeniyle proteinin yapısında işlevsel etkileri olabileceği beklenmektedir.

İncelenen viral örneklerin gerçek mesafelerinin filogenetik olarak anlaşılması için, bu çalışmada HCMV'nin GP55 ampikonlarının çoğaltılmış PCR ürünlerinde gözlemlenen nükleik asit dizilerine göre kapsamlı bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaçlar, viral diziler arasındaki evrimsel ilişkilerin genetik bilgilerine dayalı grafiksel gösterimleridir. HCMV söz konusu olduğunda, genetik çeşitlilik, GP55 dizileri gibi viral genomun belirli bölgelerinin dizilenmesiyle analiz edilebilir. Bu diziler daha sonra farklı HCMV suşlarının akrabalık ve evrimsel geçmişini yüksek verimlilikle tasvir eden filogenetik ağaçlar oluşturmak için kullanılabilir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen HCMV izolatlarından elde edilen genetik dizilerin karşılaştırılmasıyla, suşların çeşitliliği ve akrabalığı hakkında değişken bilgiler elde edilir. Filogenetik analiz, HCMV izolatlarının, belirli suşların yayılması ve bulaşması hakkında bilgi sağlayabilen birkaç farklı kladda sınıflandırılmasına olanak tanır. Halihazırda oluşturulan ağaç kullanılarak, ortak bir atadan ortaya çıkmış olabilecek yakın akraba suşlar çözülür. Bu, HCMV'nin genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısının kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına yardımcı olabilir.

Mevcut inşa edilen ağaç dikdörtgen bir kladogramda temsil edilmiştir. Bu kapsamlı ağaçtaki hizalanmış nükleik asit dizilerinin toplam sayısı yirmi yedidir. İlginç bir şekilde, birleştirilmiş viral dizilerin tek tipinin HCMV'nin tip-5'ine atfedildiği görülürken, GP55 geninin diğer tiplerinin (1, 2, 3 ve 4) tip-5 ile yakın bir benzerlik göstermediği tespit edilmiştir. Bu veri, bu viral sekans tipinin diğer tiplerle karıştırılmadan tanımlanmasında bu genetik parçanın yüksek özgüllüğüne işaret etmektedir. Oluşturulan kladogramda,

birleştirilen örnekler HCMV-5 içinde beş filogenetik kladda kümelenmiştir. Özellikle, hem klad-1 hem de klad-2 aynı ataya aitti. Benzer şekilde, klad-3, klad-4 ve klad-5 Şekil 4.20'de gösterildiği gibi aynı ortak ataya aittir.



Şekil 4.20 Dört HCMV5 örneği için GP55 fragmanlarının kapsamlı dikkörtgen kladogram filogenetik ağacı. Siyah renkli üçgen analiz edilen viral dizileri ifade ederken, kareler ve daireler sırasıyla HCMV5 suşlarını ve izolatlarını temsil etmektedir. Belirtilen tüm numaralar, atıfta bulunulan her türün GenBank erişim numarasına atıfta bulunmaktadır. Ağacın üst kısmındaki sayılar, ağaçta kategorize edilen kapsamlı organizmalar arasındaki ölçek aralığının derecesini ifade etmektedir

Klad-1, ABD'den toplanan tek bir HCMV5 klinik izolatından oluşmuştur (GenBank MK157427.1). Klad 1, Klad 2'nin yakınında konumlandırılmıştır. Klad-2, kandan toplanan bir klinik İran HCMV5 izolatının (GenBank MW899354.1) yanında birbirleriyle konumlandırılan araştırılmış B1 - B4 örneklerimizden oluşmuştur. İncelenen B1 - B4 örneklerinin bu klinik izolatların yanında konumlandırılması, bu örneklerin klinik kaynağı için başka bir doğrulama katmanı eklemiştir. Küme-3'te, yakın çevrede BE/ ve JER suşu olmak üzere iki HCMV5 suşu yer almıştır. GP55 tabanlı ağacın verileri, BE/ ve JER suşlarının her ikisinin de son derece yakın benzerliklere sahip olduğunu göstermiştir. BE/ suşunun tüm sekansları Belçika'dan iki farklı klinik kaynaktan izole edilmiştir. Benzer şekilde, JER suşunun tüm dizileri Filistin'den iki farklı klinik kaynaktan izole edilmiştir. Klad-4, klad-3'ün yanına, aralarında önemli bir konumlandırma ile

yerleştirilmiştir. Toledo suşuna ait sadece üç dizi konumlandırılmıştır. Bu suşlar Amerikan laboratuvarlarında Toledo suşu ile Towne suşu arasındaki bir rekombinasyon olayından kaynaklanmıştır. Klad-4'ün yakınında klad-5 konumlandırılmıştır. Bu klad, HCMV5'in üç farklı suşuna ait on iki diziden oluşan, inşa edilen ağaçtaki ana kladı temsil etmektedir. Özellikle, bu ana klad içinde yer alan tüm diziler Avrupa'dan izole edilmiştir. HANSCTR, Merlin, UK/Lon ve HANRTR suşlarının üç viral dizisi de dahil olmak üzere, küme-5'te üç tür suş birbiriyle hizalanmıştır. Daha önce tanımlanan kümelerde olduğu gibi, birleştirilen dizilerin çoğunluğu çeşitli klinik kaynaklara aitti. Bu veriler, izole edildikleri klinik kaynağı tanımlamak için kullanılan GP55 parçasının yüksek özgüllüğünü de doğrulamıştır.

Oluşturulan filogenetik ağaçta, ilgili tüm viral dizilerin klinik kaynaklardan izole edildiği görülmüştür. Kullanılan GP55 gen parçasının toplandığı izolasyon kaynağını belirleme kabiliyetini doğrulayan şey, kandan toplanan örneklerimizin yakınında konumlandırılan izolatlarda bulunmuştur. Ayrıca, dahil edilen dizilerin çoğunluğu da kandan ve diğer klinik kaynaklardan izole edilmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17 Şu anda oluşturulan filogenetik ağaçtaki HCMV-5 dizilerine dahil edilen organizmaların ayrıntıları

No	GenBank Erişim No	İzolasyon ismi	Ülke	Klinik izolasyon kaynağı	Klad No
1	MK157427.1	11	ABD	Vajina	1
2	OR965963	Ali-B1	Irak	Kan	2
3	OR965964	Ali-B2	Irak	Kan	2
4	OR965965	Ali-B3	Irak	Kan	2
5	OR965966	Ali-B4	Irak	Kan	2
6	MW899354.1	T8	İran	Kan	2
7	KP745633.1	BE/	Belçika	nazofarengeal aspirat	3
8	KP745639.1	BE/	Belçika	idrar	3
9	KP745725.1	BE/	Belçika	nazofarengeal aspirat	3
10	KR534196.1	JER	Filistin	idrar	3
11	KR534210.1	JER	Filistin	amniyotik sıvı	3
12	KR534212.1	JER	Filistin	amniyotik sıvı	3
13	KX101021.1	Toledo	ABD	rekombinasyon (Toledo x Towne)	4
14	KX101023.1	Toledo	ABD	rekombinasyon (Toledo x Towne)	4
15	KX101024.1	Toledo	ABD	rekombinasyon (Toledo x Towne)	4
16	KY490086.1	HANSCTR	Almanya	Kan	5
17	KY490084.1	HANSCTR	Almanya	Bronko alveolar lavaj	5

Çizelge 4.17 Şu anda oluşturulan filogenetik ağaçtaki HCMV-5 dizilerine dahil edilen organizmaların ayrıntıları (Devam eden)

18	KY490081.1	HANSCTR	Almanya	Kan	5
19	KP973641.1	Merlin	BİRLEŞİK KRALLIK	Viral transfeksiyon	5
20	KP973636.1	Merlin	BİRLEŞİK KRALLIK	Viral transfeksiyon	5
21	KP973637.1	Merlin	BİRLEŞİK KRALLIK	Viral transfeksiyon	5
22	KT726952.1	İngiltere/Lon	BİRLEŞİK KRALLIK	Kan	5
23	KT726947.1	İngiltere/Lon	BİRLEŞİK KRALLIK	Kan	5
24	KT726955.1	İngiltere/Lon	BİRLEŞİK KRALLIK	Kan	5
25	KY490073.1	HANRTR	Almanya	Kan	5
26	KY490074.1	HANRTR	Almanya	Kan	5
27	KY490078.1	HANRTR	Almanya	Kan	5

Bu ağacın mevcut gözlemi, incelenen dizilerdeki gerçek komşuluk-birleşme temelli konumlandırmayı açıkladığı için dizileme reaksiyonlarını doğrulamıştır. Bu çalışmada GP55 dizilerinin kullanılması, bu viral organizmaların gerçek tanımının kesin olarak tanımlanmasının varlığı için daha fazla gösterge sağlamıştır. Çalışmamız, HCMV suşlarının genetik çeşitliliğinin araştırılması ve bu önemli viral patojenlerin evrimsel geçmişine dair içgörü sağlanması için GP55 gen diziliminin faydasını göstermiştir. Bu veriler, bu tür genetik fragmanların, GP55 genine dayalı bu fragmanları kullanarak viral dizileri verimli bir şekilde tanımlamak için yüksek bir potansiyele sahip olmasını gerektirmiştir.

Genel olarak, viral örneklerde bulunan genetik varyasyonları ve bu varyasyonların farklı virüs grupları arasındaki evrimsel ilişkileri nasıl etkileyebileceğini anlamının önemini vurgulamak, her bir HCMV izolatının gerçek biyolojik çeşitliliğini değerlendirmek için son derece önemlidir. Bu nedenle, GP55 gen diziliminin kullanılması HCMV'nin tanımlanmasında önemli avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlar, HCMV ile ilişkili enfeksiyonların ve klinik gözetimin daha iyi anlaşılmasına ve yönetilmesine katkıda bulunabilir.

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Sitomegalovirüs vücut sıvıları yoluyla, hamilelik sırasında trans plasental geçişle veya enfekte bir partnerden hamile bir kadına cinsel yolla bulaşabilir. Enfekte sıvılarla doğrudan temas ve küçük çocuklara veya sağlık hizmeti ortamlarına maruz kalma, bulaşma riskini artırır (Voordouw vd. 2019). İnsan sitomegalovirüsü (HCMV), yoksul ülkelerde konjenital enfeksiyonların birincil nedenidir. Virüs, asemptomatik vakalardan (vakaların %90'ında görülür) ciddi fetal hasara ve düşükle ilişkili ölümlere kadar çok çeşitli klinik semptomlara neden olabilir (Aljumaili vd. 2014). Ayrıca, HCMV prenatal enfeksiyondan sorumlu önemli bir viral ajandır ve ensefalit, koryoretinit, pnömoni, mikrosefali, işitme kaybı ve bilişsel gelişimde gecikme gibi ciddi klinik sonuçlara yol açmaktadır (AbdulSamad ve Yassir 2018). Düşük ve orta gelirli ülkelerde (LMIC) konjenital CMV (cCMV) prevalansı, yüksek gelirli ülkelere (HMIC) göre üç kat daha fazladır (Mhandire vd. 2019). Konjenital CMV tanısı, düşük yapan kadınların vücut sıvılarının herhangi birinde CMV DNA'sının varlığı tespit edildiğinde doğrulanır. Hamile kadınlar CMV reaktivasyonuna karşı daha hassastır çünkü bağışıklık sistemleri zayıfladığından CMV enfeksiyonuna veya reaktivasyonuna karşı daha duyarlı hale gelirler (Mhandire vd. 2019).

5.1 Düşük Yapan Kadınlarda CMV Seroprevalans Sonuçları

Bu çalışma, düşük yapan (140) hastadan 50'sinin (%35,7) CMV için seropozitif olduğunu, 90'ının (%64,3) ise CMV için seronegatif olduğunu ve iki grup arasında anlamlı bir fark olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamızın sonuçları, çalışma popülasyonları arasında (%56,9) seropozitif CMV oranları bulan (Shaker Jaber vd. 2023, Picone vd. 2009) gibi diğer çalışmalarla neredeyse tutarlıdır. Ancak sonuçlarımız, CMV enfeksiyonu prevalans oranının sırasıyla (%60,63 ve %85,5) olduğunu bildiren (Al-Rawazq vd. 2017, Yasir vd. 2020) gibi bizimkinden daha yüksek CMV seroprevalans oranları tespit eden diğer çalışmalarla tutarsızlık göstermektedir. Öte yandan, Salah Al-Deen vilayetindeki Tikrit Eğitim Hastanesi'nde daha önce yapılan bir çalışmada (Al-dorri 2018) düşük yapan kadınların 16'sının (%40) CMV için seropozitif olduğu bildirilmiştir ki bu bizim bulgumuzdan çok daha düşüktür.

CMV enfeksiyonu oranları, araştırma popülasyonunun özelliklerinden önemli ölçüde etkilenebilir. Farklı araştırmalarda yaş, coğrafya, sosyoekonomik düzey, immünolojik durum ve altta yatan tıbbi bozukluklar gibi değişkenlerde farklılıklar bulunabilir. Düşük yapan kadınlar arasında CMV enfeksiyonu oranlarındaki farklılıklar bu değişkenliklerden kaynaklanıyor olabilir. Mevcut ve önceki sonuçlardaki bu farklılık, artan seroprevalans oranlarının CMV virüsünün artan yayılımına bağlı olduğunu göstermektedir.

Hijyenik olmayan koşulların ve daha düşük sosyo-ekonomik statünün yanı sıra daha düşük eğitim seviyelerinin görülme sıklığının artması, gelişmekte olan ülkelerde CMV prevalansının daha yüksek olmasına katkıda bulunan nedenler olabilir (Akunaeziri vd. 2021, Vueba vd. 2022). Bununla birlikte, seroprevalans oranları yaşa, ikamet edilen coğrafi konuma (gelişmekte olan ülkeler tipik olarak daha yüksek oranlara sahiptir) ve sosyoekonomik konuma (ekonomik olarak dezavantajlı sektörler tipik olarak daha yüksek oranlara sahiptir) göre farklılık gösterebilir (Razonable vd. 2013).

5.2 Düşük Yapan Kadınlarda Pozitif CMV IgM ve IgG Sonuçları

Bu çalışmada, CMV ile enfekte düşük yapan kadınların serodiagnozu, 3 (%6) örneğin IgM için seropozitif olduğunu, 8 (%16) örneğin hem CMV IgM hem de IgG için seropozitif olduğunu ve 39 (%78) örneğin sadece IgG için seropozitif olduğunu ve CMV IgG ve CMV IgM seviyeleri arasında oldukça anlamlı bir varyasyon olduğunu göstermiştir.

