ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİABETES MELLİTUS TİP 2'DE HCMV ENFEKSİYONUNDA GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GSTM1 VE GSTT1) İLİŞKİSİ: BİR KONTROL-VAKA ÇALIŞMASI

Randa Khalid Abdulhakeem AL-KHALIDI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Randa Khalid Abdulhakeem AL-KHALIDI tarafından hazırlanan **"Diabetes Mellitus Tip 2'de HCMV Enfeksiyonunda Glutatyon S-Transferaz (GSTM1 ve GSTT1) İlişkisi: Bir Kontrol-Vaka Çalışması"** adlı tez çalışması 17/03/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT

Eş Danışman : Dr. Mohammed Hamzah Abdulkadhim ALSAADİ

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Eldivan SHMYO Veterinerlik Bölümü
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Emre ÖZAN
Veterinerlik Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Eldivan SHMYO Veterinerlik Bölümü
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Diabetes Mellitus Tip 2'de HCMV Enfeksiyonunda Glutatyon S-Transferaz (GSTM1 ve GSTT1) İlişkisi: Bir Kontrol-Vaka Çalışması**" 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 Fen Bilimleri 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 (17/03/2022).

Randa Khalid Abdulhakeem AL-KHALID

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİABETES MELLİTUS TİP 2'DE HCMV ENFEKSİYONUNDA GLUTATYON S-TRANSFERAZ (GSTM1 VE GSTT1) İLİŞKİSİ: BİR KONTROL-VAKA ÇALIŞMASI

Randa Khalid Abdulhakeem AL-KHALID

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Eş Danışman: Dr. Mohammed Hamzah Abdulkadhim ALSAADİ

Oksidatif stres koşulları, şeker hastalığı gibi birçok hastalığın ana nedeni olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, son araştırmalar İnsan Sitomegalovirus (HCMV) enfeksiyonunun muhtemelen Diabetes Mellitus vakalarında meydana geldiğini göstermiştir. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, diyabetik hastalarla karşılaştırıldığında, görünmeyen enfeksiyonlar (sağlıklı bireyler) içindeki HCMV vakalarını belirlemektir. Bunu yapmak için iki PCR yaklaşımının kullanılmasına karar verilmiştir. İlk yöntem olarak, GSTM1 ve GSTT1 genleri dahil olmak üzere multipleks konvansiyonel PCR tekniği kullanılarak stres koşullarıyla mücadele eden ilgili iki polimorfik genin genotiplenmesinin araştırılması; ikinci yöntem ise, incelenen numunelerdeki HCMV enfeksiyonunu belirlemek için Taqman qPCR testi olmuştur. Veriler, GSTM1 ile diyabetik hastalar arasında (P değeri=0,001) iken, GSTT1 ile diyabetik hastalar arasında ise (P değeri=0,023) olacak şekilde anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bunlar arasında HCMV frekansı, sırasıyla (P değeri=0,01 ve P değeri=0,023) olan hem GSTM1 hem de GSTT1 içinde anlamlı görünmüştür. Diyabetik hastalarda (hiperglisemi), özellikle GSTM1 geninde genetik polimorfizmleri olanlarda HCMV ile enfekte olma olasılığı daha yüksektir (P değeri=0,0147). Buna karşılık HCMV, GSTT1 gen polimorfizmi ile ilişkili olmamıştır (P değeri=0,696). Sonuç olarak, hipertansiyon, kardiyovasküler ve obezite gibi diğer hastalıklardaki diğer genetik polimorfizmleri göstermek için acilen daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

2022, 49 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Diabetes Mellitus, HCMV, Glutatyon S-transferaz

ABSTRACT

Master of Science Thesis

ASSOCIATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (GSTM1 AND GSTT1) IN HCMV INFECTION WITHIN DIABETES MELLITUS TYPE 2: A CONTROL-CASE STUDY

Randa Khalid Abdulhakeem AL-KHALID

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Müge FIRAT
Co-Advisor: Dr. Mohammed Hamzah Abdulkadhim ALSAADİ

Oxidative stress circumstances have been identified as the main reason for many diseases such as diabetes mellitus. Also, recent research has shown that Human Cytomegalovirus (HCMV) likely occurs within DM cases. Thus, the aim of this study was to identify the HCMV cases within unapparent infections (healthy individuals) compared with diabetic patients. To do this, two PCR approaches were being recruited; initially, to investigate the genotyping of two polymorphic genes that related to stress circumstances tackling by conventional multiplex PCR technique including: GSTM1 and GSTT1 genes. The second method was Taqman qPCR assay to identify the HCMV infection within the examined samples. The data showed that there was significant relationship between GSTM1 with diabetic patient (P value=0.001) while there was significant association between GSTT1 and diabetic patients (P value=0.023). Among these, HCMV frequency was appeared significant within both GSTM1 and GSTT1 in which (P value=0.01 and P value=0.023) respectively. In diabetic patients (hyperglycaemia) more likely to be infected with HCMV in particular those who have genetic polymorphisms in the GSTM1 gene (P value=0.0147). In contrast, HCMV was not related to GSTT1 gene polymorphism (P value=0.696). In conclusion, further investigation is urgently needed to demonstrate other genetic polymorphisms within the cases of other diseases such as hypertension, cardiovascular and obesity

2022, 49 pages

Keywords: Diabetes Mellitus, HCMV, Glutathione S-transferase

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Kariyerim boyunca bana gösterdiği sabır ve iş birliği için tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT'a, çok teşekkür ederim.

Bana yardım ettiği ve yol gösterdiği için Dr. Muhammed'e özel teşekkürlerimi sunarım.

Yapmış olduğum çalışmamı aileme Babam (Khalid Abdulhakeem Suliman) ve Annem (Sawsan Raheem Mohammed) ve birçok arkadaşıma, sevgi dolu ebeveynlerime özel bir şükran duygusu ile adıyorum. Kız kardeşlerim (Rawya, Hader, Rawasy ve Amasy) ve erkek kardeşim (Ahmed) yanımdan hiç ayrılmadılar ve benim için her zaman çok özel olacaklar.

Dr. Amer Abdulrhman Kaab'ın beni çalışkan ve başarılı bir insan haline getirmek için harcadığı zaman ve çabayı içtenlikle takdir ediyorum ve kendisine teşekkürlerimi iletiyorum.

Ayrıca bu çalışmayı, süreç boyunca bana destek olan birçok arkadaşıma ve üniversite doktoruma adıyorum. Yaptıklarını her zaman takdir edeceğim. Sizler benim en iyi destekçilerim oldunuz.

Randa Khalid Abdulhakeem AL-KHALID
Çankırı, Mart 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Diabetes Mellitus (DM) **1**
1.2 İnsan Sitomegalovirüsü (HCMV) **2**
1.3 Çalışmanın Amaçları **2**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Diabetes Mellitus (DM) Hastalığı **3**
2.2 Diabetes Mellitus (DM) Hastalığının Tipleri **3**
2.3 Diabetes Mellitus (DM) Patofizyolojisi ve Başlıca Risk Faktörleri **4**
2.4 İnsan Sitomegalovirüsü (HCMV) **4**
2.4.1 HCMV genomu **5**
2.4.2 HCMV yapısı **5**
2.4.3 HCMV çoğalma mekanizması **6**
2.4.4 HCMV enfeksiyon döngüleri **8**
2.4.5 HCMV patogenezi **10**
2.4.6 Stres faktörleri ve HCMV reaktivasyonu **11**
2.4.7 Oksidatif stres ve HCMV enfeksiyonu **12**
2.5 Glutatyon S-Transferaz (GSTs) **12**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **14**
3.1 Araç ve Gereçler **14**
3.2 Kimyasallar ve Çözeltiler **15**
3.3 Numune Toplama **15**
3.4 Kan Alma ve Serumun Hazırlanması **15**
3.5 Moleküler Analizler **16**

3.5.1 DNA ekstraksiyonu **16**
3.5.2 DNA'nın agaroz jel elektroforezi **17**
3.5.3 DNA kalitesinin tespiti **18**
3.5.4 Primerler ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.5.5 Konvansiyonel multipleks PCR **21**
3.5.6 Taqman kantitatif gerçek zamanlı PCR (Taqman qPCR) **21**
3.5.7 Jel Dokümantasyonu **24**
3.6 İstatistiksel Analiz **25**
4. BULGULAR **26**
4.1 Kandan Genomik DNA Ekstraksiyonu **26**
4.2 Glutatyon S-Transferaz Geninin Amplifikasyonu **26**
4.3 Glutatyon S-Transferaz Genotiplerinin Kontrol (G1) ve Diabetik (G2) Gruplardaki Oranları **31**
4.3.1 GSTM1'in kontrol (G1) ve diabetik (G2) gruplardaki frekansları **31**
4.3.2 GSTT1'in kontrol (G1) ve diabetik (G2) gruplardaki frekansları **32**
4.4 HCMV Enfeksiyonunun Kontrol (G1) ve Diabetik (G2) Gruplardaki Oranı **33**
4.4.1 HCMV ile GSTM1 ..... **33**
4.4.2 HCMV ile GSTT1 ..... **34**
4.5 İstatistiksel Analiz GSTM1 Genotipinde HCMV Enfeksiyonunun Oranı . Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
4.5.1 HCMV enfeksiyonunun GSTM1 genotipinde oranı……..……**35**
4.5.2 HCMV enfeksiyonunun GSTT1 genotipinde oranı……**35**
5. TARTIŞMA **37**
KAYNAKLAR **41**
ÖZGEÇMİŞ **49**

KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	Kazanılmış Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
ARMS-PCR	Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi PCR
CI	Güven aralığı
DM	Diabetes Mellitus
CMV	Sitomegalovirüs
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etileninitrilotetraasetik asit
GDM	Gestasyonel diyabetes mellitus
GSTM1	Glutatyon S-Transferaz Mu 1
GSTT1	Glutatyon S-Transferaz Teta 1
GSTs	Glutatyon S-transferaz
HCMV	İnsan Sitomegalovirüsü
HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
Na-EDTA	Etileninitrilotetraasetik asit disodyum tuzu
MIE	Majör Immediate Early
OR	Olasılık oranı
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGFRα	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü-alfa
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SNPs	Tek nükleotid polimorfizmleri
TBE	Tris-Borat Elektroforez tamponu
TDM1	Tip 1 Diabetes Mellitus
TDM2	Tip 2 Diabetes Mellitus
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Herpes virüslerinin yapısı 6
Şekil 2.2 HCMV'nin hücreyi enfekte etme mekanizmasının şematik diyagramı 8
Şekil 2.3 HCMV ile konakçı hücrelerin immünomodülasyonu 10
Şekil 3.1 AddPrep Genomic DNA ekstraksiyon kitinin resmi……...16
Şekil 3.2 Macrogen (Kore) tarafından sentezlenmiş olan konvansiyonel ve Taqman Real Time PCR primerleri. 20
Şekil 3.3 Isısal döngü cihazı 20
Şekil 3.4 qPCR makinesi 23
Şekil 3.5 DNA bantlarını içeren agaroz jellerin görüntülenmesi için jel dokümantasyon sistemi 25
Şekil 4.1 DNA ekstraksiyonu sonrasında ürünlerin agaroz jel (%2 agaroz) elektroforez görüntüsü 26
Şekil 4.2 Test edilen sağlıklı gruba ait numunelerdeki (1-16) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici). 27
Şekil 4.3 Test edilen sağlıklı gruba ait numunelerdeki (17-33) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)…….28
Şekil 4.4 Test edilen sağlıklı gruba ait numunelerdeki (34-50) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)…….28
Şekil 4.5 Test edilen sağlıklı gruba ait numunelerdeki (51-65) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)…….29
Şekil 4.6 Test edilen diabetik hasta grubuna ait numunelerdeki (1-15) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)…….29
Şekil 4.7 Test edilen diabetik hasta grubuna ait numunelerdeki (16-32) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)……..36
Şekil 4.8 Test edilen diabetik hasta grubuna ait numunelerdeki (33-48) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)……..36
Şekil 4.9 Test edilen diabetik hasta grubuna ait numunelerdeki (49-60) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)……..36
Şekil 4.10 Kontrol ve Diabetes Mellitus gruplarında GSTM1 genotipinin oranını gösteren istatistiksel grafik…….....32

Şekil 4.11 Kontrol ve Diabetes Mellitus gruplarında GSTT1 genotipinin oranını gösteren istatistiksel grafik…….....33
Şekil 4.12 Kontrol ve Diabetes Mellitus içindeki GSTM1 genotiplerinde HCMV enfeksiyon oranının karşılaştırmasının istatistiksel grafiği…….35
Şekil 0.13 Kontrol ve Diabetes Mellitus içindeki GSTT1 genotiplerinde HCMV enfeksiyon oranlarının karşılaştırılması…….36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Litik ve latent fazlar sırasında HCMV genetik transkripsiyonunun karşılaştırılması 9
Çizelge 3.1 Menşei ülkeleriyle birlikte kullanılan araç ve gereçler 14
Çizelge 3.2 Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler 15
Çizelge 3.3 Deneyde kullanılan örnekler ve gruplar 15
Çizelge 3.4 Tüm gruplar için DNA konsantrasyonu ve saflığı 19
Çizelge 3.5 Konvansiyonel multipleks PCR'da kullanılan primerlere ait bilgiler 19
Çizelge 3.6 PCR ana karışımın bileşenleri 22
Çizelge 3.7 Konvansiyonel multipleks PCR termal koşulları 23
Çizelge 3.8 CMV tespiti için kullanılan primer ve prob dizileri 24
Çizelge 3.9 Toplam hacim 20 µL Taqman qPCR reaksiyonunun bileşenleri 24
Çizelge 3.10 Taqman qPCR testinin termal koşulları 24
Çizelge 4.1 G1 (kontrol) ve G2 (Diabetes Mellitus) gruplarında GSTM1 genotiplerinin dağılımı 31
Çizelge 4.2 G1 (kontrol) ve G2 (Diabetes Mellitus) gruplarında GSTT1 genotiplerinin dağılımı 32
Çizelge 4.3 GSTM1 genotipinin varlığı ve yokluğu durumlarında toplam HCMV enfeksiyonu 34
Çizelge 4.4 GSTT1 genotipinin varlığı ve yokluğu durumlarında toplam HCMV enfeksiyonu 34

1. GİRİŞ

1.1 Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes Mellitus (DM), kandaki glikoz seviyesinde bir artış (hiperglisemi) ile kendini gösteren metabolik bir hastalıktır. Başlıca sebebi, insülin üretiminde bir eksiklikle sonuçlanan pankreastaki β hücrelerinin işlevsizliğidir (Baynest 2015). Diğer sendrom ise insülin direncini içermekte olup genellikle protein, yağ ve karbonhidrat metabolizması üzerinde etkisi olan insülin bozuklukları ile kandaki glikoz seviyesindeki bir artış ile karakterizedir (Punthakee *et al*. 2018).

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre Diabetes Mellitus, insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak, son sınıflandırma Tip 1 ve Tip 2 diyabetin yanı sıra gestasyonel diyabet ve monogenik diyabeti de içermektedir

Tip 1 diyabetin başlıca nedeni, insülin üretiminin azalmasıyla sonuçlanan bir otoimmün bozukluk süreci nedeniyle β-hücresinin ortadan kaldırılmasıdır (Oram *et al.* 2016). Diğer diyabetik tipler arasında bu tipin görülme sıklığının %5 ila 10 olduğu tahmin edilmekte olup esas olarak immünolojik hücreler (CD8 ve CD4 T lenfositler) tarafından β-hücrelerinin nekrozundan kaynaklanan genç yaştaki popülasyonla ilişkilidir (Diaz-Valencia *et al*. 2015).

Öte yandan, diyabetik vakaların %80 ila 90'ına ulaşabilen ve hastalık öyküsü; obezite, yaş vb. birçok faktörle ilişkili olduğu için Tip 2 diyabetin oranı Tip 1 diyabetten daha yüksektir (Khan *et al.* 2019).

