

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İnsan Tükürük Örneklerinde Yaş Tayini İçin Biyobelirteç Adayları GPR19 (G Protein-Bağlantılı Reseptör 19), CST1 (SN Sistatin) ve NFE2L2 (NFE2 Benzeri Bzip Transkripsiyon Faktörü 2) Genlerinin Moleküler Yöntemler İle Analizi.

Mehmet Önsan KÜTÜKOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Mayıs, 2025

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAYI

İnsan Tükürük Örneklerinde Yaş Tayini İçin Biyobelirteç Adayları GPR19 (G Protein-Bağlantılı Reseptör 19), CST1 (SN Sistatin) ve NFE2L2 (NFE2 Benzeri Bzıp Transkripsiyon Faktörü 2) Genlerinin Moleküler Yöntemler İle Analizi.

Mehmet Önsan KÜTÜKOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bu Yüksek Lisans Tezi 20 /05 /2025 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği ile Kabul Edilmiştir.

Jüri :Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ

:Prof. Dr. Gülüzar ATLI DEMİRAY

:Dr. Öğr. Üyesi. Özgür Cem ERKİN

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 16647

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
TABLO VE ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tükürük ve Özellikleri	2
1.1.1. Tükürük Salgılanmasını Etkileyen Faktörler	3
1.2. Yaşlanma ve Yaşlanma Mekanizmaları.....	3
1.2.1. Hüresel Yaşlanma	4
1.2.2. Biyolojik Yaşlanma ve Nedenleri.....	4
1.3. CST1; SN sistatin [Homo sapiens (insan)]	4
1.3.1. Genin Özellikleri.....	5
1.3.2. Yaşlanmadaki İşlevi.....	6
1.4. NFE2L2, NFE2 benzeri bZIP transkripsiyon faktörü2 [Homo sapiens (insan)]	6
1.4.1. Genin Özellikleri.....	6
1.4.2. Yaşlanmadaki İşlevi.....	7
1.5. GPR19; G protein-bağlantılı reseptör 19 [Homo sapiens (insan)].....	7
1.5.1. Genin Özellikleri.....	7
1.5.2. Yaşlanmadaki İşlevi.....	8
1.6. GAPDH; gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz [Homo sapiens (insan)]	8
1.6.1. Genin Özellikleri.....	8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
2.1. GPR19.....	11
2.2. CST1	11
2.3. NFE2L2.....	12
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri.....	15
3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar	15
3.1.3. Çalışmada kullanılan kitler	15

3.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar	15
3.2. Metot	16
3.2.1. Tükürük Örneklerinin Toplanması Ve Saklanması	16
3.2.2. Tükürük Örneklerinden Total RNA' ların İzolasyonu ve Spektrofotometre (NanoPhotometer/IMPLEN)Konsantrasyon Ölçümü	17
3.2.3.cDNA Sentezi:	19
3.2.4.qPCR:	19
3.2.5. Primerler	20
3.2.6. qPCR Sonuçlarının İstatistiksel Analizi	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. BULGULAR	27
4.1.1. CST1 geni için tüm yaş gruplarında dişi bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafığı.	27
4.1.2. CST1 geni için tüm yaş gruplarında erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafığı.	28
4.1.3. NFE2L2 geni için tüm yaş gruplarında dişi bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafığı.	29
4.1.4. NFE2L2 geni için tüm yaş grubu erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafığı.	30
4.1.5. GPR19 geni için tüm yaş grubu dişi bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafığı.	31
4.1.6. GPR19 geni için tüm yaş grubu erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafığı.	32
4.2. TARTIŞMA	33
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	43

İnsan Tükürük Örneklerinde Yaş Tayini İçin Biyobelirteç Adayları GPR19 (G Protein-Bağlantılı Reseptör 19), CST1 (SN Sistatin) Ve NFE2L2 (NFE2 Benzeri Bzip Transkripsiyon Faktörü 2) Genlerinin Moleküler Yöntemler İle Analizi.

Mehmet Önsan KÜTÜKOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Biyolojik yaşlanma, genetik programlarla düzenlenen ve çevresel faktörlerin etkisiyle meydana gelen bedenin canlılığını yitirdiği, metabolizmasını devam ettiremediği ve kaçınılmaz olarak ölümle sonuçlanan süreç olarak tanımlanmaktadır. Yaşlanma ile ilgili mekanizmaların açıklanması daha önceki birçok çalışmada da denenmiş ve yaşlanmaya neden olan, yaşlanmayı geciktiren veya hızlandıran birçok parametre elde edilmiştir. Bu çalışmada kişilerin yaşlarını tahmin etmek amacıyla tükürük sıvısında var olan 3 adet gen ile sürecin biraz daha anlaşılır olmasını ve rutin kullanıma katkı sağlamasını amaç edindik. Çeşitli yaş ve cinsiyete sahip insan gruplarından tükürük örnekleri topladık ve tükürükten total RNA izolasyon çalışması yaptık ve cDNA sentezi gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz verilerin hesaplanması ve istatistiksel analizini yaptık.

Çalışmamızın sonucunda elde edilen CST1 genine ait $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerine göre 14-19 yaş grubu dişi örneklerin tamamında 1,73 kat yukarı regülasyon ve 24-29 yaş grubu dişilerin tamamında 2,2 kat aşağı regülasyon tespit ettik. GPR19 geni için $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerine göre 14-19 yaş grubu dişi örneklerin tamamında 3,47 kat yukarı regülasyon tespit ettik. Bu genin 30< yaş erkek grubunun tamamında 2,88 kat yukarı regülasyon tespit ettik. NFE2L2 geni için 14-19 grubu dişilerde 2,7 kat ve 30< grubu erkeklerde 2,88 kat yukarı regülasyon gözledik. Ayrıca her üç genin 4-9 yaş gruplarının (hem dişi hem erkek) en küçük üyelerinde yüksek oranda aşağı regülasyon tespit ettik. Her 3 gen için ortalama $2^{\Delta\Delta Ct}$ değeri 4 yaşındaki dişi bireylerde 31,8 kat, 6,5 yaşındaki erkek bireylerde ise 4,6 kat aşağı regüle olduğunu kaydettik.

CST1, NFE2L2 ve GPR19 genlerinin yaş tahmininde kullanılabileceğini düşünmekle beraber geniş örnek gruplarıyla daha kapsamlı çalışma yapılması gerektiğine kanaat getirdik.

Anahtar Kelimeler: Yaşlanma, Biyobelirteç, Tükürük, Total RNA, RT-PCR

Analysis of GPR19 (G Protein-Coupled Receptor 19), CST1 (SN Cystatin) and NFE2L2 (NFE2-Like Bzip Transcription Factor 2) Genes as Biomarker Candidates for Age Determination in Human Saliva Samples by Molecular Methods.

Mehmet Önsan KÜTÜKOĞLU

Advisor: Prof. Dr. M. Bertan YILMAZ

Department of Medical Biology

ABSTRACT

Biological aging is defined as a process in which the body loses its vitality, cannot continue its metabolism and inevitably results in death, which is regulated by genetic programs and occurs under the influence of environmental factors. The explanation of the mechanisms related to aging has been tried in many previous studies and many parameters that cause, delay or accelerate aging have been obtained. In this study, we aimed to make the process a little more understandable and contribute to routine use with 3 genes present in salivary fluid in order to estimate the ages of people. We collected saliva samples from groups of people with different ages and genders and performed a total RNA isolation study from saliva and performed cDNA synthesis.

We calculated and statistically analyzed the data we obtained. According to the $2^{\Delta\Delta Ct}$ value of the CST1 gene obtained as a result of our study, we detected 1.73-fold upregulation in all female samples in the 14-19 age group and 2.2-fold downregulation in all females in the 24-29 age group. For the GPR19 gene, we detected 3.47-fold upregulation in all 14-19 age group female samples according to $2^{\Delta\Delta Ct}$ value. We detected 2.88-fold upregulation of this gene in all 30< age group males. For the NFE2L2 gene, we observed 2.7-fold upregulation in 14-19 age group females and 2.88-fold upregulation in 30< age group males. We also detected high downregulation in the youngest members of 4-9 age groups (both females and males) for all three genes.

We recorded that the average $2^{\Delta\Delta Ct}$ value for all 3 genes was 31.8-fold downregulation in 4-year-old females and 4.6-fold downregulation in 6.5-year-old males. We believe that CST1, NFE2L2 and GPR19 genes can be used in age estimation, but we believe that more comprehensive studies should be conducted with larger sample groups.

Keywords: Aging, Biomarker, Saliva, Total RNA, RT-PCR

TEŞEKKÜR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Çümerlab ve Agentem Anabilim Dalı 'nda çalışan sevgili mesai arkadaşlarıma emeklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışma boyunca Sayın Öğretmenim Prof. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ' a sevgi dolu kalbi ve okyanustaki her bir su tanesi kadar hoşgörüsü ve çalışma boyunca kılavuzluğu için ömür boyu minnet duygusu besleyeceğim. Öğr. Gör. Dr. Sabriye KOCATÜRK SEL Öğretmenim, ne zaman zorlansam o dingin ve sevecen ruhu ile bana yol gösterdiği ve yanımda olduğu için sonsuz saygı ve sevgilerimi iletirim.

En başından beri bu çalışmada bir tek cümleyle bile yardımını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma bir ömür borçlu olduğumu belirtir,

Sayın Arş. Gör. Dr. Nermin Seda ILGAZ ve Sayın Dr. Hale ÖKSÜZ Öğretmenlerime cesaretlendiren yaklaşımları ve tavsiyeleri için, Sayın Buket KALFA çalışmamın en başından bu yana sabırla yanımda olduğu için, sayın Göksu ŞENER'e, sayın Gamze GİZİR' e ve Gift Onyinye OKAFOR'a arkadaşlıkları ve dayanışmalarından, emeklerinden dolayı bir ömür borçluyum, çok teşekkür ederim.

Sayın İlkan MUDU ve Sayın Burak KAŞIKÇI değerli arkadaşlarım, dostlukları ve yardım severlikleri için minnet duyuyorum.

Sizleri tanımak benim için bir onur.

Ve tabi ki canım aileme, çalışmam boyunca bana her an sabırla inandıkları için çok teşekkür ederim.

TABLO VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 1.	Araştırmada kullanılan tükürük örneklerinden elde edilen Total RNA'ların konsantrasyonları ve Spektrofotometre (NanoPhotometer/IMPLEN) ile 260/280 dalga boylarında ölçüm sonuçları	18
Tablo.2.	cDNA sentez kit protokolü.....	19
Tablo.3.	qPCR çalışma protokolü	19
Tablo 4.	İlk 24 örneğin plate düzeneğindeki yerleşimi. Tablo 5. PCR reaksiyonları için hazırlanan plate düzeneğinde harf ve rakamlarla belirlenen kuyucuklara yüklenen tükürük örneklerinin ait olduğu kişilerin yaş ve cinsiyetleri.....	20
Tablo 6.	PCR örnek düzeni 25-39 numaralı örneklerin plate düzeneğindeki yerleşimi.....	21
Tablo 7.	Her bir örneğin yaş ve cinsiyet aralıkları PCR reaksiyonları için hazırlanan plate düzeneğinde harf ve rakamlarla belirlenen kuyucuklara yüklenen tükürük örneklerinin ait olduğu kişilerin yaş ve cinsiyetleri.	21
Tablo 8.	qPCR sonuçlar.GAPDH (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) Geni Cq değeri.....	22
Tablo 9.	CST1 – sistatin SN gen değerleri.....	23
Tablo 10.	NFE2L2 (Nrf-2, NFE2 benzeri bZIP transkripsiyon faktörü 2) gen değerleri.....	24
Tablo 11.	GPR19 G protein-bağlantılı reseptör 19 [Homo sapiens (insan)] gen değerleri	25
Tablo 12.	CST1 geni için tüm yaş gruplarında dişi bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.....	27
Tablo 13.	CST1 geni için tüm yaş gruplarında erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.....	28
Tablo 14.	NFE2L2 geni için tüm yaş gruplarında dişi bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.....	29
Tablo 15.	NFE2L2 geni için tüm yaş gruplarında erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.....	30
Tablo 16.	NFE2L2 geni için tüm yaş gruplarında dişi bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.....	31
Tablo 17.	GPR19 geni için tüm yaş gruplarında erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Metot ve yöntem için araştırma süresince izlenecek yolu ifade etmektedir.	16
Şekil 2. CST1 cinsiyet ve $2^{\Delta\Delta Ct}$ avarage ilişkisi	33
Şekil 3 NFE2L2 cinsiyet ve $2^{\Delta\Delta Ct}$ avarage ilişkisi.....	34
Şekil 4 GPR19 cinsiyet ve $2^{\Delta\Delta Ct}$ avarage ilişkisi.....	34



SİMGELER VE KISALTMALAR

sn	:Saniye
dk	:Dakika
µl	:Mikrolitre
mg	:Miligram
ml	:Mililitre
ng	:Nanogram
µg	:Mikrogram
cDNA	:Tamamlayıcı DNA
mRNA	:Haberci RNA
DNA	:Deoksiribonükleik asit
RNA	:Ribonükleik asit
DNaz	:Deoksiribonükleaz
RNaz	:Ribonükleaz
GAPDH	:Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
RT-PCR	:Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ΔCt	:Örneklerin Ct değerlerinin GAPDH Ct değeri arasındaki farkı ifade eder.
ΔΔCt	:Ortalama ΔCt değeri ve hedef genin ΔCt değerinin farkı.
2^{ΔΔCt}	:Sonuç bulgularımızın GAPDH ile aralarındaki korelasyonu ifade eder.
Ct	:Eşik döngüsü(Ct:threshold cycle). Logaritmik artış gözlenen döngü.
Cq	:Niceleme döngüsü(Cq:quantification cycle)
Biyobelirteç	:Normal veya anormal bir süreci belirten moleküllerdir.
CST1	:CST1, SN sistatin [Homo sapiens (insan)]
NFE2L2	:NFE2L2, NFE2 benzeri bZIP transkripsiyon faktörü2 [Homo sapiens (insan)]
GPR19	:GPR19, G protein-bağlantılı reseptör 19 [Homo sapiens (insan)]
HEK293	:İnsan embriyonik böbrek 293 hücreleri
Proteaz	:protein parçalanmasında kullanılan enzim
Sitoprotektif	:Lezyondan alınan örneklerle, hücresel elementlerin incelenip bozukluk derecesini değerlendirme yöntemi.

1. GİRİŞ

Yaş tayini, adli bilimlerin temel unsurlarından biri olup, özellikle kimliklendirme süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Farklı yaş gruplarına ve cinsiyetlere sahip bireylerin yaşlarının doğru, hızlı ve non-invaziv yöntemlerle tahmin edilmesi, hem adli tıp uygulamalarında hem de biyomedikal araştırmalarda önemli bir gereklilik haline gelmiştir. Bu bağlamda, yaş tahminine yönelik güvenilir biyobelirteçlerin belirlenmesi, günümüzde bilimsel çalışmalarda öne çıkan konulardan biridir.

Bu çalışmanın temel amacı, farklı yaş gruplarına ve cinsiyetlere sahip bireylerin yaş tayininin kolaylaştıracak anlamlı biyobelirteçlerin belirlenmesine katkı sağlamaktır. Bu hedef doğrultusunda, bireylerden non-invaziv yöntemlerle elde edilen tükürük örnekleri materyal olarak kullanılmış; kişiye zarar vermeyen, kolayca toplanabilir özellikteki bu biyolojik sıvı, çalışmanın merkezine alınmıştır. Çalışmada hedeflenen CST1, NFE2L2 ve GPR19 genlerinin tükürük örnekleri içerisindeki ekspresyon düzeyleri analiz edilerek, bu genlerin yaş ve cinsiyet ile ilişkili ekspresyon farklılıkları değerlendirilmiştir.

Literatürdeki önceki çalışmalarda, pek çok vücut sıvısından(kan, tükürük, idrar vb.) elde edilen DNA ve RNA örneklerinin, birey tanımlamada kullanıldığı çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanında yaşanan teknolojik ilerlemeler sayesinde, gen ekspresyonuna dayalı yaş tahmini gibi hassas analizlerin gerçekleştirilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu gelişmeler, adli tıp, kriminoloji ve sosyoloji gibi disiplinlerde olan etkileşimi artırmış ve bireyin yalnızca kimliğini değil aynı zamanda biyolojik yaşını ve fizyolojik durumunu da anlamaya yönelik yeni kapılar aralamıştır.