Düşük yapan kadınlar arasında CMV IgM ve IgG oranları hakkında farklı vilayetlerde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, (Al-Baiati vd. 2014) infertilite için Al-Yarmouk Eğitim Hastanesi'nde CMV enfeksiyonu olan 152 düşük yapan kadın arasında IgM ve IgG oranlarının sırasıyla (%10) ve (%85) olduğunu ortaya koymuştur. Naame vd. (2021) tarafından yapılan bir başka çalışmada, Basra ilindeki Basra Hastanesine başvuran Düşük yapan kadınlar arasında IgM ve IgG oranları sırasıyla (%2,5) ve (%30,8) olarak bulunurken, Saeed vd. (2022) tarafından düşük öyküsü olduğu bilinen 101 gebe kadın üzerinde yapılan bir çalışmada, CMV IgM oranının (%32,6) ve CMV IgG oranının (%61,3) olduğu, aynı zamanda bazı hastaların hem CMV IgM hem de IgG oranına

(%19,3) sahip olduğu bulunmuştur. Bizim sonuçlarımızla karşılaştırıldığında, (Al-Rawazq vd. 2017) daha yüksek antikor oranlarının yanı sıra daha yüksek enfeksiyon oranı bulunmuştur (Al-Mousawi ve AL-Hajjar 2021, Kalaf ve Jameel 2023) tarafından yapılan bir çalışmada, düşük yapan kadınlar arasında sırasıyla yüksek CMV IgG oranları (%89 ve %90) bildirmişlerdir.

IgM'nin gecikmeli olarak ortaya çıkması ve IgG'nin yüksek oranda görülmesi, yanlış negatif sonuçlara yatkınlıkla sonuçlanır, bu nedenle CMV enfeksiyonu için tanı ortamında serum antikor testinin faydasını kısıtlar (Li vd. 2023). İlk enfeksiyon sırasında IgG mevcut olsa bile, yeniden enfeksiyonu veya reaktivasyonu önlemez, ancak hastalığın şiddetini azaltabilir. Eskiden, enfeksiyonun hemen ardından gelişen ve kısa (16-20) haftalık bir süre içinde kaybolan IgM immünoglobulin varlığının yeni veya akut bir enfeksiyona işaret ettiğine inanılırdı (Kalaf ve Jameel 2023). Anti-CMV IgG prevalansı, katılan hastaların çoğunun daha önce virüse maruz kaldığını göstermektedir (Sharmin vd. 2023).

5.3 CMV IgM ve IgG Pozitif Olan Düşük Yapan Kadınların Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

Mevcut çalışmadaki sonuçlar, CMV IgM pozitifliği oranının (20-29) yaş grubunda 9 (%18) olduğunu ve diğer yaş gruplarıyla arasında oldukça anlamlı bir fark olduğunu, CMV IgM pozitifliği için en düşük sayı ve yüzdenin ise (<20) yaş grubunda olduğunu göstermiştir. Pozitif CMV IgG oranı (20-30) yaş grubunda 30 (%60) olup diğer yaş gruplarıyla arasında oldukça anlamlı bir fark bulunmaktadır.

Çalışmamızın sonuçları, düşük yapan kadınların (20-30) yaş grubunda pozitif CMV IgM ve IgG oranlarının sırasıyla (%4 ve %62) olduğunu gösteren başka bir çalışmayla neredeyse uyumludur (Al-Rawazq vd. 2017, Kalaf ve Jameel 2023). Bu yaş grubunda (20-30) enfeksiyon oranının yüksek olması, bu yaş grubunun düşük yapan kadınlar arasında en üreme kategorisi olmasına bağlanmaktadır.

Bir çalışmada, CMV ile enfekte 160 vakanın 52'sinin (%32,5) (16-25) yaş grubundaki kadınlara ait olduğu, bunu (26-35) yaş grubundakilerin izlediği, 8 (%5) vakanın (36-45) yaş grubuna ait olduğu, 15 yaş grubundaki kadınlarda ise sadece 2 (%1,25) vaka tespit edildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, anti-HCMV IgG seropozitifliğinin (20-34) yaş grubundaki kadınlarda daha yüksek olduğunu gösteren diğer birçok çalışma (Slyker vd. 2009, Mahdi vd. 2011, Jihad 2015) ile benzerlik göstermektedir. Bunun nedeni, daha genç yaştaki kadınlarda (20-35) gebelik şansının daha yaşlı veya daha genç yaş gruplarına kıyasla daha yüksek olmasıdır.

Almanya'da (Lachmann vd. 2018) tarafından yürütülen bir çalışmada, 18-45 yaş arası kadınların %51,7'sinde CMV sero-prevalansının yüksek olduğu bulunmuştur. Yaş, CMV seroprevalansı ile güçlü bir şekilde ilişkili kilit bir faktör olarak tanımlanmıştır (Lachmann vd. 2018). Kuzey Amerika'da yapılan çok sayıda çalışma, 40 yaş ve üzerindeki kadınların 40 yaşın altındakilere kıyasla daha yüksek CMV seroprevalansına sahip olduğunu göstermiştir. Meksika'da yapılan bir çalışma, 20-30 yaş arası hamile kadınlar arasında, 20 yaşın altındaki kadınlara kıyasla daha yüksek bir prevalans olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulguların aksine, Avrupa'da düşük yapan kadınlarda yaş ile CMV enfeksiyonu arasında bir korelasyon gözlenmemiştir (Alvarado-Esquivel vd. 2018, Gorun vd. 2020).

5.4 Düşük Yapan Kadınlarda Pozitif CMV IgM ve IgG Sonuçları ve Fetal Yaş

Mevcut çalışmamızda, düşük yapan kadınların sayısı ile fetüsün yaşı arasında yüksek bir fark olduğu ve fetüsün üç aylık (ilk trimester) yaşının 26 (%5) gibi yüksek bir düşük yüzdesini oluşturduğu bulunmuştur.

Fetal enfeksiyonun şiddeti özellikle birinci ve ikinci trimesterde yüksektir. Enfeksiyon gebeliğin 20. haftasından sonra ortaya çıkarsa konjenital defektlerin görülme olasılığı daha düşüktür. Bunun nedeni, ilk trimesterin fetal gelişim için kritik bir dönem olması ve CMV gibi latent enfeksiyonların yeniden aktive olması gibi herhangi bir risk faktörünün fetüsü tehdit edebilmesi olabilir (Tabata vd. 2019, Uenaka vd. 2019). Bu durum, CMV IgM ve CMV IgG antikor titrelerinin 0 ila 3 hafta arasında belirgin hale gelmesi nedeniyle

enfeksiyon evresindeki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Bu durum, akut enfeksiyonların fetüse geçme olasılığının daha yüksek olduğunu ve tekrarlayan enfeksiyonlara kıyasla daha ciddi zararlara yol açabileceğini belirten (Plotogea vd. 2022) bir rapora göre, CMV enfeksiyonunun zamanlamasının virüse karşı bağışıklık gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir, çünkü ilk enfeksiyondan sonra bir latans dönemi vardır ve virüs yeniden aktive olarak kadınlarda tekrarlayan semptomlara ve CMV bulaşmasına neden olabilir.

5.5 CMV IgM ve IgG Pozitif Olan Düşük Yapan Kadınların İkamet Ettikleri Bölgelere Göre Dağılımı

Çalışmamızda, kırsal kesimde yaşayan düşük yapan kadınlarda CMV seroprevalansının kentsel kesimde yaşayanlara kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir; kırsal kesimde yaşayan düşük yapan kadınlarda pozitif CMV IgM oranı 9(%18) iken, kentsel kesimde yaşayan kadınlarda bu oran 2(%4)'tür. Ayrıca, kırsal kesimde ikamet eden düşük yapan kadınlarda pozitif CMV IgG oranı 33(%66) iken, kentsel kesimde ikamet eden kadınlarda bu oran 12 (%24)'dir. Bu bulgular, kırsal kesimde yaşayanlar arasındaki enfeksiyon oranının (%74), kentte yaşayanlar arasındaki enfeksiyon oranından (%24) önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gösteren gibi birçok çalışmayla uyumludur (Al-Rawazq vd. 2017).

Kırsal kesimde yaşayan hamile kadınlarda 1, 2-3 ve 4-5 düşük vakaları, kentsel kesimde yaşayan kadınlara kıyasla en yüksek orana sahiptir (Kalaf ve Jameel 2023). Bununla birlikte, (Hama ve Abdurahman 2013) tarafından yapılan bir çalışma, düşük yapan kadınlar arasında sitomegalovirüs IgG ve IgM oluşumunun ikamet yerlerine göre değiştiğini göstermektedir. Özellikle, metropol bölgelerde serumlarında yüksek düzeyde CMV pozitif çıkan Düşük yapan kadınların sayısında %91'lik önemli bir artış vardır. Ayrıca, ayrı bir çalışma, kırsal bölgelerde sadece %4'lük bir orana kıyasla, kentsel bölgelerde CMV için yüksek serum pozitifliği olan kadınlar arasında düşük oluşumunda %96'lık bir artış olduğunu ortaya koymuştur (Alkharsan vd. 2022). Bulgularımıza göre, virüs enfeksiyonlarının şiddetinin, sağlıklı alışkanlıklar, beslenme alışkanlıklarındaki kültürel farklılıklar, eğitim düzeyleri, birinci basamak sağlık programları ve

enfeksiyonların erken teşhisi gibi çeşitli faktörler nedeniyle bölgeler arasında farklılık gösterdiği söylenebilir (Kakayi vd. 2021). Temizlik ve kişisel bakımla ilgili uygulamaların yanı sıra hijyen uygulamaları ve sıhhi koşullar kırsal alanlar ile kentsel alanlar arasında farklılık gösterebilir. Temiz suyun mevcudiyeti, yeterli sanitasyon tesisleri ve hijyen alışkanlıklarına ilişkin talimatlar kırsal ve kentsel bölgeler arasında farklılık gösterebilir. Sık el yıkama ve vücut sıvılarının uygun şekilde atılması gibi daha iyi hijyen önlemlerinin benimsenmesi CMV'nin yayılmasını etkili bir şekilde azaltabilir. Köylerde kaynaklara erişimin yetersiz olması veya önleyici tedbirler hakkında bilgi eksikliği CMV enfeksiyonu prevalansının artmasına neden olabilir. CMV enfeksiyonu oranları, yoksulluk ve sağlık hizmetlerine yetersiz erişim gibi sosyoekonomik değişkenlerden etkilenebilir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki kırsal bölgeler, yüksek yoksulluk oranları sergileyebilir ve sağlık altyapısının kısıtlı mevcudiyetiyle karşılaşabilir. Bu değişkenler genel refahı etkileyebilir ve CMV enfeksiyonu olasılığını artırabilir.

5.6 Düşük Yapan Kadınlarda mikroRNA Ekspresyon Profili ve Sitomegalovirüs (HCMV) Enfeksiyonu ile İlişkisi

MikroRNA'lar gen ifadesini düzenleyebilen küçük RNA molekülleridir ve viral enfeksiyonlara karşı bağışıklık tepkileri de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde yer aldıkları bilinmektedir (Letafati vd. 2022). Genel olarak mikroRNA'lar, gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan küçük kodlamayan RNA molekülleridir (Abu-Izneid vd. 2021). Belirli mesajcı RNA (mRNA) moleküllerine bağlanarak mRNA'nın bozulmasına veya bir proteine çevrilmesinin engellenmesine yol açabilirler (Correia de Sousa vd. 2019). MikroRNA'lar, viral enfeksiyonlara karşı bağışıklık tepkileri de dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer almaktadır (Zhou vd. 2020). Konjenital sitomegalovirüs (cCMV) enfeksiyonu ile ilgili olarak, çalışmalar virüs-konak etkileşimini etkileyebilecek birkaç mikroRNA tanımlamıştır, bazı mikroRNA'ların viral genleri hedeflediği, böylece viral replikasyonu ve latent bir enfeksiyonun oluşumunu etkilediği gösterilmiştir (Diggin vd. 2021). Tersine, CMV enfeksiyonu hücrel mikroRNA'ların ekspresyonunu da değiştirerek virüsün konakçı bağışıklık tepkilerini manipüle etmesini ve viral hayatta kalma ve

yayılmayı teşvik etmesini sağlayabilir (Dass vd. 2023). HCMV enfeksiyonu olan yenidoğanlarda hücre dışı veziküllerdeki hcmv-miRNA'ların ekspresyonu ile karaciğer hasarı arasındaki bağlantıyı araştırmak için (Zhou vd. 2020) tarafından yapılan bir çalışmada, HCMV ile enfekte bebeklerde bu miRNA'ların ekspresyon seviyelerini sağlıklı bebeklerinkine karşılaştırmışlardır. Sonuçlar ,miRNA seviyelerinin HCMV ile enfekte bebeklerde enfekte olmayan bebeklere göre önemli ölçüde daha yüksek (4 kat artışla) olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, bir embriyonun düzgün gelişimi, kısmen miRNA'lar tarafından kontrol edilen biyokimyasal süreçler olan trofoblastın çoğalmasına, farklılaşmasına ve ölümüne dayanır (Liang vd. 2017, Ashary vd. 2018).

Ayrıca, viral protein kodlayan genlerle birlikte viral mikroRNA'lar (miRNA'lar) gibi kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) da HCMV litik enfeksiyonu sırasında üretilir. HCMV tarafından kodlanan mikroRNA'ların (miRNA'lar) latent enfeksiyon sırasında ifade edilme kalitesi veya miktarının analizi, miRNA ifadesinin latent yaşam döngüsünün gerekliliklerine çok uygun olmasına rağmen sınırlı kalmıştır (Meshesha vd. 2016). Kodlamayan RNA'lar aynı anda birçok hedefin ifadesini düzenleyebildiğinden ve gen ifadesini küresel olarak değiştirebildiğinden, latens sırasında üretildikleri takdirde bağışıklık sisteminin latent olarak enfekte olmuş hücreleri tespit etmesini tetiklemeyecek immünojenik olmayan moleküllerdir (Rossetto vd. 2013, Meshesha vd. 2016). HCMV tarafından üretilen bağışıklık kaçırma genlerinin çoğu muhtemelen viral yaşam döngüsünün bu aşamasında aktif olmadığından, bunun sağlanması özellikle latens sırasında çok önemlidir (Lau vd. 2016). Bu çalışmada, düşük yapan kadınlarda ve kontrol örneklerinde CMV tarafından kodlanan dört miRNA geni, housekeeping genler (U6 geni) ile normalize edilerek incelenmiştir. Veriler, tüm düşük yapan kadın gruplarının CMV tarafından kodlanan miRNA'larda belirli bir seviyeye sahip olduğunu göstermiştir. Özellikle hcmv-miRUL36-5P, hcmv-miRUL36-3P, hcmv-miRUL22A-3P ve hcmv-miRUL148D, CMV ile enfekte düşük yapan kadınlarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek seviyelerde ifade edilmiştir. Bu bulgular, değişmiş HCMV kodlu miRNA'ların Düşük yapan ve CMV ile enfekte olmuş kadınlara özgü olabileceğini düşündürmektedir.