Diabetes Mellitusun diğer nedenleri arasında viral enfeksiyonlar bulunmaktadır. Bu muhtemelen pankreatit ve/veya hepatitten kaynaklanmaktadır (Elhawary *et al.* 2011). Sitomegalovirüs (CMV), Diabetes Mellitus ile ilişkili önemli bir viral enfeksiyondur (Elhawary *et al.* 2011, Eltayib *et al.* 2014).

1.2 İnsan Sitomegalovirüsü (HCMV)

HCMV veya insan herpes virüsü 5, bağışıklığı azalmış insanları enfekte eden Herpesviridae ailesi, Beta-herpesvirinae alt ailesi, sitomegalovirüs cinsine ait bir virüstür (Davison 2010a). Bağışıklık sistemi zayıfladığında, yeniden aktifleşene kadar herhangi bir semptom olmadan hastaları enfekte edebilir ve daha da önemlisi enfeksiyon yaşam boyu devam eder (Eltayib *et al.* 2014). HCMV'nin üç çeşit enfeksiyonu vardır:

- Edinilmiş veya Birincil CMV: Bu tip, enfekte kişilerden doğrudan temas yoluyla enfeksiyonun kapılması anlamına gelir.
- Tekrarlayan CMV: Virüsün hala latent olduğu ve bağışıklık sistemi zayıfladığında yeniden aktive olduğu durumdur.
- Konjenital CMV: Bu tipte enfeksiyon hamilelik sırasında ortaya çıkar ve virüs fetüse de geçer (Rawlinson *et al.* 2016).

Diğer viral enfeksiyonlar gibi; HCMV de muhtemelen β-pankreatik hücrelerin enfeksiyonu nedeniyle Tip 1 Diabetes Mellitus ile ilişkilidir (Ekman *et al*. 2019, Eltayib *et al.* 2014). Ayrıca HCMV'nin Tip 2 Diabetes Mellitus ile de ilişkili olduğu bulunmuştur (Dworzański *et al.* 2019, Eltayib *et al.* 2014). Bu nedenle, diyabetik hastaların HCMV ile enfekte olma olasılığının daha yüksek olduğunu varsayılmaktadır. Bu, bağışıklık aşağı regülasyon ve / veya stres faktörlerinden kaynaklanmaktadır. Bu hipotezi test etmek için, stresle ilişkili genlerin (Glutatyon) genetik durumunu göstermek için Taqman qPCR ve geleneksel PCR kullanılarak diyabetik hastaları HCMV'ye karşı incelemek için iki moleküler yaklaşım benimsenmiştir.

1.3 Çalışmanın Amaçları

- Sağlıklı ve diyabetik hastalarda (Tip 2 Diabetes Mellitus) CMV enfeksiyonunun araştırılması,
- Sağlıklı olanlarla karşılaştırıldığında, diyabetik hastalarda oksidatif stresin (Glutatyon S-transferaz özelliğinin) gösterilmesi bu çalışmanın amaçlarıdır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Diabetes Mellitus (DM) Hastalığı

Diabetes Mellitus (DM), vücuttaki ana enerji kaynağı kan şekerinin yüksekliği ile ilişkili metabolik bir hastalıktır. Glikoz vücutta birçok kaynaktan elde edilmekle beraber asıl kaynak karbonhidratlardır; karbonhidrat azaldığında veya bulunmadığında (açlık, oruç veya keto diyeti) vücut, glikozu glukoneogenez metabolizması ile karbonhidrat olmayan kaynaklardan elde eder. Temel olarak, glikoz, insülin olarak bilinen bir hormon ile enerji üretimi için hücrelere girer. İnsülin, pankreastaki (Langerhans Adası) beta hücreleri tarafından üretilir. Ancak hücreler bozulduğunda; insülin üretimi gerçekleşmez veya yetersiz insülin üretilir. Bu durum insülin direnci olarak bilinmektedir. Asıl sorun, kan şekeri yükseldiğinde ortaya çıkar; karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozulmalarla beraber göz hastalığı, böbrek yetmezliği, sinir sorunları, kangrenli uzuvlar gibi diğer işlev bozukluklarına da neden olur (Kokil *et al.* 2010). Başlıca klinik belirtiler poliüri, halsizlik, polidipsi, yavaş yara iyileşmesi, kilo kaybı ve göz görme bozukluğudur (Harrison *et al*. 2003).

2.2 Diabetes Mellitus (DM) Tipleri

Genel olarak iki tane Diabetes Mellitus tipi vardır, diğerleri ise Tip 2 Diabetes Mellitusun alt tipleridir. Başlıca türleri:

- **Tip 1 Diabetes Mellitus (TDM1)**

Otoimmün bir hastalık olarak kabul edilmekle beraber esas olarak çocuklarda görülür (30 yaş altı). Bu durumun nedeni pankreasın tüm beta hücrelerinin zarar görmesidir. Önemli biçimde, TDM1 hastalarının yaklaşık %10'unun erken ölümden muzdarip olduğu tahmin edilmektedir. TDM1'in ana etiyolojisi otoimmünitedir ve kalıtsal faktörler ile çevresel koşullar predispozan faktörler olabilir (Marjanac *et al.* 2019).

- **Tip 2 Diabetes Mellitus (TDM2)**

Bu tip daha yaygın olup dünya çapında insanların yaklaşık %90 ila 95'i bu tipten muzdariptir. Başlıca nedeni, beta hücrelerinin önemli bir kısmının hasar görmesidir. Diğer bir neden ise kanda glikoz olmasına rağmen hücrelerin insülini gerektiği gibi kullanamamasıdır. Bu durum insülin direnci olarak da bilinir (Duarte *et al.* 2020).

- **Diabetes Mellitusun diğer tipleri**

Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) gebelikle ilişkilidir. Bu durumda DM, vakaların yaklaşık %90'ında geçici olabilir ve doğumdan sonra normal duruma gelir. Normal kan şekerini geri döndürür veya bazen DM iyileşmeden devam eder. Diğer bir yaygın olmayan tip ise prediyabetik olarak bilinir; bu durum açlık sırasındaki glikoz değerinin 120-130 mg/dL arasında olduğunda ortaya çıkmaktadır (Bergman 2013).

2.3 Diabetes Mellitus (DM) Patofizyolojisi ve Başlıca Risk Faktörleri

Diabetes Mellitusa neden olan iki tip metabolik bozukluk vardır (Murphy *et al.* 2008):

- Beta hücrelerinin ve insülin üretiminin verimsiz olması.
- İnsülin direnci; kas veya karaciğer gibi insüline iyi yanıt vermeyen ve kandaki glikozu enerji üretimi için kullanamayan belirli dokulardaki hücrelerde oluşur. Telafi edici bir mekanizma olarak pankreas daha fazla insülin üretir, ancak kandaki miktarı yüksektir ve etkisizdir (Jennings *et al.* 2014).

2.4 İnsan Sitomegalovirüsü (HCMV)

HCMV, Beta-herpes virüsleri alt ailesine aittir; dünyanın her yerinde bulunur ve enfeksiyon insan popülasyonunda yaygın olarak görülür. İnsan Sitomegalovirüsü (HCMV) ilk olarak 1957 yılında doku kültüründe izole edilmiştir. Daha sonra, 1990'da genomik yapısı gösterilmiştir. Virüs çift zincirli DNA'ya sahiptir. Etiyolojisi, İnsan herpesvirüs 5'tir (HHV5) (Davison 2010b). Genel olarak, Beta-herpes virüsleri, HCMV'nin sitomegaliye (hücre genişlemesi) neden olmak için yavaş çoğaldığı böbrek ve

lenf dokuları gibi enfekte etmek için spesifik bir hücre tipi tropizm izler, ayrıca enfekte hücrelerin içinde latent kalabilir (Weinberg 2008).

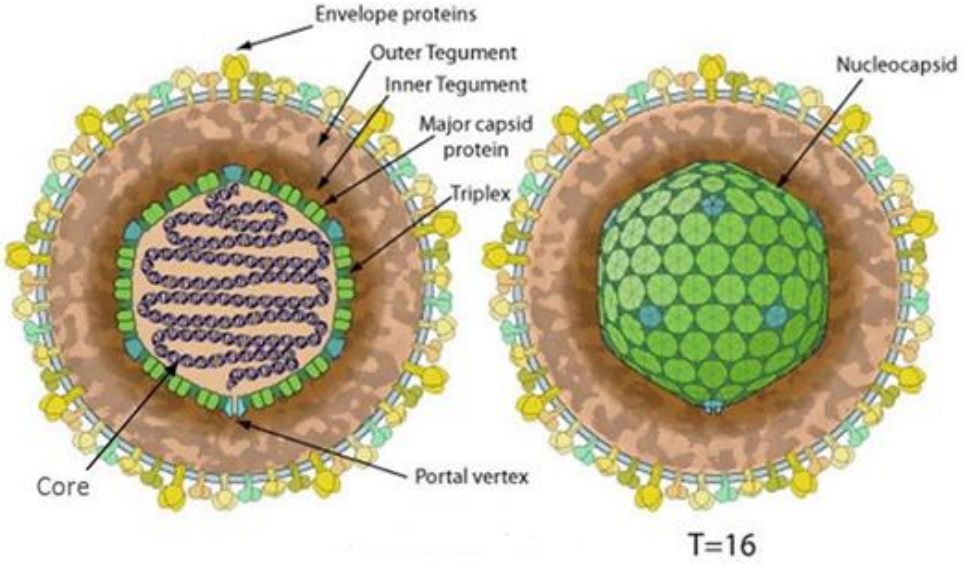
2.4.1 HCMV genomu

HCMV genomunun boyutu yaklaşık 235.646 (Dolan *et al.* 2004) kb'dir ve çok sayıda proteini kodlayan çok karmaşık yapılara sahiptir. Tüm genom iki bölgeden (tekrarlanan ve benzersiz bölgeler) oluşur. Genomun şekli doğrusaldır. Bununla birlikte, kromozomlara bağlanma yoluyla viral latentlik için konakçı çekirdeğinde kalan bir epizom olarak enfeksiyonun gizli fazı sırasında dairesel hale gelir (Davison 2010b). Temel olarak, HCMV kendi genomu içinde 200'den fazla Açık Okuma Çerçevesini kodlar ve ayrıca çok sayıda mikroRNA'ları kopyalar (Woodhall *et al*. 2006).

2.4.2 HCMV yapısı

HCMV'nin yapısı lipid, karbonhidrat, protein içeren ikosahedral simetrili ve viral zarfa sahip bir nükleokapsidden oluşur. Kapsid ve zarfın arası, tegument protein yapısı ile doldurulur (McGeoch 1989). Tegument olarak bilinen ve viral replikasyon döngülerinde muhtemelen önemli bir rol oynayan amorf proteinli bir yapı ile kaplı yaklaşık 160 kapsomer vardır. Kapsidin; konağın interferon, sitokinler, kemokin, MHC sistemi, hücre ölüm sinyali, NK, T ve B hücrelerinin bağışıklığının ortadan kaldırılmasında hayati bir rolü vardır (Biolatti *et al*. 2018, Brune and Andoniou 2017, Mocarski 2002, Patro 2019, Stempel *et al*. 2019).

Virüs yüzeyi, konakçı hücrelere viral bağlanmada önemli rolü olan glikoprotein yapılarını içeren bir lipid tabakası ile kaplıdır (McGeoch 1989, Mettenleiter *et al.* 2009). Bu glikoproteinler viral zarfa gömülüdür; tüm bu yapılar Şekil 2.1 de gösterilmektedir.



Şekil 2.1 Herpes virüslerinin yapısı (Roizman 1982)

2.4.3 HCMV çoğalma mekanizması

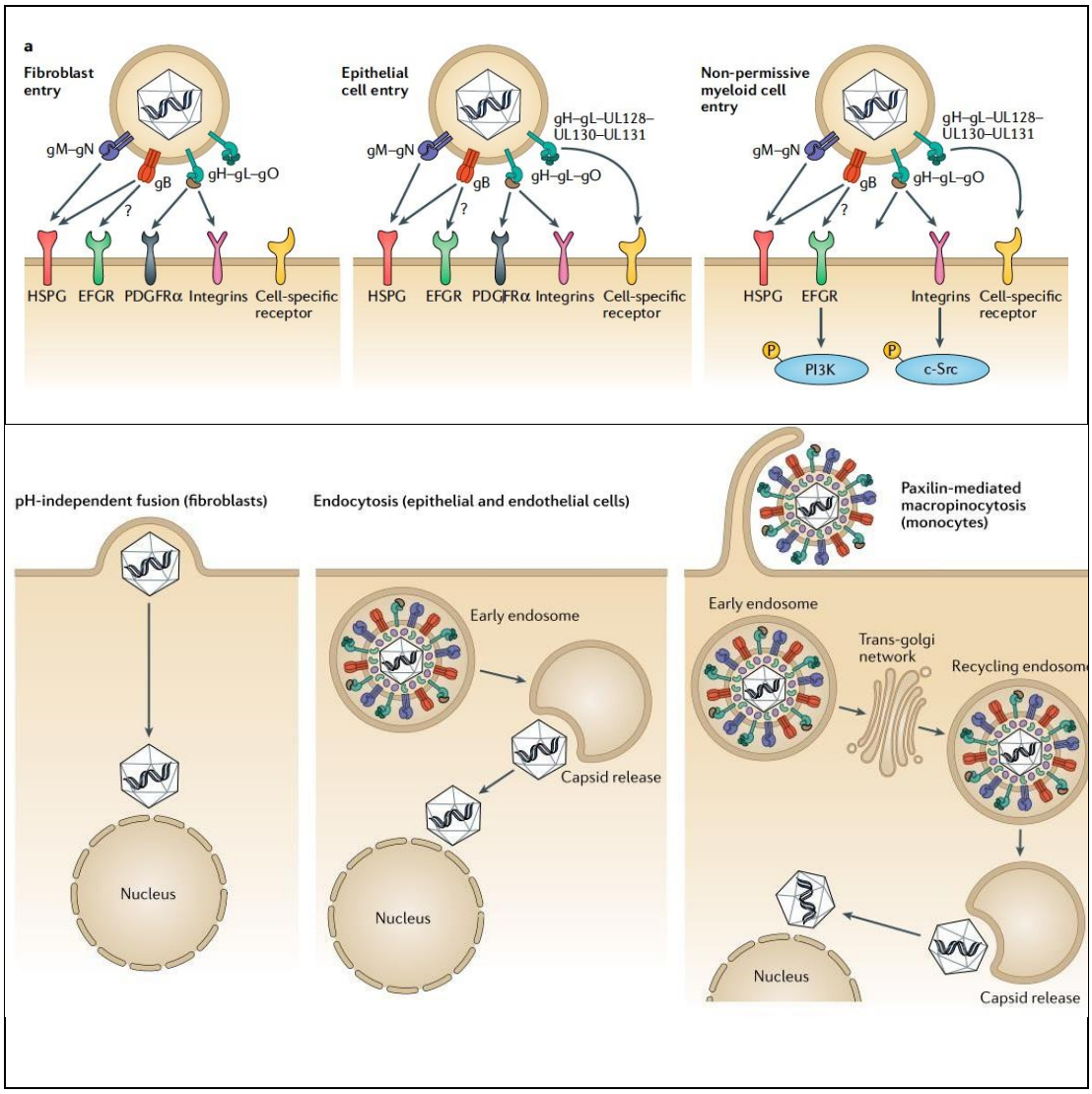
Konakçı hücrenin çekirdeğinde yerleşik virüsün genomunun ilgili transkriptleri ile viral kapsidinin sentezi, birleşmeyi gerçekleştirmek için konakçı hücreye ihtiyaç duyar. Daha da önemlisi, latent bir virüs olarak konakçı hücre içinde uzun süre hareketsiz kalabilir (Mettenleiter *et al.* 2009). HCMV'nin endotel hücreleri yoluyla konakçı hücrelerin içine girdiği (Sinzger 2008) ve konakçı hücrelerin içinde birleşme bölmeleri oluşturduğu (Golgi aygıtı) ve ayrıca hücresel biyolojik süreçleri çalıştırdığı bulunmuştur (Alwine 2012, Lučin *et al.* 2020).