Bu çalışmada, tükürük örneklerinden elde edilen gen ekspresyon verileri ile bireyin yaş aralığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, ilerleyen aşamalarda bireyin cinsiyeti, yaşa bağlı hastalıklar, bu hastalıkların moleküler yolları ve potansiyel tedavi stratejileri hakkında da çıkarımlar yapılabileceği öngörülmektedir. Özellikle CST1, NFE2L2 ve GPR19 genlerinin yaşla ilişkili ifade düzeylerinin literatürde sınırlı sayıda çalışılmış olması, bu çalışmanın bilimsel katkısını artıran önemli bir etmendir.

Tükürük örneklerinin bu denli dikkat çekici hale gelmesinin bir diğer nedeni de adli bilimlerdeki geniş uygulama alanıdır. Tükürük, yalnızca suç mahallerinde bulunan ısıruk izleri gibi doğrudan temas izlerinden değil; giysiler, içecek kapları, sigara izmaritleri gibi çok çeşitli yüzeylerden de kolaylıkla elde edilebilmektedir. Bu durum, tükürüğe dayalı biyobelirteç araştırmalarının adli bilimlerdeki yerini güçlendirmekte ve yaş tayini gibi kompleks analizler için yeni olanaklar sunmaktadır. Hücresel yaşlanmaya bağlı olarak ekspresyon düzeylerinde değişim gösterdiği düşünülen CST1, NFE2L2 ve GPR19 genleri, bu bağlamda potansiyel yaş belirleyici adaylar olarak ön plana çıkmakta ve çalışmanın bilimsel ve uygulamalı değerini pekiştirmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma yaş tayinine yönelik yeni biyobelirteçlerin belirlenmesi, tükürüğün non-invaziv bir biyolojik örnek olarak adli bilimlerde kullanımının yaygınlaştırılması ve gen ekspresyon verilerine dayalı yaş tahmini modellerinin geliştirilmesine katkı sunmayı amaçlamaktadır. Aynı zamanda çalışmanın, ilerleyen süreçlerde yapılacak daha kapsamlı projeler temel oluşturması ve adli bilimler alanında yeni yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlaması beklenmektedir.

Araştırma, Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı, ÇÜMERLAB ve Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ve Tanı Anabilim Dallarının ortak altyapısında yürütülmüş olup, örnekler uyarılmamış salya akıtma yöntemiyle toplanmıştır. Bu sayede örnek alma süreci hem etik açıdan güvenli hem de uygulanabilirlik açısından pratik hale getirilmiştir.

1.1. Tükürük ve Özellikleri

Tükürüğün bu çalışmada kullanılmasının nedenleri biyolojik örneklerin toplanmasındaki kolaylık, sağlık ve hastalıkla ilgili spesifik biyobelirteçleri içermesi, örnek alımı için medikal personele ihtiyaç duyulmaması ve büyük miktardaki örnekleme için ekonomik oluşudur.

Tükürüğün görevleri arasında tadın algılanması, sindirimin gerçekleşmesi antibakteriyel özelliği, antifungal, antiviral özelliği, ortamı kayganlaştırması remineralizasyon ve demineralizasyona karşı koruma ve tampon özellikleri bilinmektedir. Tükürüğün ana görevi yiyeceklerin sindirilmesine yardım etmek ve sindirim kanalında kolayca ilerlemesini sağlamak için besinlerin kayganlığını oluşturmaktır. Çiğneme sırasında besinlerin küçük parçalara ayrılması kimyasal sindirimi kolaylaştıracaktır. Tükürük içeriğinde bulunan müsin küçük parçalara ayrılmış besinleri birbirine yapıştırarak yutulmasına yardım eder. Özellikle ağız kuruluğu yaşayan bireylerde bu çok önemlidir. Yine tükürük içerisinde bulunan pityalin (amilaz) karbonhidrat sindiriminde önemli rol oynamaktadır. Dilin gerisinde bulunan bezlerden salgılanan lipaz da trigliseritlerin parçalanmasında görev alır. Organizmanın su ihtiyacını gidermesinde ağız ve boğaz mukozasının kurumasının önlenmesinde tükürüğün büyük görevi vardır. Termoregülatör rol oynamaktadır. Organizmanın suya zorunlu olduğu durumlarda tükürük miktarı azalır, su içerek susuzluk hissi giderilir. Böylece tükürük salgısı da normale döner. Korku heyecan kuraklık sıcak hava gibi etkenler ağız kuruluğu yaptığı için su içmeye ihtiyacı duyulur. Bukal ve faringeal mukozanın yeterince ıslatılması koruyucu yönü yanında konuşma yönünden de gereklidir. Tükürük yapısında mikroorganizmalara karşı ve mukozal enfeksiyonları önleyici birçok madde bulunur asiner hücrelerden salgılanan peroksidaz ve duktal sistemden salgılanan iyodit bunlara örnektir. Peroksidaz bakteri proteinlerindeki tirozini parçalar. Tükürükteki diğer antibakteriyel protein lizozimdir. Lizozim bakteriyel hücre membranının polisakkaritlerini parçalar. Böylece bakteri etkisiz hale getirilir. Bununla birlikte tükürük içerisinde immüoglobülinler bulunur. Tükürük bezlerinin bulunduğu bölgedeki bağ

doku plazma hücreleri salgıladığı IgA, IgG, IgM gibi mukozanın dış yüzeylerini mikroorganizmalara karşı korur. Tükürük bakterilere karşı bakteriyostatik ve bakterisi etki gösterdiğinden ağız kokusu ağız temizliği ve diş sağlığı için pozitif etkiler gösterir. Dişler arasındaki yemek artıklarının da parçalanmasını sağlayarak bölgenin temiz kalmasına yardımcı olur. Tükürük içeriğindeki glikoproteinler dişlerin mine tabakasında bir katman oluşturur. Yine içerikte bulunan bikarbonat iyonları tamponlama görevi üstlenip çürük oluşmasını engeller. Çürük taşımayan bireylerin ağız içi tamponlama özelliğinin çürük taşıyanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tükürükteki amonyak ve ürenin çürümelere karşı sağladığı nötralizasyon ile kalsiyum yoğunluğunun yüksek olması çürüklerin oluşumunda azaltıcı etki yapmıştır. Tersine inorganik fosfatın yoğun olması ise çürükleri arttırmıştır. Özetle tükürükteki tampon sistemleri, tükürüğün genel yapısı, kalsiyum fosfat oranı dişlerin remineralizasyonunda, çürük oluşumlarında büyük etkenlerdir(Aktaş A. ve ark, 2009; Carpenter G. H. 2013).

1.1.1. Tükürük Salgılanmasını Etkileyen Faktörler

Otonom sinir sisteminin kontrolü ile çalışan tükürük bezleri sempatik ve parasempatik sinir sistemi tarafından kontrol edilir. Öne çıkan etken ise parasempatik sinir sistemidir. Yiyecekleri düşünmek, kokusunu almak, hayal etmek şeklinde başlayan tükürük salgısı bu evrede sefallik faz adını alır. Beyin kabuğundan çıkan impulslar ise tat alma veya dokunma duyularının uyarılması ile ağızda tükürük salgısını başlatır. Bu faza ise bukkal faz adı verilir. Bu süreci takip eden mide ve üst sindirim sistemi yoluna ait elemanlarınca gerçekleştirilen refleks ile gastrointestinal fazı gerçekleştirir. Özefagusa giren besin maddeleri bu bölgede genişletme etkisi yaratıp aşağı bölgede mide mukozasını uyararak da tükürük salgısı devam eder. Tükürük salgısı istirahat anında yani bir uyarıcı yok iken az salgılanır. Ağız kuruluğunun giderilmesi yeterlidir. Tükürüğün yapısı yaş, cinsiyet, uyku, diyet, dehidratasyon, infeksiyon hastalıkları, sinir sistemi hastalıkları, kullanılan ilaçlar, uyarıcıların cinsi ve uygulanış şekli, hamilelik gibi durumlara göre değişiklik gösterebilir. Çiğneme aktivitesi ise tükürük salgılanmasını sağlayan en önemli uyarıcıdır. Yine koku ve tadın alınması da. Tükürük salgısını arttıran diğer etkenlerden bazıları ise metal zehirlenmeleri, ağrı ve irritasyon, sigara içmek, bağırsak parazitleri, mide bulantıları gibi sıralanabilir. Tükürük içeriğinde yer alan enzimler ve elektrolitler akış hızına bağlı farklılıklar gösterebilir. Tükürük miktarı 6-10 yaşlarında en fazla, 20 yaşından sonra ise giderek azalmaktadır. Kadınlara göre erkeklerde daha fazladır.(Aktaş A. ve ark, 2009).

1.2. Yaşlanma ve Yaşlanma Mekanizmaları

Yaşa bağlı dejeneratif fenotiplerde patolojik bulgular yaşlanan hücrelerin bu dejenerasyona neden olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Normal doku ve doku işleyişinde bozukluklara neden olduğu gözlenmiştir. Örneğin aterositlerin yaşlanmasının ve bununla

ilişkili mekanizmaların bilişsel bozukluğa neden olarak alzheimer parkinson gibi hastalıkları teşvik ettiğini göstermiştir. Yaşlı epitel, endotel, kas hücrelerin kardiyovasküler hastalıkların var olmasında rol oynadığı gözlenmiştir.(Karan, M. A., Tufan F. (2010). Yine bu hastalıklara örnek olarak makula dejenerasyonu, kronik ofsrüktif akciğer hastalığı, amfizem, insülin duyarsızlığı verilebilir. Kısaca yaşlanmış hücreler buldukları dokuve organizmada birçok dejenerasyon ve metabolik bozukluğa neden olmuştur. Diğer bazı yaşlanma nedenleri ise şöyle sıralanabilir. Yaşlanmada genetik programlama teorileri dna hasarı, yaşlanmada glikozilasyon teorisi, fiziksel ve kimyasal yıkıcıların vücut hücrelerini yıpratması, doğal ve yapay bazı maddelerle ortaya çıkan ölüm, kognitif yaşlanma, mitokondri, lipid peroksidasyonu, apopitozis, immunité ve yaşlanma, melatonin eksikliği, oksidatif stres (serbest radikal teorileri), deneysel modellerde saptanan genler, erken yaşlanma sendromları, somatik mutasyon teorisi, telomer-telomerez, epigenetik düzenleme, protein sentez azalması(Öksüzokyar, M. M., ve ark,2016)

1.2.1. Hücresel Yaşlanma

Hücresel yaşlanma, stres kaynaklı geri dönüşü olmayan ve giderek ilerleyen bir süreç olarak ifade edilebilir. Neticede metabolizmanın aktivitesini tamamen yitirerek ölümlé sonuçlandığı bir gerçektir.(Rose, M. R.,2012). Yaşlanan hücrelerin canlı organizmada zararlı sonuçları doğurabileceği, dokuların yenilenme süreçlerini sekteye uğratacağı, yaşa bağılı birçok hastalığın ortaya çıkabileceği süreçleri tetiklediğine dair kanıtlar vardır. Hücre yaşlanması çeşitli içsel ve dışsal faktörlerle ilerleyen uzun ve karmaşık bir süreçtir. Yaşlanan hücrelerin biyolojik açıdan olumsuzluklar ortaya çıkaran birçok aktif madde ürettiği ve bu maddelerin fizyolojik ve patolojik sonuçlara katkıda bulunduğu örnek çalışmalar giderek artmaktadır(Kwon, S.M., ve ark., 2019).

1.2.2. Biyolojik Yaşlanma ve Nedenleri

Hücre metabolizması genel olarak birbirine zıt iki aktivite ile yürür. Bu aktiviteler yapım(anabolizma) ve yıkımdır (katabolizmadır). İlk bakış olarak bir hücrede veya organizma da katabolik tepkimeler anabolik tepkimelere göre daha yoğun ise yaşlanma süreçleri meydana geliyor demektir. Katabolik tepkimelerde hücresel ATP enerjisi olarak bildiğimiz bu molekülü üreten makromoleküllerin oksidatif şekilde bozunumu ve anabolik tepkimelerle enerji tüketimi gerçekleşirken bir takım indirgeyici makromolekül sentezlerinin meydana gelmesi hücre büyümesinin kalıcı olarak durdurulmuş olmasına rağmen yaşlı hücrelerde bir değişiklik silsilesi ortaya çıkarır. Bu durumda hücrelerin yaşlanması nitelenmiş olur(Kwon, S.M., ve ark., 2019).

1.3. CST1; SN sistatin [Homo sapiens (insan)]

(Gen Kimliği: 1469, 7-Nis-2025 tarihinde güncellendi[NCBI])

Kromozomal yerleşim: 20p11.21

1.3.1. Genin Özellikleri

Sistatin süper ailesi, birden fazla sistatin benzeri dizi içeren proteinleri kapsar. Üyelerden bazıları aktif sistein proteaz inhibitörleri iken, diğerleri bu inhibitör aktiviteyi kaybetmiş veya belki de hiç kazanmamıştır. Süper ailede tip 1 sistatinler (stefinler), tip 2 sistatinler ve kininojenler olmak üzere üç inhibitör aile vardır. Tip 2 sistatin proteinleri, çeşitli insan sıvılarında ve salgılarında bulunan bir sistein proteinaz inhibitörü sınıfıdır ve burada koruyucu işlevler sağladıkları görülmektedir. Kromozom 20'deki sistatin lokusu, tip 2 sistatin genlerinin ve psödogenlerinin çoğunu içerir. Bu gen sistatin lokusunda bulunur ve tükürük, gözyaşı, idrar ve seminal sıvıda bulunan bir sistein proteinaz inhibitörünü kodlar. [RefSeq tarafından sağlanmıştır, Temmuz 2008]

Anonim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1469#gene-expression>[Son erişim tarihi: 02.05.2025].

CST1 proteini esas olarak submandibular bez(çene altında bulunan ve orta kısma yakın ve yerleşik olarak duran tükürük bezleri), safra kesesi ve uterusu dağılır, ancak aynı zamanda kötü huylu dokuyu da yüksek oranda ifade eder (Liu, Y., & Yao, J. (2019)).

Sistatin (CST), insan vücut sıvıları ve dokularında yaygın olarak dağılmış, sistein proteazlarını inhibe eden ve üç türe ayrılabilen bir protein sınıfıdır. Tip 1 sistatinler (A ve B) esas olarak hücre içi, tip 2 sistatinler (C, D, E/M, F, G, S, SN ve SA) hücre dışı ve tip 3 sistatinler (L- ve H-kininojenler) damar içi proteinlerdir. Tüm gerçek sistatinler papain (C1) ailesinin sistein peptidazlarını inhibe eder ve bazıları da legumain (C13) ailesinin enzimlerini inhibe eder. Bu peptidazlar, hücre içi protein yıkımı (katepsinler B, H ve L) gibi fizyolojik süreçlerde önemli roller oynar, kemiğin yeniden şekillenmesinde (katepsin K) merkezi bir rol oynar ve antijen sunumunun kontrolünde önemli olabilir (katepsin S, memeli legumaini). Dahası, bu tür peptidazların aktiviteleri kanser metastazı ve inflamasyon gibi patofizyolojik koşullarda artar. Ek olarak, bu tür peptidazlar çeşitli patojenik parazitler ve bakteriler için gereklidir. Bu nedenle sistatinler sadece normal vücut süreçlerini düzenleme ve aşağı düzenlendiğinde hastalığa neden olma kapasitesine sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda mikrobiyal infeksiyonlara karşı savunmaya da katılabilir. Sistatin, proteaz inhibitörleri sınıfına aittir ve insan hücreleri ve dokularında sistatin formlarının sayısı 12 gibi görünmektedir. Dizilerinin merkezinde, proteaz inhibitörleri olarak işlevleri için çok önemli olan “sistatin motifi” adı verilen oldukça korunmuş bir segment bulunur. Organizmadaki sistatin dağılımındaki farklılıklara göre, 12 çeşit sistatin tanımlanmış ve üç türe ayrılmıştır: tip 1, tip 2 ve tip 3.(Jeremy S., ve ark., 2003). Sistatin SN, tip 2 sistatin süper ailesine aittir ve 121 amino asitten oluşan ve ~14,5 kDa'lık göreceli moleküler kütleyle sahip bir salgı proteini türüdür. Sistatin SN, üç ekzon ve iki intron içeren ve kromozom 20p11.2'de bulunan CST1 geni tarafından kodlanır. (de Sousa-Pereira P., ve ark., 2013). Sistatin SN'nin işlevine gelince, hücre döngüsü, hücre yaşlanma, tümör oluşumu ve metastaz gibi hücre kaderini ve hastalık gelişimini belirlemede yaygın olarak yer alır. CST1,

meme kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını, klon oluşumunu ve metastazı teşvik eder. (Dai, Dn., ve ark., 2017).