5.6.1 hcmv-miRUL36-5P

Çalışmamızda düşük yapan kadın grubunda hcmv-Mir-UL36-5P ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Düşük yapan kadınlarda ortalama kat değişimi 3,11 iken, kontrol grubunda ($1\pm0,0$) olarak bulunmuştur. 3,11 kat değişim, hcmv-miRUL36-5P ekspresyon seviyesinin CMV ile enfekte düşük yapan kadınlarda kontrol grubuna göre yaklaşık 3,11 kat daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Bu, genin düşük yapan kadın grubunda kontrol grubuna kıyasla yukarı regüle olduğu anlamına gelir, bu da bu spesifik mikroRNA'nın ekspresyon seviyesinin düşük yapan kadınlarda daha yüksek olduğu anlamına gelir. Sonuç, düşük yapan kadınlar için ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerinin (3.011 ± 0.78), kontrol grubuna (1.23 ± 0) kıyasla anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir.

hcmv-Mir-UL36-5P'nin yukarı regülasyonu CMV enfeksiyonu ve gebelik kaybındaki potansiyel rolü ile ilişkilidir. Aynı bir araştırma, SLC25A6'nın (ANT3) western blot analizi ile miR-UL36-5P'nin doğrulanmış bir hedefi olduğunu ve apoptotik yolun baskılanmasına yol açtığını göstermiştir (Guo vd. 2015). Ayrıca, aynı bir çalışma, SOT hastalarında antiviral tedavinin ilk aşamalarında miR-UL36-5P seviyelerindeki yükselmenin viremi süresinin uzamasıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu korelasyon, bu miRNA'nın viral üremeyi artırdığının gösterildiği laboratuvar modellerinde gösterilmiştir. Yazarlar ayrıca yukarıda bahsedilen etkinin, tedavi ile bağışıklık sisteminin azaltılması gibi diğer çelişkili faktörlere atfedilebileceğini öne sürmüştür (Mohammad vd. 2014). Verilerimiz ayrıca her iki miR-UL36-3P/5P'nin de CMV enfeksiyonunun aktif fazında önemli ölçüde arttığını göstermiştir. miR-UL36-5p'nin doğrudan hedef geni olan ANT3 deneysel olarak doğrulanmıştır. Latent olarak enfekte olmuş hücrelerde ANT3 ekspresyon seviyelerinde önemli düşüşler görülmüştür, bu da miR-UL36-5p'nin ANT3'ün bir inhibitörü olarak görev yapabileceğini düşündürmektedir. miR-UL36-5p'nin yukarı regülasyonu ANT3'ün baskılanmasıyla sonuçlanır, bu da miR-UL36-5p'nin konakçı-virüs dengesini düzenlemek için gerçek HCMV enfeksiyonu sırasında anti-apoptotik bir miRNA olarak çalışabileceğini düşündürür (Guo vd. 2015). Zhou vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, HEK293 hücrelerinde miR-UL36-5P'nin yüksek oranda ekspresyonunun HCMV DNA sentezinde artışa yol açtığı ve miR-UL36-5P'nin HCMV replikasyonuna katkıda bulunan viral bir

miRNA olabileceği ortaya konmuştur (Golshan vd. 2021) tarafından yürütülen bir araştırma, aktif CMV ile enfekte hastalarda ve kontrol grubunda viral miRNA'ların gen ekspresyonunu incelemeyi amaçlamıştır. Çalışma, CMV miRNA'larının çoğunun, latent miRNA'lara ve kontrollere kıyasla aktif CMV ile enfekte KTR'lerde kayda değer bir yukarı regülasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma, miR-UL36-3P/5P'nin latent CMV ile enfekte hastalarda değerlendirilen tüm miRNA'lar arasında en yüksek ekspresyon seviyesini sergilediğini göstermiştir. Bu çalışma aynı zamanda CMV enfeksiyonunun aktif fazı sırasında her iki miR-UL36-3P/5P seviyesinde kontrol grubuna kıyasla önemli bir artış olduğunu göstermiştir.

Virüs latansından reaktivasyona geçiş sırasında dolaşımda insan sitomegalovirüsü tarafından kodlanan mikroRNA'ların ekspresyon modeli (Zhou vd. 2020) tarafından yapılan bir çalışmada araştırılmış ve bulgular CMV'den etkilenen bireyler arasında gen ekspresyonunda 2,26 kat artış olduğunu göstermiştir. Artmış gen ifadesi açısından bu sonuç, çalışmamızın bulgularıyla karşılaştırılabilir. Dahası, araştırmalar CMV tarafından kodlanan miRNA seviyelerindeki değişiklikler ile hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık, kanser, diyabet, psikiyatrik ve nörolojik bozukluklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişimi arasındaki ilişkiyi deneysel olarak ortaya koymuştur. Düzensiz viral miRNA'ların konak transkriptomunu değiştirebileceğine inanılmaktadır (Wang vd. 2019). CMV'nin dolaşımdaki miRNA'ları ile insan hastalıkları arasındaki ilişki ilk kez esansiyel hipertansiyonda doğrulanmıştır (Li vd. 2011). CMV enfeksiyonunun yeniden aktivasyonu, nakil alıcıları gibi bozulmuş veya olgunlaşmamış bağışıklık sistemlerini barındıran hastalarda ciddi ve yaşamı tehdit edici olabilir (Requião-Moura vd. 2015). miRNA'lar, nakil sonrası CMV seropozitif SOT alıcılarında viral replikasyonun kontrolünü teşvik edebilir (Han vd. 2017). Çok sayıda çalışma Sitomegalovirüste mikroRNA'ları göstermiş (Gao 2021) ve CMV'ye yakalanmış hamile kadınlarda hcmv-miRUL36-5P'nin (APO'da kat değişikliği (0,95) ile) olduğunu bulmuştur. Bu sonuç bizim çalışmamızdaki bulgularla çelişmektedir.

5.6.2 hcmv-miRUL36-3P

Bu çalışmada, düşük yapan kadınlar grubunda hcmv-miRUL36-3P ekspresyon düzeyinin

ortalama 21,16 kat değiştiği, kontrol grubunda ise $1\pm0,0$ olduğu gösterilmiştir. 21,16 kat değişim, hcmv-miRUL36-3P ekspresyon seviyesinin düşük yapan kadın grubunda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 21,16 kat daha yüksek olduğunu göstermektedir. Sonuçlar ayrıca düşük yapan kadınlar için ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerinin kontrol grubuna (1.179 ± 0.03) kıyasla (19.58 ± 3.7) olduğunu ve oldukça anlamlı bir fark olduğunu ortaya koymuştur. Bu, genin CMV'li düşük yapan kadın hastalarda düzenlenmemiş olduğunu ve potansiyel olarak gebelik sırasında CMV enfeksiyonunun patogenezinde rol oynadığını göstermektedir.

Çok sayıda çalışma mikroRNA'ların sitomegalovirsteki önemini ortaya koymuştur. (Gao vd. 2021) tarafından yapılan bir çalışmada, hcmv-miRUL36-3P'nin, 1,59 kat değişiklikle, CMV'ye yakalanmış hamile kadınlarda olumsuz gebelik sonuçlarının (APO) bir göstergesi olarak hizmet edebileceği bulunmuştur. Bu sonuç, gen ifadesinde bir artış gösterdiğimiz için bulgularımızla benzerdir. (Huang vd. 2013) tarafından hazırlanan bir rapora göre, CMV enfeksiyonu sonrası viral DNA kopyalarının yaygınlığı, farklı zaman noktalarında gerçek zamanlı PCR ile llmştr. HPI 24'te pSilencer-miR-UL36 ile transfekte edilen hücrelerdeki viral DNA kopya sayıları, oldukça anlamlı bir farkla transfekte edilen hcrelerdekinden 3 kattan fazla daha yüksekti. CDK6 ve FAS, miR-UL36-3P için kanıtlanmış hedeflerdir ve bu şekilde miR-UL36-3P hedef hücrelerde apoptozu inhibe edebilir (Kim vd. 2015). Ayrıca, bir çalışma miR-UL36-3P'nin latens ilişkili protein UL138'in ekspresyonunu aşağı düzenleyerek etkili litik replikasyonu teşvik etmede bir rolü olduğunu ve miR-UL36'nın ektopik ekspresyonunun fibroblastlarda replikasyonun erken aşamalarında CMV DNA sentezini artırdığını göstermiştir (Golshan vd. 2021) ve bu sonuç, gen ekspresyonunda bir artış gösteren çalışmamızdaki bulgularla benzerdir.

5.6.3 hcmv-miRUL22A-3P

Bu alışma, CMV ile enfekte düşük yapan kadın grubunda kontrol grubuna kıyasla hcmv-miRUL22A-3P ekspresyonunu göstermiştir. Düşük yapan kadınlarda ortalama kat değişiminin 2,92 kat olduğu, kontrol grubunda ise $1\pm0,0$ olduğu gösterilmiştir. 2,92 kat değişim, hcmv-miRUL36-5P ekspresyon seviyesinin CMV'li düşük yapan kadınlarda

kontrol grubuna göre yaklaşık 2,92 kat daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir, bu da genin kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda upregüle olduğunu, yani bu spesifik mikroRNA'nın ekspresyon seviyesinin kadın hastalarda daha yüksek olduğunu göstermektedir. Sonuçlarımız ayrıca düşük yapan kadınlar için ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerinin (2.77 ± 0.78), kontrol grubuna (0.7197 ± 0.02) kıyasla oldukça anlamlı bir farkla yüksek olduğunu göstermiştir.

Daha önce, HCMV miRUL-22A nakledilen hastalarda bir biyobelirteç olarak tanımlanmış ve viral miRNA'ların gen ekspresyonu üzerinde çok yönlü etkilere sahip olabileceğini ve gelecekteki potansiyel biyobelirteçlerini öneren açık viroloji ve klinik sonuçlarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, viral litik aşamada önemli bir rol oynamaktadırlar (Ji vd. 2006). hcmv-miRUL22A-3P'nin yukarı regülasyonu CMV enfeksiyonu ve gebelik kaybındaki potansiyel rolü ile ilişkilidir. Mir-UL22A-3P çoğunlukla apoptoz üretimi ile ilgilidir (Skaletskaya vd. 2001). Mir-UL22A, enfekte HPC'lerde (hematopoietik progenitör hücreler) latansın sürdürülmesinde gerekli olan SMAD3'ün aşağı regülasyonu yoluyla viral rekürrensi indükler (Hancock vd. 2020). Çalışmada miR-UL22A'nın C-MYC'yi hedef aldığı ve SOT hastalarında CMV'nin tekrarlayan viremisini desteklemek için ısı şoku proteinlerinin baskılanmasıyla sonuçlandığı doğrulanmıştır. CMV patogenezinin anlaşılmasına yardımcı olan yeni bir immün modülasyon mekanizması önermişlerdir ve daha ileri değerlendirmelerden sonra nakil sonrası klinik tanı için aday bir biyobelirteç olabilir (Lisboa vd. 2015).

CMV miR-UL22A-3P'nin işlevini analiz eden sınırlı çalışma vardır, ancak miRNA'ların viral enfeksiyonun nüksetmesini sağladığı görülmektedir (Lau vd. 2016b). Gao vd. (2021) tarafından yapılan önceki bir çalışmada ,miRUL22A-3P'nin kat değişikliği (1,23) ile CMV'ye yakalanmış hamile kadınlarda olumsuz gebelik sonuçlarının (APO) bir göstergesi olarak hizmet edebileceği bulunmuştur ve bu sonuç, gen ifadesinde artış gösteren sonuçlarımızla örtüşmektedir. Golshan vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, miR-UL22A-3P'nin latent CMV ile enfekte grupta kontrollere kıyasla azaldığı ve miRNA'ların CMV enfeksiyonunun hem litik hem de latent fazlarında rol oynadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada, aktif CMV ile enfekte KTR'lerde latent olanlara kıyasla son derece yüksek bir miR-UL22A-3P ekspresyon seviyesi tespit

edilmiştir, bu da CMV patogenezindeki olası kritik ve merkezi biyolojik rollerini kanıtlamaktadır, bu sonuç gen ekspresyonundaki artışın CMV'nin viral yükündeki artışla doğru orantılı olduğunu doğrulamaktadır. Bu sonuç, mevcut çalışmamızda elde edilen sonuçlarla tutarlıdır.

5.6.4 hcmv-miRUL148D

Düşük yapan kadın grubunda hcmv-miRUL148D ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve düşük yapan kadınlarda ortalama 2,66 kat değişim olduğu, kontrol grubunda ise $1 \pm 0,0$ olduğu ortaya çıkmıştır. 2,66 kat değişim, hcmv-miRUL36-5P ekspresyon seviyesinin CMV'li düşük yapan kadınlarda kontrol grubuna göre yaklaşık 2,66 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu, genin kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda yukarı regüle olduğu anlamına gelir ve bu spesifik mikroRNA'nın ekspresyon seviyesinin kadın hastalarda daha yüksek olduğunu gösterir. Sonuçlar ayrıca düşük yapan kadınlar için ($2^{-\Delta\Delta CT}$) değerinin kontrol grubuna (1.172 ± 0.01) kıyasla (2.76 ± 0.44) olduğunu ve anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir.

hcmv-miRUL148D'nin yukarı regülasyonu CMV enfeksiyonu ve gebelik kaybındaki potansiyel rolü ile ilişkilidir. miR-UL148D hücrel hedeflerinden bazıları RANTES (CCL5; CMV litik enfeksiyonu sırasında deneysel olarak doğrulanmıştır) (Kim vd. 2012), IEX-1 (miR-UL148D tarafından baskılanır ve hedef hücrelerin apoptozunda inhibisyona neden olur) (Wang vd. 2013), IER5 (CDC25B ekspresyonunu artırarak latans oluşturabilir ve IE gen ekspresyonunu sınırlayabilir) (Pan vd. 2016). ACVR1B (Aktivin A reseptörü 1B; aynı zamanda latens sırasında miRUL148D için başka bir hedeftir ve aktivin A sinyal kaskadının bir parçasıdır) (Loomans ve Andl 2014). Daha önce, miR-UL148D'nin kronik hepatit B (Pan vd. 2016) ve Oral liken planusta yukarı regüle olduğu gösterilmiştir (Ding vd. 2017). MiR-UL148D, IEX-1'in translasyonunu transkripsiyon sonrası düzeyde inhibe eder ve IEX-1'in azalması, in vitro HCMV enfeksiyonu sırasında anti-apoptotik etkiler gösterir. MiR-UL148D, başka bir pro-apoptotik gen olan ERN1'in ekspresyonunu aşağı regüle eder. ERN1 geninin endoplazmik retikulum stresi kaynaklı apoptozun başlatılmasında rol oynadığı bildirilmiş ve in silico analizler ERN1'in miR-UL148D tarafından hedef alındığını öngörmüştür (Wang vd. 2013, Babu vd. 2014). Bu

miRUL 148-D, viral enfeksiyon sırasında kemokin (C-C Motif) ligand 5 (CCL5) genini ve RANTES'in (Aktivasyonda Düzenlenen, Normal T Eksprese Edilen ve Salgılanan) 3'UTR'sini hedefleyerek bağışıklıktan kaçınmaya katkıda bulunur (Kim vd. 2012). Ayrıca, HCMV-miRUL-148D latent olarak enfekte olmuş monositte aktivin A'ya yanıt olarak IL-6 salgılanmasını aşağı regüle eder, bu da replikasyon, enfeksiyon ve bağışıklık sisteminden kaçma kabiliyetindeki rolünü açıklar (Pan vd. 2016).