Genel olarak virüs, virion kapsidlerinin mikrotübüller vasıtasıyla konakçı hücre çekirdeğine taşındığı konakçı hücrelerin içine içine girer ve tutunur, daha sonra viral DNA'nın bırakıldığı çekirdeğin gözeneklerine ulaşır. Bundan sonra, virion olgunlaşması amacıyla viral partikülleri oluşturmak için bir dizi genetik transkripsiyon başlatılır. Son olarak, bu virionlar hücre zarına ulaşır, sonra birleşir ve hücrelerin dışına çıkar (McGeoch 1989).

Temel olarak virüs, zarfı üzerinde konakçı hücre reseptörlerine bağlanan glikoproteinler içerir. Bağlanma gerçekleştiğinde, virün hücreye girişine öncülük etmek için çok sayıda

işlemin başlatılması gerekir. Bununla birlikte, enfekte hücre tipine göre meydana gelen birkaç tutarsızlık vardır. Örneğin, fibroblast hücre tiplerinde üç çeşit viral glikoprotein, (gH, gL ve gO), ko-reseptörlere ve ayrıca trombosit türevli büyüme faktörü-alfaya (PDGFRα) bağlanmak için trimer bir glikoprotein görevi görür. Bu durum, viral zarfın hücre zarına pH bağımlı bir şekilde füzyonuna yol açar. Öte yandan, endotelyal ve epitelyal hücre tiplerinde, H ve L glikoproteinleri, pentamerik bir yapı olarak UL130, UL131 ve UL128 genleri tarafından kodlanan diğer üç proteine bağlanır. Bu yapı, endositozu başlatmak için nöropilin 2'ye bağlanır (pH bağımlı) ve oluşturulan endozomdan salınmak için gB füzyonu gereklidir (Griffiths and Reeves 2021) (Şekil 2.2).

Önemli olarak, HCMV'nin bazı zarf glikoproteinleri, plazma zarının hücreden hücreye füzyonunu indüklemek ve çok çekirdekli sinsitya oluşturmak için hareket etmektedir (Tang *et al.* 2021) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 HCMV'nin hücreyi enfekte etme mekanizmasının şematik diyagramı (Griffiths and Reeves 2021).

2.4.4 HCMV enfeksiyon döngüleri

2.4.4.1 HCMV litik enfeksiyon döngüsü

Çoğu herpes virüste olduğu gibi, HCMV'nin de litik ve latent aşamalar olmak üzere iki enfeksiyon evresi vardır. Litik fazda virüs, konakçı hücrelerin içinde çoğalabilir ve proteinlerini üretmek için genomunu verimli bir şekilde ifade edebilir. Daha da önemlisi, buna konakçı bağışıklığından kaçmak için viral ürünlerin kodlanmasıyla eşlik edilir. Bu

durum, esas olarak B ve T hücreleri gibi belirli bağışıklık hücrelerinden kaçarak gerçekleşir (Griffin *et al.* 2010, Sadeghipour and Mathias 2017, Sausen *et al.* 2021).

Virüs erken litik aşamada, viral genom replikasyonunu başlatmak için anında erken alfa ürünlerini (alfa-IE) kodlar. Bunu, RNA polimeraz 2'nin alınması gibi hücresel süreci kontrol etmek için beta-IE transkriptlerinin üretilmesi ve daha sonra viral olgunlaşma için gerekli olan yapısal proteinleri oluşturmak için gama-geç genlerin üretilmesi takip eder (McGeoch 1989, Weinberg 2008).

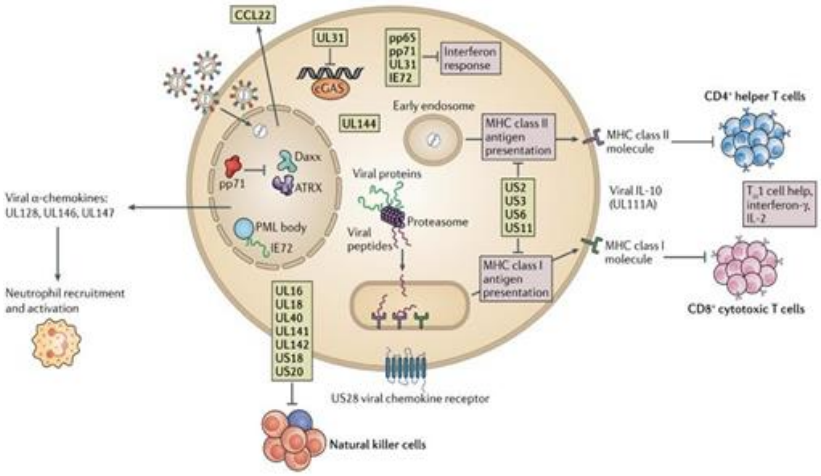
2.4.4.2 HCMV latent enfeksiyon döngüsü

Herpes virüslerin en karakteristik özelliklerinden biri, enfekte olmuş hücrelerde latent kalma yetenekleridir. CMV özellikle monositleri (CD14+) veya hematopoetik progenitör hücreleri (HPCs-CD34+) enfekte ederek latent kalabilir (Tarrant-Elorza *et al*. 2014). Bu enfeksiyon aşamasında, genomik virion dairesel hale gelir ve konakçı kromozomu ile bağlanır ve bu evrede çok düşük seviyede viral gen ürünleri kopyalanır. Bu aşamada HCMV, viral epizomlar olarak görünür (Mauch-Mücke *et al.* 2020) (Çizelge 2.1).

Önemli olarak, HCMV ayrıca Ana Histouyumluluk Kompleksi Sınıf I ve II (MHC Sınıf I ve II) yoluyla konak bağışıklığını (T hücreleri) ve cGAS-cGAMP-STING Toll-Benzeri Reseptör (TLR) sinyallemesi, AKT ve apoptozun yolu inhibisyonu gibi diğer yolları iptal edebilir (Sausen *et al.* 2021) (Şekil 2.3).

Çizelge 2.1 Litik ve latent fazlar sırasında HCMV genetik transkripsiyonunun karşılaştırılması (Mauch-Mücke *et al.* 2020, Tarrant- Elorza *et al.* 2014)

Litik faz	**Latent faz**
Konakçı biyolojik sistemi ile düzenlenmiş litik gen ekspresyonu	Kısıtlı litik gen ekspresyonu
Litik ilişkili genlerin ekspresyonu ve konakçı bağışıklığının yönetimi	Latent genlerin ekspresyonu
Konakçı bağışıklığından kaçınma ve virüs replikasyonunun sürdürülmesi	Virüs kalıcılığını koruyarak konakçı bağışıklığından kurtulma ve ardından yeniden etkinleşme



Şekil 2.3 HCMV ile konakçı hücrelerin immünomodülasyonu (Griffiths and Reeves 2021).

2.4.5 HCMV patogenezi

HCMV enfeksiyonu hafif bulaşıcıdır ve en önemlisi çocuklardan yetişkinlere idrar ve tükürük yoluyla bulaşabilirken, yetişkinlerde cinsel yolla bulaşma ve kan transfüzyonu viral yayılmanın ana yollarıdır (Colugnati *et al.* 2007). Genellikle HCMV enfeksiyonu, konakçı bağışıklığı tarafından kontrol edilir. Böylece klinik belirtiler hafif veya asemptomatik görünür. Bununla birlikte, bağışıklığı baskılanmış hastalarda HCMV, yüksek viral yük üretmesi nedeniyle ciddi sağlık sorunlarına neden olabilir. Bunun sonucunda patolojik değişikliklere neden olur. Bu durum, yeniden yapılanma ve konakçı bağışıklığından kaçınma ile birleştirilir (Griffiths 2020, Oh *et al.* 2021).

HCMV'nin reaktivasyonu; miyeloid hücreler, olgun dendritik hücreler veya makrofajlar, CD14+ monositler ve CD34+ progenitör hücreler gibi farklı hücre tiplerinde birçok araştırmacı tarafından gözlemlenmiştir (Aslam *et al.* 2019, Reeves *et al*. 2005, Reeves and Sinclair 2013).

2.4.6 Stres faktörleri ve HCMV reaktivasyonu

Çok sayıda araştırma, HCMV enfeksiyonda özellikle viral reaktivasyonun genellikle organ transplantasyonu (Luo *et al.* 2021), ülseratif kolit (Qin *et al.* 2021), mide ülseri (Zhang *et al.* 2017), Diabetes Mellitus Tip 1 ve 2 enfeksiyonu (Dworzański *et al.* 2019) ve gebelikte konjenital HCMV bulaşması (Rawlinson *et al.* 2016) dahil olmak üzere diğer risk faktörlerinin bağışıklığı azaltmasıyla ortaya çıktığını bulmuştur.

Ayrıca mantar enfeksiyonu gibi diğer koenfeksiyonlarda da rapor edilmiştir (Chuleerarux *et al.* 2021). Virüs stres faktörlerinin varlığında reaktive olabilir ve reaktivasyona kadar da latent kalabilir. Bu muhtemelen, virüsün MHC bağışıklık sistemini ve ayrıca konakçı eksozomunu kaçırma gibi diğer yolları ortadan kaldırarak konak bağışıklığından kaçma yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Griffin *et al.* 2010, Sadeghipour and Mathias 2017).

Bağışıklığı baskılanmış ve organ nakli olanlarda HCMV enfeksiyonunun yüksek enfeksiyon oranı ve ölümlere sebep olduğu ve daha da önemlisi hastaların çoğunlukla birden fazla HCMV genotipi ile enfekte olduğu bildirilmiştir (Ciotti *et al.* 2018, Luo *et al.* 2021).

HIV enfeksiyonu (AIDS) vakalarının çoğunda, HCMV'nin yeniden reaktive olma olasılığının yüksek olduğu da belirtilmiştir (Springer and Weinberg 2004). Kronik olarak HCMV ile enfekte hastalarda, yeniden aktive olan HCMV enfeksiyonlarının kardiyovasküler hastalıklar gibi diğer hastalıkları tetikleyerek bu hastaların çoğunda yüksek ölüm oranı oluşturma riskine sahip olabileceği (Firth *et al.* 2016) ve ayrıca, HCMV enfeksiyonu ile meme kanseri ve glioblastoma gibi birçok kanser türü arasında olası bir ilişki olabileceği bildirilmiştir (Maussang *et al.* 2006).

2.4.7 Oksidatif stres ve HCMV enfeksiyonu

Kronik hepatit C gibi bazı viral enfeksiyonların, Diabetes Mellitus Tip 2 ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok metabolik bozukluk riskini artırabileceği, bunun metabolik yolaklardaki aksaklıklardan ve kronik inflamatuar reaksiyonlardan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Drazilova *et al.* 2018). Diğer araştırmacılar, bu viral enfeksiyonların sadece bu tür metabolik bozuklukların gelişimini etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda hastalığın sonucunu ve komplikasyonlarını da karmaşık hale getirdiğini göstermiştir (Devi *et al.* 2021, Lee *et al.* 2013).

Xiao *et al.* (2015), stres ajanı olarak bilinen Hidrojen Peroksitin HCMV transkripsiyonlarını ve majör immediate early (MIE) promotor aktivitesini artırarak HCMV replikasyonunu desteklediğini göstermiştir. HCMV enfeksiyonu, vasküler endotel hücreleri üzerindeki etkisi ile stresli durumların varlığında hipertansiyona yol açabilmektedir (Zhang *et al.* 2020). Ayrıca glutatyon enzimi ile HCMV enfeksiyonu arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Tilton *et al.* 2011).

2.5 Glutatyon S-Transferaz (GSTs)

Oksidatif stres muhtemelen TDM2 gibi çok sayıda hastalığın ilerlemesine katılan Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) birikmesine yol açmaktadır. Etkilenen çok sayıda hücre tipi arasında özellikle pankreasın Langerhans Adacıkları TDM2 hastalarında bu oksidatif stresin ana hedefi gibi görünmektedir (Gorogawa *et al.* 2002).

Reaktif Oksijen Türleri için bir temizleyici görevi gören çok sayıda antioksidatif enzim varolmakla beraber GST, çoğu oksidasyona (ROS ve NOS) karşı koruyucu bir element olarak önemli bir rol oynayan ve hücrelerin içinde üretilen bir antioksidan olarak önemli bir enzimdir. Ayrıca biyolojik hücre yollarında metabolik ve fizyolojik olarak çok sayıda rolü vardır (Harries 1997, Sheehan *et al.* 2001).

Antioksidan GST; TDM2, obezite, lipid peroksidasyonu, vb. gibi sayısız hastalık için bir inhibitör kadar detoksifiye edici bir ajan olarak görev yapar. Son zamanlarda, birçok araştırmacı GST'lerin genetik polimorfizmleri ile TDM2 oluşumu arasında bir ilişki olduğunu bulmuştur (Musavi *et al.* 2019, Ortega *et al.* 2017, Pahwa *et al.* 2017, Selph *et al.* 2015).

GSTs genindeki genetik polimorfizmin, sayısız metabolik bozukluğa duyarlılığı arttırması nedeniyle ciddi sağlık sorunlarına neden olabileceği bildirilmiştir. Örneğin, GSTM1 ve/veya GSTT1'in silinmesi oksidasyonun artmasına ve dolayısıyla diğer hastalıkların yanı sıra TDM2 riskinin de artmasına neden olmuştur (Mustafa *et al.* 2010, Probst-Hensch *et al.* 2008).

GSTT1 ve/veya GSTM1'in silinmesi, diğer sonuçlarının yanında TDM2 gelişimine predispozisyona da yol açabilir. GSTT1 ve/veya GSTM1'de şekillenen genetik polimorfizmin, enzimatik detoksifikasyon seviyesinin düşmesi nedeniyle hücrelerin oksidasyondan korunmasında azalmaya sebep olması ile açıklanmaktadır (Klusek *et al*. 2018, Musavi *et al.* 2019).