1.3.2. Yaşlanmadaki İşlevi

CST1 geninin aşırı ekspresyonunun akciğer kanseri, meme kanseri vd. ve diğer tümörlerin hücresel artışı ve yayılmasında rol oynadığını ileri süren çalışmalar vardır(Liu, Y., ve ark., 2019). CST1 ekspresyonunda aşırılığın mide kanseri hücrelerini ferroptoz(hücrede demir birikimi ve lipit bozulması şeklinde seyreden bir hücre ölüm süreci) girmekten koruduğu ve böylece ilerlemesini ve metastazını teşvik ettiği kritik bir yolu açıklığa kavuşturan bir çalışmada mide kanseri için bir biyobelirteç niteliği taşımaktadır (Li, D., ve ark. 2019).

Bilinen bir katepsin B (CatB) inhibitörü olan sistatin SN (CST1), tümör gelişiminde önemli rollere sahiptir. Paradoksal olarak, CatB, tümör gelişimi ve invazyon gibi hücresel süreçlerde etki eden sistatin katepsin ailesinin bir üyesidir. Ancak, CST1 ve CatB arasındaki ilişki ve tümör gelişimindeki rolleri yeterince anlaşılmamıştır. CST1'in baskılanmasının, hücresel yaşlanmanın bir belirteci olan yaşlanmayla ilişkili β -galaktozidaz aktivitesini ve MDA-MB-231 ve SW480 kanser hücrelerinde interlökin-6 ve kemokin (CC motif) ligandı 20 dahil olmak üzere yaşlanmayla ilişkili salgı fenotip genlerinin ekspresyonunu indüklediği gözlemlenmiştir. CST1 baskılanması, hücre dışı CatB aktivitesini azalttı ve doğrudan CatB inhibisyonu, hücresel yaşlanmayı indüklemiştir. CST1 aracılı ekstraselüler CatB aktivitesinin hücresel yaşlanmayı önleyerek tümör gelişimini artırdığını göstermiştir. CST1 baskılanmasının hücresel yaşlanmanın indüklenmesi yoluyla kanser hücresi çoğalmasını azalttığını göstermektedir. Hücre dışı CatB aktivitesinin CST1 tarafından pozitif olarak düzenlendiğini ve hücre yaşlanmasının önlenmesi için gerekli olduğunu göstermektedir. Hücre dışı sistatin SN ve katepsin B, anormal glikojen birikimini engelleyerek hücresel yaşlanmayı önler. CST1'in baskılanması hücresel yaşlanmayı tetikler. CST1 baskılanmasının hücresel yaşlanmanın indüksiyonu yoluyla kanser hücresi çoğalmasını azalttığını da göstermektedir. (Oh SS. ve ark., 2017).

1.4. NFE2L2, NFE2 benzeri bZIP transkripsiyon faktörü2 [Homo sapiens (insan)]

(Gen Kimliği: 4780, 28-Nis-2025 tarihinde güncellendi).

Kromozomal yerleşim: 2ç31.2

Diğer adları: NRF2; HEBP1; Nrf-2; IMDDHH

1.4.1. Genin Özellikleri

Bu gen, temel lösin fermuarı (bZIP) proteinlerinin küçük bir ailesinin üyesi olan bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Kodlanan transkripsiyon faktörü, promotörlerinde antioksidan tepki elementleri (ARE) içeren genleri düzenler; bu genlerin çoğu, serbest radikallerin üretimini

içeren yaralanma ve inflamasyona yanıt olarak yer alan proteinleri kodlar. Bu gen için farklı izoformları kodlayan birden fazla transkript varyantı karakterize edilmiştir. [RefSeq tarafından sağlanmıştır, Eylül 2015], Anonim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4780>[Son erişim tarihi:05.05.2025].

1.4.2. Yaşlanmadaki İşlevi

Transkripsiyon faktörü Nrf-2, 1997 yılında biyokimyacı Masayuki Yamamoto tarafından Tsukuba Üniversitesi'nde belirsizlikten ortaya çıktı. Antioksidan proteinler, detoksifiye edici enzimler, ilaç taşıyıcıları ve çok sayıda sitoprotektif protein dahil olmak üzere hücrel homeostazda yer alan yaklaşık 250 geni düzenler. ARE/EpRE'ye (antioksidan yanıt) etkili bağlanma için küçük Maf proteinleri (MafG, MafK, MafF) ile NFE2L2 heterodimerizasyonu gereklidir(Silva-Palacios A. ve ark., 2018).

Hücreler, farklı bağlamlarda kemoprotektif genlerin normal ve indüklenmiş ekspresyonunu kontrol etmek için çekirdekdeki NFE2L2 içeriğini otomatik olarak düzenler. Bununla birlikte, toplam NFE2L2 proteini yaşlanmanın bir sonucu olarak mutlaka azalmaz. Stressiz bazal koşullar altında yetişkin ve yaşlı sıçanlarda benzer kardiyak NFE2L2 seviyeleri bulunmuştur. Oysa doğal olarak uzun ömürlü çıplak köstebek faresinde NFE2L2 bolluğu, daha kısa ömürlü diğer kemirgen türleriyle karşılaştırılabilir düzeydedir(Silva-Palacios A. ve ark., 2018)

Epigenetik, gen ifadesinde kalıtsal değişiklikler üreten, nükleotid dizisindeki değişikliklerle ilişkili olmayan fakat daha ziyade transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya erişiminin kısıtlanmasıyla ilgili olan moleküler olayları inceler. Histonlarda sitozin metilasyonu ve translasyon sonrası modifikasyon en çok araştırılan epigenetik değişikliklerdir, ancak mikro-RNA (miRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) da son araştırmada incelenmiştir. Bu rollerini karmaşık bir bileşime ve çok yönlü fiziksel özelliklere sahip olarak gerçekleştirir. Protein ve iyon bileşenleri, %99'u sudan oluşan bir çözeltiyi, yağlayıcı ve antimikrobiyal olarak hareket etme, dişlerin erimesini önleme, sindirime yardımcı olma ve tadı kolaylaştırma gibi birçok görevi üstlenebilen viskoelastik bir çözelti haline getirir(Silva-Palacios A. ve ark., 2018).

1.5. GPR19; G protein-bağlantılı reseptör 19 [Homo sapiens (insan)]

(Gen Kimliği: 2842, 3-May-2025 tarihinde güncellendi).

Kromozomal yerleşim: 12s13.1

1.5.1. Genin Özellikleri

G proteinine bağlı reseptör aktivitesini etkinleştirilmesi öngörülmüştür. G proteinine bağlı reseptör sinyalleme yolunda yer alması öngörülmüştür. Silyumda yer almaktadır.[Alliance of Genome Resources tarafından sağlanmıştır Mayıs2025].

Anonim:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2842#gene-expression> [Son erişim tarihi: 05.05.2025].

1.5.2. Yaşlanmadaki İşlevi

G proteinine bağlı reseptörler (GPCR'ler), yaşlanma ve yaşlanmayla ilişkili hastalıklar gibi biyolojik paradigmaları kontrol etmede önemli bir rol oynar. GPR19'un işlevselliğinin yaşlanmayla ilişkili patolojiyle ilişkili duyusal, koruyucu ve iyileştirici sinyal sistemleriyle bağlantılıdır. Ayrıca reseptörün aktivitesinin koruyucu ve iyileştirici sinyal sistemlerini teşvik ederek yaşlanmayla ilişkili patolojinin etkilerini hafifletmede rolü olabilir. Yapılan çalışmalar G proteinine bağlı reseptör (GPCR) sistemlerinin yaşlanma sürecinde önemli, çok boyutlu bir rol oynadığını göstermiştir. HEK293 hücrelerinde düşük ifade seviyelerinde, GPR19 ifadesi stres tepkileri ve bunlara karşı metabolik tepkilerle bağlantılı sinyal paradigmasını düzenler. Daha yüksek ifade seviyelerinde, GPR19 ifadesi DNA hasarını algılama ve onarmada yer alan sistemleri birlikte düzenlerken, GPR19 ifadesinin en yüksek seviyelerinde, hücrel yaşlanma süreçlerine işlevsel bir bağlantı görülür. Bu şekilde, GPR19 yaşlanmayla ilişkili metabolik işlev bozukluğunun, stres tepkisinin, DNA bütünlüğü yönetiminin ve nihai yaşlanmanın koordinatörü olarak işlev görebilir. GPR19'un yaşlanma sürecinde tamamlayıcı moleküler aktiviteleri düzenleyebileceği öngörülmektedir. GPR19 lipit metabolizmasıyla güçlü bir şekilde ilişkilidir. GPR19 ekspresyonunun, peroksit kaynaklı oksidatif stres veya DNA hasarı tarafından indüklenen zararlı etkileri azalttığı belirlenmiştir. Daha yüksek ifade seviyelerinde, GPR19 ifadesi DNA hasarını algılama ve onarmada yer alan sistemleri birlikte düzenlerken, GPR19 ifadesinin en yüksek seviyelerinde, hücrel yaşlanma süreçlerine işlevsel bir bağlantı görülür. Bu şekilde, GPR19 yaşlanmayla ilişkili metabolik işlev bozukluğunun, stres tepkisinin, DNA bütünlüğü yönetiminin ve nihai yaşlanmanın koordinatörü olarak işlev görebilirliği düşünülmektedir (Maudsley S, ve ark., 2023).

1.6. GAPDH; gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz [Homo sapiens (insan)].

(Gen Kimliği: 2597, 3-May-2025 tarihinde güncellendi).

Kromozomal yerleşim: 12p13.31

Anonim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597> [Son erişim tarihi: 05.05.2025]

1.6.1. Genin Özellikleri

Bu gen, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz protein ailesinin bir üyesini kodlar. Kodlanan protein, mekanik olarak farklı işlevleri yerine getirme yeteneğine dayanarak bir ek iş yapan protein olarak tanımlanmıştır. Bu genin ürünü, karbonhidrat metabolizmasında önemli bir enerji üreten adımı, inorganik fosfat ve nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) varlığında gliseraldehit-3-fosfatın geri dönüşümlü oksidatif fosforilasyonunu katalize eder. Kodlanan

proteinin ayrıca çekirdekte urasil DNA glikozilaz aktivitesine sahip olduğu tanımlanmıştır. Ayrıca, bu protein E. coli, P. aeruginosa ve C. albicans'a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip bir peptit içerir. Farede benzer bir proteinin çalışmaları, nükleer proteinlerin nitrozilasyonu, mRNA stabilitesinin düzenlenmesi ve makrofajın hücre yüzeyinde transferin reseptörü olarak hareket etme dahil olmak üzere çeşitli ek işlevler atamıştır. Bu lokusla benzer birçok psödogen insan genomunda mevcuttur. Alternatif ekleme, çoklu transkript varyantlarıyla sonuçlanır. [RefSeq tarafından sağlanmıştır, Kasım 2014] Anonim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597> [Son erişim tarihi: 05.05.2025]

CST1 ve NFE2L2, GPR19 genlerinin tükürük örneklerinde ekspresyon düzeyleri, bireylerin yaşlarına bağlı olarak anlamlı farklılık göstermektedir ve bu genler, yaş tayini amacıyla kullanılabilir potansiyel biyobelirteçlerdir. Bu çalışmanın temel amacı, farklı yaş gruplarına ve cinsiyetlere sahip bireylerin yaş tayinin kolaylaştırarak anlamlı biyobelirteçlerin belirlenmesine katkı sağlamaktır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

(GPR19, CST1 ve NFE2L2 genlerinin yaşla bağlantılı ekspresyonlarına dair literatür karşılaştırmaları)

2.1. GPR19

G proteinine bağlı reseptörler (GPCR'ler), yaşlanma ve yaşlanmayla ilişkili hastalıklar gibi biyolojik paradigmaları kontrol etmede önemli bir rol oynar. Bir çalışmada yaşlanma sürecinin birçok moleküler yönüne duyarlı olan bir psödo-yetim GPCR, G proteinine bağlı reseptör 19 (GPR19) tanımlanmış ve proteomik, moleküler biyolojik ve gelişmiş bilişim deneylerini içeren derinlemesine bir moleküler araştırma süreciyle, yaşlanma patolojisiyle ilişkili duyuşal, koruyucu ve iyileştirici sinyal sistemleriyle özel olarak bağlantılı olduğu bulunan bir çalışmada bu reseptörün aktivitesinin koruyucu ve iyileştirici sinyal sistemlerini teşvik ederek yaşlanmayla ilişkili patolojinin etkilerini hafifletmede bir rol oynayabileceğini öne sürüyor (Maudsley S, ve ark., 2023).

GPR19 kodlayan mRNA, küçük hücreli akciğer kanseri hastalarından alınan doku örneklerinde sıklıkla aşırı ifade edildiği bulundu. Birkaç gözlem, Gpr19'un aşırı ifadesinin, hücre döngüsü boyunca geçişi hızlandırarak akciğer kanseri hücrelerine belirli bir avantaj sağladığını göstermektedir. RNA müdahalesiyle Gpr19 mRNA' sının devre dışı bırakılması, insan akciğer kanseri hücre dizilerinin hücre büyümesini azalttı. Gpr19'a karşı yönlendirilmiş siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde G₂ –M fazı boyunca hücre döngüsü ilerlemesi bozuldu ve bu, siklin B1 ve fosforile histon H3'ün artan protein seviyeleriyle ilişkilendirildi. Gpr19 mRNA'nın ifade düzeyleri hücre döngüsü boyunca değişti ve S fazında bir zirve gözlemlendi. Gpr19 ifadesinin E2F transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edildiği varsayımı kromatin immünoçöktürmesiyle doğrulandı: E2F-1 ile -4'e yönelik antikörler Gpr19 promotörünün geri kazanılmasını sağladı. Gpr19 promotöründe E2F bağlanma bölgelerinin çıkarılması bir lüsiferaz muhabirinin ifadesini azalttı. E2f ve Gpr19 ifadesi akciğer kanseri hasta örneklerinde korelasyon gösterdi. Bildiğimiz kadarıyla bu, hücre döngüsüne özgü mRNA ifadesini gösteren bir GPCR'nin ilk örneğidir. Verilerimiz ayrıca GPR19'un akciğer kanserinde aşırı ifade edildiğinde bir aday hedef olduğunu doğrulamaktadır. (Kastner S., ve ark. 2012).

2.2. CST1

Başka bir çalışma, yaşlanan hücrelerin bu süreçte çok sayıda genin de değişmiş ifadesini sergilediğini öne sürmektedir. Buna göre gen ifadesindeki değişiklikleri açıklığa kavuşturmak yaşlanma biyolojisini anlamamıza yardımcı olabilir. Çalışmada hücre yaşlanma sırasında, CST1 ifadesinin tutarlı ve güçlü bir şekilde yukarı düzenlendiği ifade edilmiştir. Hem mRNA hem de protein seviyelerinde CST1 ifadesi, erken geçiş çoğalan, durgun veya ölümsüz insan

fibroblastları ve çeşitli insan tümör hücre hatlarını içeren kontrol hücrelerinde çok düşük miktarlarda olduğunu bildirmiştir. İmmüno-blotlama ve immüno-floresan sitokimyasal çalışmalar ayrıca CST1'in veziküler yapılar içinde hücre içinde biriktiğini ileri sürmektedir. (Kepler D, ve ark., 2011).

2.3. NFE2L2

NFE2L2, üyeleri temel bir lörin fermuar alanı (bZIP) içeren Cap'n'collar (CNC) proteinleri ailesine aittir. Aile, iki gruba ayrılmış altı bilinen üyeden oluşur. İlk grup, dört nükleer faktör eritroid türevi faktörden oluşur: p45 NF-E2 ve NFE2L1, **NFE2L 2** ve NFE2L 3. Transkripsiyonel düzenlemenin analizindeki son gelişmeler, birçoğu izole edilmiş olan Maf ve Cap 'n' collar (CNC) düzenleyici protein ailelerini içeren mükemmel bir işlevsel ağıın varlığını ortaya koymuştur. Maf faktörleri arasında, büyük Maf proteinleri embriyonik gelişim ve hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde önemliyken, küçük Maf proteinleri CNC ailesinin üyeleri için zorunlu heterodimerik ortak moleküller olarak görev yapar. Transkripsiyon faktörlerinin Maf ve CNC ailelerinden oluşan düzenleyici ağıın moleküler temelinin çözülmesi şüphesiz transkripsiyon faktörlerinin işbirlikçi işlevi için de bir çözümleme niteliği taşır. Örneğın bir düzenleme şekli olarak CNC proteinlerinin bir transkripsiyon ko-faktörüne bağlanma yeteneğine bağlı olarak, antioksidan genlerin transkripsiyonunu ya uyarır ya da durdururlar. (Motohashi, H., ve.ark., 2002).