RANTES, T hücrelerinin, bazofillerin ve eozinofillerin enfeksiyon bölgesine toplanmasında rol oynayan pro-inflamatuar bir kemokindir. Mutasyona uğramış miR-UL-148D içeren HCMV virüsü RANTES seviyesinde düşüşe neden olamaz (Diggins and Hancock 2018). Goodrum (2016) ve Pan vd. (2016) tarafından yapılan çalışmalarda, enfekte monositlerde IL-6'daki azalmanın aktivin A reseptörünü (ACVR1B) hedef alarak HCMV miRUL-148D ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Lau vd. (2016a) da söz konusu viral miRNA'nın ifadesinin CCL5'i hedefleyerek latent enfeksiyon sırasında arttığını göstermiştir. UL-148D geni, viral litik aşamada daha fazla ifade edilen ve virüs replikasyonunda önemli bir rol oynayan temel bir HCMV glikoproteini olarak tanımlanmıştır (Golshan vd. 2021).

Bir çalışmada, HCMV miRUL-148D ve UL-148D geninin ekspresyon seviyelerinin inaktif ve aktif HCMV ile enfekte gruplar arasında karşılaştırıldığı bildirilmiştir. Sonuçlar, bu miRNA'nın latent aşamada çalışılan genden daha fazla eksprese edildiğini göstermiştir. Ayrıca, aktif HCMV ile enfekte gruplarda miRUL-148D ekspresyonunun UL-148D genine kıyasla azaldığı gösterilmiştir (Golshan vd. 2021).

Çok sayıda çalışma Sitomegalovirüste mikroRNA'ların önemini ortaya koymuş (Gao vd. 2021) ve hcmv-miRUL148D'nin 1,73 kat değişiklikle CMV'ye yakalanmış hamile kadınlarda olumsuz gebelik sonuçlarının (APO) bir göstergesi olarak kullanılabileceğini bulmuştur. Bu sonuç, gen ekspresyonunda artış gösteren çalışmamızdaki sonuçlarla benzerdi. Zhou vd. (2020) tarafından virüs latansından reaktivasyona kadar dolaşımda insan sitomegalovirüsü tarafından kodlanan mikroRNA'ların farklı ekspresyon paternleri üzerine bir çalışma yapılmıştır. Elde ettikleri sonuçlar, sitomegalovirüs ile enfekte olanlarda gen ekspresyonunda (2,87) kat değişiklik gösteren bir artış olduğunu

göstermiştir ve bu sonuç, artan gen ekspresyonu açısından bulgularımızla benzerlik göstermektedir.

Aksine, miR-UL148D belirgin şekilde yüksek ekspresyon göstermiş ve RANTES seviyeleri ile ters orantılı olmuştur. İlginç bir şekilde, miR-UL148D-1 HCMV enfeksiyonu sırasında RANTES ekspresyonunu inhibe edebilir, böylece CMV ile enfekte fibroblast hücrelerinden RANTES salınımının belirgin şekilde inhibe edilmesine ve konakçı bağışıklık sisteminin modüle edilmesine yol açar (Kim vd. 2012). Ek olarak, miR-UL148D'nin ACVR1B'yi hedef aldığı ve HCMV latent enfekte primer miyeloid hücrelerde pro-enflamatuar sitokin sekresyonunu sınırladığı bulunmuştur (Lau vd. 2016a).

5.7 qPCR Tabanlı Test ile CMV Viral Yük Ölçümü

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) tabanlı QNAT, PCR teknolojisi aracılığıyla az miktarda viral nükleik asidi tespit edip çoğaltarak klinik numunelerdeki CMV viral yükünü ölçmek için kullanılan kantitatif bir testtir (Sam vd. 2023). Yüksek hassasiyeti ve verimliliği nedeniyle qPCR, CMV enfeksiyonu için tercih edilen tanı testi haline gelmiş ve klinisyenlerin enfeksiyonları etkili bir şekilde teşhis ve tedavi etmelerini sağlamıştır. Preemptif tedaviye rehberlik etmek, antiviral tedavinin etkinliğini değerlendirmek, tedavinin zamanlamasını belirlemek ve viral replikasyonu ve hastalığın ilerlemesini izlemek için klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır (Aman vd. 2020, Sam vd. 2023). CMV DNA'sının ölçümü ile viral yük (yani viral replikasyon derecesi) arasında bir korelasyon vardır ve aktif CMV replikasyonu, daha yüksek viral yük değerleri veya viral yükte artan bir eğilim ile kendini gösterir (Razonable ve Hayden 2013).

Çalışmamızdaki veriler, düşük yapan kadınlarda ortalama CMV viral yük konsantrasyonunun 5431.92, kontrol grubunda ise 0.00 olduğunu ve iki grup arasında oldukça anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir.

Anne kanında virüs dolaşımının artmasının anne-fetüs ara yüzeyinde daha fazla viral yüke yol açarak plasental enfeksiyon ve konjenital bulaşma olasılığını artırabileceği düşünülmüştür. Bu fikir yakın zamanda dikey CMV bulaşmasının matematiksel modellenmesi ile desteklenmiştir (Gong vd. 2022). Buna ek olarak, nötralizasyon, antikora bağlı hücrel sitotoksiste (ADCC) ve antikora bağlı hücrel fagositoz (ADCP) dahil olmak üzere maternal virüse özgü fonksiyonel antikor yanıtlarının viral replikasyonun düzenlenmesinde ve dikey bulaşmanın önlenmesinde çok önemli bir rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bunun nedeni, hücreden hücreye yayılmanın CMV'nin yayılması için temel bir mekanizma olmasıdır. Bu nedenle, hem hücresiz hem de hücreyle ilişkili virüsü hedef alan antikor işlevlerinin etkili kontrol için gerekli olabileceğine inanılmaktadır (Otero vd. 2023).

CMV viral yükünün ölçümü, uzun vadeli sonuçların olasılığını tahmin etmek için kullanılabilir. Düşük viral yük, gelecekteki normal gelişimin makul bir göstergesidir (Ross vd. 2009, Cannon vd. 2011). Asemptomatik yenidoğanlarda viremiyi uzun vadeli sekellerin bir öngörücüsü olarak değerlendiren sınırlı sayıda uzunlamasına çalışma olmasına rağmen, gebelik sırasında primer enfeksiyonu olan annelerin 33 asemptomatik yenidoğanı arasında yapılan bir çalışma, ≥ 12.000 IU/ml eşik değerinin geç ve ilerleyici CMV ile ilişkili sekel riskini öngördüğünü göstermiştir. Ayrıca, ≥ 17.000 IU/ml eşik değeri gecikmiş başlangıçlı SNHL'yi daha doğru bir şekilde öngörmektedir (Forner vd. 2015).

Kuzey Amerika'daki birçok merkez yakın zamanda yüksek riskli hastalarda tedaviye başlamak için 25 ila 300 IU/mL arasında CMV viremi eşik değerlerini benimsemiştir (Tan vd. 2015). Avrupa'daki bazı merkezler ise viremi ≥ 1500 ila 2500 IU/mL'ye ulaşana kadar anti-CMV tedavisinin başlatılmasını geciktirmektedir (Giménez vd. 2014). CMV viremi eşiklerinin yorumlanmasına, çalışmalar arasında CMV DNA seviyelerindeki önemli farklılıklar nedeniyle dikkatle yaklaşılmalıdır; bu farklılıklar numune türünden (örneğin, plazmaya kıyasla tam kanda daha yüksek CMV viral yükleri) ve belirli CMV PCR platformundan etkilenmektedir (Preiksaitis vd. 2016). Green vd. (Green vd. 2012) tarafından yapılan bir çalışmaya göre, 250 IU/mL CMV viral yükü ile transplantasyonu takip eden ilk 60 gün içinde daha yüksek ölüm riski arasında bir korelasyon vardır. Bu

durum, CMV viremisini bu eşiğin altında tutmak için önleyici tedbirler alınması gerektiğini göstermektedir. Kortikosteroid veya T hücresi tükenmesi gibi hızlı CMV replikasyonu yaşama olasılığı daha yüksek olan hastalarda daha düşük bir tedavi eşiği (25 IU/mL) belirlemenin, en fazla risk altında olanlara önleyici tedaviyi hedeflemenin etkili bir yolu olduğu büyük bir HCT kohortunda gösterilmiştir. Tan vd. (2015) CMV DNA seviyeleri 135 IU/mL'ye ulaştığında preemptif tedaviye başlanmasını önermiştir. Bununla birlikte, antiviral tedaviye erken başlanmasının, zaman içinde düzelebilecek CMV viremi vakaları için tedavi israfına yol açabileceğini de kabul etmişlerdir.

5.8 CMV DNA Dizilemesi

CMV'nin genetik çeşitliliğine odaklanan araştırmalar; popülasyondaki birçok gen varyantının sıklığı hakkında daha fazla bilgi edinmek, CMV enfeksiyonu tespitinin doğruluğunu artırmak ve risk gruplarını etkili bir şekilde yönetmek için gereklidir (Vankova vd. 2023).

Enfekte bireylerin fiziksel örneklerinde bulunan CMV varyasyonlarını tespit etmek için çeşitli teknikler kullanılmaktadır: DNA kısıtlama fragman uzunluğu polimorfizm analizi, Sanger fragman dizilimi, gerçek zamanlı genotipe özgü PCR ve büyük paralel dizilim. Tercih edilenler dizileme tabanlı DNA analiz teknikleridir. Bu teknikler, dünya çapında genetik olarak çeşitlilik gösteren önemli sayıda CMV suşunun varlığına dair kanıt sağlamıştır (Dhingra vd. 2021, Brait vd. 2022). UL55(gB), UL73(gN), UL74(gO) ve UL144-TNRF şu anda uluslararası araştırmacılar tarafından klinik CMV izolatları arasında ayırım yapmak için potansiyel epidemiyolojik göstergeler olarak kullanılan en kapsamlı araştırılmış genlerdir (Garcia de Figueiredo vd. 2018, Külekci vd. 2022).

CMV'nin genetik değişkenliği, virüsün bağışıklıktan kaçınma yollarını (örneğin, antijen epitoplarının değişiklikleri) gerçekleştirmesine, konak organizmanın hücreleri için tropizmi geliştirmesine, virüs replikasyonunun etkinliğini artırmasına ve farmasötik preparatlara karşı duyarlılığı değiştirmesine olanak tanır (Vankova vd. 2023).

CMV'nin genotipi karmaşık gen kompleksi tarafından belirlenir. RL5A, RL6, RL12, RL13, UL1, UL9, UL11, UL73, UL74, UL120, UL146 ve UL139 olmak üzere on iki genin ayırt edici polimorfizmlere sahip olduğu bilinmektedir (Suárez vd. 2019). Sanger dizileme tabanlı genotipik analiz, günümüzde ticari referans laboratuvarları tarafından kullanılan baskın tekniktir. İlaça dirençli mutasyonların tanımlanması için kısıtlama parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ve gerçek zamanlı PCR teknikleri kullanılabilir. Sanger dizileme tekniğinin bir dezavantajı, doğru karakterizasyon için en az 1000 IU/mL viral yük içeren katı numune gereklilikleridir. Ek olarak, tüm potansiyel direnç mutasyon bölgelerini içerecek şekilde analiz için gereken parçanın önemli uzunluğu bir zorluk teşkil etmektedir (Chou 2020).

HCMV'nin klinik izolatları, başta UL55 (gB), UL73 (gN) ve UL75 (gH) gibi zarf glikoproteinleri olmak üzere çeşitli genlerde genetik varyasyonlara sahiptir. (Hage vd. 2017). UL55 geni tarafından ifade edilen ve beş farklı genotipe (gB1, gB2, gB3, gB4 ve gB5) ayrılan glikoprotein B (gB) olarak bilinen glikoprotein, CMV'nin en bol bulunan ve en çok korunan glikoproteinidir (Dong vd. 2023, Coşkun vd. 2023).

CMV DNA için PCR, kaynak materyaldeki viral DNA miktarının ölçümüne bağlı olarak kalitatif veya kantitatif olarak kategorize edilebilir. Kalitatif yaklaşımda aşırı tespitten kaçınmak için eşiğin titiz bir şekilde kalibre edilmesi gerekir. Kantitatif bir analitik teknik olan Gerçek Zamanlı PCR, proaktif ilaç tedavisi için CMV enfeksiyonuna duyarlı hastaları tespit etmek ve tedaviye verdikleri yanıtı değerlendirmek için bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerin sürekli gözetimini sağlar (Yalda ve Goreal 2023).

Gerçekleştirilen dizileme reaksiyonları, HCMV'nin 5. kategorisine veya HCMV5'e atfedildiği tespit edilen incelenen örneklerin doğru kimliğini göstermiştir. B1-B4 örneklerinin nükleik asit dizilerinin HCMV5'in en homolog referans dizileriyle (GenBank acc. no. U88704.1) hizalanması, bu referans dizilerde bulunmayan dört yeni nükleik asit varyantının (B1'de 155C>T, B3'te 160T>C ve 161T>C ve B4'te 177T>G) varlığını ortaya çıkarmıştır. Bu varyantların çevirisi, 155C>T'nin GP55 kodlu p.59Ser>Phe proteini üzerinde yanlış anlamlı bir etki sergilediğini göstermiştir. Benzer şekilde, hem 160T>C hem de 161T>C, glikoprotein B değişken bölgesi üzerinde p.61Phe>Pro'nun yanlış anlam

etkisinin uygulanmasına katkıda bulunmuştur. Üçüncü varyant 177T>G ise nekrotik glikoprotein üzerinde p.65Gly='nin sessiz bir etkisini sergilemiştir. p.59Ser>Phe mutasyonu, 59. pozisyonda polar yüksüz serinin hidrofobik fenilalanine dönüşümünü içerir. Bu değişikliğin proteinin 3D yapısını önemli ölçüde değiştirmesi, katlanma stabilitesini ve konak reseptör ile etkileşimleri etkilemesi beklenmektedir.