HCMV enfeksiyonu ile ilişkili birden fazla genetik polimorfizmin muhtemelen TDM2 enfeksiyonu olasılığının artışına yol açtığı bildirilmiştir (Klusek *et al.* 2018).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Araç ve Gereçler

Bu çalışma boyunca kullanılan ekipman ve aletler Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Menşei ülkeleriyle birlikte kullanılan araç ve gereçler

Araç ve Gereçler	**Şirket**	**Menşei**
0,5-10µL mikropipet	Slamed	Almanya
5-50 µL mikropipet	Dragon	Çin
10-100 µL mikropipet	Dragon	Çin
100-1000 µL mikropipet	Dragon	Çin
1-250 µL çok kanallı pipet	Dragon	Çin
Santrifüj	Hettich zentifugen	Almanya
Soğutmalı mikro santrifüj	Bioneer	Güney Kore
Eppendorf tüpü 1,5 µL	Capp	Danimarka
İnkübator dondurucu	Toshiba	İngiltere
Yüksek hızlı santrifüj	Heraens Biofugepico	İngiltere
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	IKAMAGRCT	Hindistan
Sıcak plaka	Lab-compinian Hp- 3000	ABD
Gerçek Zamanlı PCR ısı döngüleyici	Applied Biosystem	ABD
PCR ısı döngüleyici	BIORAD	ABD
Hassas terazi	Precis	İsviçre
PCR tüpü	Güney Kore	Güney
Jel elektroforez sistemi	Cleaver Scientific	Kore
Jel dokümantasyon sistemi	Cleaver Scientific	İngiltere
UV transillüminatör cihazı	Cleaver Scientific	İngiltere
Nano damla UV-Vis spektrofotometre Q5000	Quawell	İngiltere
Vorteks	Bioneer	ABD
Benmari	Grrant	Güney Kore

3.2 Kimyasallar ve Çözeltiler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler

Kimyasallar ve Çözeltiler	Şirket	Menşei
Agaroz tozu	BDH	İngiltere
Mutlak etanol	BDH	İngiltere
DNA merdiveni 100-3000 bp	Promega	ABD
Genomik DNA ekstraksiyon kiti (Kandan)	AddBIO	Güney Kore
Yükleme boyası	Newbiolabs	İngiltere
PCR ana karışımı	AddBIO	Güney Kore
Taqman qPCR ana karışımı	AddBIO	Güney Kore
PCR primer	Macrogen	Güney Kore
Taqman test çubuğu	Macrogen	Güney Kore
PCR su	Bioneer	Güney Kore
TBE tampon 10X	AddBIO	Güney Kore

3.3 Numune Toplama

Irak, Al-Diwaniyah Eğitim Hastanesi'ndeki bireylerden 27/08/2020 ve 01/09/2021 tarihleri arasında numuneler alındı. Kontrol grubu (G1) oluşturmak için sağlıklı bireylerden 90 ve TDM2 hastalarından (G2) 70 olmak üzere, sağlıklı ve hasta bireylerden toplamda 160 kan örneği alındı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Deneyde kullanılan örnekler ve gruplar

No	Grup	Yaş aralığı	Vaka sayısı	Kullanılan örnek
G1	Kontrol	30 - 45	90	Kan örnekleri
G2	T2DM hastaları	30 - 45	70	Kan örnekleri

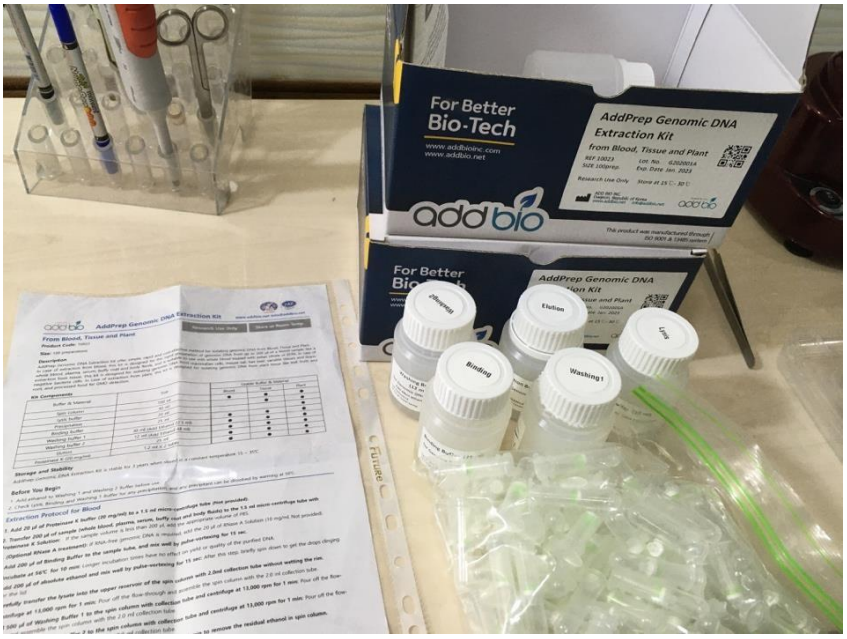
3.4 Kan Alma ve Serumun Hazırlanması

Tüplere beş mililitre venöz kan örneği ve Na-EDTA tüplerine 2 mL kan örneği alındı. Tam kan, 3.5.1'de anlatıldığı şekilde DNA ekstraksiyonuna tabi tutuldu.

3.5 Moleküler Analizler

3.5.1 DNA ekstraksiyonu

AddPrep Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (Şekil 3.1), genomik DNA'yı kandan izole etmek için basit, hızlı ve uygun maliyetli bir yöntem sunmaktadır. Kandan ekstraksiyon durumunda bu kit; tam kan, plazma, serum, beyaz kan ve vücut sıvıları gibi 200 µL'ye kadar kan örneğinden hızlı genomik DNA hazırlamak için tasarlanmış olup sitrat veya EDTA ile işlenmiş tam kanla kullanıma uygundur.



Şekil 3.1 Add Prep Genomic DNA ekstraksiyon kitinin resmi (AddBIO, Güney Kore)

DNA, üreticinin tavsiyesine göre (AddBIO, Güney Kore) kan örneklerinden aşağıdaki gibi ekstrakte edildi:

- 1,5 mL mikro santrifüj tüplerine önce 20 µL Proteinaz K çözeltisi (20 mg/mL); ardından 200 µL tam kan eklendi.
- Karışıma 200 µL bağlama çözeltisi eklendi, ardından 15 saniye vortekslendi ve 56°C'de 10 dakika inkübe edildi.

- 200 µL mutlak etanol eklendi ve 15 saniye darbeli vorteksle iyice karıştırıldı. Bundan sonra, lizat dikkatlice 2,0 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirilen döndürme kolonunun üst rezervuarına aktarıldı.
- Bunlar 1 dakika süreyle 13.000 rpm'de santrifüjlendi, ardından tüpe geçen sıvı döküldü ve döndürme kolonu tekrar 2,0 mL toplama tüpüne yerleştirildi.
- Toplama tüpüne yerleştirilen döndürme kolonuna 500 µL yıkama 1 çözeltisi ilave edildi, daha sonra 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, ardından tüpteki sıvı döküldü ve döndürme kolonu tekrar 2,0 mL toplama tüpüne yerleştirildi. Bu adım, 500 µL yıkama 2 çözeltisi eklenerek tekrarlandı.
- Son olarak, döndürme kolonunda kalan etanolün çıkarılması için boş döndürme kolonu 1 dakika boyunca 13.000 rpm'de ek santrifüjleme ile kurutuldu. Daha sonra 1,5 mL'lik yeni bir tüpe alınan döndürme kolonuna 100 µL elüsyon çözeltisi eklenerek en az 1 dakika bekletildikten sonra 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Döndürme kolonu atıldı ve tüpe geçen DNA'nın agaroz jel elektroforezi yapıldı.

3.5.2 DNA'nın agaroz jel elektroforezi

DNA'nın agaroz jel elektroforezi için;

- Agaroz tozu
- Damıtılmış su
- 10 X TBE (Tris-Borat Elektroforez tamponu)
- Güvenli jel boyası (10 mg/mL)
- Mikrodalga ve termometre
- Elektroforez ekipmanı ve güç kaynağı kullanıldı.

Elektroforez protokolü şunları içermektedir:

A- 1X TBE Tamponunun Hazırlanması: 1X TBE tamponu, 10X TBE tampon stok çözeltisinin 50 mL'si 450 mL damıtılmış suya eklenerek hazırlandı.

B- %2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması:

1. Bir şişeye 100 mL hacminde 1X TBE tampon alındı.
2. Tampona 2 g agaroz tozu ilave edildi.
3. Çözelti, tüm agaroz parçacıkları çözünene kadar mikrodalga ile kaynama noktasına kadar ısıtıldı.
4. Agaroz çözeltisine bir hacim 7 µL güvenli jel boyası ilave edildi ve ardından agaroz karışımı karıştırıldı.
5. Çözelti, oda sıcaklığında 60°C'de soğumaya bırakıldı.
6. Jel bölmesi, tepsinin bir ucuna yerleştirilen taraklarla uygun şekilde birleştirildi.
7. Çözelti bir jel tabağına döküldü ve jel tamamen katılaşana kadar 20 dakika bırakıldı.
8. Taraklar çıkarılarak jel 1X TBE içeren elektroforez tankına konuldu.
9. Genomik DNA analizi için, 5 µL DNA 1 µL yükleme boyası (New Biolabs, İngiltere) ile karıştırıldı ve tüm DNA örnekleri jeldeki ayrı kuyucuklara yüklendi.
10. Elektroforez cihazı çalıştırılarak jel 1 saat boyunca 100 V'de yürütüldü.
11. Jeldeki DNA bantları 365 nm dalga boyunda bir UV transillüminatör kullanılarak görselleştirildi ve gözlemlenen bantları belgelemek için bir jel dokümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

3.5.3 DNA kalitesinin tespiti

DNA izole edildikten sonra, DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop spektrofotometresi ile ölçüldü. Nükleik asitlerin ve proteinlerin maksimum absorbansı 260 ve 280 nm'dir. Bu absorbans arasındaki oran, DNA ve proteinin saflığını ölçmek için kullanıldı. Nanodrop'un lensine 2 µL DNA yüklendi ve 260-280 nm dalga boyunda ölçüldü, sonuç nanodropa bağlı dizüstü bilgisayar ekranında görüntülendi, konsantrasyonlar 10 - 65 ng/µL ve saflıklar 1,7 - 1,9 arasında tespit edildi. Nanodrop lens, her numuneden sonra distile su ve pamuklu çubukla temizlendi, sonra diğer numuneler

ölçüldü. Mevcut çalışmadaki DNA'nın saflık ve konsantrasyon sonuçları Çizelge 3.4'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.4 Tüm gruplar için DNA konsantrasyonu ve saflığı

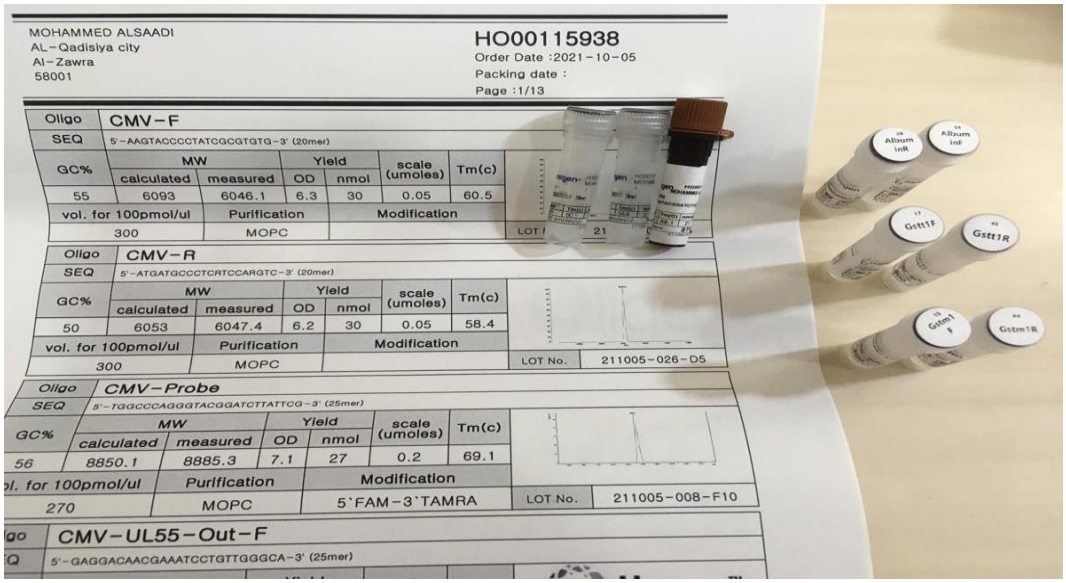
DNA	**Ortalama ± SD**
DNA konsantrasyonu (ng/mL)	49,7 ± 7,98
DNA saflığı	1,88 ± 0,05

3.5.4 Primerler

Primer, DNA sentezinin ilk parçası olarak işlev gören bir DNA parçasıdır ve DNA duplikasyonu için çok önemlidir çünkü duplikasyon, DNA zincirinde primerin başlangıç noktasına sadece yeni bir nükleotid eklenerek başlatılır, replikasyon primerin 3'-ucunda başlar ve zıt sarmal oluşturulur. DNA ve DNA polimerlerini kopyalamaktan sorumlu enzimler, DNA polimeraz bir tamamlayıcı sarmalda başlamadan önce primerin şablona bağlanmasını gerektiren mevcut DNA'nın sadece 3' ucuna nükleotidler ekleyebilirler. Bu çalışmada kullanılan primerler özel bir firmaya (Macrogen, Güney Kore) sentezlettirilmiş ve liyofilize halde alınmıştır. Liyofilize primerler, stok solüsyon ve çalışma solüsyonu elde etmek için sulandırılmıştır. Bu çalışmada araştırılan tüm genler için konvansiyonel multipleks PCR'da kullanılan primerlerin nükleotid dizileri Çizelge 3.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Konvansiyonel multipleks PCR'da kullanılan primerlere ait bilgiler (da Fonte de Amorim *et al.* 2002)

Primer/Gen Bölgesi	**Primer dizileri 5'----------3'**	**Uzunluğu (bp)**
GSTM1	F1- GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAGC	22
	R1- GTT GGG CTC AAA TAT AGG GTG G	22
GSTT1	F2- TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC	23
	R2-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA	20
Albumin (kontrol)	F3- GCC CTC TGC TAA CAA GTC CTA C	22
	R3- GCC CTA AAA AGA AAA TCG CCA ATC	24



Şekil 3.2 Macrogen (Kore) tarafından sentezlenmiş olan konvansiyonel ve Taqman Real Time PCR primerleri

Primerlerin hazırlanması: Primerlerin stok solüsyon süspansiyonu, her primerin üretici tarafından önerilen hacme göre PCR suyunda (Bioneer, Güney Kore) çözülmesiyle ve primer bileşenlerini çözmek için bir vorteks ile karıştırılarak, kısa süreli santrifüj edilmesiyle hazırlandı. Primerler reaksiyonda kullanılacak son konsantrasyonları için tekrar PCR su ile seyreltildi. Hepsi, Şekil 3.2'de görüldüğü üzere, üreticinin talimatlarına göre yüksek saflıkta su ile hazırlandı, alikotlandı ve -20 °C'de saklandı.

Primerlerin sulandırılması için aşağıdaki adımlar kullanılmıştır:

1. Liyofilize primerleri içeren tüp kapak açılmadan önce aşağı döndürüldü.
2. Primerler, 100 pmol/µL'lik bir nihai konsantrasyon (bir stok solüsyonu olarak) verecek şekilde PCR suyu içinde çözündürüldü.
3. Su içinde erittikten sonra, vorteksleyerek iyice karıştırıldı ve ardından her bir primerden bir (ana stok) elde etmek için 2 dakika santrifüjlendi.
4. 10 pmol/µL'lik nihai hacme ulaşmak için 90 µL su ile daha fazla seyreltmek üzere 10 µL ana stok primerden alındı. Bu çalışma solüsyonu PCR reaksiyonunda kullanıldı.
5. Stok ve çalışma solüsyonları, bir sonraki kullanıma kadar -20 °C'de saklandı.

3.5.5 Konvansiyonel multipleks PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bir DNA molekülünün seçilen bir bölümünü amplifiye etmek için DNA polimeraz I enziminin polimeraz aktivitesini kullanan bir tekniktir. Bilim insanlarının çok küçük bir DNA örneğini alıp PCR ile ayrıntılı olarak çalışmak için yeterince büyük bir miktara yükseltmesini sağlayan, belirli bir DNA örneğinin milyonlarca ila milyarlarca kopyasını hızla üretmek için moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Çok küçük miktarlardaki DNA dizilerinin kopyaları, bir dizi sıcaklık değişimi döngüsü sağlayan ısısal döngü cihazında (Şekil 3.3) büyük ölçüde amplifiye edilir.



Şekil 3.3 Isısal döngü cihazı (BioRad, ABD)

PCR, 3 adımlık döngülerden oluşmaktadır:

Denatürasyon: DNA zincirlerini ayırmak veya denatüre etmek için reaksiyon kuvvetlice ısıtılır. Bu, bir sonraki adım için tek sarmallı bir şablon sağlar.

Bağlanma: Primerlerin tek sarmallı şablon DNA üzerindeki tamamlayıcı dizilerine bağlanabilmesi için reaksiyon soğutulur. Yan bölgeleri tamamlayıcı primerler (~18 baz) daha sonra reaksiyon karışımının soğutulmasıyla ssDNA sarmallarına bağlanır.

Uzatma: Tepkime sıcaklıkları yükseltilir, böylece Taq polimeraz primerleri uzatır, DNA polimeraz, ana ssDNA sarmallarını bir şablon olarak kullanarak primerden başlayarak yeni DNA sarmallarını sentezler.