NFE2L2'nin işlevselliği, bazı amino asitlerin fosforilasyonu ve amino asit kalıntılarının asetilasyonu sonucunda etkilenerek transkripsiyon, translasyon, translasyon sonrası modifikasyonlar, nükleer translokasyon ve düzenlenmiş genlerin promotörlerine bağlanma seviyelerinde değişebilir. (Zenkov, NK, ve ark. 2017). NFE2L2 hücrel homeostazda yer alan yaklaşık 250 geni doğrudan düzenler. Örneğın antioksidan proteinler, detoksifiye ediciler, ilaç taşıyıcıları ve diğeri sitoprotektif proteinler, örneğın NAD(P)H: kinon-oksido-reduktaz 1 (NQO-1), γ -glutamilsistenil sentetaz, glutatyon-S-transferaz ve hem oksijenaz 1 (HO-1) bunlara dahildir. Transkripsiyon faktörü nükleer faktör-eritroid 2 p45 ilişkili faktör 2 (Nrf2, NFE2L2 adı verilen genle) antioksidan tepkisinin ana düzenleyicisidir. Son on yılda, birkaç fizyolojik ve patolojik süreçteki önemi yaygın olarak kabul edildiğinden bu araştırma alanına olan ilgi yoğunlaşmıştır; bunlara redoks sinyalizasyonu ve redoks homeostazisi, ilaç metabolizması ve dağılımı, aracı metabolizma, strese hücrel adaptasyon, kemoprevansiyon ve kemorezistans, toksisite, inflamasyon, nörodejenerasyon, lipogenez ve yaşlanma dahildir. (O'Connell, Maria A., and John D. Hayes., 2015).

GPR19 (G Proteinine Bağlı Reseptör 19): GPR19 geni, yaşlanma biyolojisi ile ilişkili sinyal yollarında rol oynayan yetim GPCR ailesinin bir üyesidir. Literatürde GPR19'un, metabolik kontrol, sirkadiyen ritim düzenlemesi ve stres yanıtları gibi yaşlanmayla ilişkili temel süreçlerde önemli bir işlevi olabileceği belirtilmiştir (Maudsley, S., ve ark.,2022). Nitekim

Stuart Maudsley ve arkadaşlarının (2022) derlemesine göre, GPR19'un sinyal yolları yaşlanmaya bağlı hastalıkların etiolojisinde önemli yer tutmaktadır (Maudsley, S., ve ark.,2022) . Deneysel veriler, hücre kültürü modellerinde GPR19 ifadesinin düzeyine bağlı olarak farklı yaşlanma mekanizmalarını etkilediğini göstermiştir. Düşük GPR19 ekspresyon seviyelerinde hücrelerdeki stres ve metabolik tepki ile ilişkili sinyaller düzenlenirken, daha yüksek GPR19 seviyelerinde DNA hasarını algılama ve onarma sistemleri devreye girmekte; en yüksek GPR19 ekspresyonunda ise hücrel yaşlanma (senesens) süreçleri ile fonksiyonel bir bağlantı ortaya çıkmaktadır . Bu bulgular, GPR19'un yaşlanmaya bağlı metabolik işlev bozukluğu, stres tepkisi, DNA bütünlüğünün korunması ve nihayetinde hücrel yaşlanma süreçlerinin bir koordinatörü olabileceğini düşündürmektedir (Maudsley, S. ve ark. 2022). Ancak insanlarda GPR19 ekspresyonunun yaş ile nasıl değiştiğine dair doğrudan veriler sınırlıdır; mevcut çalışmalar daha çok GPR19'un yaşlanma ile ilişkili patolojilerdeki rollerine odaklanmıştır. Örneğin, hızlandırılmış yaşlanma fenotipine sahip hayvan modellerinde GPR19 gen ekspresyonunun değişime uğradığı bildirilmiştir (örn. GPR19'un artan yaşlanma stresine yanıt olarak düzenlenmesi) (Maudsley, S., ve ark.,2023). Bu bağlamda, GPR19 geninin olası bir biyogerontoloji hedefi olarak görüldüğünü ve terapötik stratejilerde yaşlanma sürecini etkilemek amacıyla araştırıldığını belirtmek gerekir(Maudsley, S., ve ark.,2022).

CST1 (Cystatin SN): CST1 geni tükürük bezi ve diğer mukozal dokularda ifade edilen bir sistein proteaz inhibitörünü kodlar ve doku homeostazında rol oynar. Yaşlanma ile ilişkili olarak CST1 geninin özellikle hücrel yaşlanma (senesens) bağlamında dikkat çektiği görülmektedir. Yapılan çalışmalar, hücre kültürü modellerinde farklı nedenlerle tetiklenen senesens sırasında CST1 ekspresyonunun belirgin ve sürekli biçimde arttığını ortaya koymuştur. Örneğin, bir çalışmada çeşitli uyarıcılarla senesense sokulan hücrelerde CST1 geninin diğer genlere kıyasla en yüksek oranda (katlanarak) yukarı regüle olduğu bildirilmiştir (Keppler, D., ve ark. 2021). Bu bulgular CST1'in senesens belirteci olabileceğine işaret etmektedir.

Hücrel düzeydeki veriler, CST1'in yaşlanmış hücrelerde birikerek proteaz aktivitesini kontrol altına alabileceğini ve böylece yaşlanmanın doku hasarına yol açan etkilerini sınırlamaya çalışabileceğini düşündürmektedir. Literatürde klinik düzeyde de CST1'in yaşla ilişkisini dolaylı gösteren veriler mevcuttur: Örneğin periodontal hastalıklar gibi yaşla insidansı artan durumlarda tükürükte CST1 düzeylerinin değiştiği, gençlere kıyasla ileri yaş gruplarında farklı ekspresyon paternleri gözlenebileceği rapor edilmiştir (Keppler, D., ve ark. 2021; Lira-J.R. ve ark. 2017). Bununla birlikte, doğrudan sağlıklı bireylerde yaş ilerledikçe CST1 gen ekspresyonunun nasıl değiştiği konusunda sınırlı veri vardır. Mevcut bulgular daha çok patolojik veya hücrel yaşlanma modellerinden elde edildiğinden, CST1'in doğal yaşlanma sürecindeki rolü tam olarak aydınlatılmayı beklemektedir.

NFE2L2 (NRF2): NFE2L2 geni, hücrelerin antioksidan savunma mekanizmalarının ana düzenleyicisi olan NRF2 transkripsiyon faktörünü kodlar ve yaşlanma ile ilişkisi en iyi bilinen genlerden biridir. Yaşlanmanın ilerlemesiyle NRF2 aktivitesi ve ekspresyonunda azalma olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir. Örneğin, yapılan bir çalışmada yaşlı farelerin beyin korteksinde NFE2L2 gen ekspresyonunun gençlere oranla belirgin biçimde düştüğü tespit edilmiştir (Gureev, AP, ve ark. 2022). Benzer şekilde, insanlar ve farklı hayvan türlerinde çeşitli dokularda ileri yaşlarla birlikte NRF2 seviyelerinde azalma saptanmıştır (Shrestha L., ve ark. 2025). Bu durum, yaşlılıkta hücrelerin oksidatif stresle mücadele kapasitesinin azalmasına yol açmaktadır. Öte yandan bazı uzun yaşamlı hayvan modellerinde NRF2 yolunun daha aktif kalabildiği ve bunun yaşlanmayı yavaşlatıcı etkileri olabileceği öne sürülmüştür. Literatür karşılaştırması yapıldığında, NFE2L2 geninin ekspresyonunun ve NRF2 aktivitesinin yaşlanma süresince genellikle negatif yönlü bir seyir izlediği konusunda görüş birliği vardır; ancak dokuya ve koşullara bağlı olarak farklı dinamikler gözlenebileceği de belirtilmektedir. Örneğin, beynin hipokampus bölgesinde yukarıda bahsedilen çalışmada NRF2 ekspresyonunda anlamlı bir değişim saptanmamıştır (Gureev, AP, ve ark. 2022), bu da yaşlanmanın etkilerinin doku spesifik olduğunu göstermektedir. Genel olarak GPR19, CST1 ve NFE2L2 genlerine dair literatürdeki bulgular, bu genlerin yaşlanmayla ilişkili hücresel süreçlerde rol oynadığını ortaya koymakta ve tez bulgularımızda gözlenen ekspresyon değişimlerinin biyolojik olarak anlamlı olabileceğini desteklemektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

- Falcon Tüpleri(GREINER 50 ml)
- Ependorf Tüpleri(SİGMA 1.5 ml konikal)
- Pipet Uçları(AXYGEN / 2-10-200-1000 µl)
- Mikropipet tabancaları(Thermo SCI./ 0.5-10,2-20,10-100,100-1000 µl)

3.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

- Vortex (HEIDOLPH)
- Yarı Islak Isıtıcı Blok (DLAB)
- Santrifüj (DLAB)
- Derin dondurucu(-80°C / -20°C)
- Spektrofotometre (NanoPhotometer/IMPLEN)
- AZURE CIELO qPCR System (Model: Azure Cielo 3)
- Termal Cycler (AB-Applied Biosystem 2720)

3.1.3. Çalışmada kullanılan kitleler

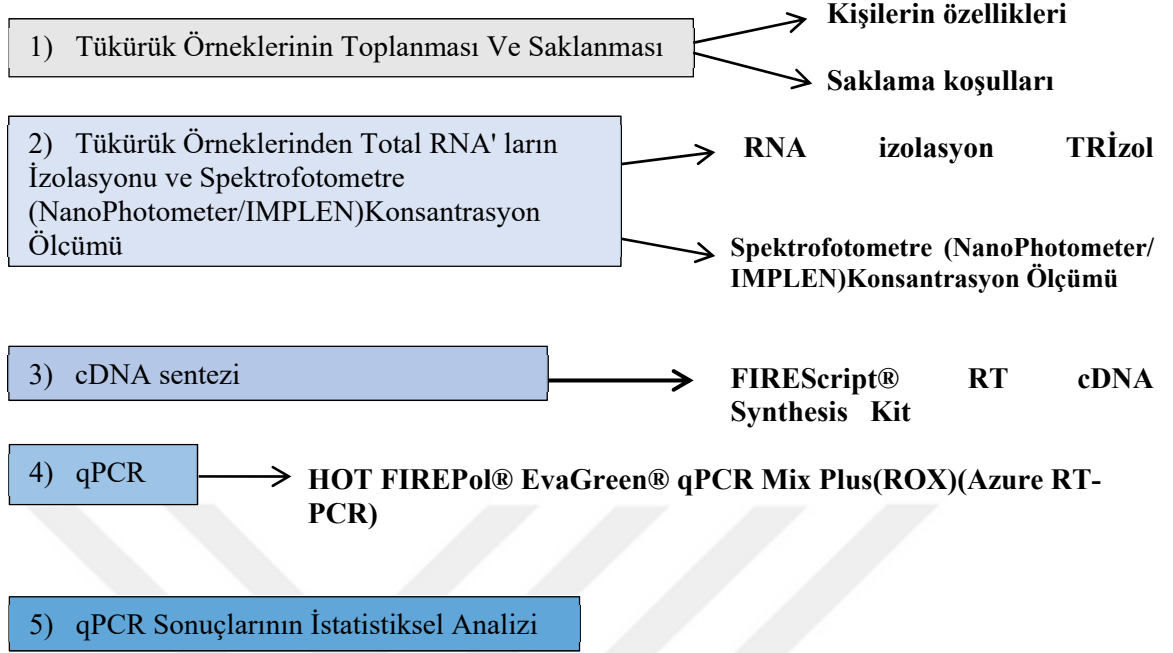
- **cDNA Kiti**(SOLİS BİODYNE/FIREScript® RT cDNA synthesis KIT)
- **qPCR MasterMix Kiti**(SOLİS BİODYNE/HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX), 5x)
- **50 nmol Primer** (Sentebiolab)

3.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar

- Total RNA izolasyon (QIAzol/TRİzol)
- 2-Propanol
- Kloroform ve Etanol
- Distile su

Malignite, otoimmün bozukluklar, metabolik bozukluklar öyküsü yok. Ayrıca, son 6 ay içinde bulaşıcı hastalık öyküsü bildirilmemiştir.

3.2. Metot



Şekil 1. Metot ve yöntem için araştırma süresince izlenecek yolu ifade etmektedir.

3.2.1. Tükürük Örneklerinin Toplanması Ve Saklanması

- Deneklerden numune alınmadan önce en az bir saat boyunca yemek yememeleri veya içmemeleri istendi
- Tükürük toplamadan önce ağızlarında biriktirmeleri istendi
- Uyarılmamış tam tükürük pasif salya akıtma yöntemiyle 50 ml'lik steril DNaz ve RNaz içermeyen tüplerde toplandı
- RNA hazırlanmasından önce tüm numuneler 2 saate kadar kuru buz üzerinde donduruldu. Her yaş grubu için eşit sayıda erkek ve kadın katılımcı sağlanarak (20 erkek ve 20 kadın olmak üzere) toplamda 40 sağlıklı gönüllüden tükürük örnekleri alındı. 4 yaş öncesi donörlerden örnek almanın zorlukları neticesinde başlangıç yaş grubu 4 olarak belirlendi. Ayrıca 30 yaş ve üzeri donörlerin yapılan pilot çalışmalarda anlamlı bir farklılık ifade etmediği gözlemlendi. Çalışma sırasında tükürük örneklerinin toplandığı gönüllülerin her birinden onam formu alındı. Ayrıca 4 Ocak 2024 tarihli, toplantı sayısı: 140 ve karar no: 41 künyesi ile etik kurul onayı alındı.

Tükürük örnekleri yaşa göre dört gruba ayrıldı:

1.grup(Çocuk)	: 4-9
2.grup(Genç)	: 14-19
3.grup(Genç-Yetişkin)	: 24-29
4.grup(Orta yaş/ Yaşlı)	: ≥30

**Hemen çalışılmayacak ise tükürük, DNaz ve RNaz içermeyen Falcon tüplerinde (50 ml) toplanıp, kuru buz üzerinde dondurulup sonraki analize kadar -80 °C de saklanmalı.*

ön işlemler:

Tükürük örnekleri oda sıcaklığında çözüldü. Örnekler 1,5 ml steril DNase ve RNase içermeyen tüplere 1 ml'lik parçalara bölündü. 13400x g' de ve 4°C'de 20 dakika santrifüj edildi. -80 buzdolabında saklandı.

3.2.2. Tükürük Örneklerinden Total RNA' ların İzolasyonu ve Spektrofotometre (NanoPhotometer/IMPLEN)Konsantrasyon Ölçümü

Tükürük Örneklerinden Total RNA' ların İzolasyon

Tükürük örneklerinden Total RNA izolasyonu yapılabilmesi için **QIAzol** marka **TRİzol** kullanılarak Total RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ticari marka Total RNA izolasyon kitinin belirlemiş olduğu prosedür:

- **TRİzol** yöntemi için, tükürük örnekleri, süpernatantı hücresel fraksiyondan ayırmak için 4 °C de 20 dakika boyunca 13400x g' de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.
- Pellet e 1000µl **TRİzol** eklenerek örnekler kısaca vorteks ile oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- Her 1,5 ml Eppendorf tüpüne 200 µl **kloroform** eklendi ve 20 sn. vorteksle kuvvetli karıştırılıp ikinci kez 5 dk.oda sıcaklığında inkübe edildi. Numuneler daha sonra 13400x g'de 20 dakika 4 °C de santrifüjlendi. **3 faz gözlendi.**
- Üst sulu katman (500 µl) yeni bir 1,5 ml eppendorf tüpüne aktarıldı. Eppendorf tüpüne 500 µl **2-Propanol** ilave edildi ve tüp vortekslendi. 1saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Numuneler daha sonra 13400x g 'de 4 °C de 20dk. santrifüjlendi. Üst sulu katman atıldı.
- Pelet 1 ml %70 lik etanol ile yıkandı. Ortamdan **etanol** uzaklaştırıldı. 30 µl RNaz içermeyen suda yeniden süspansiyon edildi.