Benzer şekilde, p.61Phe>Pro mutasyonu, hidrofobik fenilalanini 61. pozisyonda siklik ve sert proline dönüştürerek, genel katlanma ve stabiliteyi potansiyel olarak etkileyen bükülmeler ve kıvrımlar dahil olmak üzere beklenen yapısal değişikliklere yol açar. Ağaçtan, incelenen örneklerin farklı bir filogenetik pozisyona sahip olduğu ve kandan izole edilen bir klinik İran izolatının yakınına uydukları sonucu çıkarılmıştır. Ağaçtan, İran izolatları kadar incelenen Irak örneklerinin de kandan izole edilen ortak bir Amerikan suşundan (GenBank acc. no. MK157427.1) türediği sonucuna varılmıştır. HCMV5'in bilinen diğer suşlarının ise aynı ağaçta başka bir klad sergilediği tespit edilmiştir. Bu araştırmada, dört HCMV izolatı filogenetik çeşitlilik aralığı açısından karşılaştırılmıştır. İncelenen tüm örneklerin HCMV'nin tip-5'ine ait olduğu tespit edilmiştir. B1'de 155C>T, B3'te 160T>C ve 161T>C ve B4'te 177T>G olmak üzere dört yeni nükleik asit varyantı tanımlanmıştır. Tanımlanan mutasyonların, proteinin konak reseptörleriyle etkileşime girme kabiliyetini etkileyebileceği ve bunun da potansiyel işlevsel sonuçları olabileceği tahmin edilmektedir. İncelediğimiz B1-B4 örneklerinin klinik suşlara yakın olması nedeniyle GP55 geni, yüksek hassasiyet ve özgüllüğü, düşük maliyeti ve hızlı geri dönüş süresi açısından HCMV'nin klinik örneklerini tanımlamak ve karakterize etmek için güçlü bir araçtır.

Çalışmanın sonuçları, hem hcmv-miRUL36-5P, hcmv-miRUL36-3P, hcmv-miRUL22A-3P hem de hcmv-miRUL148D genlerinin, sağlıklı hamile kadınlara kıyasla CMV enfeksiyonu ile düşük yapan kadınlarda yukarı regüle olduğunu göstermektedir. Bu yukarı düzenleme istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulunmuştur ve bu genlerin düşük ve CMV enfeksiyonu bağlamında bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu bulguların olası bir yorumu bu mikroRNA'ların yukarı regülasyonunun düşük geçiren kadınlarda CMV enfeksiyonuna bir yanıt olabileceğidir.

Sonuçlar

1. Mevcut çalışmanın sonuçları, Irak'da Babil Vilayetinde yüksek CMV antikorlarına (CMV IgG) sahip kadınlarda virüsün yeniden aktive olduğunu göstermiştir.
2. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, hcmv-MikroRNA'ların (Mir-UL148D, Mir-UL22A-3P, Mir-UL36-3P ve Mir-UL36-5P) ekspresyonu, CMV ile enfekte olmuş düşük yapan kadınlarda gebelik komplikasyonlarında rol oynayabilecek şekilde artmıştır ve sonuçlar anlamlı istatistiksel değere sahiptir.
3. ROC eğrisi testi, bu çalışmadaki tüm MikroRNA'lar için 1'e yaklaşan yüksek bir eğri altı alanının (AUC) varlığını ortaya koymuştur ki bu da evlilik öncesi evrenin gelişimini belirlemek için önemli bir tanı aracı olarak kabul edilmektedir.
4. Bu çalışmada, HCMV'nin dört izolatu filogenetik çeşitlilik aralığı açısından karşılaştırılmış ve incelenen tüm örneklerin HCMV'nin tip-5'ine atfedildiği bulunmuştur. B1'de 155C>T, B3'te 160T>C ve 161T>C ve B4'te 177T>G olmak üzere dört yeni nükleik asit varyantı tanımlanmış olup, tanımlanan mutasyonların proteinin konak reseptörleriyle etkileşime girme kabiliyetini etkileyebileceği ve bunun da potansiyel işlevsel sonuçları olabileceği düşünülmektedir.
5. İncelediğimiz B1-B4 örneklerinin klinik suşlara yakın olması nedeniyle, GP55 geninin yüksek duyarlılık ve özgüllük, düşük maliyet ve hızlı geri dönüş süresi açısından HCMV'nin klinik örneklerini tanımlamak ve karakterize etmek için güçlü bir araç olduğu bulunmuştur.

Tavsiyeler

1. Gebeliğin ilk döneminde MikroRNA gen ekspresyonunu periyodik olarak ölçerek gebe kadınların takibi.
2. Hamilelik sırasında daha fazla hcmv-mikroRNA türünü incelemek ve bunların düşükle ilişkisini belirlemek.
3. GP55 gen parçasının patojen tanımlamasında, patojenin diğer yakın ilişkili HCMV türlerinden ayırt edilmesinde ve patojen konakçıların ve izolasyon kaynaklarının daha iyi tanımlanmasında çok daha fazla ayrıntı vermek için kullanılmasını önerilmektedir.
4. Az sayıda örnekte tespit edilen genetik değişkenliğe dayanarak, GP55 gen parçası

üzerinde, çözülmesi için daha fazla örnek gerektiren daha fazla detayın ortaya çıkarılması için büyük ölçekli incelemeler kullanılarak daha fazla araştırma yapılması şiddetle tavsiye edilmektedir.

5. Tanımlanan mutasyonların viral glikoproteinin 3D yapısı ve biyolojik işlevi üzerindeki spesifik etkilerini daha iyi anlamak için deneysel doğrulamaya ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- AbdulSamad, A. and Yassir, H. S. 2018. Detection of some Immunological parameters (c3, c4) of Cytomegalovirus in Miscarriage women In Wasit Province.
- Abu-Izneid, T., AlHajri, N., Ibrahim, A. M., Javed, M. N., Salem, K. M., Pottoo, F. H. and Kamal, M. A. 2021. Micro-RNAs in the regulation of immune response against SARS CoV-2 and other viral infections. *Journal of Advanced Research*, 30: 133–145.
- Adland, E., Klenerman, P., Goulder, P. and Matthews, P. C. 2015. Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1016.
- Akunaeziri, U. A., Magaji, A. F., Anyaka, C. and Ocheke, A. N. 2021. Cytomegalovirus infection among women with recurrent miscarriages. *Tropical Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 38(2): 128–138.
- Al Baloushi, M., Saleh, H., Ahmed, B. and Konje, J. C. 2024. Congenital Viral Infections: Consequences on the Mother and Fetus and Management. *Preprints*, 22-23.
- Al-Baiati, A., Muhsin, M. A. and Jabbar, R. N. 2014. Seroprevalence of Human Cytomegalovirus (HCMV) in miscarriage women in Baghdad. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2): 97–102.
- Al-dorri, A. Z. R. 2018. Estimation of some immunological biomarkers in miscarriage women infected with human cytomegalovirus (HCMV) in Salah Al-deen province. *MJOTU*, 24(2): 12–24.
- Aljumaili, Z. K. M., Alsamarai, A. M. and Najem, W. S. 2014. Cytomegalovirus seroprevalence in women with bad obstetric history in Kirkuk, Iraq. *Journal of Infection and Public Health*, 7(4): 277–288.
- Alkharsan, N. H., Aljanabi, A. A. and Alshammari, Z. M. 2022. Immunological Indicators in Miscarriage women Infected with Human Cytomegalovirus in Karbala City, Iraq. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 89(2): 7056–7060.
- Al-Mousawi, H. T. M. and AL-Hajjar, Q. N. 2021. Immunological and molecular diagnosis of cytomegalovirus infection between aborted & pregnant women in Babylon city. *Baghdad Science Journal*, 18(2): 1086.

- Al-Rawazq, H. S. A.-M., Al-Zubaidy, R. A.-R. and Al-Rawi, L. I. 2017. Human Cytomegalovirus Immunoglobulin G (IgG) and Immunoglobulin M (IgM) Seropositivity among Pregnant Women in Baghdad City and Their Relations to the Abortion Factors. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 5(3): 1100–1104.
- Alvarado-Esquivel, C., del Carmen Terrones-Saldivar, M., Hernandez-Tinoco, J., Munoz-Terrones, M. D. E., Gallegos-Gonzalez, R. O., Sanchez-Anguiano, L. F., Reyes-Robles, M. E. and Antuna-Salcido, E. I. 2018. Seroepidemiology of cytomegalovirus infection in pregnant women in the Central Mexican City of Aguascalientes. *Journal of Clinical Medicine Research*, 10(4): 337.
- Alwan, H., Torabi, M., Nourani, H. and Al-Shuhaib, M. B. S. 2023. The emergence of novel Iranian variants in sheeppox and goatpox viral envelope proteins with remarkably altered putative binding affinities with the host receptor. *Virus Genes*, 59(3): 437–448.
- Aman, R., Mahas, A. and Mahfouz, M. 2020. Nucleic acid detection using CRISPR/Cas biosensing technologies. *ACS Synthetic Biology*, 9(6): 1226–1233.
- Åsberg, A., Rollag, H. and Hartmann, A. 2010. Valganciclovir for the prevention and treatment of CMV in solid organ transplant recipients. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(7): 1159–1166.
- Ashary, N., Tiwari, A. and Modi, D. 2018. Embryo implantation: war in times of love. *Endocrinology*, 159(2): 1188–1198.
- Babu, S. G., Pandeya, A., Verma, N., Shukla, N., Kumar, R. V. and Saxena, S. 2014. Role of HCMV miR-UL70-3p and miR-UL148D in overcoming the cellular apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 393: 89–98.
- Bain, M., Mendelson, M. and Sinclair, J. 2003. Ets-2 Repressor Factor (ERF) mediates repression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter in undifferentiated non-permissive cells. *Journal of General Virology*, 84(1): 41–49.
- Barber, V., Calvert, A., Vandrevalla, T., Star, C., Khalil, A., Griffiths, P., Heath, P. T. and Jones, C. E. 2020. Prevention of acquisition of cytomegalovirus infection in pregnancy through hygiene-based behavioral interventions: a systematic review and gap analysis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 39(10): 949–954.

- Barbu, M. G., Condrat, C. E., Thompson, D. C., Bugnar, O. L., Cretoiu, D., Toader, O. D., Suci, N. and Voinea, S. C. 2020. MicroRNA involvement in signaling pathways during viral infection. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8: 143.
- Bartlett, A. W., Hall, B. M., Palasanthiran, P., McMullan, B., Shand, A. W. and Rawlinson, W. D. 2018. Recognition, treatment, and sequelae of congenital cytomegalovirus in Australia: An observational study. *Journal of Clinical Virology*, 108: 121–125.
- Bego, M., Maciejewski, J., Khaiboullina, S., Pari, G. and St. Jeor, S. 2005. Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *Journal of Virology*, 79(17): 11022–11034.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. and Sayers, E. W. 2012. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1): D36–D42.
- Bernier, A. and Sagan, S. M. 2018. The diverse roles of microRNAs at the host–virus interface. *Viruses*, 10(8): 440.
- Bhella, D., Rixon, F. J. and Dargan, D. J. 2000. Cryomicroscopy of human cytomegalovirus virions reveals more densely packed genomic DNA than in herpes simplex virus type 1. *Journal of Molecular Biology*, 295(2): 155–161.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M. and Bordoli, L. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1): W252–W258.
- Blut, A. 2010. Untergruppe “Bewertung Blutassoziierter Krankheitserreger”. *Human Cytomegalovirus (HCMV)*. *Transfus Med Hemother*, 37: 365–375.
- Boeckh, M. and Boivin, G. 1998. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3): 533–554.
- Boeckh, M. and Geballe, A. P. 2011. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(5): 1673–1680.
- Bottino, P., Pastrone, L., Curtoni, A., Bondi, A., Sidoti, F., Zanutto, E., Cavallo, R., Solidoro, P. and Costa, C. 2023. Antiviral Approach to Cytomegalovirus Infection: An Overview of Conventional and Novel Strategies. *Microorganisms*, 11(10): 2372.

- Brait, N., Külekçi, B. and Goerzer, I. 2022. Long range PCR-based deep sequencing for haplotype determination in mixed HCMV infections. *BMC Genomics*, 23(1): 31.
- Brañas, P., Blázquez-Gamero, D., Galindo, A., Prieto, C., Olabarrieta, I., Cuadrado, I. and Folgueira, L. 2015. Cytomegalovirus genotype distribution among congenitally and postnatally infected patients: Association of particular glycoprotein (g) B and gN types with symptomatic disease. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(4): 151.
- Brandariz-Nuñez, A., Robinson, S. J. and Evilevitch, A. 2020. Pressurized DNA state inside herpes capsids—A novel antiviral target. *PLoS Pathogens*, 16(7): e1008604.
- Butcher, S. J., Aitken, J., Mitchell, J., Gowen, B. and Dargan, D. J. 1998. Structure of the human cytomegalovirus B capsid by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Journal of Structural Biology*, 124(1): 70–76.
- Cannon, M. J., Hyde, T. B. and Schmid, D. S. 2011. Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. *Reviews in Medical Virology*, 21(4): 240–255.
- Cannon, M. J., Schmid, D. S. and Hyde, T. B. 2010. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in Medical Virology*, 20(4): 202–213.
- Carlson, A., Norwitz, E. R. and Stiller, R. J. 2010. Cytomegalovirus infection in pregnancy: should all women be screened? *Reviews in Obstetrics and Gynecology*, 3(4): 172.
- Cary, N. 2012. Statistical analysis system, User's guide. *Open Journal of Animal Sciences*, 9 (4): 22-27.
- Chen, D. H., Jiang, H., Lee, M., Liu, F. and Zhou, Z. H. 1999. Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus. *Virology*, 260(1): 10–16.
- Cheng, S., Caviness, K., Buehler, J., Smithey, M., Nikolich-Žugich, J. and Goodrum, F. 2017. Transcriptome-wide characterization of human cytomegalovirus in natural infection and experimental latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(49): E10586–E10595.