Bir PCR reaksiyonunun temel bileşenleri Taq polimeraz (yeni DNA sarmallarını polimerize eden bir enzim), primerler, şablon DNA ve nükleotidlerdir (DNA yapı taşları). Bileşenler, enzimin ihtiyaç duyduğu kofaktörlerle birlikte bir tüpte birleştirilir ve DNA'nın sentezlenmesine olanak veren tekrarlanan ısıtma ve soğutma döngülerinden geçirilir.

Bu çalışmada; 18 µL toplam PCR reaksiyon karışımını hazırlamak için Add TaqMaster kiti ana karışımı (AddBio, Kore), PCR suyu, 3 gen bölgesine (GSTM1, GSTT1 ve albumin) ait ileri (F) ve geri (R) primerler kullanıldı. Karışım tüplere dağıtıldıktan sonra üzerine 2 mikrolitre şablon DNA eklendi (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 PCR ana karışımın bileşenleri

Bileşen	**Hacim (µL)**
PCR suyu	2
Ana karışım	10
F1	1
R1	1
F2	1
R2	1
F3	1
R3	1
Şablon DNA	2

Örnekler ısı döngüleme cihazına (Şekil 3.3) (BIORAD, ABD) yerleştirilerek, Çizelge 3.7'de verilmiş olan termal koşullar uygulandı.

Çizelge 3.7 Konvansiyonel multipleks PCR termal koşulları

PCR adımı	Isı	Süre	Tekrar
İlk denatürasyon	95 °C	5 dk	1
Denatürasyon	95 °C	40 sn	35 döngü
Bağlanma	61°C	60 sn	
Uzatma	72 °C	1 dk	
Nihai uzatma	72 °C	5 dk	1
Tutma	4 °C	3 dk	-

3.5.6 Taqman kantitatif gerçek zamanlı PCR (Taqman qPCR)

Oksidatif stresle ilgili genler için incelenen tüm DNA örnekleri ayrıca HCMV enfeksiyonlarının varlığı için test edildi. Bu, daha önce (Jebbink *et al.* 2003) tarafından tasarlanan ve virüsün teşhisinde oldukça spesifik, hassas, kısa sürede sonuç veren Taqman qPCR kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.4) (Çizelge 3.8, Çizelge 3.9, Çizelge 3.10).



Şekil 3.4 qPCR makinesi (Applied Biosystem, ABD)

A. Taqman qPCR primerleri ve test çubukları

Çizelge 3.8 CMV tespiti için kullanılan primer ve prob dizileri (Jebbink *et al.* 2003)

Adı	5'------3'
CMV-F	AAGTACCCCTATCGCGTGTG
CMV-R	ATGATGCCCTCRTCCARGTC
CMV-Test çubuğu	Fam' TGGCCCAGGGTACGGATCTTATT CG BHQ-1

B. Taqman qPCR bileşenleri

Çizelge 3.9 Toplam hacim 20 µL Taqman qPCR reaksiyonunun bileşenleri

Bileşen	Hacim (µL)
H_2O	5
Taqman ana karışım	10
F	1
R	1
Test çubuğu	1
Şablon DNA	2

C. Taqman qPCR termal koşulları

Çizelge 3.10 Taqman qPCR testinin termal koşulları

PCR adımı	Isı	Süre	Tekrar
İlk denatürasyon	95 °C	10 dk	1
Denatürasyon	95 °C	40 sn	40 döngü
Bağlanma ve plaka okuma	60°C	60 sn	
Nihai uzatma ve plaka okuma	72 °C	5 dk	1

3.5.7 Jel Dokümantasyonu

UV transillüminatör cihazı, konvansiyonel multipleks PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinin görüntülenmesi için kullanıldı. Agaroz jel, jel dokümantasyon sistemine

yerleştirildi, UV ışığına maruz bırakıldı, ekranda görüntülendi ve fotoğraflar dijital kamera kullanılarak çekildi. UV transillüminatör cihazı Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5 DNA bantlarını içeren agaroz jellerin görüntülenmesi için jel dokümantasyon sistemi

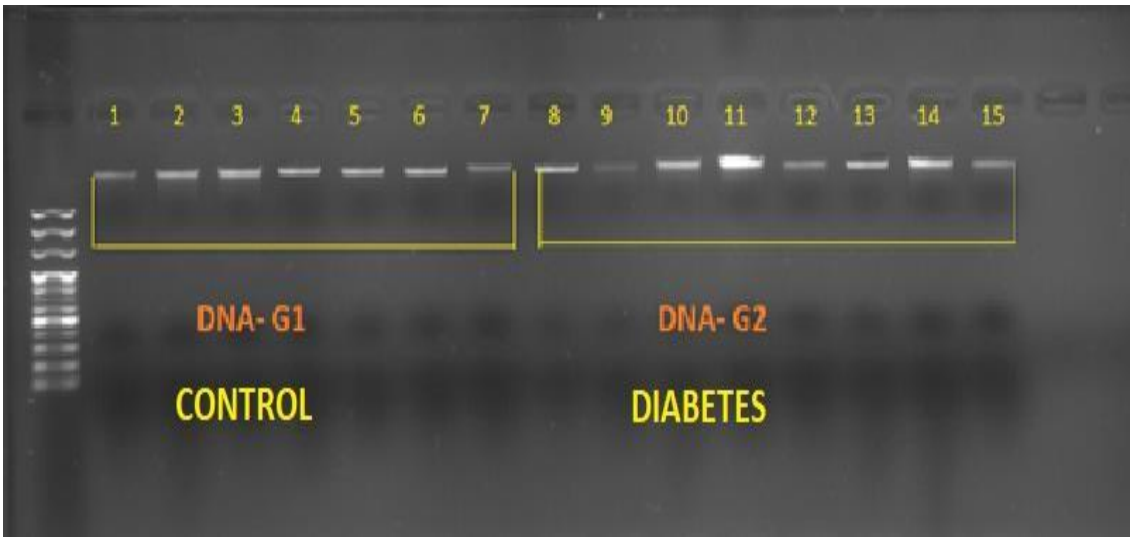
3.6 İstatistiksel Analiz

Dört grubun alel frekansları ve genotip dağılımları arasındaki istatistiksel analiz, tanımlayıcı istatistiklerle (P-değeri < 0,05) doğrulandı. Bu çalışmanın sonuçları ortalama ±SD veya yüzde olarak sunuldu. SPSS program sürüm 23 yazılımı (SPSS Inc. Chicago, IL, ABD) kullanılarak iki sayısal değişken grubu arasındaki ortalamalardaki farklılıkları belirlemek için t-testi kullanıldı. Çalışılan gruplarda, hastalar ve kontroller arasındaki genotip ve alel frekanslarını değerlendirmek için Ki-kare ($\chi 2$ değerleri) testi uygulandı. Her grupta genotip ve alel dağılımları belirlendi ve %95 güven aralığı (%95 GA) ile olasılık oranları (OR) hesaplandı. <0,05 olan bir p değeri, %95'lik bir güven aralığında (CI) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Kandan Genomik DNA Ekstraksiyonu

Sağlıklı kontrol grubu ve şeker hastaları olmak üzere iki gruptan ekstrakte edilen DNA'lar; elektroforez ile agaroz jelde yürütüldü ve yüksek verimli bant elde edildi. Bu aşamadan sonra DNA'lar Glutatyon S-transferaz geni için multipleks PCR ve HCMV tespiti için Taqman qPCR ile test edildi (Şekil 4.1).



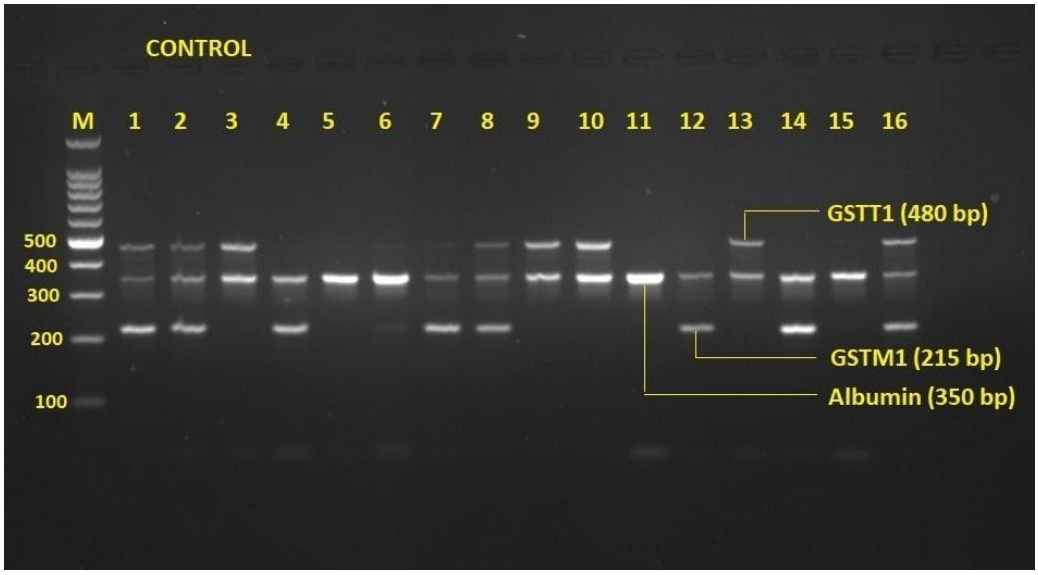
Şekil 4.1 DNA ekstraksiyonu sonrasında ürünlerin agaroz jel (%2 agaroz) elektroforez görüntüsü

4.2 Glutatyon S-Transferaz Geninin Amplifikasyonu

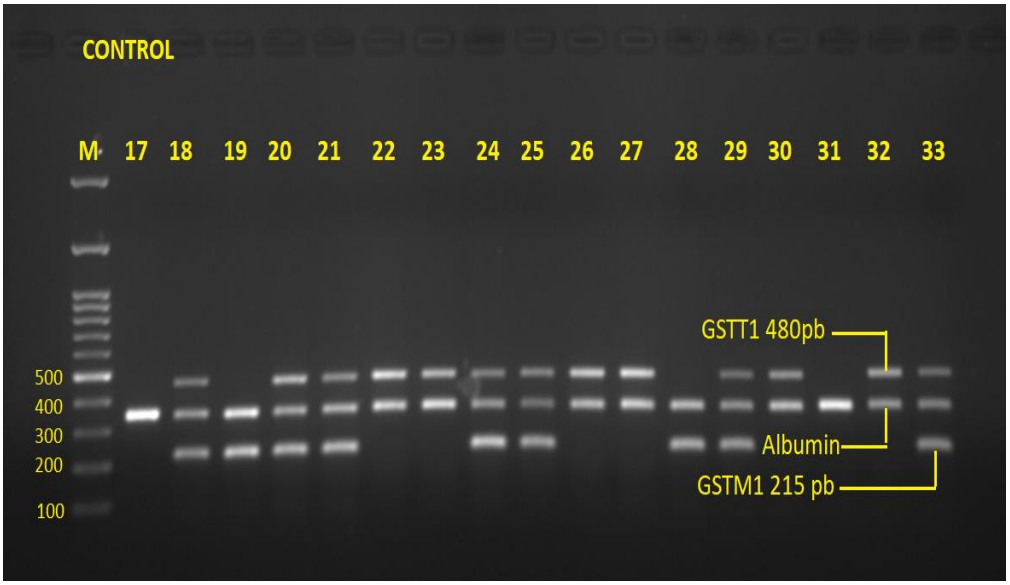
Temel olarak bu genin amplifikasyonu, GSTM1 ve GSTT1'in varlığına veya gende şekillenmiş bir silinmeye bağlıdır. Ayrıca, Albumin geni bir dahili kontrol (housekeeping geni) olarak bütün PCR işlemlerinde amplifiye edilmiştir. Bu amaçla bir multipleks konvansiyonel PCR protokolü kullanılmıştır ve ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.2-Şekil 4.9 arası verimli PCR protokolünü göstermektedir.

Moleküler boyutta GSTT1 amplikonları 480 bp'de, GSTM1 amplikonları ise 215 bp'de görünmüştür. Her durumda, Albumin geni (iç kontrol) 350 bp'de sergilenmiş ve bu durum bu üç gen için çok etkili bir multipleks konvansiyonel PCR protokolünü ve etkili DNA ekstraksiyonunu göstermektedir. Önemli bir şekilde, bazı durumlarda kontrol (G1) ve diyabetik (G2) gruplarının bazılarında bir veya iki genin silindiği, bazılarında ise her ikisinin veya birinin bulunduğu fark edilmiştir. Bunlar istatistiksel olarak boş gen durumu olarak analiz edilmiş ve amplifiye genleri sergileyenlerle karşılaştırılmıştır.

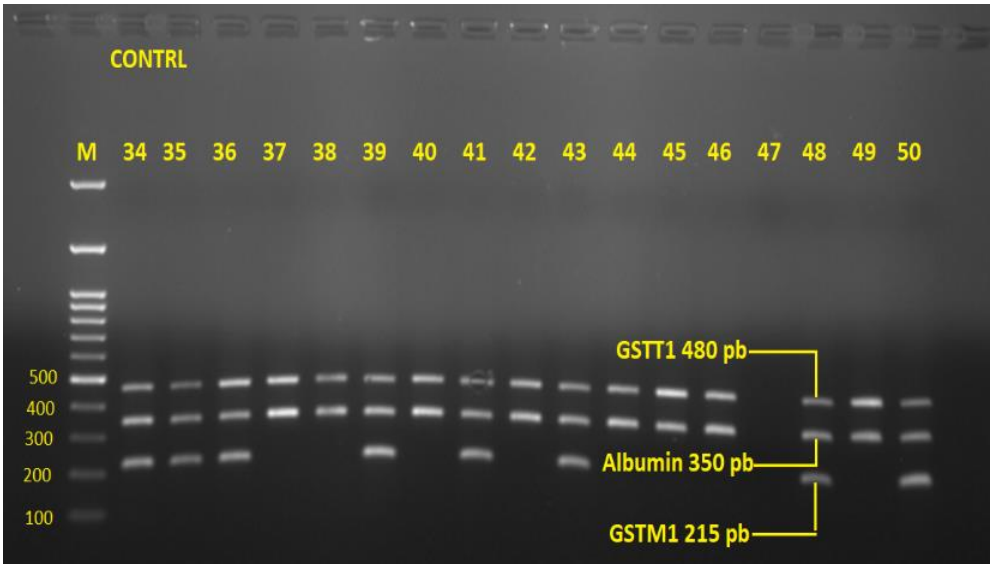
Şekil 4.2'de görülebileceği gibi, sağlıklı kontrol grubunda 1, 2, 6, 7, 8 ve 16 numaralı numunelerde hem GSTT1 hem de GSTM1 varlığı görülürken 3, 9, 10 ve 13 numaralı numunelerde GSTT1 genotipi görülürken GSTM1 genotipinin silindiği belirlenmiştir. 4, 12 ve 14 numaralı numunelerde ise GSTM1 genotipinin varlığı ve GSTT1 genotipinin silindiği belirlenmiştir. 5, 11 ve 15 numaralı numunelerde olduğu gibi bazı numunelerde, hem GSTT1 hem de GSTM1'in silinmesi anlamına gelen yalnızca dahili kontrolün (Albumin geni= 350 bp) amplifiye edildiği görülmektedir. Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de diğer bazı kontrol grubu örneklerinin sonuçları gösterilmiştir.