- Son kısım örnek 25 µl (-80°Cde) cDNA sentezi için ve 5 µl şeklinde Spektrofotometre_(NanoPhotometer/IMPLEN) ile total RNA ölçümleri için ayrıldı. Ölçüm sonuçları TABLO 1.'de görüldüğü gibi tespit edildi.

Spektrofotometre (NanoPhotometer/IMPLEN) Konsantrasyon Ölçümü:

Total RNA izolasyonu sonucunda elde edilen toplam solüsyondan ayrılan 5 µl örneğimiz kullanılmıştır. Cihazın önce boş darası distile su ile alınmış(3-5 µl). Temizlenen cihaza 4 µl örnek yüklenerek ölçüm alınmıştır. Ölçümler µl /ng şeklinde TABLO 1. de kaydedilip gösterilmiştir.

Tablo 1. Araştırmada kullanılan tükürük örneklerinden elde edilen Total RNA'ların konsantrasyonları ve Spektrofotometre (NanoPhotometer/IMPLEN) ile 260/280 dalga boylarında ölçüm sonuçları

Örnek no	Öneklerin Yaşları-Cinsiyet	Konsantrasyon(ng/µl)	260/280(Safılık)	Örnek Yaş Grupları
1	6-KIZ	612	1,824	4-9 YAŞ
2	8-ERKEK	217	1,76	
3	11-ERKEK	271	1,73	1, 2,3,4,5,6,7,8,9,10
4	10-ERKEK	522	1,584	
5	6,5-ERKEK	117	1,703	
6	10-ERKEK	250	1,793	
7	7-KIZ	644	1,62	
8	9-KIZ	272	1,816	
9	11-KIZ	878	1,474	
10	4-KIZ	156	1,444	
11	23-ERKEK	176	1,659	24-29 YAŞ
12	23-ERKEK	492	1,569	
13	24-KIZ	721	1,563	11,12,13,14,15,16
14	27-ERKEK	423	1,221	17,18,19,20
15	23-ERKEK	816	1,487	
16	26-KIZ	222	1,581	
17	28-KIZ	106	1,529	
18	28-ERKEK	338	1,594	
19	24-ERKEK	254	1,507	
20	23-KIZ	579	1,714	
21	14-KIZ	211	1,684	14-19 YAŞ
22	14-KIZ	205	1,598	
23	19-KIZ	512	1,752	21,22,23,24,25,26,
24	17-ERKEK	492	1,456	27,28,29,30,35
25	16-KIZ	880	1,525	
26	18-ERKEK	550	1,778	
27	19.5-KIZ	801	1,564	
28	17-ERKEK	252	1,694	
29	16-ERKEK	562	1,569	
30	20-KIZ	618	1,757	
31	70-ERKEK	893	1,048	>>30yaş
32	34-KIZ	297	1,598	
33	34-ERKEK	864	1,514	31,32,33,34,36
34	46-ERKEK	665	1,412	37, 38, 39
35	22-ERKEK	798	0,98	
36	39-ERKEK	720	1,682	
37	67-KIZ	840	1	
38	32-KIZ	846	1,638	
39	30-KIZ	632	1,773	

TABLO 1. Araştırmada kullanılan tükürük örneklerinden elde edilen Total RNA 'ların konsantrasyonları ve Spektrofotometre (NanoPhotometer/IMPLEN) ile 260/280 dalga boylarında ölçüm sonuçları.Örnekler alınış zamanına göre sıralanmış ve gruplanmıştır.

3.2.3.cDNA Sentezi:

FIREScript® RT cDNA Synthesis Kit Protokolüne uyularak her bir örnek başına,

Tablo.2. cDNA sentez kit protokolü

Template RNA	5µl	
Oligonükleotid	1µl	
d NTP	0,5µl	
10x RT buffer	2µl	
FIREScript	1µl	
Rnase inhibitör	0,5µl	
Nükleaz free H ₂ O	10µl	
Toplam 20µl olacak şekilde Nükleaz free H ₂ O ile düzenek tamamlandı ve kit protokolüne uyularak qPCR cihazı hazırlandı.		
Primer anneling	25°C	5-10 Dk.
Reverse Transcriptase	50°C	30 Dk.
Enzim inaktivasyon	85°C	5 Dk.
TABLO 2. cDNA sentez kit protokolü.		

Tabloda düzenlenen protokol ile cDNA sentezi gerçekleştirildi.

3.2.4.qPCR:

HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus(ROX) Kit Protokolüne uyularak her bir örnek için hazırlanan Mix,

Tablo.3. qPCR çalışma protokolü

qPCR Toplam Konsantrasyon içeriği	miktar		
qPCR mix Plus (5x)	4µl		
Forward Primer	1µl		
Reverse Primer	1µl		
DNA Template	5µl		
H ₂ O PCR Grade	9µl		
şeklinde her örnek için ayrı ayrı hazırlandı.			
Kit prosedürüne uygun olarak qPCR cihazı hazırlandı.			
qPCR Protokolü:			
Cycle step	sıcaklık	time	cycle
initial activation	95°C	12Dk.	1
denaturation	95°C	15 sn.	40
anneling	60-65°C	20 sn.	40
extension	72°C	20 sn.	40
TABLO 3: qPCR çalışma protokolü.			

Tabloda düzenlenen protokol ile çalışıldı ve sonuçlar kaydedildi.

3.2.5. Primerler

CST1	Forward: 5'-TTCTTCGACGTAGAGGTGGG-3' Reverse: 5'-CCAGGGACCTTCTGTTCTCC-3'
NFE2L2	Forward: 5'-TCCTTCAGCAGCATCCTCTC-3' Reverse: 5'-AAGTAGCAGGTGAGGGCATG-3'
GPR19	Forward: 5'-GCCAAGAAAATGATTGCGGC-3' Reverse: 5'-GGAATCACAAAGCCCACCAA-3'

Kullanılan Primerler: <https://primer3.ut.ee/> aracılığı ile çalışılan genler için dizayn edilmiştir[Son erişim Tarihi: 05.05.2025].

Tablo 4. İlk 24 örneğin plate düzeneğindeki yerleşimi. Tablo 5. PCR reaksiyonları için hazırlanan plate düzeneğinde harf ve rakamlarla belirlenen kuyucuklara yüklenen tükürük örneklerinin ait olduğu kişilerin yaş ve cinsiyetleri.

Tablo 4.PCR plate düzeni		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
●GAPDH	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
●CST1	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	D	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
●NFE2L2	E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	F	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
●GPR19	G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	H	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

Tablo 5. Her bir plate örneğinin yaş ve cinsiyet aralıkları		CST1		NFE2L2		GPR19	
A1(1)	6yaş/kız	C1(1)	6yaş/kız	E1(1)	6yaş/kız	G1(1)	6yaş/kız
A2(2)	8yaş/erk	C2(2)	8yaş/erk	E2(2)	8yaş/erk	G2(2)	8yaş/erk
A3(3)	11yaş/erk	C3(3)	11yaş/erk	E3(3)	11yaş/erk	G3(3)	11yaş/erk
A4(4)	10yaş/erk	C4(4)	10yaş/erk	E4(4)	10yaş/erk	G4(4)	10yaş/erk
A5(5)	6,5/erk	C5(5)	6,5/erk	E5(5)	6,5/erk	G5(5)	6,5/erk
A6(6)	10/erk	C6(6)	10/erk	E6(6)	10/erk	G6(6)	10/erk
A7(7)	7/kız	C7(7)	7/kız	E7(7)	7/kız	G7(7)	7/kız
A8(8)	9/kız	C8(8)	9/kız	E8(8)	9/kız	G8(8)	9/kız
A9(9)	11/kız	C9(9)	11/kız	E9(9)	11/kız	G9(9)	11/kız
A10(10)	4/kız	C10(10)	4/kız	E10(10)	4/kız	G10(10)	4/kız
A11(11)	23/erk	C11(11)	23/erk	E11(11)	23/erk	G11(11)	23/erk
A12(12)	23/erk	C12(12)	23/erk	E12(12)	23/erk	G12(12)	23/erk
B1(13)	24/kız	D1(13)	24/kız	F1(13)	24/kız	H1(13)	24/kız
B2(14)	27/erk	D2(14)	27/erk	F2(14)	27/erk	H2(14)	27/erk
B3(15)	23/erk	D3(15)	23/erk	F3(15)	23/erk	H3(15)	23/erk
B4(16)	26/kız	D4(16)	26/kız	F4(16)	26/kız	H4(16)	26/kız
B5(17)	28/kız	D5(17)	28/kız	F5(17)	28/kız	H5(17)	28/kız
B6(18)	28/erk	D6(18)	28/erk	F6(18)	28/erk	H6(18)	28/erk
B7(19)	24/erk	D7(19)	24/erk	F7(19)	24/erk	H7(19)	24/erk
B8(20)	23/kız	D8(20)	23/kız	F8(20)	23/kız	H8(20)	23/kız
B9(21)	14/kız	D9(21)	14/kız	F9(21)	14/kız	H9(21)	14/kız
B10(22)	14/kız	D10(22)	14/kız	F10(22)	14/kız	H10(22)	14/kız
B11(23)	19/kız	D11(23)	19/kız	F11(23)	19/kız	H11(23)	19/kız
B12(24)	17/erk	D12(24)	17/erk	F12(24)	17/erk	H12(24)	17/erk

Tablo 6. PCR örnek düzeni 25-39 numaralı örneklerin plate düzeneğindeki yerleşimi

PCR örnek düzeni		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
●GAPDH	A	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	B	37	38	39									
●CST1	C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	D	37	38	39									
●NFE2L2	E	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	F	37	38	39									
●GPR19	G	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	H	37	38	39									

Tablo 7. Her bir örneğin yaş ve cinsiyet aralıkları PCR reaksiyonları için hazırlanan plate düzeneğinde harf ve rakamlarla belirlenen kuyucuklara yüklenen tükürük örneklerinin ait olduğu kişilerin yaş ve cinsiyetleri.

GAPDH		CST1		NFE2L2		GPR19	
A1(25)	16/kız	C1(25)	16/kız	E1(25)	16/kız	G1(25)	16/kız
A2(26)	18/erk	C2(26)	18/erk	E2(26)	18/erk	G2(26)	18/erk
A3(27)	19.5/kız	C3(27)	19.5/kız	E3(27)	19.5/kız	G3(27)	19.5/kız
A4(28)	17/erk	C4(28)	17/erk	E4(28)	17/erk	G4(28)	17/erk
A5(29)	16/erk	C5(29)	16/erk	E5(29)	16/erk	G5(29)	16/erk
A6(30)	20/kız	C6(30)	20/kız	E6(30)	20/kız	G6(30)	20/kız
A7(31)	70/erk	C7(31)	70/erk	E7(31)	70/erk	G7(31)	70/erk
A8(32)	34/kız	C8(32)	34/kız	E8(32)	34/kız	G8(32)	34/kız
A9(33)	34/erk	C9(33)	34/erk	E9(33)	34/erk	G9(33)	34/erk
A10(34)	46/erk	C10(34)	46/erk	E10(34)	46/erk	G10(34)	46/erk
A11(35)	22/erk	C11(35)	22/erk	E11(35)	22/erk	G11(35)	22/erk
A12(36)	39/erk	C12(36)	39/erk	E12(36)	39/erk	G12(36)	39/erk
B1(37)	67/kız	D1(37)	67/kız	F1(37)	67/kız	H1(37)	67/kız
B2(38)	32/kız	D2(38)	32/kız	F2(38)	32/kız	H2(38)	32/kız
B3(39)	30/kız	D3(39)	30/kız	F3(39)	30/kız	H3(39)	30/kız

Yukarıdaki Tablo 4-5 ve 6-7 'de tükürük örneklerinin toplandığı dişi ve erkek bireylerden oluşan toplam 39 örneğin imkanlar dahilinde ayrı ayrı 2 playt düzeneği şeklinde hazırlanmış olduğu gösterilmektedir. Tablo 1'deki ilk toplama sıralamasındaki veriler kullanılarak harfler ve rakamlarla gösterilen kuyucuklara denk gelen örnekler kodlanmıştır.

3.2.6. qPCR Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplaması: Çalışılan tüm genlerin ve kontrol genimiz olan GAPDH in tüm örnekler için ayrı ayrı Ct (Cq) değeri (average: ortalama) bulunmuştur. Ct değerinden genlerimizin ortalaması çıkarılarak ΔCt değeri bulunmuştur. Daha sonra ΔCt değerinin ortalaması alınmış ve bir sonuç elde edilmiştir. Yine her bir hedef genin Ct değeri ve sonuç değerinin farkı bulunarak $\Delta\Delta Ct$ değerine ulaşılmıştır. Bundan sonraki aşamada $\Delta\Delta Ct$ değerinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ üzeri eksi şeklinde hesaplanması ile çalışılan tüm genlerin ve örneklerin ayrı ayrı kontrol genine uzaklığı hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ göre yorum yapılacaktır.

GAPDH (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) Geni Cq değeri.

Tablo 8. qPCR sonuçlar.GAPDH (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) Geni Cq değeri.

Örnekler	Well	Sample	Target	Fluorescence	Cq
6yaş/kız	A1	1	GAPDH	EVAGREEN	26,155
8yaş/erk	A2	2	GAPDH	EVAGREEN	28,158
11yaş/erk	A3	3	GAPDH	EVAGREEN	22,611
10yaş/erk	A4	4	GAPDH	EVAGREEN	23,36
6,5/erk	A5	5	GAPDH	EVAGREEN	23,886
10/erk	A6	6	GAPDH	EVAGREEN	23,923
7/kız	A7	7	GAPDH	EVAGREEN	21,918
9/kız	A8	8	GAPDH	EVAGREEN	21,087
11/kız	A9	9	GAPDH	EVAGREEN	20,405
4/kız	A10	10	GAPDH	EVAGREEN	28,563
23/erk	A11	11	GAPDH	EVAGREEN	23,529
23/erk	A12	12	GAPDH	EVAGREEN	25,182
24/kız	B1	13	GAPDH	EVAGREEN	29,046
27/erk	B2	14	GAPDH	EVAGREEN	21,427
23/erk	B3	15	GAPDH	EVAGREEN	22,301
26/kız	B4	16	GAPDH	EVAGREEN	22,979
28/kız	B5	17	GAPDH	EVAGREEN	24,593
28/erk	B6	18	GAPDH	EVAGREEN	22,441
24/erk	B7	19	GAPDH	EVAGREEN	22,134
23/kız	B8	20	GAPDH	EVAGREEN	23,098
14/kız	B9	21	GAPDH	EVAGREEN	22,243
14/kız	B10	22	GAPDH	EVAGREEN	21,994
19/kız	B11	23	GAPDH	EVAGREEN	22,959
17/erk	B12	24	GAPDH	EVAGREEN	23,586
16/kız	A1	25	GAPDH	EVAGREEN	20,475
18/erk	A2	26	GAPDH	EVAGREEN	23,713
19.5/kız	A3	27	GAPDH	EVAGREEN	21,774
17/erk	A4	28	GAPDH	EVAGREEN	22,132
16/erk	A5	29	GAPDH	EVAGREEN	21,369
20/kız	A6	30	GAPDH	EVAGREEN	19,837
70/erk	A7	31	GAPDH	EVAGREEN	20,049
34/kız	A8	32	GAPDH	EVAGREEN	19,407
34/erk	A9	33	GAPDH	EVAGREEN	21,068
46/erk	A10	34	GAPDH	EVAGREEN	22,585
22/erk	A11	35	GAPDH	EVAGREEN	20,519
39/erk	A12	36	GAPDH	EVAGREEN	22,233
67/kız	B1	37	GAPDH	EVAGREEN	24,253
32/kız	B2	38	GAPDH	EVAGREEN	24,262
30/kız	B3	39	GAPDH	EVAGREEN	17,528
				Avarage:	22,78928205

CST1 – sistatin SN Gen Değerleri ve 2^{ΔΔCt} hesaplanması

Tablo 9. CST1 – sistatin SN gen değerleri.