- Chong, E. T. J., Suardi, A. F. A. and Lee, P.-C. 2023. Pathogenicity and diagnostic methods of human cytomegalovirus. *Borneo International Journal of Biotechnology (BIJB)*, 3: 100–111.
- Chou, S. 2020. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral Research*, 176: 104711.
- Coppola, T., Mangold, J. F., Cantrell, S. and Permar, S. R. 2019. Impact of maternal immunity on congenital cytomegalovirus birth prevalence and infant outcomes: a systematic review. *Vaccines*, 7(4): 129.
- Correia de Sousa, M., Gjorgjieva, M., Dolicka, D., Sobolewski, C. and Foti, M. 2019. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24): 6249.
- Coşkun, A., Gökahmetoğlu, S., Özmen, P., Çevik, Ş., Karakükcü, M., Kaynar, L., Midilli, K. and Kuskucu, M. 2023. Determination of genotypes in cytomegalovirus (CMV) strains obtained from pediatric and adult immunocompromised patients. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 7(1): 270–276.
- Crough, T. and Khanna, R. 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1): 76–98.
- Cullen, B. R. 2009. Viral and cellular messenger RNA targets of viral microRNAs. *Nature*, 457(7228): 421–425.
- Dass, D., Dhotre, K., Chakraborty, M., Nath, A., Banerjee, A., Bagchi, P. and Mukherjee, A. 2023. MiRNAs in Herpesvirus infection: Powerful regulators in small packages. *Viruses*, 15(2): 429.
- Demmler-Harrison, G. J. 2019. Congenital cytomegalovirus infection: Management and outcome. Edwards MS, Weisman LE (Eds). Web site. <https://medilib.ir/uptodate/show/98188>. Date of access: 08.08.2024
- Dhingra, A., Götting, J., Varanasi, P. R., Steinbrueck, L., Camiolo, S., Zischke, J., Heim, A., Schulz, T. F., Weissinger, E. M. and Kay-Fedorov, P. C. 2021. Human cytomegalovirus multiple-strain infections and viral population diversity in haematopoietic stem cell transplant recipients analysed by high-throughput sequencing. *Medical Microbiology and Immunology*, 210: 291–304.

- Diggins, N. L. and Hancock, M. H. 2018. HCMV miRNA targets reveal important cellular pathways for viral replication, latency, and reactivation. *Non-Coding RNA*, 4(4): 29.
- Diggins, N. L., Skalsky, R. L. and Hancock, M. H. 2021. Regulation of latency and reactivation by human cytomegalovirus miRNAs. *Pathogens*, 10(2): 200.
- Ding, M., Wang, X., Wang, C., Liu, X., Zen, K., Wang, W., Zhang, C.-Y. and Zhang, C. 2017. Distinct expression profile of HCMV encoded miRNAs in plasma from oral lichen planus patients. *Journal of Translational Medicine*, 15: 1–12.
- Ding, S.-W. and Voinnet, O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130(3): 413–426.
- Dong, N., Cao, L., Zheng, D., Su, L., Lu, L., Dong, Z., Xu, M. and Xu, J. 2023. Distribution of CMV envelope glycoprotein B, H and N genotypes in infants with congenital cytomegalovirus symptomatic infection. *Frontiers in Pediatrics*, 11: 1112645.
- Dreher, A. M., Arora, N., Fowler, K. B., Novak, Z., Britt, W. J., Boppana, S. B. and Ross, S. A. 2014. Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of Pediatrics*, 164(4): 855–859.
- Egilmezer, E., Hamilton, S. T., Foster, C. S. P., Marschall, M. and Rawlinson, W. D. 2024. Human cytomegalovirus (CMV) dysregulates neurodevelopmental pathways in cerebral organoids. *Communications Biology*, 7(1): 340.
- Enders, J. F., Weller, T. H. and Robbins, F. C. 1949. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science*, 109(2822): 85–87.
- Esquivel-Fariña, A., González-Segnana, L. R. and Kitajima, E. W. 2024. An annotated list of plant viruses described in Paraguay (1920–2023). *Biota Neotropica*, 24(1): e20231574.
- Faith, S. C., Durrani, A. F. and Jhanji, V. 2018. Cytomegalovirus keratitis. *Current Opinion in Ophthalmology*, 29(4): 373–377.
- Farber, S. and Wolbach, S. B. 1932. Intranuclear and cytoplasmic inclusions (“protozoan-like bodies”) in the salivary glands and other organs of infants. *The American Journal of Pathology*, 8(2): 123.

- Fernández-Moreno, R., Torre-Cisneros, J. and Cantisán, S. 2021. Human cytomegalovirus (HCMV)-encoded microRNAs: potential biomarkers and clinical applications. *RNA Biology*, 18(12): 2194–2202.
- Fetterman, G. H. 1952. A new laboratory aid in the clinical diagnosis of inclusion disease of infancy. *American Journal of Clinical Pathology*, 22(5): 424–425.
- Forner, G., Abate, D., Mengoli, C., Palù, G. and Gussetti, N. 2015. High cytomegalovirus (CMV) DNAemia predicts CMV sequelae in asymptomatic congenitally infected newborns born to women with primary infection during pregnancy. *The Journal of Infectious Diseases*, 212(1): 67–71.
- Foulon, I., Naessens, A., Foulon, W., Casteels, A. and Gordts, F. 2008. A 10-year prospective study of sensorineural hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. *The Journal of Pediatrics*, 153(1): 84–88.
- Fruci, D., Rota, R. and Gallo, A. 2017. The role of HCMV and HIV-1 microRNAs: processing, and mechanisms of action during viral infection. *Frontiers in Microbiology*, 8: 249320.
- Gao, Z., Zhou, L., Bai, J., Ding, M., Liu, D., Zheng, S., Li, Y., Li, X., Wang, X. and Jin, M. 2021. Assessment of HCMV-encoded microRNAs in plasma as potential biomarkers in pregnant women with adverse pregnancy outcomes. *Annals of Translational Medicine*, 9(8): 22–23.
- Garcia de Figueiredo, G., Marques, A. A., Mussi-Pinhata, M. M., Silva Jr, W. A. and Yamamoto, A. Y. 2018. Is the mixture of human cytomegalovirus genotypes frequent in infants with congenital infection at birth in a high seroprevalence population? *Journal of Medical Virology*, 90(8): 1389–1397.
- Gebert, L. F. R. and MacRae, I. J. 2019. Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1): 21–37.
- Gelemanović, A., Dobberpuhl, K., Krakar, G., Patarčić, I., Kolčić, I. and Polašek, O. 2016. Host genetics and susceptibility to congenital and childhood cytomegalovirus infection: a systematic review. *Croatian Medical Journal*, 57(4): 321–330.
- Giménez, E., Muñoz-Cobo, B., Solano, C., Amat, P. and Navarro, D. 2014. Early kinetics of plasma cytomegalovirus DNA load in allogeneic stem cell transplant recipients

- in the era of highly sensitive real-time PCR assays: does it have any clinical value? *Journal of Clinical Microbiology*, 52(2): 654–656.
- Gimeno, C., Solano, C., Latorre, J. C., Hernández-Boluda, J. C., Clari, M. A., Remigia, M. J., Furió, S., Calabuig, M., Tormo, N. and Navarro, D. 2008. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (cytomegalovirus PCR kit) for surveillance of active cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10): 3311–3318.
- Gleaves, C. A., Smith, T. F., Shuster, E. A. and Pearson, G. R. 1984. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 19(6): 917–919.
- Golshan, M., Yaghoobi, R., Geramizadeh, B., Afshari, A., Shahroodi, J. R. and Malek-Hosseini, S. A. 2021. Determination of the importance of miR-UL148D gene expression pattern in cytomegalovirus infected transplant patients. *Int J Organ Transplant Med (IJOTM)*: 12(4): 22-27.
- Gong, Y., Moström, M., Otero, C., Valencia, S., Kaur, A., Permar, S. R. and Chan, C. 2022. Mathematical Modeling of Rhesus Cytomegalovirus (RhCMV) Placental Transmission in Seronegative Rhesus Macaques. *BioRxiv*, 2004–2022.
- Goodrum, F. 2016. Human cytomegalovirus latency: approaching the Gordian knot. *Annual Review of Virology*, 3(1): 333–357.
- Gorun, F., Motoi, S., Malita, D., Navolan, D. B., Nemescu, D., Olariu, T. R., Craina, M., Vilibic-Cavlek, T., Ciohat, I. and Boda, D. 2020. Cytomegalovirus seroprevalence in pregnant women in the western region of Romania: A large-scale study. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(3): 2439–2443.
- Gottwein, E. and Cullen, B. R. 2008. Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host & Microbe*, 3(6): 375–387.
- Grangeot-Keros, L., Mayaux, M. J., Lebon, P., Freymuth, F., Eugene, G., Stricker, R. and Dussaix, E. 1997. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Journal of Infectious Diseases*, 175(4): 944–946.

- Green, M. L., Leisenring, W., Stachel, D., Pergam, S. A., Sandmaier, B. M., Wald, A., Corey, L. and Boeckh, M. 2012. Efficacy of a viral load-based, risk-adapted, preemptive treatment strategy for prevention of cytomegalovirus disease after hematopoietic cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 18(11): 1687–1699.
- Grey, F., Antoniewicz, A., Allen, E., Saugstad, J., McShea, A., Carrington, J. C. and Nelson, J. 2005. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *Journal of Virology*, 79(18): 12095–12099.
- Griffiths-Jones, S., Hui, J. H. L., Marco, A. and Ronshaugen, M. 2011. MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO Reports*, 12(2): 172–177.
- Gruffat, H., Marchione, R. and Manet, E. 2016. Herpesvirus late gene expression: a viral-specific pre-initiation complex is key. *Frontiers in Microbiology*, 7, 195439.
- Guo, X., Huang, Y., Qi, Y., Liu, Z., Ma, Y., Shao, Y., Jiang, S., Sun, Z. and Ruan, Q. 2015. Human cytomegalovirus miR-UL36-5p inhibits apoptosis via downregulation of adenine nucleotide translocator 3 in cultured cells. *Archives of Virology*, 160: 2483–2490.
- Ha, M. and Kim, V. N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8): 509–524.
- Hage, E., Wilkie, G. S., Linnenweber-Held, S., Dhingra, A., Suárez, N. M., Schmidt, J. J., Kay-Fedorov, P. C., Mischak-Weissinger, E., Heim, A. and Schwarz, A. 2017. Characterization of human cytomegalovirus genome diversity in immunocompromised hosts by whole-genome sequencing directly from clinical specimens. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(11): 1673–1683.
- Halwachs-Baumann, G. 2018. Virus–Host Interaction for Defense and Transmission. *Congenital Cytomegalovirus Infection: Epidemiology, Diagnosis, Therapy*, 11–54.
- Hama, S. A. and Abdurahman, K. J. 2013. Human cytomegalovirus IgG and IgM seropositivity among pregnant women in Sulaimani city and their relations to the abortion rates. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 5(4): 161–167.
- Hamilton, S. T., van Zuylen, W., Shand, A., Scott, G. M., Naing, Z., Hall, B., Craig, M. E. and Rawlinson, W. D. 2014. Prevention of congenital cytomegalovirus

- complications by maternal and neonatal treatments: a systematic review. *Reviews in Medical Virology*, 24(6): 420–433.
- Han, S. H., Kumar, D., Ferreira, V. H., Egli, A., Hirsch, H. H., Weisser, M., Garzoni, C., van Delden, C., Bochud, P.-Y. and Manuel, O. 2017. Human microRNA responses predict cytomegalovirus replication following solid organ transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(4): 537–546.
- Hancock, M. H., Crawford, L. B., Pham, A. H., Mitchell, J., Struthers, H. M., Yurochko, A. D., Caposio, P. and Nelson, J. A. 2020. Human cytomegalovirus miRNAs regulate TGF- β to mediate myelosuppression while maintaining viral latency in CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Cell Host & Microbe*, 27(1): 104–114.
- Huang, Y., Qi, Y., Ma, Y., He, R., Ji, Y., Sun, Z. and Ruan, Q. 2013. Down-regulation of human cytomegalovirus UL138, a novel latency-associated determinant, by hcmv-miR-UL36. *Journal of Biosciences*, 38: 479–485.
- Jackson, J. W. and Sparer, T. 2018. There is always another way! cytomegalovirus' multifaceted dissemination schemes. *Viruses*, 10(7): 383.
- Jean Beltran, P. M. and Cristea, I. M. 2014. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 11(6): 697–711.
- Jenkins, C., Garcia, W., Abendroth, A. and Slobedman, B. 2008. Expression of a human cytomegalovirus latency-associated homolog of interleukin-10 during the productive phase of infection. *Virology*, 370(2): 285–294.
- Ji, Y. H., Sun, Z. R., Ruan, Q., Guo, J. J., He, R., Qi, Y., Ma, Y. P., Mao, Z. Q. and Huang, Y. J. 2006. Polymorphisms of human cytomegalovirus UL148A, UL148B, UL148C, UL148D genes in clinical strains. *Journal of Clinical Virology*, 37(4): 252–257.
- Jihad, S. A. 2015. Molecular Detection of Cytomegalovirus (CMV) Isolated from Repeated Miscarriage Women and Its Relation to TLR2 and ILT2 Receptors. MSc. Thesis, Al-Nahrain University, 82 page, Iraq.
- Jin, Q., Su, J. and Wu, S. 2017. Cytomegalovirus infection among pregnant women in Beijing: seroepidemiological survey and intrauterine transmissions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5): 1005–1009.