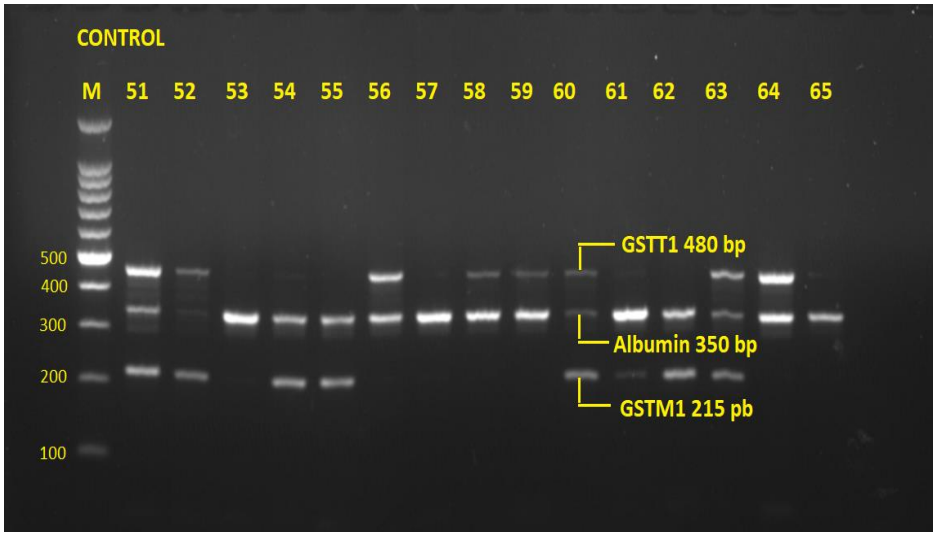
Şekil 4.2 Test edilen sağlıklı gruba ait numunelerdeki (1-16) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel elektroforez (%2) görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)



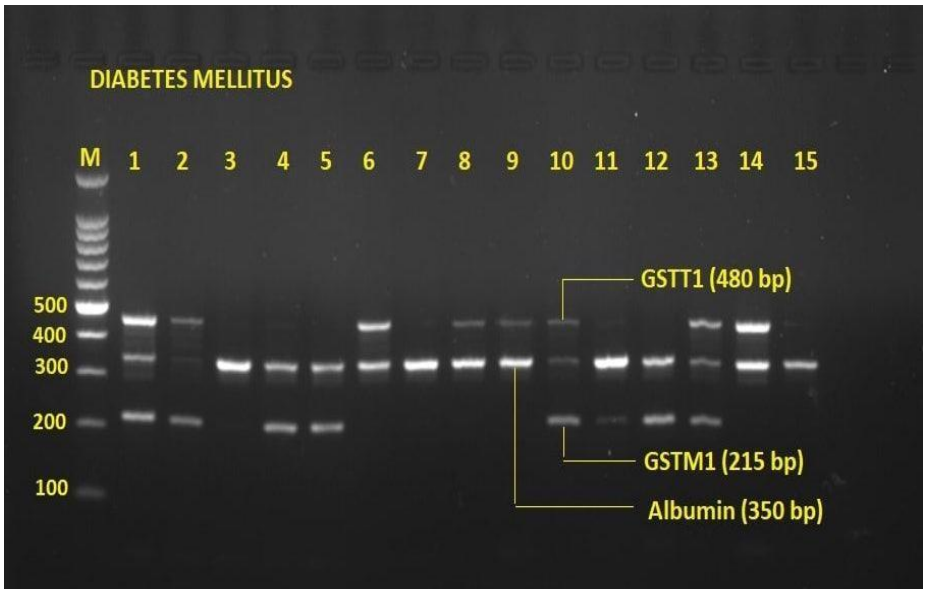
Şekil 4.3 Test edilen sağlıklı gruba ait numunelerdeki (17-33) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel elektroforez (%2) görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)



Şekil 4.4 Test edilen sağlıklı gruba ait numunelerdeki (34-50) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel elektroforez (%2) görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)



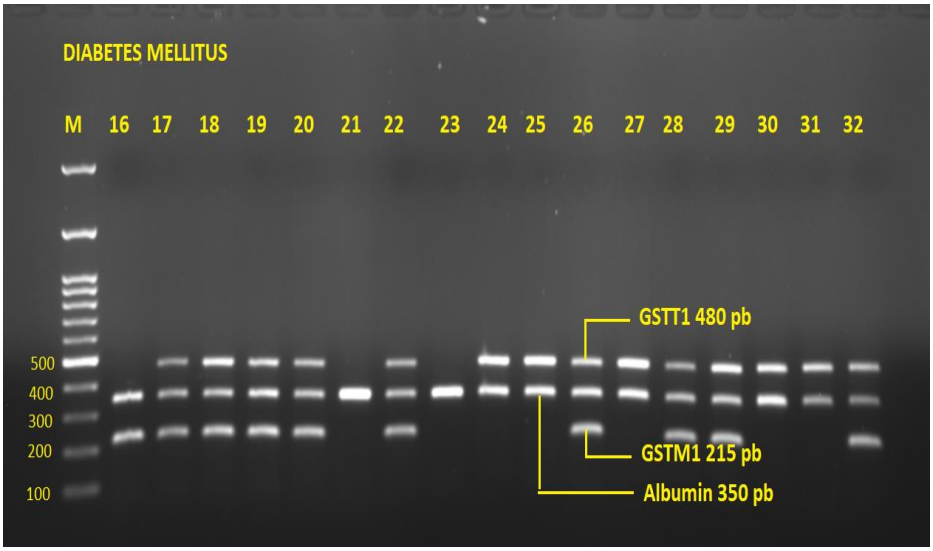
Şekil 4.5 Test edilen sağlıklı gruba ait numunelerdeki (51-65) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel elektroforez (%2) görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)



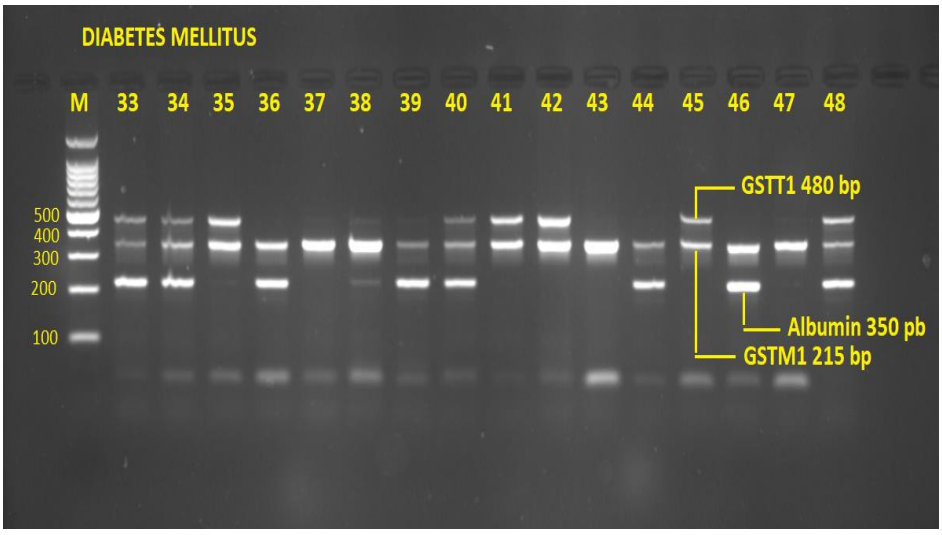
Şekil 4.6 Test edilen diabetik hasta grubuna ait numunelerdeki (1-15) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)

Şekil 4.6'da görülebileceği gibi, Diabetes Mellitus hasta grubunda 1, 2, 10 ve 13 numaralı numunelerde hem GSTT1 hem de GSTM1 amplifiye edilmişken, 6, 8, 9 ve 14 numaralı numunelerde GSTT1 genotipi amplifiye edilmiş ve GSTM1 genotipinin silindiği belirlenmiştir. 4, 5, 11 ve 12 numaralı numunelerde ise GSTM1 genotipi amplifiye

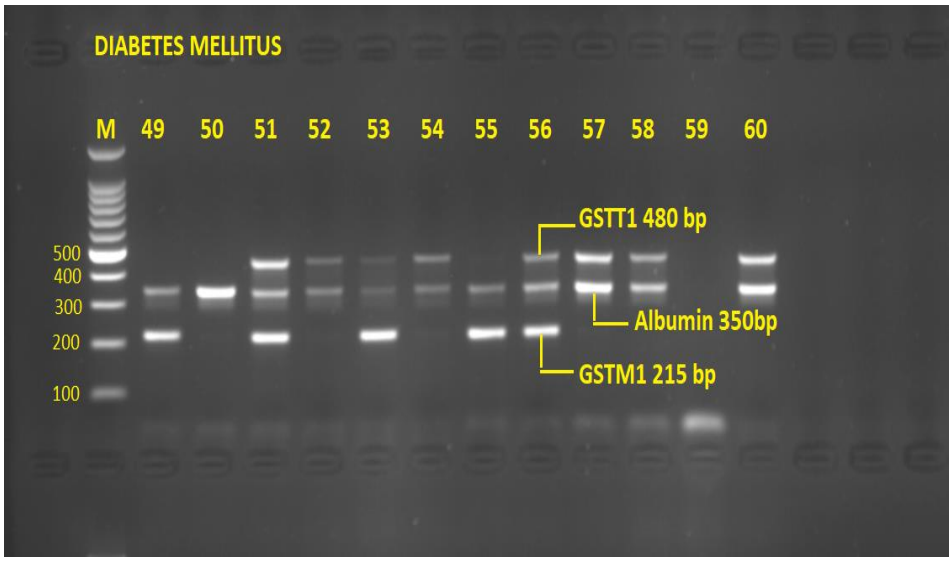
edilmiş ve GSTT1 genotipinin silindiği belirlenmiştir. Önemli olarak, 3, 7 ve 15 numaralarda olduğu gibi bazı numuneler için, hem GSTT1 hem de GSTM1'in silinmesi anlamına gelen yalnızca dahili kontrolün (Albumin geni= 350 bp) amplifiye edildiği belirlenmiştir. Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da diğer bazı diabetik hasta grubu örneklerinin sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Test edilen diabetik hasta grubuna ait numunelerdeki (16-32) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)



Şekil 4.8 Test edilen diabetik hasta grubuna ait numunelerdeki (33-48) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)



Şekil 4.8 Test edilen diabetik hasta grubuna ait numunelerdeki (49-60) GSTT1 ve GSTM1 genlerinin genotiplerini gösteren agaroz jel (%2) elektroforez görüntüsü (M; moleküler işaretleyici)

4.3 Glutatyon S-Transferaz Genotiplerinin Kontrol (G1) ve Diabetik (G2) Gruplardaki Oranları

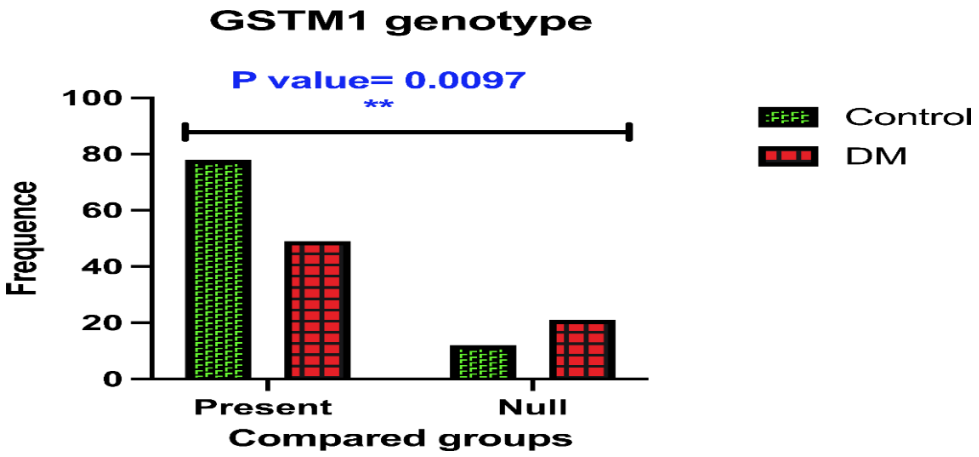
4.3.1 GSTM1'in kontrol (G1) ve diabetik (G2) gruplardaki frekansları

Sonuç olarak, Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi, G1 grubundaki (n=90) GSTM1- boş oranı, G2'deki %30'a kıyasla %13,3 olmuştur. Bu istatistiksel olarak anlamlı olmuştur (P değeri= 0.01*). Ancak bu genin G1 ve G2'de sırasıyla %86,6 ve %70 olması durumunda oran önemli olmamıştır.

Çizelge 4.1 G1 (kontrol) ve G2 (Diabetes Mellitus) gruplarında GSTM1 genotiplerinin dağılımı

Polimorfizmler	**G1 Kontrol N=90(%)**	**G2 Hastalar N=70(%)**	**OR (%95 cl)**	**P değeri**
GSTM1 Mevcut Boş	78 (%86,6) 12 (%13,3)	49 (%70) 21 (%30)	1,0 ref (1,0 ref) 0,359 (0,162 - 0,794)	0,01*

Bu sonuçlar Şekil 4.10'da gösterilmektedir; bu, kontrol grubu içindeki mevcut genlerin oranının DM'dekilerden daha yüksek olduğunu gösterirken, boş genotip, DM grubu ile karşılaştırıldığında kontrolde daha düşük olmuştur.



Şekil 4.10 Kontrol ve Diabetes Mellitus gruplarında GSTM1 genotipinin oranını gösteren istatistiksel grafik

4.3.2 GSTT1'in kontrol (G1) ve diabetik (G2) gruplardaki frekansları

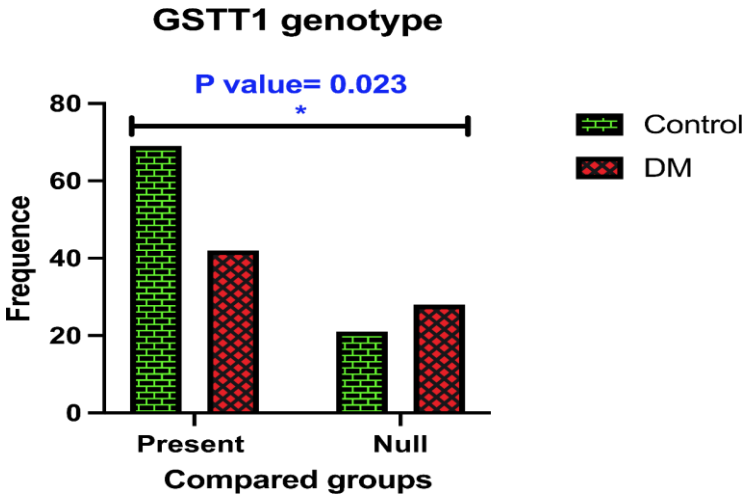
Kontrol grubunda (G1) gözlemlenen GSTT1-boş frekansları %23,3 olmuş ve bu G2'dekilerden (%40) önemli ölçüde daha düşük çıkmıştır (P-değeri = 0,023*). G1'de %76,6 ve G2'de %60 GSTT1'in varlığı ise önemsiz görünmüştür (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 G1 (kontrol) ve G2 (Diabetes Mellitus) gruplarında GSTT1 genotiplerinin dağılımı

Polimorfizmler	**G1 Kontrol N=90(%)**	**G2 Hastalar N=70(%)**	**OR (%95 cl)**	**P değeri**
GSTT1 Mevcut Boş	69 (%76,6) 21 (%23,3)	42 (%60) 28 (%40)	1,0 ref (1,0 ref) 0,457 (0,230-0,904)	0,023*

Şekil 4.11'de gösterildiği gibi GSTT1 testinin sonuç verileri; kontrol grubu içindeki mevcut genin oranının DM'dekilerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu ancak

anlamlı olmadığı, boş genotipte ise DM grubu ile karşılaştırıldığında kontrolde hala daha düşük olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.11 Kontrol ve Diabetes Mellitus gruplarında GSTT1 genotipinin oranını gösteren istatistiksel grafik

4.4 HCMV Enfeksiyonunun Kontrol (G1) ve Diabetik (G2) Gruplardaki Oranı

4.4.1 HCMV ile GSTM1

4.4.1.1 Kontrol grubundaki HCMV yüzdesi

Kontrol grubunda tespit edilen HCMV, 12 üzerinden 8 olmuş, yani HCMV enfeksiyonu yüzdesi %66,67 bulunmuştur (Çizelge 4.3).