Örnekler	Well	Sample	Target	Fluorescence	Cq	ΔCt	ΔΔCt	2 ^{ΔΔCt}	Yorum
6yaş/kız	C1	1	CST1	EVAGREEN	35,97	13,18072	-2,54516	0,171329	Downregulation (5,83 kat azalma)
8yaş/erk	C2	2	CST1	EVAGREEN	36,434	13,64472	-3,00916	0,124209	Downregulation (8,05 kat azalma)
11yaş/erk	C3	3	CST1	EVAGREEN	32,294	9,504718	1,130842	2,189865	Upregulation (2,19 kat artış)
10yaş/erk	C4	4	CST1	EVAGREEN	32,963	10,17372	0,461842	1,377299	Upregulation (1,38 kat artış)
6,5/erk	C5	5	CST1	EVAGREEN	34,648	11,85872	-1,22316	0,428344	Downregulation (2,33 kat azalma)
10/erk	C6	6	CST1	EVAGREEN	34,2	11,41072	-0,77516	0,584325	Downregulation (1,71 kat azalma)
7/kız	C7	7	CST1	EVAGREEN	32,403	9,613718	1,021842	2,03051	Upregulation (2,03 kat artış)
9/kız	C8	8	CST1	EVAGREEN	32,821	10,03172	0,603842	1,519758	Upregulation (1,52 kat artış)
11/kız	C9	9	CST1	EVAGREEN	31,585	8,795718	1,839842	3,579708	Upregulation (3,58 kat artış)
4/kız	C10	10	CST1	EVAGREEN	36,743	13,95372	-3,31816	0,100262	Downregulation (9,97 kat azalma)
23/erk	C11	11	CST1	EVAGREEN	33,303	10,51372	0,121842	1,088123	Upregulation (Hafif artış)
23/erk	C12	12	CST1	EVAGREEN	36,721	13,93172	-3,29616	0,101802	Downregulation (9,82 kat azalma)
24/kız	D1	13	CST1	EVAGREEN	35,122	12,33272	-1,69716	0,308393	Downregulation (3,24 kat azalma)
27/erk	D2	14	CST1	EVAGREEN	31,889	9,099718	1,535842	2,899576	Upregulation (2,90 kat artış)
23/erk	D3	15	CST1	EVAGREEN	32,09	9,300718	1,334842	2,522479	Upregulation (2,52 kat artış)
26/kız	D4	16	CST1	EVAGREEN	34,594	11,80472	-1,16916	0,444681	Downregulation (2,25 kat azalma)
28/kız	D5	17	CST1	EVAGREEN	34,341	11,55172	-0,91616	0,529918	Downregulation (1,89 kat azalma)
28/erk	D6	18	CST1	EVAGREEN	32,835	10,04572	0,589842	1,505082	Upregulation (1,51 kat artış)
24/erk	D7	19	CST1	EVAGREEN	34,635	11,84572	-1,21016	0,432221	Downregulation (2,31 kat azalma)
23/kız	D8	20	CST1	EVAGREEN	33,895	11,10572	-0,47016	0,721886	Downregulation (1,39 kat azalma)
14/kız	D9	21	CST1	EVAGREEN	33,467	10,67772	-0,04216	0,971201	Yaklaşık değişim yok (0,97)
14/kız	D10	22	CST1	EVAGREEN	32,893	10,10372	0,531842	1,445774	Upregulation (1,45 kat artış)
19/kız	D11	23	CST1	EVAGREEN	32,849	10,05972	0,575842	1,490547	Upregulation (1,49 kat artış)
17/erk	D12	24	CST1	EVAGREEN	34,17	11,38072	-0,74516	0,596603	Downregulation (1,68 kat azalma)
16/kız	C1	25	CST1	EVAGREEN	32,211	9,421718	1,213842	2,319545	Upregulation (2,32 kat artış)
18/erk	C2	26	CST1	EVAGREEN	33,583	10,79372	-0,15816	0,896169	Downregulation (Hafif azalma)
19,5/kız	C3	27	CST1	EVAGREEN	33,007	10,21772	0,417842	1,335928	Upregulation (1,34 kat artış)
17/erk	C4	28	CST1	EVAGREEN	32,581	9,791718	0,843842	1,794824	Upregulation (1,79 kat artış)
16/erk	C5	29	CST1	EVAGREEN	31,797	9,007718	1,627842	3,090504	Upregulation (3,09 kat artış)
20/kız	C6	30	CST1	EVAGREEN	31,936	9,146718	1,488842	2,806636	Upregulation (2,81 kat artış)
70/erk	C7	31	CST1	EVAGREEN	32,099	9,309718	1,325842	2,506792	Upregulation (2,51 kat artış)
34/kız	C8	32	CST1	EVAGREEN	32,062	9,272718	1,362842	2,571913	Upregulation (2,57 kat artış)
34/erk	C9	33	CST1	EVAGREEN	32,585	9,795718	0,839842	1,789854	Upregulation (1,79 kat artış)
46/erk	C10	34	CST1	EVAGREEN	34,865	12,07572	-1,44016	0,368527	Downregulation (2,71 kat azalma)
22/erk	C11	35	CST1	EVAGREEN	31,961	9,171718	1,463842	2,75842	Upregulation (2,76 kat artış)
39/erk	C12	36	CST1	EVAGREEN	32,888	10,09872	0,536842	1,450793	Upregulation (1,45 kat artış)
67/kız	D1	37	CST1	EVAGREEN	33,034	10,24472	0,390842	1,311158	Upregulation (1,31 kat artış)
32/kız	D2	38	CST1	EVAGREEN	34,258	11,46872	-0,83316	0,561299	Downregulation (1,78 kat azalma)
30/kız	D3	39	CST1	EVAGREEN	31,837	9,047718	1,587842	3,005994	Upregulation (3,01 kat artış)
					Average:	10,63556			

NFE2L2 (Nrf-2, NFE2 benzeri bZIP transkripsiyon faktörü 2) gen değerleri ve $2^{\Delta\Delta Ct}$ hesaplanması

Tablo 10. NFE2L2 (Nrf-2, NFE2 benzeri bZIP transkripsiyon faktörü 2) gen değerleri.

Örnekler	Well	Sample	Target	Fluorescence	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	Yorum
6yaş/kız	E1	1	NFE2L2	EVAGREEN	26,842	4,052718	-3,08497	0,11785	Downregulation (8,48 kat azalma)
8yaş/erk	E2	2	NFE2L2	EVAGREEN	28,164	5,374718	-4,40697	0,047138	Downregulation (21,22 kat azalma)
11yaş/erk	E3	3	NFE2L2	EVAGREEN	22,799	0,009718	0,958026	1,94265	Upregulation (1,94 kat artış)
10yaş/erk	E4	4	NFE2L2	EVAGREEN	23,939	1,149718	-0,18197	0,881496	Downregulation (Hafif azalma)
6,5/erk	E5	5	NFE2L2	EVAGREEN	26,406	3,616718	-2,64897	0,159433	Downregulation (6,27 kat azalma)
10/erk	E6	6	NFE2L2	EVAGREEN	24,702	1,912718	-0,94497	0,519439	Downregulation (1,93 kat azalma)
7/kız	E7	7	NFE2L2	EVAGREEN	23,513	0,723718	0,244026	1,184293	Upregulation (Hafif artış)
9/kız	E8	8	NFE2L2	EVAGREEN	22,79	0,000718	0,967026	1,954807	Upregulation (1,95 kat artış)
11/kız	E9	9	NFE2L2	EVAGREEN	21,981	-0,80828	1,776026	3,424815	Upregulation (3,42 kat artış)
4/kız	E10	10	NFE2L2	EVAGREEN	29,262	6,472718	-5,50497	0,022021	Downregulation (45,41 kat azalma)
23/erk	E11	11	NFE2L2	EVAGREEN	24,663	1,873718	-0,90597	0,533672	Downregulation (1,87 kat azalma)
23/erk	E12	12	NFE2L2	EVAGREEN	25,914	3,124718	-2,15697	0,224226	Downregulation (4,46 kat azalma)
24/kız	F1	13	NFE2L2	EVAGREEN	29,59	6,800718	-5,83297	0,017543	Downregulation (57,00 kat azalma)
27/erk	F2	14	NFE2L2	EVAGREEN	22,32	-0,46928	1,437026	2,707621	Upregulation (2,71 kat artış)
23/erk	F3	15	NFE2L2	EVAGREEN	22,813	0,023718	0,944026	1,92389	Upregulation (1,92 kat artış)
26/kız	F4	16	NFE2L2	EVAGREEN	22,574	-0,21528	1,183026	2,270525	Upregulation (2,27 kat artış)
28/kız	F5	17	NFE2L2	EVAGREEN	25,169	2,379718	-1,41197	0,375797	Downregulation (2,66 kat azalma)
28/erk	F6	18	NFE2L2	EVAGREEN	23,564	0,774718	0,193026	1,143159	Upregulation (Hafif artış)
24/erk	F7	19	NFE2L2	EVAGREEN	23,166	0,376718	0,591026	1,506318	Upregulation (1,51 kat artış)
23/kız	F8	20	NFE2L2	EVAGREEN	24,449	1,659718	-0,69197	0,619006	Downregulation (1,62 kat azalma)
14/kız	F9	21	NFE2L2	EVAGREEN	23,587	0,797718	0,170026	1,125079	Upregulation (Hafif artış)
14/kız	F10	22	NFE2L2	EVAGREEN	23,597	0,807718	0,160026	1,117307	Upregulation (Hafif artış)
19/kız	F11	23	NFE2L2	EVAGREEN	23,773	0,983718	-0,01597	0,988989	Yaklaşık değişim yok (0,99)
17/erk	F12	24	NFE2L2	EVAGREEN	24,278	1,488718	-0,52097	0,696901	Downregulation (1,43 kat azalma)
16/kız	E1	25	NFE2L2	EVAGREEN	22,18	-0,60928	1,577026	2,983542	Upregulation (2,98 kat artış)
18/erk	E2	26	NFE2L2	EVAGREEN	23,896	1,106718	-0,13897	0,908165	Downregulation (Hafif azalma)
19,5/kız	E3	27	NFE2L2	EVAGREEN	21,856	-0,93328	1,901026	3,734787	Upregulation (3,73 kat artış)
17/erk	E4	28	NFE2L2	EVAGREEN	19,14	-3,64928	4,617026	24,53937	Upregulation (24,54 kat artış)
16/erk	E5	29	NFE2L2	EVAGREEN	22,068	-0,72128	1,689026	3,22439	Upregulation (3,22 kat artış)
20/kız	E6	30	NFE2L2	EVAGREEN	21,094	-1,69528	2,663026	6,333601	Upregulation (6,33 kat artış)
70/erk	E7	31	NFE2L2	EVAGREEN	21,466	-1,32328	2,291026	4,894041	Upregulation (4,89 kat artış)
34/kız	E8	32	NFE2L2	EVAGREEN	23,776	0,986718	-0,01897	0,986934	Yaklaşık değişim yok (0,99)
34/erk	E9	33	NFE2L2	EVAGREEN	22,759	-0,03028	0,998026	1,997265	Upregulation (1,99 kat artış)
46/erk	E10	34	NFE2L2	EVAGREEN	23,471	0,681718	0,286026	1,219277	Upregulation (Hafif artış)
22/erk	E11	35	NFE2L2	EVAGREEN	21,728	-1,06128	2,029026	4,081292	Upregulation (4,08 kat artış)
39/erk	E12	36	NFE2L2	EVAGREEN	23,076	0,286718	0,681026	1,60328	Upregulation (1,60 kat artış)
67/kız	F1	37	NFE2L2	EVAGREEN	24,216	1,426718	-0,45897	0,727503	Downregulation (1,37 kat azalma)
32/kız	F2	38	NFE2L2	EVAGREEN	24,474	1,684718	-0,71697	0,608372	Downregulation (1,64 kat azalma)
30/kız	F3	39	NFE2L2	EVAGREEN	21,469	-1,32028	2,288026	4,883874	Upregulation (4,88 kat artış)
						Avarage:	0,967744		

GPR19 G protein-bağlantılı reseptör 19 [Homo sapiens (insan)] gen değerleri ve $2^{\Delta\Delta Ct}$ hesaplanması

Tablo 11. GPR19 G protein-bağlantılı reseptör 19 [Homo sapiens (insan)] gen değerleri

Örnekler	Well	Sample	Target	Fluorescence	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	Yorum
6yaş/kız	G1	1	GPR19	EVAGREEN	27,507	4,717718	-3,27908	0,103015	Downregulation (9,71 kat azalma)
8yaş/erk	G2	2	GPR19	EVAGREEN	28,651	5,861718	-4,42308	0,046615	Downregulation (21,46 kat azalma)
11yaş/erk	G3	3	GPR19	EVAGREEN	23,03	0,240718	1,197923	2,294092	Upregulation (2,29 kat artış)
10yaş/erk	G4	4	GPR19	EVAGREEN	24,346	1,556718	-0,11808	0,921415	Downregulation (Hafif azalma)
6,5/erk	G5	5	GPR19	EVAGREEN	26,671	3,881718	-2,44308	0,183891	Downregulation (5,43 kat azalma)
10/erk	G6	6	GPR19	EVAGREEN	25,051	2,261718	-0,82308	0,565235	Downregulation (1,77 kat azalma)
7/kız	G7	7	GPR19	EVAGREEN	23,906	1,116718	0,321923	1,249996	Upregulation (Hafif artış)
9/kız	G8	8	GPR19	EVAGREEN	23,235	0,445718	0,992923	1,990213	Upregulation (1,99 kat artış)
11/kız	G9	9	GPR19	EVAGREEN	22,058	-0,73128	2,169923	4,499994	Upregulation (4,50 kat artış)
4/kız	G10	10	GPR19	EVAGREEN	29,576	6,786718	-5,34808	0,024551	Downregulation (40,64 kat azalma)
23/erk	G11	11	GPR19	EVAGREEN	24,743	1,953718	-0,51508	0,699756	Downregulation (1,43 kat azalma)
23/erk	G12	12	GPR19	EVAGREEN	26,387	3,597718	-2,15908	0,223899	Downregulation (4,47 kat azalma)
24/kız	H1	13	GPR19	EVAGREEN	30,239	7,449718	-6,01108	0,015505	Downregulation (64,39 kat azalma)
27/erk	H2	14	GPR19	EVAGREEN	22,404	-0,38528	1,823923	3,540426	Upregulation (3,54 kat artış)
23/erk	H3	15	GPR19	EVAGREEN	23,018	0,228718	1,209923	2,313253	Upregulation (2,31 kat artış)
26/kız	H4	16	GPR19	EVAGREEN	23,48	0,690718	0,747923	1,679373	Upregulation (1,68 kat artış)
28/kız	H5	17	GPR19	EVAGREEN	25,485	2,695718	-1,25708	0,418391	Downregulation (2,39 kat azalma)
28/erk	H6	18	GPR19	EVAGREEN	23,685	0,895718	0,542923	1,456921	Upregulation (1,46 kat artış)
24/erk	H7	19	GPR19	EVAGREEN	23,336	0,546718	0,891923	1,855648	Upregulation (1,86 kat artış)
23/kız	H8	20	GPR19	EVAGREEN	24,907	2,117718	-0,67908	0,624565	Downregulation (1,60 kat azalma)
14/kız	H9	21	GPR19	EVAGREEN	23,699	0,909718	0,528923	1,442852	Upregulation (1,44 kat artış)
14/kız	H10	22	GPR19	EVAGREEN	23,478	0,688718	0,749923	1,681703	Upregulation (1,68 kat artış)
19/kız	H11	23	GPR19	EVAGREEN	24,186	1,396718	0,041923	1,029485	Upregulation (Hafif artış)
17/erk	H12	24	GPR19	EVAGREEN	24,718	1,928718	-0,49008	0,711987	Downregulation (1,40 kat azalma)
16/kız	G1	25	GPR19	EVAGREEN	22,231	-0,55828	1,996923	3,991478	Upregulation (3,99 kat artış)
18/erk	G2	26	GPR19	EVAGREEN	24,388	1,598718	-0,16008	0,894977	Downregulation (Hafif azalma)
19.5/kız	G3	27	GPR19	EVAGREEN	22,297	-0,49228	1,930923	3,812991	Upregulation (3,81 kat artış)
17/erk	G4	28	GPR19	EVAGREEN	24,334	1,544718	-0,10608	0,929111	Downregulation (Hafif azalma)
16/erk	G5	29	GPR19	EVAGREEN	23,201	0,411718	1,026923	2,037674	Upregulation (2,04 kat artış)
20/kız	G6	30	GPR19	EVAGREEN	21,075	-1,71428	3,152923	8,894559	Upregulation (8,89 kat artış)
70/erk	G7	31	GPR19	EVAGREEN	21,745	-1,04428	2,482923	5,59029	Upregulation (5,59 kat artış)
34/kız	G8	32	GPR19	EVAGREEN	23,35	0,560718	0,877923	1,837728	Upregulation (1,84 kat artış)
34/erk	G9	33	GPR19	EVAGREEN	22,783	-0,00628	1,444923	2,722483	Upregulation (2,72 kat artış)
46/erk	G10	34	GPR19	EVAGREEN	23,701	0,911718	0,526923	1,440853	Upregulation (1,44 kat artış)
22/erk	G11	35	GPR19	EVAGREEN	21,745	-1,04428	2,482923	5,59029	Upregulation (5,59 kat artış)
39/erk	G12	36	GPR19	EVAGREEN	23,405	0,615718	0,822923	1,768987	Upregulation (1,77 kat artış)
67/kız	H1	37	GPR19	EVAGREEN	24,506	1,716718	-0,27808	0,82469	Downregulation (Hafif azalma)
32/kız	H2	38	GPR19	EVAGREEN	25,056	2,266718	-0,82808	0,56328	Downregulation (1,77 kat azalma)
30/kız	H3	39	GPR19	EVAGREEN	23,276	0,486718	0,951923	1,934449	Upregulation (1,93 kat artış)
						Average:	1,438641		



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

Grafiklerin X ekseninde örnek gruplar, Y ekseninde ise genlere ait $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin avarajları yer almaktadır.