- Johnson, D. C. and Baines, J. D. 2011. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5): 382–394.
- Kakayi, S. T., Haji, H. O. and Al-Daoody, A. A. K. 2021. Incidence of Miscarriage in Pregnant Women due to TORCH Co-Infection in Erbil City/Iraq. *Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences*, 29(2): 1–15.
- Kalaf, S. H. and Jameel, Z. J. 2023a. Detection of Cytomegalovirus among Women with Abortion by Real Time PCR. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 90(2): 2852–2857.
- Kalaf, S. H. and Jameel, Z. J. 2023b. Evaluation The Sero-Prevalence of Cytomegalovirus Infection among Abortion Women in Baqubah city. *Academic Science Journal*, 1(4): 93–108.
- Kalejta, R. F. 2008. Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Human Cytomegalovirus*, 101–115.
- Kenneson, A. and Cannon, M. J. 2007. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Reviews in Medical Virology*, 17(4): 253–276.
- Kim, S., Seo, D., Kim, D., Hong, Y., Chang, H., Baek, D., Kim, V. N., Lee, S. and Ahn, K. 2015. Temporal landscape of microRNA-mediated host-virus crosstalk during productive human cytomegalovirus infection. *Cell Host & Microbe*, 17(6): 838–851.
- Kim, Y., Lee, S., Kim, S., Kim, D., Ahn, J.-H. and Ahn, K. 2012. Human cytomegalovirus clinical strain-specific microRNA miR-UL148D targets the human chemokine RANTES during infection. *PLoS Pathogens*, 8(3): e1002577.
- Kowalik, T. F. 2014. The DNA damage response induced by infection with human cytomegalovirus and other viruses. *Viruses*, 6(5): 2155–2185.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M. and Griffiths-Jones, S. 2019. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1): D155–D162.
- Krause, P. R., Bialek, S. R., Boppana, S. B., Griffiths, P. D., Laughlin, C. A., Ljungman, P., Mocarski, E. S., Pass, R. F., Read, J. S. and Schleiss, M. R. 2013. Priorities for CMV vaccine development. *Vaccine*, 32(1): 4–10.
- Külekci, B., Schwarz, S., Brait, N., Perkmann-Nagele, N., Jaksch, P., Hoetzenecker, K., Puchhammer-Stöckl, E. and Goerzer, I. 2022. Human cytomegalovirus strain

- diversity and dynamics reveal the donor lung as a major contributor after transplantation. *Virus Evolution*, 8(2): veac076.
- Lachmann, R., Loenenbach, A., Waterboer, T., Brenner, N., Pawlita, M., Michel, A., Thamm, M., Poethko-Müller, C., Wichmann, O. and Wiese-Posselt, M. 2018. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PloS One*, 13(7): e0200267.
- Lanzieri, T. M., Dollard, S. C., Bialek, S. R. and Grosse, S. D. 2014. Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *International Journal of Infectious Diseases*, 22: 44–48.
- Lau, B., Poole, E., Krishna, B., Montanuy, I., Wills, M. R., Murphy, E. and Sinclair, J. 2016a. The expression of human cytomegalovirus microRNA MiR-UL148D during latent infection in primary myeloid cells inhibits activin A-triggered secretion of IL-6. *Scientific Reports*, 6(1): 31205.
- Lau, B., Poole, E., Van Damme, E., Bunkens, L., Sowash, M., King, H., Murphy, E., Wills, M., Van Loock, M. and Sinclair, J. 2016b. Human cytomegalovirus miR-UL112-1 promotes the down-regulation of viral immediate early-gene expression during latency to prevent T-cell recognition of latently infected cells. *Journal of General Virology*, 97(9): 2387–2398.
- Letafati, A., Najafi, S., Mottahedi, M., Karimzadeh, M., Shahini, A., Garousi, S., Abbasi-Kolli, M., Sadri Nahand, J., Tamehri Zadeh, S. S. and Hamblin, M. R. 2022. MicroRNA let-7 and viral infections: focus on mechanisms of action. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1): 14.
- Letunic, I. and Bork, P. 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1): W256–W259.
- Li, S., Zhu, J., Zhang, W., Chen, Y., Zhang, K., Popescu, L. M., Ma, X., Bond Lau, W., Rong, R. and Yu, X. 2011. Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation*, 124(2): 175–184.
- Li, X., Zhong, Y., Qiao, Y., Li, H., Hu, X., Imani, S., Zheng, S. and Li, J. 2023. Advances and challenges in cytomegalovirus detection methods for liver transplant donors. *Diagnostics*, 13(21): 3310.

- Liang, J., Wang, S. and Wang, Z. 2017. Role of microRNAs in embryo implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15: 1–11.
- Lipschütz, B. 1921. Untersuchungen über die Ätiologie der Krankheiten der Herpesgruppe (Herpes zoster, Herpes genitalis, Herpes febrilis. *Archiv Für Dermatologie Und Syphilis*, 136(3): 428–482.
- Lisboa, L. F., Egli, A., Nicholls, K., OShea, D., Asberg, A., Hartmann, A., Rollag, H., Pang, X. L., Tyrrell, D. L. and Kumar, D. 2015. Hcmv-miR-UL22A-5p: a biomarker in transplantation with broad impact on host gene expression and potential immunological implications. *American Journal of Transplantation*, 15(7): 1893–1902.
- Ljungman, P., Boeckh, M., Hirsch, H. H., Josephson, F., Lundgren, J., Nichols, G., Pikis, A., Razonable, R. R., Miller, V. and Griffiths, P. D. 2016. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clinical Infectious Diseases*, 64(1): 87–91
- Loomans, H. A. and Andl, C. D. 2014. Intertwining of activin A and TGF β signaling: dual roles in cancer progression and cancer cell invasion. *Cancers*, 7(1): 70–91.
- Mahdi, B., Saour, M. and Salih, W. 2011. Cytomegalovirus infection in infertile women. *J Exp Integr Med*, 1: 273–276.
- Makker, J., Bajantri, B., Sakam, S. and Chilimuri, S. 2016. Cytomegalovirus related fatal duodenal diverticular bleeding: Case report and literature review. *World Journal of Gastroenterology*, 22(31): 7166.
- Manicklal, S., Emery, V. C., Lazzarotto, T., Boppana, S. B. and Gupta, R. K. 2013. The “silent” global burden of congenital cytomegalovirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1): 86–102.
- Martí-Carreras, J. and Maes, P. 2019. Human cytomegalovirus genomics and transcriptomics through the lens of next-generation sequencing: revision and future challenges. *Virus Genes*, 55(2): 138–164.
- Meshesha, M. K., Bentwich, Z., Solomon, S. A. and Avni, Y. S. 2016. In vivo expression of human cytomegalovirus (HCMV) microRNAs during latency. *Gene*, 575(1): 101–107.
- Meshesha, M. K., Veksler-Lublinsky, I., Isakov, O., Reichenstein, I., Shomron, N., Kedem, K., Ziv-Ukelson, M., Bentwich, Z. and Avni, Y. S. 2012. The microRNA

- transcriptome of human cytomegalovirus (HCMV). *The Open Virology Journal*, 6: 38.
- Mhandire, D., Rowland-Jones, S., Mhandire, K., Kaba, M. and Dandara, C. 2019. Epidemiology of Cytomegalovirus among pregnant women in Africa. *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(10): 6-7.
- miRBase, 2024a. miRBase Sequence database and Registry. Web site. <https://www.mirbase.org/hairpin/MI0001681>. Date of access: 21.07.2024.
- miRBase, 2024b. miRBase Sequence database and Registry. Web site. <https://www.mirbase.org/mature/MIMAT0001575>. Date of access: 21.07.2024.
- miRBase, 2024c. miRBase Sequence database and Registry. Web site. <https://www.mirbase.org/mature/MIMAT0001576>. Date of access: 21.07.2024.
- miRBase, 2024d. miRBase Sequence database and Registry. Web site. <https://www.mirbase.org/mature/MIMAT0004754>. Date of access: 21.07.2024.
- Mohammad, A.-A., Rahbar, A., Lui, W.-O., Davoudi, B., Catrina, A., Stragliotto, G., Mellbin, L., Hamsten, A., Ryden, L. and Yaiw, K.-C. 2014. Detection of circulating hcmv-miR-UL112-3p in patients with glioblastoma, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus and healthy controls. *PloS One*, 9(12): e113740.
- Mokry, R. L., Monti, C., Rosas-Rogers, S., Schumacher, M., Dash, R. K. and Terhune, S. S. 2024. Replication efficiencies of human cytomegalovirus-infected epithelial cells are dependent on source of virus production. *BioRxiv*, 18-19.
- Møller, R., Schwarz, T. M., Noriega, V. M., Panis, M., Sachs, D., Tortorella, D. and tenOever, B. R. 2018. miRNA-mediated targeting of human cytomegalovirus reveals biological host and viral targets of IE2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(5): 1069–1074.
- Murphy, J. C., Fischle, W., Verdin, E. and Sinclair, J. H. 2002. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *The EMBO Journal*.
- Mussi-Pinhata, M. M., Yamamoto, A. Y., Aragon, D. C., Duarte, G., Fowler, K. B., Boppana, S. and Britt, W. J. 2018. Seroconversion for cytomegalovirus infection during pregnancy and fetal infection in a highly seropositive population: “The BraCHS Study.” *The Journal of Infectious Diseases*, 218(8): 1200–1204.

- Naame, Z. K., Thuwaini, M. M. and Mahdi, D. S. 2021. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, CMV, rubella and HSV-1&2) in miscarriage women in Basra, southern of Iraq. *Ann. Trop. Med. Public Health*, 24(5): 295–301.
- Navti, O. B., Al-Belushi, M. and Konje, J. C. 2021. Cytomegalovirus infection in pregnancy—An update. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 258: 216–222.
- Nigro, G., Adler, S. P., La Torre, R. and Best, A. M. 2005. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *New England Journal of Medicine*, 353(13): 1350–1362.
- Nosotti, M., Tarsia, P. and Morlacchi, L. C. 2018. Infections after lung transplantation. *Journal of Thoracic Disease*, 10(6): 3849.
- Novelli, M., Natale, F., Di Norcia, A., Boiani, A., Temofonte, S., Calandriello, F., Zitarelli, C. and Caravale, B. 2022. Early neurodevelopmental outcomes in children with asymptomatic congenital CMV infection. *Italian Journal of Pediatrics*, 48(1): 203.
- Oiknine-Djian, E., Bar-On, S., Laskov, I., Lantsberg, D., Haynes, R. K., Panet, A. and Wolf, D. G. 2019. Artemisone demonstrates synergistic antiviral activity in combination with approved and experimental drugs active against human cytomegalovirus. *Antiviral Research*, 172: 104639.
- Otero, C. E., Barfield, R., Scheef, E., Nelson, C. S., Rodgers, N., Wang, H.-Y., Moström, M. J., Manuel, T. D., Sass, J. and Schmidt, K. 2023. Relationship of maternal cytomegalovirus-specific antibody responses and viral load to vertical transmission risk following primary maternal infection in a rhesus macaque model. *PLoS Pathogens*, 19(10): e1011378.
- Otsuka, M., Jing, Q., Georgel, P., New, L., Chen, J., Mols, J., Kang, Y. J., Jiang, Z., Du, X. and Cook, R. 2007. Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in *Dicer1*-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*, 27(1): 123–134.
- Pan, C., Zhu, D., Wang, Y., Li, L., Li, D., Liu, F., Zhang, C.-Y. and Zen, K. 2016. Human cytomegalovirus miR-UL148D facilitates latent viral infection by targeting host cell immediate early response gene 5. *PLoS Pathogens*, 12(11): e1006007.

- Pan, Y., Wang, N., Zhou, Z., Liang, H., Pan, C., Zhu, D., Liu, F., Zhang, C.-Y., Zhang, Y. and Zen, K. 2016. Circulating human cytomegalovirus-encoded HCMV-miR-US4-1 as an indicator for predicting the efficacy of IFN α treatment in chronic hepatitis B patients. *Scientific Reports*, 6(1): 23007.
- Paradowska, E., Jabłońska, A., Studzińska, M., Kasztelewicz, B., Zawilińska, B., Wiśniewska-Ligier, M., Dzierżanowska-Fangrat, K., Woźniakowska-Gęsicka, T., Kosz-Vnenchak, M. and Leśnikowski, Z. J. 2014. Cytomegalovirus glycoprotein H genotype distribution and the relationship with hearing loss in children. *Journal of Medical Virology*, 86(8): 1421–1427.
- Paradowska, E., Jabłońska, A., Studzińska, M., Skowrońska, K., Suski, P., Wiśniewska-Ligier, M., Woźniakowska-Gęsicka, T., Nowakowska, D., Gaj, Z. and Wilczyński, J. 2016. TLR9-1486T/C and 2848C/T SNPs are associated with human cytomegalovirus infection in infants. *PLoS One*, 11(4): 44-47.
- Pass, R. F., Fowler, K. B., Boppana, S. B., Britt, W. J. and Stagno, S. 2006. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. *Journal of Clinical Virology*, 35(2): 216–220.
- Petrucelli, A., Rak, M., Grainger, L. and Goodrum, F. 2009. Characterization of a novel Golgi apparatus-localized latency determinant encoded by human cytomegalovirus. *Journal of Virology*, 83(11): 5615–5629.
- Picarda, G. and Benedict, C. A. 2018. Cytomegalovirus: shape-shifting the immune system. *The Journal of Immunology*, 200(12): 3881–3889.
- Picone, O., Vauloup-Fellous, C., Cordier, A. G., Guitton, S., Senat, M. V., Fuchs, F., Ayoubi, J. M., Grangeot Keros, L. and Benachi, A. 2013. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenatal Diagnosis*, 33(8): 751–758.
- Picone, O., Vauloup-Fellous, C., Cordier, A., Parent Du Châtelet, I., Senat, M., Frydman, R. and Grangeot-Keros, L. 2009. A 2-year study on cytomegalovirus infection during pregnancy in a French hospital. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 116(6): 818–823.
- Pignatelli, S., Dal Monte, P., Rossini, G., Chou, S., Gojobori, T., Hanada, K., Guo, J. J., Rawlinson, W., Britt, W. and Mach, M. 2003. Human cytomegalovirus glycoprotein N (gpUL73-gN) genomic variants: identification of a novel

- subgroup, geographical distribution and evidence of positive selective pressure. *Journal of General Virology*, 84(3): 647–655.
- Pignatelli, S., Lazzarotto, T., Gatto, M. R., Dal Monte, P., Landini, M. P., Faldella, G. and Lanari, M. 2010. Cytomegalovirus gN genotypes distribution among congenitally infected newborns and their relationship with symptoms at birth and sequelae. *Clinical Infectious Diseases*, 51(1): 33–41.
- Pignatelli, S., Monte, P. D., Rossini, G. and Landini, M. P. 2004. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Reviews in Medical Virology*, 14(6): 383–410.
- Plosa, E. J., Esbenschade, J. C., Fuller, M. P. and Weitkamp, J.-H. 2012. Cytomegalovirus infection. *Pediatrics in Review*, 33(4): 156–163.
- Plotogea, M., Isam, A. J., Frincu, F., Zgura, A., Bacinschi, X., Sandru, F., Duta, S., Petca, R. C. and Edu, A. 2022. An overview of cytomegalovirus infection in pregnancy. *Diagnostics*, 12(10): 2429.
- Polz-Dacewicz, M., Fołtyn, S., Macieląg, P. and Polz, D. 2013. Cytomegalovirus (CMV)-a new prospect for prevention. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 7(2): 11-13.
- Pontes, K. F. M., Nardoza, L. M. M., Peixoto, A. B., Werner, H., Tonni, G., Granese, R. and Araujo Júnior, E. 2024. Cytomegalovirus and Pregnancy: A Narrative Review. *Journal of Clinical Medicine*, 13(2): 640.
- Poole, E., McGregor Dallas, S. R., Colston, J., Joseph, R. S. V and Sinclair, J. 2011. Virally induced changes in cellular microRNAs maintain latency of human cytomegalovirus in CD34+ progenitors. *Journal of General Virology*, 92(7): 1539–1549.
- Preiksaitis, J. K., Hayden, R. T., Tong, Y., Pang, X. L., Fryer, J. F., Heath, A. B., Cook, L., Petrich, A. K., Yu, B. and Caliendo, A. M. 2016. Are we there yet? Impact of the first international standard for cytomegalovirus DNA on the harmonization of results reported on plasma samples. *Clinical Infectious Diseases*, 63(5): 583–589.
- Razonable, R. R. and Hayden, R. T. 2013. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4): 703–727.