4.4.1.2 DM grubundaki HCMV yüzdesi

Hastalarda tespit edilen HCMV, 21 hastada 15, dolayısıyla HCMV enfeksiyon yüzdesi %71,42 bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 GSTM1 genotipinin varlığı ve yokluğu durumlarında toplam HCMV enfeksiyonu

	HCMV enfeksiyonu	
	Kontrol (G1) (n= 12)	**DM (G2) (n= 21)**
Toplam	8 (%66,67)	15 (%71,42)

4.4.2 HCMV ile GSTT1

4.4.2.1 Kontrol grubundaki HCMV yüzdesi

Kontrol grubunda tespit edilen HCMV, 21 üzerinden 10 yani HCMV enfeksiyonu yüzdesi %47,6 bulunmuştur (Çizelge 4.4).

4.4.2.2 DM grubundaki HCMV yüzdesi

Hastalarda tespit edilen HCMV, 28 hastada 6, dolayısıyla HCMV enfeksiyon yüzdesi %21,42 bulunmuştur (Çizelge 4.4).

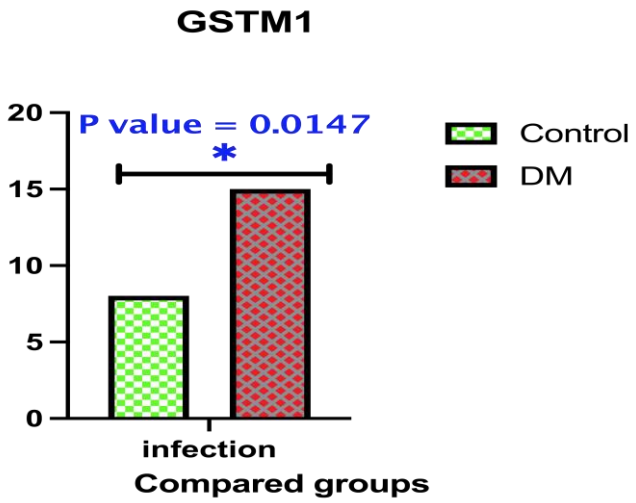
Çizelge 4.4 GSTT1 genotipinin varlığı ve yokluğu durumlarında toplam HCMV enfeksiyonu

	HCMV enfeksiyonu	
	Kontrol (G1) (n= 21)	**DM (G2) (n= 28)**
Toplam	10 (%47,6)	6 (%21.42)

4.5 İstatistiksel Analiz

4.5.1 HCMV enfeksiyonunun GSTM1 genotipinde oranı

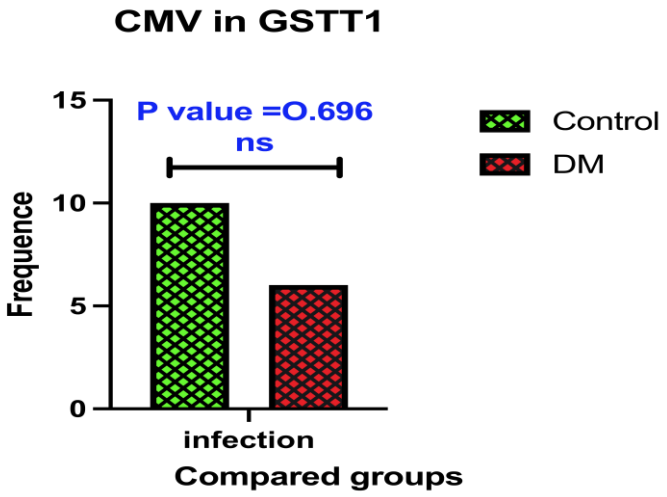
Kontrol ve Diabetes Mellitus içindeki GSTM1 genotiplerinde HCMV enfeksiyon oranının Ki-kare analizi ile yapılmış karşılaştırmasının istatistiksel grafiği Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12 Kontrol ve Diabetes Mellitus içindeki GSTM1 genotiplerinde HCMV enfeksiyon oranının karşılaştırmasının istatistiksel grafiği

4.5.2 HCMV enfeksiyonunun GSTT1 genotipinde oranı

Kontrol ve Diabetes Mellitus içindeki GSTT1 genotiplerinde HCMV enfeksiyon oranının Ki-kare analizi ile yapılmış karşılaştırmasının istatistiksel grafiği Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13 Kontrol ve Diabetes Mellitus içindeki GSTT1 genotiplerinde HCMV enfeksiyon oranlarının karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Diabetes Mellituslu hastalarda HCMV enfeksiyonu araştırılmıştır. Bu hastalar ayrıca stres faktörü ile ilişkili genlerde (GSTM1 ve GSTT1 dahil Glutatyon S-transferaz) genetik polimorfizm yönünden test edilmiştir. Çalışma hipotezi olarak HCMV oluşumu ile stres faktörü ile mücadele eden genlerde mutasyona sahip hastalar arasında doğrudan bir ilişki olduğu öne sürülmüştür. Bu amaçla 70 Tip 2 diabet hastası (30-45 yaş arası) ve 90 sağlıklı birey (sağlık sorunu olmayan, 30-45 yaş arası) karşılaştırmalı kontrol grubu olarak incelenmiştir.

Başlangıçta, hedef doku anlamında kana bağlı olarak bir DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak tüm numunelerden (hastalar ve kontrol) genomik DNA ekstrakte edilmiştir, çünkü beklenen şekilde HCMV, latent bir enfeksiyon olarak uzun süre hayatta kalan beyaz kan hücrelerini enfekte etmektedir. Ekstrakte edilen tüm DNA, agaroz jel elektroforezi ile yüksek oranda saflaştırılmış DNA'nın mevcudiyeti için kontrol edilmiştir (Şekil 4.1).

GSTT1 ve GSTM1 genleri hem kontrol hem de hasta gruplarında multipleks PCR ile başarılı bir şekilde amplifiye edilmiştir (Şekil 4.2-Şekil 4.9 arası). GSTT1 ve GSTM1'in amplikon boyutları sırasıyla 480 bp ve 215 bp olmuştur. Her iki gen, testin duyarlılığını göstermek için dahili kontrol geni (Albumin= 350 bp) ile aynı PCR reaksiyonunda amplifiye edilmiştir. Genetik polimorfizmlerin belirlenmesi, belirli bir genin silinmesi veya varlığının gözlemlenmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar, GSTM1 genindeki boş polimorfizmlerin %13,3 olduğunu, kontrol grubu (G1) içinde ise genotip varlığının %86,6 olduğunu ortaya koymuştur. Öte yandan, hastalarda (G2), elde edilen sonuçlar genotip varlığında %70, boş genotip varlığında ise %30 olmuştur. İstatistiksel analiz, diyabet ve GSTM1 arasındaki ilişkinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olduğunu (P değeri= 0,01*) ortaya koymuştur. Boş GSTM1 oranı kontrolden daha yüksek olmuştur (sırasıyla %30 ve %13,3). Diyabetik hastalarda oksidatif stres (ROS) artışına bağlı olarak hastalarda GSTM1'in boş genotiplenmesinin artmasının ana nedeni, bu ilişkiyi açıklayan (Stephens *et al.* 2009)'a göre, oksidatif stres

muhtemelen çok sayıda oksidatif stres faktörü üretir ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) bu kategorideki ana tip olduğu ve bunun Tip 2 DM'nin patogenezinin gelişimi üzerinde doğrudan etkisi olduğudur. Bu durum, enzimatik antioksidanların seviyesinin azalması nedeniyle beta hücrelerinin reaktif oksijene daha duyarlı olması ve glutatyon peroksidazın önemli bir enzim olması ile açıklanabilir (Telci vd. 2000). Dolayısıyla ROS'un birçok patolojik komplikasyonu vardır; bunlardan biri, insülin direncine veya Tip 2 DM gelişimine yol açan beta hücrelerinin hasarıdır.

Glutatyon S-transferaz (GST), hücre zarlarının oksidatif hasarından kaynaklanan yıkıcı faktörlerle mücadelede koruyucu bir ajan olarak görev yapan önemli bir antioksidan enzimdir. Kelimenin tam anlamıyla, GST genotipindeki herhangi bir genetik polimorfizm, muhtemelen Tip 2 DM'ye duyarlılığı artıran detoksifikasyonun etkisinde bir azalmaya yol açmakta ve bu durum diğer patolojik enfeksiyonlara neden olabilmektedir.

Diabetes Mellitus insidansı GST mutasyonları ile ilişkilidir; sonuçlarımız, GSTM1'deki mutasyonun Tip 2 DM içinde daha yüksek dereceli olduğunu bulmuştur ve bu sonuç, (Hori *et al.* 2007, Wang *et al.* 2006) gibi birçok araştırmacı ile hemfikirdir.

Elde edilen sonuçlar, GSTM1'de hastalarda kontrolden (%13,3) daha yüksek boş frekanslar (%30) göstermiştir. Bu sonuç daha önce Hindistan'da (Raza *et al.* 2014) tarafından onaylanmıştır.

Mısır'da Tip 2 DM oluşumu ile GSTM1'deki boş genotipler arasında yakın bir ilişki bulan benzer sonuçlar gösterilmiş ve kontrol grubuna kıyasla Tip 2 DM oluşumunda üç kattan fazla artış olduğu sonucuna varılmıştır (Amer *et al.* 2011).

Çin'de benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır, çünkü GSTT1-boş genotipi kontrol grubundakilere (%51) kıyasla hastalarda daha yüksek oranda (%61) gözlemlenmiştir. GSTT1 genotipinin silinmesinin Tip 2 DM riskini arttırdığını kanıtlamıştır (Wang *et al.*

2006). Başka araştırmacılar da, GSTM1 silinmesinin Tip 2 DM insidansı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Datta *et al.* 2010, Raza *et al.* 2014).

Sonuçlarımız, GSTT1 genindeki mevcut genotipin %76,6 olduğunu, kontrol grubu (G1) içinde boş genotipin % 23,3 olduğunu, hastalarda (G2) ise, elde edilen sonuçların mevcut genotipinde % 60 ve boş genotipte % 40 olduğunu göstermiştir.

İstatistiksel analiz, diyabet ve GSTT1 arasındaki ilişkinin sağlıklı grupla karşılaştırıldığında anlamlı olduğunu (P değeri= 0,023*) göstermiştir. Boş GSTT1 oranı kontrol grubundakinden daha yüksek olmuştur (sırasıyla %40 ve %23,3). GSTT1'in boş genotiplemesinin artmasının nedenine bağlı olarak, diyabetik hastalar, hücrelerin içinde en aza indirilmiş bağışıklığa yol açan serbest radikaller üreten oksidatif stresten muzdariptir (Stephens *et al.* 2009, Telci vd. 2000).

Geriye dönük olarak, GSTM1 ve GSTT1 için P değerinin sırasıyla anlamlı (0,01 ve 0,023) olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum hastalarda bu enzimatik antioksidan ile Diabetes Mellitus arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir. Ayrıca, GSTM1 ve GSTT1 için (OR, %95 Cl) istatistiksel değeri sırasıyla (0,359, 0,162 -0,794) ve (0,457, 0,230-0,904) olmuştur (Çizelge 4.1 ve 4.2).

Mevcut sonuçlar ayrıca, GSTM1-boş genotipin, GSTM1'de bulunan genotip (G2'de G1'e kıyasla) ile bağlantılı Tip 2 DM riskinde 2,5 katlık bir artışa sebep olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde, GSTT1-boş genotip, mevcut genotipe göre Tip 2 DM riskinde 1,8 katlık bir artış sağlamıştır.

Sonuçlarımız, Irak'ta GSTM1 ve GSTT1 gen polimorfizmi ile Tip 2 DM riski ($P<0,05$) arasında anlamlı bir ilişkiye atıfta bulunan Irak'ta yapılan önceki bir çalışmanın bulgularıyla uyumludur (Al-Barqaawee and Al- Nahi 2018, Datta *et al.* 2010).

Halihazırda çalışılan genler (GSTM1 ve GSTT1), Tip 2 DM'nin ilerlemesinde ve patogenezinde çok önemli bir role sahiptir ve Tip 2 DM 'nin duyarlılığını göstermek için

bir genetik belirteç olarak kullanılabilir. Her iki belirtecin boş genotipi, kan şekeri ve vasküler disfonksiyon üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Bu arada, diğer stresli koşullar, HCMV gibi diğer enfeksiyonların olasılığını artırabilir.

Elde edilen verilere, kontrol ve DM gruplarındaki genetik polimorfizmlere göre, bu vakaların stresli koşullara sahip olduğunu, yani onları HCMV enfeksiyonuna duyarlı hale getiren immün downregülasyondan muzdarip olduklarını varsaydık.

Beklendiği gibi, sonuçlarımız her iki genotip polimorfizmlerinde kontrol ve DM gruplarında çok sayıda HCMV enfeksiyonu vakası olduğunu göstermiştir.

GSTM1'de kontrol grubunda 12'de 8'inde HCMV enfeksiyonu varken, p değerinin anlamlı olduğu DM'de vakalar 21'te 15 (= 0,0147) olmuştur. Bu sonuçlar, HCMV prevalansının hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu durum DM vakalarında bağışıklığın azalmasının HCMV enfeksiyonuna yatkınlığın artmasına yol açması ile açıklanabilir. Öte yandan GSTT1 anlamlı çıkmamıştır. Kontrol grubunda HCMV enfeksiyonu saptanmış ve 21'de 10 olarak gösterilmiştir p değerinin anlamlı olmadığı (= 0,696) DM'de vakalar 28'te 6 olmuştur.

KAYNAKLAR

Al-Barqaawee, M. J. and Al-Nahi, A. S. 2018. Association of glutathione S transferase (GSTM1 and GSTT1) genetic polymorphism and type 2 diabetes Mellitus. J. Pharm. Sci. Res., 10: 1959–1962.

Alwine, J. C. 2012. The Human Cytomegalovirus Assembly Compartment: A Masterpiece of Viral Manipulation of Cellular Processes That Facilitates Assembly and Egress. PLoS Pathog., 8: 1–4.

Amer, M. A., Ghattas, M. H., Abo-ElMatty, D. M., Abou-El-Ela and S. H. 2011. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes Mellitus risk. Genet. Mol. Res., 10: 3722–3730.

Aslam, Y., Williamson, J., Romashova, V., Elder, E., Krishna, B., Wills, M., Lehner, P., Sinclair, J. and Poole, E. 2019. Human Cytomegalovirus Upregulates Expression of HCLS1 Resulting in Increased Cell Motility and Transendothelial Migration during Latency. iScience, 20: 60–72.

Baynest, H. W. 2015. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. J. Diabetes Metab., 06: 541.

Bergman, M., 2013. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes Mellitus. Endocrine, 43: 504–513.

Biolatti, M., Gugliesi, F., Dell'Oste, V. and Landolfo, S. 2018. Modulation of the innate immune response by human cytomegalovirus. Infect. Genet. Evol., 64: 105–114.

Brune, W. and Andoniou, C. 2017. Die Another Day: Inhibition of Cell Death Pathways by Cytomegalovirus. Viruses, 9: 249.

Chuleerarux, N., Nematollahi, S., Thongkam, A., Dioverti, M. V., Manothummetha, K., Torvorapanit, P., Langsiri, N., Worasilchai, N., Plongla, R., Chindamporn, A., Sanguankeo, A. and Permpalung, N. 2021. The association of cytomegalovirus infection and cytomegalovirus serostatus with invasive fungal infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. Clin. Microbiol. Infect., 56: 108–109.

Ciotti, M., Cella, E., Rittà, M., Ciccozzi, M., Cavallo, R., Perno, C.F. and Costa, C. 2018. Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype Distribution in Italian Transplant Patients. Intervirology, 60: 165– 170.

Colugnati, F. A. B., Staras, S. A. S., Dollard, S. C. and Cannon, M. J. 2007. Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States. BMC Infect., 7:71.