Her bir örnek için Şekil 1 'deki yöntem basamakları 1 kez uygulanmıştır.

4.1.1. CST1 geni için tüm yaş gruplarında dişî bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

Tablo 12. CST1 geni için tüm yaş gruplarında dişî bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

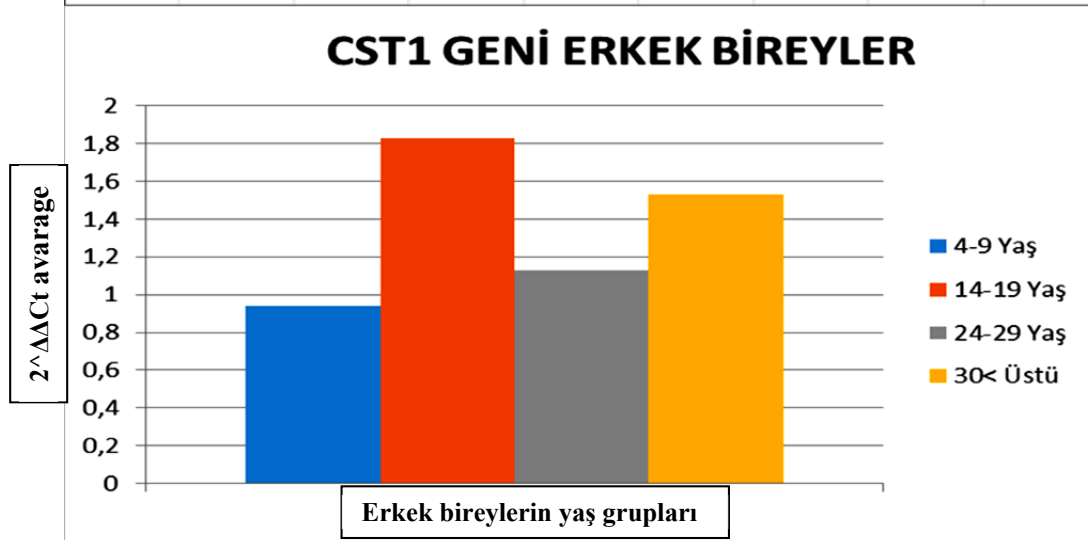
4-9 dişî								avarage:	1,825326
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
4/kız	C10	10	CST1	EVAGREEN	36,743	13,95372	-3,31816	0,100262	
6yaş/kız	C1	1	CST1	EVAGREEN	35,97	13,18072	-2,54516	0,171329	
7/kız	C7	7	CST1	EVAGREEN	32,403	9,613718	1,021842	2,03051	
9/kız	C8	8	CST1	EVAGREEN	32,821	10,03172	0,603842	1,519758	
11/kız	C9	9	CST1	EVAGREEN	31,585	8,795718	1,839842	3,579708	
14-19 kız								avarage:	1,728272
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
14/kız	D9	21	CST1	EVAGREEN	33,467	10,67772	-0,04216	0,971201	
14/kız	D10	22	CST1	EVAGREEN	32,893	10,10372	0,531842	1,445774	
19/kız	D11	23	CST1	EVAGREEN	32,849	10,05972	0,575842	1,490547	
16/kız	C1	25	CST1	EVAGREEN	32,211	9,421718	1,213842	2,319545	
19.5/kız	C3	27	CST1	EVAGREEN	33,007	10,21772	0,417842	1,335928	
20/kız	C6	30	CST1	EVAGREEN	31,936	9,146718	1,488842	2,806636	
24-29 kız								avarage:	0,501219
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
24/kız	D1	13	CST1	EVAGREEN	35,122	12,33272	-1,69716	0,308393	
26/kız	D4	16	CST1	EVAGREEN	34,594	11,80472	-1,16916	0,444681	
28/kız	D5	17	CST1	EVAGREEN	34,341	11,55172	-0,91616	0,529918	
23/kız	D8	20	CST1	EVAGREEN	33,895	11,10572	-0,47016	0,721886	
30 < kız								avarage:	1,862591
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
32 < kız	C8	32	CST1	EVAGREEN	32,062	9,272718	1,362842	2,571913	
33 < kız	D1	37	CST1	EVAGREEN	33,034	10,24472	0,390842	1,311158	
34 < kız	D2	38	CST1	EVAGREEN	34,258	11,46872	-0,83316	0,561299	
35 < kız	D3	39	CST1	EVAGREEN	31,837	9,047718	1,587842	3,005994	



4.1.2. CST1 geni için tüm yaş gruplarında erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

Tablo 13. CST1 geni için tüm yaş gruplarında erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

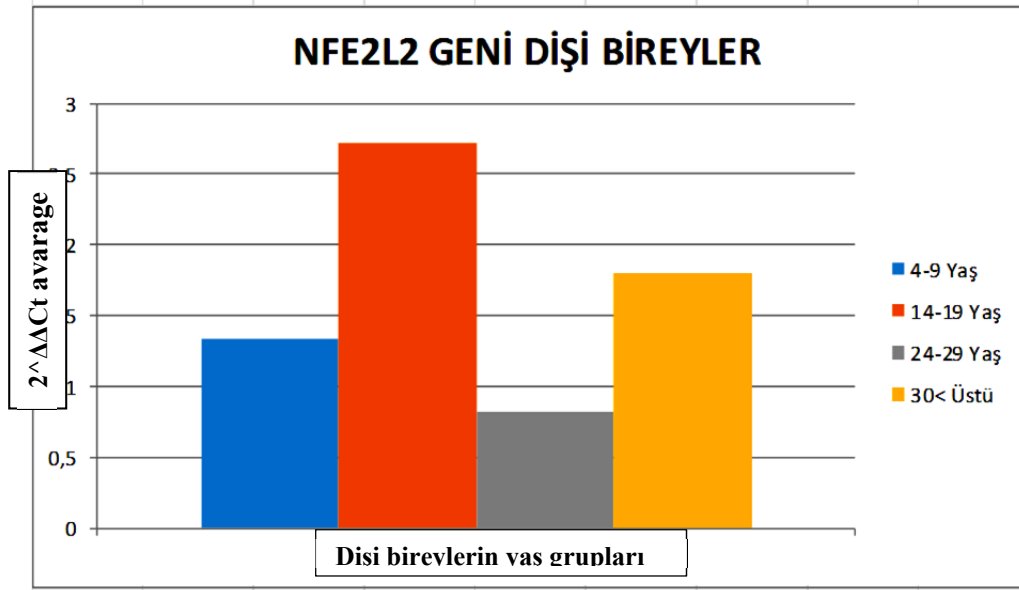
4-9 erkek								avarage:	0,940808
Örnekler	Well	Sample	Target	uorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
6,5/erk	C5	5	CST1	EVAGREEN	34,648	11,85872	-1,22316	0,428344	
8yaş/erk	C2	2	CST1	EVAGREEN	36,434	13,64472	-3,00916	0,124209	
10yaş/erk	C4	4	CST1	EVAGREEN	32,963	10,17372	0,461842	1,377299	
10/erk	C6	6	CST1	EVAGREEN	34,2	11,41072	-0,77516	0,584325	
11yaş/erk	C3	3	CST1	EVAGREEN	32,294	9,504718	1,130842	2,189865	
14-19 erkek								avarage:	2,060087
Örnekler	Well	Sample	Target	uorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
17/erk	D12	24	CST1	EVAGREEN	34,17	11,38072	-0,74516	0,596603	
17/erk	C4	28	CST1	EVAGREEN	32,581	9,791718	0,843842	1,794824	
16/erk	C5	29	CST1	EVAGREEN	31,797	9,007718	1,627842	3,090504	
22/erk	C11	35	CST1	EVAGREEN	31,961	9,171718	1,463842	2,75842	
24-29 erk								avarage:	1,129941
Örnekler	Well	Sample	Target	uorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
28/erk	D6	18	CST1	EVAGREEN	32,835	10,04572	0,589842	1,505082	
24/erk	D7	19	CST1	EVAGREEN	34,635	11,84572	-1,21016	0,432221	
23/erk	D3	15	CST1	EVAGREEN	32,09	9,300718	1,334842	2,522479	
23/erk	C11	11	CST1	EVAGREEN	33,303	10,51372	0,121842	1,088123	
23/erk	C12	12	CST1	EVAGREEN	36,721	13,93172	-3,29616	0,101802	
30< erk								avarage:	1,528992
Örnekler	Well	Sample	Target	uorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
34/erk	C9	33	CST1	EVAGREEN	32,585	9,795718	0,839842	1,789854	
46/erk	C10	34	CST1	EVAGREEN	34,865	12,07572	-1,44016	0,368527	
39/erk	C12	36	CST1	EVAGREEN	32,888	10,09872	0,536842	1,450793	
70/erk	C7	31	CST1	EVAGREEN	32,099	9,309718	1,325842	2,506792	



4.1.3. NFE2L2 geni için tüm yaş gruplarında dişi bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

Tablo 14. NFE2L2 geni için tüm yaş gruplarında dişi bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

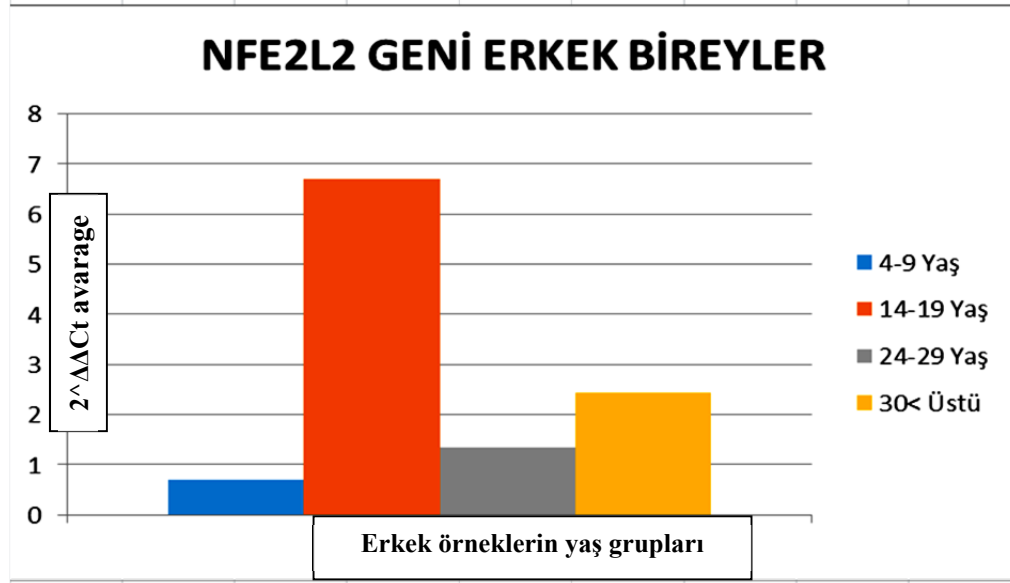
4-9 KIZ								AVARAGE	1,340757
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
6yaş/kız	E1	1	NFE2L2	EVAGREEN	26,842	4,052718	-3,08497	0,11785	
7/kız	E7	7	NFE2L2	EVAGREEN	23,513	0,723718	0,244026	1,184293	
9/kız	E8	8	NFE2L2	EVAGREEN	22,79	0,000718	0,967026	1,954807	
4/kız	E10	10	NFE2L2	EVAGREEN	29,262	6,472718	-5,50497	0,022021	
11/kız	E9	9	NFE2L2	EVAGREEN	21,981	-0,80828	1,776026	3,424815	
14-19 KIZ								AVARAGE	2,713884
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
14/kız	F9	21	NFE2L2	EVAGREEN	23,587	0,797718	0,170026	1,125079	
14/kız	F10	22	NFE2L2	EVAGREEN	23,597	0,807718	0,160026	1,117307	
19/kız	F11	23	NFE2L2	EVAGREEN	23,773	0,983718	-0,01597	0,988989	
16/kız	E1	25	NFE2L2	EVAGREEN	22,18	-0,60928	1,577026	2,983542	
19.5/kız	E3	27	NFE2L2	EVAGREEN	21,856	-0,93328	1,901026	3,734787	
20/kız	E6	30	NFE2L2	EVAGREEN	21,094	-1,69528	2,663026	6,333601	
24-29 KIZ								AVARAGE	0,820718
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
24/kız	F1	13	NFE2L2	EVAGREEN	29,59	6,800718	-5,83297	0,017543	
26/kız	F4	16	NFE2L2	EVAGREEN	22,574	-0,21528	1,183026	2,270525	
28/kız	F5	17	NFE2L2	EVAGREEN	25,169	2,379718	-1,41197	0,375797	
23/kız	F8	20	NFE2L2	EVAGREEN	24,449	1,659718	-0,69197	0,619006	
30< KIZ								AVARAGE	1,801671
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
34/kız	E8	32	NFE2L2	EVAGREEN	23,776	0,986718	-0,01897	0,986934	
67/kız	F1	37	NFE2L2	EVAGREEN	24,216	1,426718	-0,45897	0,727503	
32/kız	F2	38	NFE2L2	EVAGREEN	24,474	1,684718	-0,71697	0,608372	
30/kız	F3	39	NFE2L2	EVAGREEN	21,469	-1,32028	2,288026	4,883874	



4.1.4. NFE2L2 geni için tüm yaş grubu erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

Tablo 15. NFE2L2 geni için tüm yaş gruplarında erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

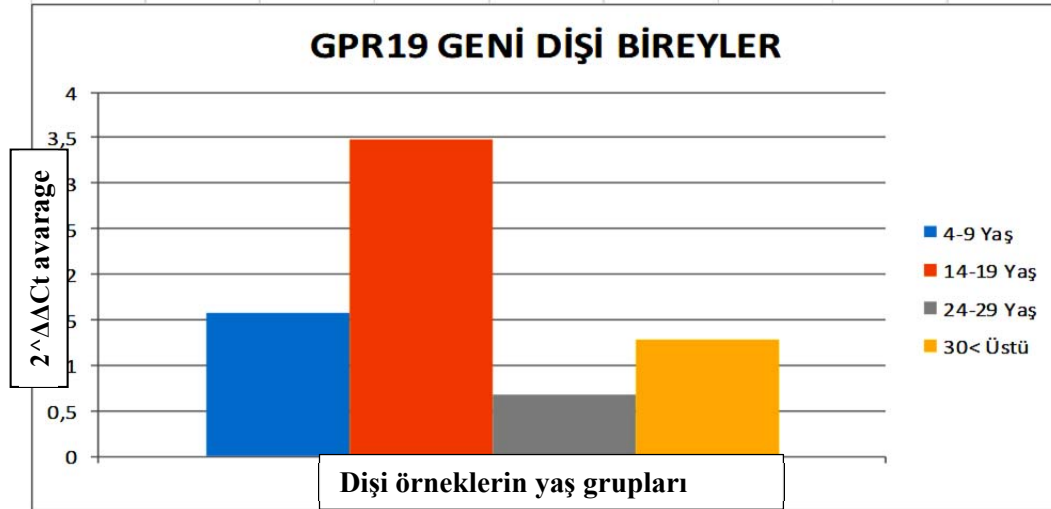
4-9 erk							AVARAGE	0,710031
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$
8yaş/erk	E2	2	NFE2L2	EVAGREEN	28,164	5,374718	-4,40697	0,047138
11yaş/erk	E3	3	NFE2L2	EVAGREEN	22,799	0,009718	0,958026	1,94265
10yaş/erk	E4	4	NFE2L2	EVAGREEN	23,939	1,149718	-0,18197	0,881496
6,5/erk	E5	5	NFE2L2	EVAGREEN	26,406	3,616718	-2,64897	0,159433
10/erk	E6	6	NFE2L2	EVAGREEN	24,702	1,912718	-0,94497	0,519439
14-19 erk							AVARAGE	6,690023
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$
17/erk	F12	24	NFE2L2	EVAGREEN	24,278	1,488718	-0,52097	0,696901
18/erk	E2	26	NFE2L2	EVAGREEN	23,896	1,106718	-0,13897	0,908165
17/erk	E4	28	NFE2L2	EVAGREEN	19,14	-3,64928	4,617026	24,53937
16/erk	E5	29	NFE2L2	EVAGREEN	22,068	-0,72128	1,689026	3,22439
22/erk	E11	35	NFE2L2	EVAGREEN	21,728	-1,06128	2,029026	4,081292
24-29							AVARAGE	1,339814
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$
28/erk	F6	18	NFE2L2	EVAGREEN	23,564	0,774718	0,193026	1,143159
24/erk	F7	19	NFE2L2	EVAGREEN	23,166	0,376718	0,591026	1,506318
27/erk	F2	14	NFE2L2	EVAGREEN	22,32	-0,46928	1,437026	2,707621
23/erk	F3	15	NFE2L2	EVAGREEN	22,813	0,023718	0,944026	1,92389
23/erk	E12	12	NFE2L2	EVAGREEN	25,914	3,124718	-2,15697	0,224226
23/erk	E11	11	NFE2L2	EVAGREEN	24,663	1,873718	-0,90597	0,533672
30< er							AVARAGE	2,428466
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$
34/erk	E9	33	NFE2L2	EVAGREEN	22,759	-0,03028	0,998026	1,997265
46/erk	E10	34	NFE2L2	EVAGREEN	23,471	0,681718	0,286026	1,219277
39/erk	E12	36	NFE2L2	EVAGREEN	23,076	0,286718	0,681026	1,60328
70/erk	E7	31	NFE2L2	EVAGREEN	21,466	-1,32328	2,291026	4,894041