- Razonable, R. R., Åsberg, A., Rollag, H., Duncan, J., Boisvert, D., Yao, J. D., Caliendo, A. M., Humar, A. and Do, T. D. 2013. Virologic suppression measured by a cytomegalovirus (CMV) DNA test calibrated to the World Health Organization international standard is predictive of CMV disease resolution in transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, 56(11): 1546–1553.
- Reed, R. G., Presnell, S. R., Al-Attar, A., Lutz, C. T. and Segerstrom, S. C. 2019. Perceived stress, cytomegalovirus titers, and late-differentiated T and NK cells: Between-, within-person associations in a longitudinal study of older adults. *Brain, Behavior, and Immunity*, 80: 266–274.
- Reeves, M. B., Breidenstein, A. and Compton, T. 2012. Human cytomegalovirus activation of ERK and myeloid cell leukemia-1 protein correlates with survival of latently infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2): 588–593.
- Requião-Moura, L. R., deMatos, A. C. and Pacheco-Silva, A. 2015. Cytomegalovirus infection in renal transplantation: clinical aspects, management and the perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*, 13 (1): 142-148.
- Revello, M. G., Fornara, C., Arossa, A., Zelini, P. and Lilleri, D. 2014. Role of human cytomegalovirus (HCMV)-specific antibody in HCMV-infected pregnant women. *Early Human Development*, 90: S32–S34.
- Ribbert, H. 1904. Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zbl Allg Pathol.*, 15: 945–948.
- Riis, J. L., Ahmadi, H., Silke, O., Granger, S. W., Bryce, C. I. and Granger, D. A. 2020. Correspondence between cytomegalovirus immunoglobulin-G levels measured in saliva and serum. *Frontiers in Immunology*, 11: 563192.
- Rinaldi, I., Muthalib, A., Sutandar, J. W., Kuncoro, H. A., Harsono, B. I., Susanto, N., Setiawan, T., Winston, K., Dewantara, I. R. and Amin, I. F. 2023. Cytomegalovirus Infection in Patient with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Case Reports in Medicine*, 33-35.
- Ross, S. A., Novak, Z., Fowler, K. B., Arora, N., Britt, W. J. and Boppana, S. B. 2009. Cytomegalovirus blood viral load and hearing loss in young children with congenital infection. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 28(7): 588–592.

- Rossetto, C. C., Tarrant-Elorza, M. and Pari, G. S. 2013. Cis and trans acting factors involved in human cytomegalovirus experimental and natural latent infection of CD14 (+) monocytes and CD34 (+) cells. *PLoS Pathogens*, 9(5): 11-17.
- Rybak-Krzyszkowska, M., Górecka, J., Huras, H., Massalska-Wolska, M., Staśkiewicz, M., Gach, A., Kondracka, A., Staniczek, J., Górczewski, W. and Borowski, D. 2023. Cytomegalovirus Infection in Pregnancy Prevention and Treatment Options: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Viruses*, 15(11): 2142.
- Rycel, M., Wujcicka, W., Zawilińska, B., Paradowska, E., Suski, P., Gaj, Z., Wilczyński, J., Leśnikowski, Z. and Nowakowska, D. 2015. Mixed infections with distinct cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Polish pregnant women, fetuses, and newborns. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34: 585–591.
- Ryckman, B. J., Chase, M. C. and Johnson, D. C. 2008. HCMV gH/gL/UL128–131 interferes with virus entry into epithelial cells: evidence for cell type-specific receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37): 14118–14123.
- Saeed, N. A.-H. A. A. H., Ibraheem, L. J. and Mahmood, S. I. 2022. Immune antibodies diagnosis of pregnant women in Iraq infected with herpes simplex virus and Human Cytomegalo virus. *World Bulletin of Public Health*, 12: 35–42.
- Sam, S. S., Rogers, R., Ingersoll, J., Kraft, C. S. and Caliendo, A. M. 2023. Evaluation of performance characteristics of the Aptima CMV quant assay for the detection and quantitation of CMV DNA in plasma samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 61(2): 21-22.
- Sartori, P., Egloff, C., Hcini, N., Vauloup Fellous, C., Périllaud-Dubois, C., Picone, O. and Pomar, L. 2023. Primary, secondary, and tertiary prevention of congenital cytomegalovirus infection. *Viruses*, 15(4): 819.
- Schottstedt, V., Blümel, J., Burger, R., Drosten, C., Gröner, A., Gürtler, L., Heiden, M., Hildebrandt, M., Jansen, B. and Montag-Lessing, T. 2010. Human cytomegalovirus (HCMV)–revised. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37(6): 365.
- shaker Jaber, M., Shubber, H. W. K. and Mohammed, G. J. 2023. Histopathological changes in placental tissue of miscarriage women infected with Cytomegalovirus

- and *Toxoplasma gondii*. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 10(3S): 3959–3973.
- Shan, L., Li, S., Meeldijk, J., Blijenberg, B., Hendriks, A., van Boxtel, K. J. W. M., van den Berg, S. P. H., Groves, I. J., Potts, M. and Svrlanska, A. 2020. Killer cell proteases can target viral immediate-early proteins to control human cytomegalovirus infection in a noncytotoxic manner. *PLoS Pathogens*, 16(4): 08-09.
- Sharmin, F., Hasan, M. and Islam, M. A. 2023. Seroprevalence of Cytomegalovirus Infection Among Pregnant Women with Prior Miscarriages in Dhaka, Bangladesh. *Age (Years)*, 18(22): 101-104.
- Simonazzi, G., Cervi, F., Zavatta, A., Pellizzoni, L., Guerra, B., Mastroroberto, M., Morselli-Labate, A. M., Gabrielli, L., Rizzo, N. and Lazzarotto, T. 2017. Congenital cytomegalovirus infection: prognostic value of maternal DNAemia at amniocentesis. *Clinical Infectious Diseases*, 64(2): 207–210.
- Sissons, J. G. P., Bain, M. and Wills, M. R. 2002. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of Infection*, 44(2): 73–77.
- Skaletskaya, A., Bartle, L. M., Chittenden, T., McCormick, A. L., Mocarski, E. S. and Goldmacher, V. S. 2001. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14): 7829–7834.
- Slyker, J. A., Lohman-Payne, B. L., John-Stewart, G. C., Maleche-Obimbo, E., Emery, S., Richardson, B., Dong, T., Iversen, A. K. N., Mbori-Ngacha, D. and Overbaugh, J. 2009. Acute cytomegalovirus infection in Kenyan HIV-infected infants. *Aids*, 23(16): 2173–2181.
- Sponholtz, M. R., Byrne, P. O., Lee, A. G., Ramamohan, A. R., Goldsmith, J. A., McCool, R. S., Zhou, L., Johnson, N. V, Hsieh, C.-L. and Connors, M. 2024. Structure-based design of a soluble human cytomegalovirus glycoprotein B antigen stabilized in a prefusion-like conformation. *BioRxiv*, 41-43.
- Stark, T. J., Arnold, J. D., Spector, D. H. and Yeo, G. W. 2012. High-resolution profiling and analysis of viral and host small RNAs during human cytomegalovirus infection. *Journal of Virology*, 86(1): 226–235.

- Stern, L., Withers, B., Avdic, S., Gottlieb, D., Abendroth, A., Blyth, E. and Slobedman, B. 2019. Human cytomegalovirus latency and reactivation in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1186.
- Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D. G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M. and Hahn, G. 2007. Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science*, 317(5836): 376–381.
- Suárez, N. M., Wilkie, G. S., Hage, E., Camiolo, S., Holton, M., Hughes, J., Maabar, M., Vattipally, S. B., Dhingra, A. and Gompels, U. A. 2019. Human cytomegalovirus genomes sequenced directly from clinical material: variation, multiple-strain infection, recombination, and gene loss. *The Journal of Infectious Diseases*, 220(5): 781–791.
- Swanson, E. C. and Schleiss, M. R. 2013. Congenital cytomegalovirus infection: new prospects for prevention and therapy. *Pediatric Clinics*, 60(2): 335–349.
- Tabata, T., Petitt, M., Fang-Hoover, J. and Pereira, L. 2019. Survey of cellular immune responses to human cytomegalovirus infection in the microenvironment of the uterine–placental interface. *Medical Microbiology and Immunology*, 208: 475–485.
- Tan, S. K., Waggoner, J. J. and Pinsky, B. A. 2015. Cytomegalovirus load at treatment initiation is predictive of time to resolution of viremia and duration of therapy in hematopoietic cell transplant recipients. *Journal of Clinical Virology*, 69: 179–183.
- Tang, S., Bertke, A. S., Patel, A., Wang, K., Cohen, J. I. and Krause, P. R. 2008. An acutely and latently expressed herpes simplex virus 2 viral microRNA inhibits expression of ICP34. 5, a viral neurovirulence factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(31): 10931–10936.
- Terhune, S. S., Schröer, J. and Shenk, T. 2004. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *Journal of Virology*, 78(19): 10390–10398.
- Thigpen, J. 2020. Congenital cytomegalovirus—history, current practice, and future opportunities. *Neonatal Network*, 39(5): 293–298.
- Torii, Y., Morioka, I., Kakei, Y., Fujioka, K., Kakimoto, Y., Takahashi, N., Yoshikawa, T., Moriuchi, H., Oka, A. and Ito, Y. 2023. Correlation of cytomegalovirus viral

- load between whole blood and plasma of congenital cytomegalovirus infection under valganciclovir treatment. *BMC Infectious Diseases*, 23(1): 31.
- Uenaka, M., Morizane, M., Tanimura, K., Deguchi, M., Kanzawa, M., Itoh, T. and Yamada, H. 2019. Histopathological analysis of placentas with congenital cytomegalovirus infection. *Placenta*, 75: 62–67.
- Vanarsdall, A. L. and Johnson, D. C. 2012. Human cytomegalovirus entry into cells. *Current Opinion in Virology*, 2(1): 4-7.
- Vankova, O. E., Brusnigina, N. F. and Novikova, N. A. 2023. NGS Technology in Monitoring the Genetic Diversity of Cytomegalovirus Strains. *Современные Технологии в Медицине*, 15(2): 41–46.
- Venselaar, H., Te Beek, T. A. H., Kuipers, R. K. P., Hekkelman, M. L. and Vriend, G. 2010. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics*, 11: 1–10.
- VonGlahn, W. C. and Pappenheimer, A. M. 1925. Intranuclear inclusions in visceral disease. *The American Journal of Pathology*, 1(5): 445.
- Voordouw, B., Rockx, B., Jaenisch, T., Fraaij, P., Mayaud, P., Vossen, A. and Koopmans, M. 2019. Performance of Zika assays in the context of *Toxoplasma gondii*, parvovirus B19, rubella virus, and cytomegalovirus (TORCH) diagnostic assays. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1): 10–1128.
- Vueba, A., Faria, C., Almendra, R., Santana, P. and Sousa, M. do C. 2022. Seroepidemiology study of Cytomegalovirus and Rubella in pregnant women in Luanda, Angola: geospatial distribution and its association with socio-demographic and clinical-obstetric determinants. *BMC Infectious Diseases*, 22(1): 124.
- Wang, C., Wang, J.-J. and Zhang, C. 2019. Altered human cytomegalovirus-encoded miRNAs in host circulation: novel disease biomarkers and potential aetiological agents. *ExRNA*, 1: 1–13.
- Wang, Y.-P., Qi, Y., Huang, Y.-J., Qi, M.-L., Ma, Y.-P., He, R., Ji, Y.-H., Sun, Z.-R. and Ruan, Q. 2013. Identification of immediate early gene X-1 as a cellular target gene of hcmv-mir-UL148D. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(4): 959–966.

- Wang, Y.-Q. and Zhao, X.-Y. 2020. Human cytomegalovirus primary infection and reactivation: insights from virion-carried molecules. *Frontiers in Microbiology*, 11: 547050.
- Wright, E., Bain, M., Teague, L., Murphy, J. and Sinclair, J. 2005. Ets-2 repressor factor recruits histone deacetylase to silence human cytomegalovirus immediate-early gene expression in non-permissive cells. *Journal of General Virology*, 86(3): 535–544.
- Wyatt, J. P., Saxton, J., Lee, R. S. and Pinkerton, H. 1950. Generalized cytomegalic inclusion disease. *Journal of Pediatrics*, 36(3): 271-294.
- Yalda, K. F. and Goreal, A. A. 2023. Prevalence of Cytomegalovirus Infection Among Pregnant Women with Cord Blood Examination. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 9(1): 22-24.
- Yasir, S. J., AL-Khafaji, Y. A.-R. and Al-Kelaby, K. K. A. 2020. Cytomegalovirus UL83 Gene as Diagnostic Marker for Preliminary Infection in Pregnant Women in AL-Najaf City. *Syst Rev Pharm*, 11(5): 123–129.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. and Madden, T. L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13: 1–11.
- Yu, M., Jin, Y., Zhang, S., Xu, J. and Zhang, J. 2022. microRNA, a subtle indicator of human cytomegalovirus against host immune cells. *Vaccines*, 10(2): 144.
- Yu, X., Jih, J., Jiang, J. and Zhou, Z. H. 2017. Atomic structure of the human cytomegalovirus capsid with its securing tegument layer of pp150. *Science*, 356(6345): 18-19.
- Yu, X.-X., Shang, Q.-N., Liu, X.-F., He, M., Pei, X.-Y., Mo, X.-D., Lv, M., Han, T.-T., Huo, M.-R. and Zhao, X.-S. 2022. Donor NKG2C homozygosity contributes to CMV clearance after haploidentical transplantation. *JCI Insight*, 7(3): 55-56.
- Zammarchi, L., Tomasoni, L. R., Liuzzi, G., Simonazzi, G., Dionisi, C., Mazzarelli, L. L., Seidenari, A., Maruotti, G. M., Ornaghi, S. and Castelli, F. 2023. Treatment with valacyclovir during pregnancy for prevention of congenital cytomegalovirus infection: a real-life multicenter Italian observational study. *American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM*, 5(10): 101101.

- Zhang, L., Yu, J. and Liu, Z. 2020. MicroRNAs expressed by human cytomegalovirus. *Virology Journal*, 17: 1–12.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1–2): 203–214.
- Zheng, Q. Y., Huynh, K. T., van Zuylen, W. J., Craig, M. E. and Rawlinson, W. D. 2019. Cytomegalovirus infection in day care centres: A systematic review and meta-analysis of prevalence of infection in children. *Reviews in Medical Virology*, 29(1): e2011.
- Zhou, W., Wang, C., Ding, M., Bian, Y., Zhong, Y., Shen, H., Wang, J., Zhang, C.-Y. and Zhang, C. 2020. Different expression pattern of human cytomegalovirus-encoded microRNAs in circulation from virus latency to reactivation. *Journal of Translational Medicine*, 18: 1–13.
- Zuhair, M., Smit, G. S. A., Wallis, G., Jabbar, F., Smith, C., Devleesschauwer, B. and Griffiths, P. 2019. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: a systematic review and meta-analysis. *Reviews in Medical Virology*, 29(3): e2034.