Da Fonte de Amorim, L. M., Rossini, A., Mendonça, G. A. S., Lotsch, P. F., de Almeida Simão, T., de Moura Gallo, C. V. and Pinto, L. F. R., 2002. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. Cancer Lett., 181: 179–186.

Datta, S. K., Kumar, V., Pathak, R., Tripathi, A. K., Ahmed, R. S., Kalra, O. P. and Banerjee, B. D., 2010. Association of glutathione S - transferase M1 and T1 gene polymorphism with oxidative stress in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease. Ren. Fail., 32: 1189–1195.

Davison, A. J. 2010a. Herpesvirus systematics. Vet. Microbiol., 143: 52–69.

Davison, A. J. 2010b. Herpesvirus systematics. Vet. Microbiol., 143: 52–69.

Devi, P., Khan, A., Chattopadhyay, P., Mehta, P., Sahni, S., Sharma, S. and Pandey, R. 2021. Co-infections as Modulators of Disease Outcome: Minor Players or Major Players? Front., Microbiol., 12: 1–13.

Diaz-Valencia, P. A., Bougnères, P. and Valleron, A. -J. 2015. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. BMC Public Health, 15: 255.

Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A.F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D. J., McGeoch, D. J., Gatherer, D., Emery, V. C., Griffiths, P. D., Sinzger, C., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W. G. and Davison, A. J. 2004. Genetic content of wild type human cytomegalovirus. J. Gen. Virol., 85: 1301–1312.

Drazilova, S., Gazda, J., Janicko, M. and Jarcuska, P. 2018. Chronic Hepatitis C Association with Diabetes Mellitus and Cardiovascular Risk in the Era of DAA Therapy. Can. J. Gastroenterol. Hepatol., 2018: 1–11.

Duarte, A. M., Guarino, M. P., Barroso, S. and Gil, M. M. 2020. Phytopharmacological Strategies in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. Foods, 9: 271.

Dworzański, J., Drop, B., Kliszczewska, E., Strycharz-Dudziak, M. and Polz-Dacewicz, M. 2019. Prevalence of Epstein-Barr virus, human papillomavirus, cytomegalovirus and herpes simplex virus type 1 in patients with diabetes Mellitus type 2 in south-eastern Poland. PLoS One, 14: e0222607.

Ekman, I., Vuorinen, T., Knip, M., Veijola, R., Toppari, J., Hyöty, H., Kinnunen, T., Ilonen, J. and Lempainen, J. 2019. Early childhood CMV infection may decelerate the progression to clinical type 1 diabetes. Pediatr. Diabetes, 20: 73–77.

Elhawary, E. I., Mahmoud, G. F., El-Daly, M. A., Mekky, F. A., Esmat, G. G. and Abdel-hamid, M. 2011. Association of HCV with diabetes Mellitus: an Egyptian case-control study. Virol. J., 8: 367.

Eltayib, H. A.-A., Mudathir, A. A., Mohamed, A. A. -H. and Ayman, A. 2014. Associations of cytomegalovirus with type I diabetes Mellitus among children in Khartoum State. African J. Microbiol. Res., 8: 1730–1734.

Firth, C., Harrison, R., Ritchie, S., Wardlaw, J., Ferro, C. J., Starr, J. M., Deary, I. J. and Moss, P. 2016. Cytomegalovirus infection is associated with an increase in systolic blood pressure in older individuals. QJM, 109: 595–600.

Gorogawa, S., Kajimoto, Y., Umayahara, Y., Kaneto, H., Watada, H., Kuroda, A., Kawamori, D., Yasuda, T., Matsuhisa, M., Yamasaki, Y. and Hori, M. 2002. Probucol preserves pancreatic β-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes. Diabetes Res. Clin. Pract., 57: 1–10.

Griffin, B. D., Verweij, M. C. and Wiertz, E. J. H. J. 2010. Herpesviruses and immunity: The art of evasion. Vet. Microbiol., 143: 89–100.

Griffiths, P. 2020. The direct and indirect consequences of cytomegalovirus infection and potential benefits of vaccination. Antiviral Res., 176: 104732.

Griffiths, P. and Reeves, M. 2021.Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host. Nat. Rev. Microbiol., 19: 759–773.

Harries, L. 1997. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S- transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. Carcinogenesis, 18: 641–644.

Harrison, T. A., Hindorff, L. A., Kim, H., Wines, R. C. M., Bowen, D. J., McGrath, B. B. and Edwards, K. L. 2003. Family history of diabetes as a potential public health tool. Am. J. Prev. Med., 24: 152–159.

Hori, M., Oniki, K., Ueda, K., Goto, S., Mihara, S., Marubayashi, T. and Nakagawa, K. 2007. Combined glutathione S - transferase T1 and M1 positive genotypes afford protection against Type 2 diabetes in Japanese. Pharmacogenomics, 8: 1307–1314.

Jebbink, J., Bai, X., Rogers, B. B., Dawson, D. B., Scheuermann, R. H. and Domiati-Saad, R. 2003. Development of Real-Time PCR Assays for the Quantitative Detection of Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus, Comparison of TaqMan Probes, and Molecular Beacons. J. Mol. Diagnostics, 5: 15–20.

Jennings, A., Welch, A. A., Spector, T., Macgregor, A. and Cassidy, A. 2014. Intakes of Anthocyanins and Flavones Are Associated with Biomarkers of Insulin Resistance and Inflammation in Women. J. Nutr., 144: 202–208.

Khan, M. A. B., Hashim, M. J., King, J. K., Govender, R. D., Mustafa, H. and Al Kaabi, J. 2019. Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. J. Epidemiol. Glob. Health, 10: 107.

Klusek, J., Nasierowska-Guttmejer, A., Kowalik, A., Wawrzycka, I., Lewitowicz, P., Chrapek, M. and Głuszek, S. 2018. GSTM1 , GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and colorectal cancer risk in Polish nonsmokers. Oncotarget, 9: 21224–21230.

Kokil, R. G., Rewatkar, V. P., Verma, A., Thareja, S. and Naik, R. S. 2010. Pharmacology and Chemistry of Diabetes Mellitus and Antidiabetic Drugs: A Critical Review. Curr. Med. Chem., 17, 4405–4423.

Lee, J., Koh, K., Kim, Y. -E., Ahn, J. -H. and Kim, S. 2013. Upregulation of Nrf2 expression by human cytomegalovirus infection protects host cells from oxidative stress. J. Gen. Virol., 94: 1658–1668.

Lučin, P., Jug Vučko, N., Karleuša, L., Mahmutefendić Lučin, H., Blagojević Zagorac, G., Lisnić, B., Pavišić, V., Marcelić, M., Grabušić, K., Brizić, I. and Lukanović Jurić, S. 2020. Cytomegalovirus Generates Assembly Compartment in the Early Phase of Infection by Perturbation of Host-Cell Factors Recruitment at the Early Endosome/Endosomal Recycling Compartment/Trans-Golgi Interface. Front. Cell Dev. Biol., 8: 1– 24.

Luo, X. -H., Zhu, Y., Chen, Y. -T., Shui, L. -P. and Liu, L. 2021. CMV Infection and CMV-Specific Immune Reconstitution Following Haploidentical Stem Cell Transplantation: An Update. Front. Immunol., 12: 732826.

Marjanac, I., Lovrić, R. and Barbić, J. 2019. Serum levels of the high- mobility group box 1 protein (HMGB1) in children with type 1 diabetes Mellitus: case-control study. Cent. Eur. J. Immunol., 44: 33–37.

Mauch-Mücke, K., Schön, K., Paulus, C., Nevels, M. M. 2020. Evidence for Tethering of Human Cytomegalovirus Genomes to Host Chromosomes. Front. Cell. Infect. Microbiol., 10: 1–11.

Maussang, D., Verzijl, D., van Walsum, M., Leurs, R., Holl, J., Pleskoff, O., Michel, D., van Dongen, G. A. M. S. and Smit, M. J. 2006. Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci., 103: 13068–13073.

McGeoch, D. J. 1989. THE GENOMES OF THE HUMAN HERPESVIRUSES: Contents, Relationships, and Evolution. Annual Review of Microbiology, 43(1): 235-265

Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G. and Granzow, H. 2009. Herpesvirus assembly: An update. Virus Res., 143: 222–234.

Mocarski, E. S. 2002. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. Trends Microbiol., 10: 332–339.

Murphy, R., Ellard, S. and Hattersley, A. T., 2008. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic β-cell diabetes. Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab., 4: 200–213.

Musavi, Z., Moasser, E., Zareei, N., Azarpira, N. and Shamsaeefar, A. 2019. Glutathione S-Transferase Gene Polymorphisms and the Development of New-Onset Diabetes After Liver Transplant. Exp. Clin. Transplant., 17: 375–380.

Mustafa, M. D., Pathak, R., Ahmed, T., Ahmed, R. S., Tripathi, A. K., Guleria, K. and Banerjee, B. D. 2010. Association of glutathione S- transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress markers in preterm labor. Clin. Biochem., 43: 1124–1128.

Oh, J. J., Carter, J. J. and Dix, R. D. 2021. A Mouse Model That Mimics AIDS-Related Cytomegalovirus Retinitis: Insights into Pathogenesis. Pathogens, 10: 850.

Oram, R. A., Patel, K., Hill, A., Shields, B., McDonald, T. J., Jones, A., Hattersley, A. T. and Weedon, M. N. 2016. A Type 1 Diabetes Genetic Risk Score Can Aid Discrimination Between Type 1 and Type 2 Diabetes in Young Adults. Diabetes Care, 39: 337–344.

Ortega, Á., Berná, G., Rojas, A., Martín, F. and Soria B. 2017. Gene-Diet Interactions in Type 2 Diabetes: The Chicken and Egg Debate. Int. J. Mol. Sci., 18: 1188.

Pahwa, S., Sharma, R. and Singh, B. 2017. Role of Glutathione S- Transferase in Coronary Artery Disease Patients with and Without Type 2 Diabetes Mellitus. J. C. D. R., 11:1.

Patro, A. R. K. 2019. Subversion of Immune Response by Human Cytomegalovirus. Front. Immunol., 10: 1–7.

Probst-Hensch, N. M., Imboden, M., Dietrich, D. F., Barthélemy, J. C., Ackermann-Liebrich, U., Berger, W., Gaspoz, J. M. and Schwartz, J. 2008. Glutathione S - Transferase Polymorphisms, Passive Smoking, Obesity, and Heart Rate Variability in Nonsmokers. Environ. Health Perspect., 116: 1494–1499.

Punthakee, Z., Goldenberg, R. and Katz, P. 2018. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. Can. J. Diabetes, 42: S10–S15.

Qin, Y., Wang, G., Kong, D., Li, G., Wang, Hongda, Qin, H. and Hao, W. 2021. Risk Factors of Cytomegalovirus Reactivation in Ulcerative Colitis Patients: A Meta-Analysis. Diagnostics, 11(11): 1952.

Rawlinson, W. D., Hamilton, S. T. and van Zuylen, W. J. 2016. Update on treatment of cytomegalovirus infection in pregnancy and of the newborn with congenital cytomegalovirus. Curr. Opin. Infect. Dis., 29: 615–624.

Reeves, M. B., Lehner, P. J., Sissons, J. G. P. and Sinclair, J. H. 2005. An in vitro model for the regulation of human cytomegalovirus latency and reactivation in dendritic cells by chromatin remodelling. J. Gen. Virol., 86: 2949–2954.

Reeves, M. B. and Sinclair, J. H. 2013. Circulating Dendritic Cells Isolated from Healthy Seropositive Donors Are Sites of Human Cytomegalovirus Reactivation In Vivo. J. Virol., 87: 10660–10667.

Roizman, B. 1982. The family herpesviridae: general description, taxonomy, and classification. In The herpesviruses (pp. 1-23). Springer, Boston, MA.

Raza, S., Abbas, S., Ahmad, A., Ahmed, F., Zaidi, Z. H. and Mahdi, F. 2014. Association of Glutathione-S-Transferase (GSTM1 and GSTT1) and FTO Gene Polymorphisms with Type 2 Diabetes Mellitus Cases in Northern India. BJMG, 17(1), 47–54.

Sadeghipour, S. and Mathias, R. A. 2017. Herpesviruses hijack host exosomes for viral pathogenesis. Semin. Cell Dev. Biol., 67: 91– 100.

Sausen, D., Reed, K., Bhutta, M., Gallo, E. and Borenstein, R. 2021. Evasion of the Host Immune Response by Betaherpesviruses. Int. J. Mol. Sci., 22: 7503.

Selph, S., Dana, T., Blazina, I., Bougatsos, C., Patel, H. and Chou, R. 2015. Screening for type 2 diabetes Mellitus: A systematic review for the U.S. preventive services task force. Ann. Intern. Med., 162: 765–776.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. and Dowd, C. A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem. J., 360: 1.

Sinzger, C. 2008. Entry route of HCMV into endothelial cells. J. Clin. Virol., 41: 174–179.

Springer, K. L. and Weinberg, A. 2004. Cytomegalovirus infection in the era of HAART: fewer reactivations and more immunity. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 54(3): 582–586.

Stempel, M., Chan, B. and Brinkmann, M. M. 2019. Coevolution pays off: Herpesviruses have the license to escape the DNA sensing pathway. Med. Microbiol. Immunol., 208: 495–512.

Stephens, J. W., Khanolkar, M. P. and Bain, S. C. 2009. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. Atherosclerosis, 202: 321–329.

Tang, J., Frascaroli, G., Zhou, X., Knickmann, J. and Brune, W. 2021. Cell Fusion and Syncytium Formation in Betaherpesvirus Infection. Viruses, 13: 1973.

Tarrant-Elorza, M., Rossetto, C. C. and Pari, G. S. 2014. Maintenance and Replication of the Human Cytomegalovirus Genome during Latency. Cell Host Microbe, 16: 43–54.

Telci, A., Çakatay, U., Kayali, R., Erdoğan, C., Orhan, Y., Sivas, A. and Akçay, T. 2000. Oxidative Protein Damage in Plasma of Type 2 Diabetic Patients. Horm. Metab. Res., 32: 40–43.

Tilton, C., Clippinger, A. J., Maguire, T. and Alwine, J. C. 2011. Human Cytomegalovirus Induces MulTiple Means To Combat Reactive Oxygen Species. J. Virol., 85: 12585–12593.

Wang, G., Zhang, L. and Li, Q. 2006. Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes Mellitus risk in Chinese population. Biochem. Biophys. Res. Commun., 341: 310–313.

Weinberg, E. D. 2008. Human Cytomegalovirus, Microchemical Journal, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Woodhall, D. L., Groves, I. J., Reeves, M. B., Wilkinson, G. and Sinclair, J. H. 2006. Human Daxx-mediated Repression of Human Cytomegalovirus Gene Expression Correlates with a Repressive Chromatin Structure around the Major Immediate Early Promoter. J. Biol. Chem., 281: 37652–37660.

Xiao, J., Deng, J., Lv, L., Kang, Q., Ma, P., Yan, F., Song, X., Gao, B., Zhang, Y. and Xu, J. 2015. Hydrogen Peroxide Induce Human Cytomegalovirus Replication through the Activation of p38- MAPK Signaling Pathway. Viruses, 7: 2816–2833.

Zhang, L., Guo, G., Xu, J., Sun, X., Chen, W., Jin, J., Hu, C., Zhang, P., Shen, X. and Xue, X. 2017. Human cytomegalovirus detection in gastric cancer and its possible association with lymphatic metastasis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 88: 62–68.

Zhang, X., Tang, N., Xi, D., Feng, Q., Liu, Y., Wang, L., Tang, Y., Zhong, H. and He, F. 2020. Human cytomegalovirus promoting endothelial cell proliferation by targeting regulator of G-protein signaling 5 hypermethylation and downregulation. Sci. Rep., 10: 2252.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Randa Khalid Abdulhakeem AL-KHALID

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Diyala Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Veteriner Hekimliği ve Cerrahisi Bölümü	2009-2015