4.1.5. GPR19 geni için tüm yaş grubu dişi bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

Tablo 16. NFE2L2 geni için tüm yaş gruplarında dişi bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

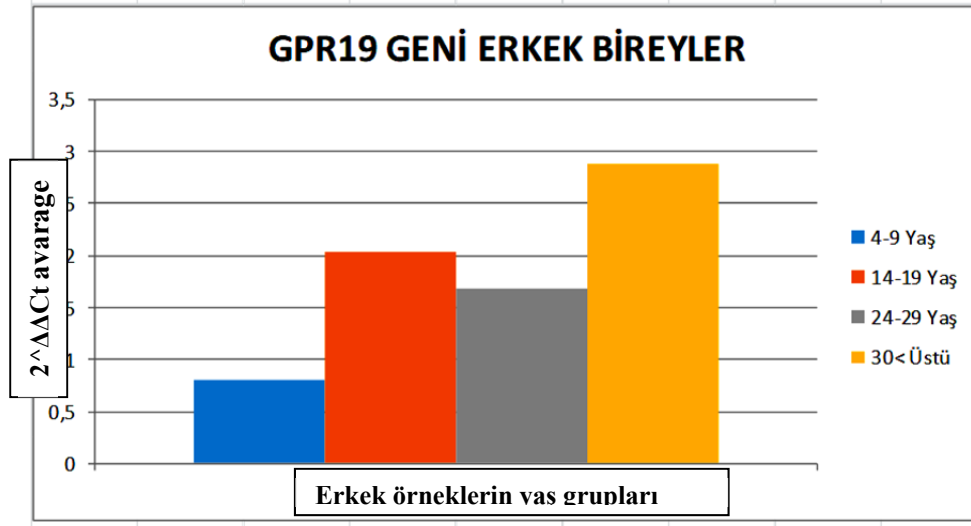
4-9 dişi								AVARAGE	1,573554
Örnekler	Well	Sample	Target	uoescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
6yaş/kız	G1	1	GPR19	EVAGREEN	27,507	4,717718	-3,27908	0,103015	
7/kız	G7	7	GPR19	EVAGREEN	23,906	1,116718	0,321923	1,249996	
9/kız	G8	8	GPR19	EVAGREEN	23,235	0,445718	0,992923	1,990213	
11/kız	G9	9	GPR19	EVAGREEN	22,058	-0,73128	2,169923	4,499994	
4/kız	G10	10	GPR19	EVAGREEN	29,576	6,786718	-5,34808	0,024551	
14-19 dişi								AVARAGE	3,475511
Örnekler	Well	Sample	Target	uoescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
14/kız	H9	21	GPR19	EVAGREEN	23,699	0,909718	0,528923	1,442852	
14/kız	H10	22	GPR19	EVAGREEN	23,478	0,688718	0,749923	1,681703	
19/kız	H11	23	GPR19	EVAGREEN	24,186	1,396718	0,041923	1,029485	
16/kız	G1	25	GPR19	EVAGREEN	22,231	-0,55828	1,996923	3,991478	
19.5/kız	G3	27	GPR19	EVAGREEN	22,297	-0,49228	1,930923	3,812991	
20/kız	G6	30	GPR19	EVAGREEN	21,075	-1,71428	3,152923	8,894559	
24-29 dişi								AVARAGE	0,684459
Örnekler	Well	Sample	Target	uoescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
24/kız	H1	13	GPR19	EVAGREEN	30,239	7,449718	-6,01108	0,015505	
26/kız	H4	16	GPR19	EVAGREEN	23,48	0,690718	0,747923	1,679373	
28/kız	H5	17	GPR19	EVAGREEN	25,485	2,695718	-1,25708	0,418391	
23/kız	H8	20	GPR19	EVAGREEN	24,907	2,117718	-0,67908	0,624565	
30< dişi								AVARAGE	1,290037
Örnekler	Well	Sample	Target	uoescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
34/kız	G8	32	GPR19	EVAGREEN	23,35	0,560718	0,877923	1,837728	
67/kız	H1	37	GPR19	EVAGREEN	24,506	1,716718	-0,27808	0,82469	
32/kız	H2	38	GPR19	EVAGREEN	25,056	2,266718	-0,82808	0,56328	
30/kız	H3	39	GPR19	EVAGREEN	23,276	0,486718	0,951923	1,934449	



4.1.6. GPR19 geni için tüm yaş grubu erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

Tablo 17. GPR19 geni için tüm yaş gruplarında erkek bireylere ait örneklerin $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin GAPDH' a göre yukarı- aşağı regülasyonunun nicel veri grafiği.

4-9erk								AVARAGE	0,802249
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
8yaş/erk	G2	2	GPR19	EVAGREEN	28,651	5,861718	-4,42308	0,046615	
11yaş/erk	G3	3	GPR19	EVAGREEN	23,03	0,240718	1,197923	2,294092	
10yaş/erk	G4	4	GPR19	EVAGREEN	24,346	1,556718	-0,11808	0,921415	
6,5/erk	G5	5	GPR19	EVAGREEN	26,671	3,881718	-2,44308	0,183891	
10/erk	G6	6	GPR19	EVAGREEN	25,051	2,261718	-0,82308	0,565235	
14-19 er								AVARAGE	2,032808
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
17/erk	H12	24	GPR19	EVAGREEN	24,718	1,928718	-0,49008	0,711987	
18/erk	G2	26	GPR19	EVAGREEN	24,388	1,598718	-0,16008	0,894977	
17/erk	G4	28	GPR19	EVAGREEN	24,334	1,544718	-0,10608	0,929111	
16/erk	G5	29	GPR19	EVAGREEN	23,201	0,411718	1,026923	2,037674	
22/erk	G11	35	GPR19	EVAGREEN	21,745	-1,04428	2,482923	5,59029	
24-29erk								AVARAGE	1,681651
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
28/erk	H6	18	GPR19	EVAGREEN	23,685	0,895718	0,542923	1,456921	
24/erk	H7	19	GPR19	EVAGREEN	23,336	0,546718	0,891923	1,855648	
27/erk	H2	14	GPR19	EVAGREEN	22,404	-0,38528	1,823923	3,540426	
23/erk	H3	15	GPR19	EVAGREEN	23,018	0,228718	1,209923	2,313253	
23/erk	G11	11	GPR19	EVAGREEN	24,743	1,953718	-0,51508	0,699756	
23/erk	G12	12	GPR19	EVAGREEN	26,387	3,597718	-2,15908	0,223899	
30< erk								AVARAGE	2,880653
Örnekler	Well	Sample	Target	luorescenc	Cq	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$	
34/erk	G9	33	GPR19	EVAGREEN	22,783	-0,00628	1,444923	2,722483	
46/erk	G10	34	GPR19	EVAGREEN	23,701	0,911718	0,526923	1,440853	
39/erk	G12	36	GPR19	EVAGREEN	23,405	0,615718	0,822923	1,768987	
70/erk	G7	31	GPR19	EVAGREEN	21,745	-1,04428	2,482923	5,59029	

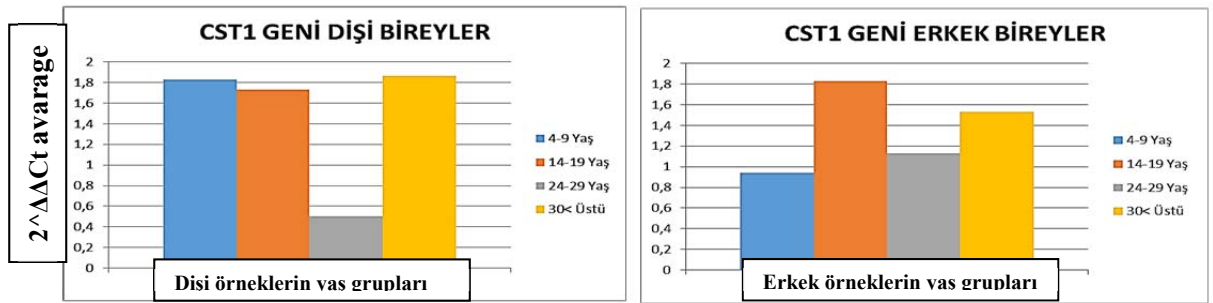


4.2. TARTIŞMA

Bu çalışmada, tükürük örneklerinden izole edilen RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi sonrası yapılan gen ekspresyon analizleriyle yaşa ve cinsiyete bağlı olarak GPR19, NFE2L2 ve CST1 genlerinin ifade düzeyleri incelenmiştir. Bulgular, bu genlerin biyolojik yaş göstergesi olarak kullanılabilme potansiyelini ortaya koymaktadır.

CST1 geni ise daha sabit bir ekspresyon profiline sahip olmakla birlikte, kadın bireylerde 24–29 yaş aralığında, erkek bireylerde ise 4–9 yaş grubunda ekspresyon düşüklüğü göstermektedir.

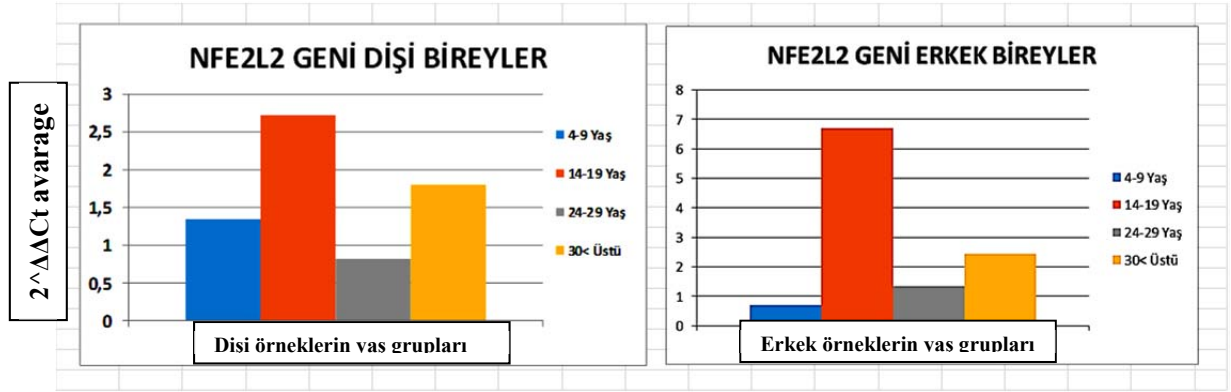
CST1 (Cystatin SN), tükürük bezlerinden salınan bir proteaz inhibitörüdür. CST1'in tükürük bezlerinde ifade edilen bir gen olduğunu ve gelişimsel süreçlerde ekspresyonunun dalgalanabileceğini belirtmiştir (Fábrián, T. K., ve ark., 2012). Ayrıca tükürük protein içeriğinin yaşla değişebileceğini ve bazı proteinlerin genç yaşlarda daha yüksek düzeyde bulunduğunu göstermiştir. Çalışmamızda gözlemlenen cinsiyet ve yaşa bağlı ekspresyon düşüşleri, bu fizyolojik değişimlerle uyumlu olarak değerlendirilebilir (Wang, K. ve ark. 2018).



Şekil 2. CST1 cinsiyet ve 2^{ΔΔCt} avarage ilişkisi

Elde edilen veriler, bu üç genin yaşa özgü ekspresyon profilleri gösterdiğini ve tükürük gibi non-invaziv bir örnekten elde edilebilecek genetik verilerin yaş tayini açısından kullanılabilceğini göstermektedir. Ancak, gen ekspresyonunun çevresel faktörler, bireysel farklılıklar ve hormon düzeyleri gibi değişkenlerden etkilenebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, bu genlerin yaş belirteci olarak kullanımı için daha büyük örneklem grupları ve farklı etnik / popülasyon temsilleriyle yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

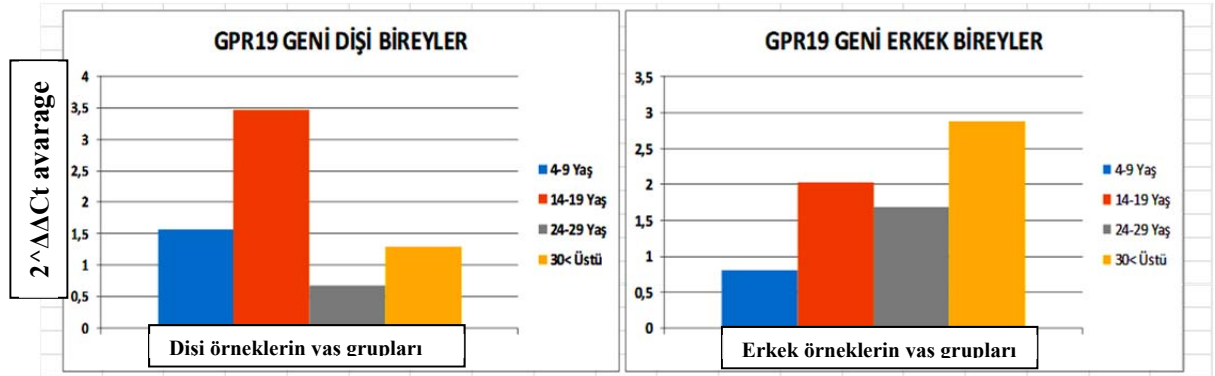
NFE2L2 genine ilişkin elde edilen veriler, her iki cinsiyette de 14–19 yaş grubunda ekspresyon düzeyinin en yüksek olduğunu göstermektedir. NFE2L2, hücrel oksidatif stres yanıtının temel düzenleyicilerinden biri olan NRF2 transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır.



Şekil 3 NFE2L2 cinsiyet ve 2^{-ΔΔCt} average ilişkisi

Literatürde, bu genin genç bireylerde daha aktif olduğu ve yaşla birlikte ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (Dınkova-Kostova, A. T. ve ark. 2015). Bu da gelişimsel süreçlerde artan antioksidan savunma mekanizmalarıyla ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla çalışmamızda 14–19 yaş grubundaki yüksek NFE2L2 ekspresyonu, hücrel savunmanın bu yaş aralığında en yoğun şekilde çalıştığını düşündürmektedir (Suh, J. H. ve ark. 2004).

Özellikle GPR19 genine ait bulgular dikkat çekicidir. Çalışmada, bu genin kadın bireylerde 14–19 yaş aralığında, erkek bireylerde ise 30 yaş ve üzeri grupta yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. GPR19, G-protein bağlı reseptör ailesine ait olup bazı çalışmalarda beyin gelişimi ve endokrin regülasyon süreçlerinde rol aldığı bildirilmiştir. GPR19 geninin yaşla birlikte beyinde artan bir ekspresyon gösterdiğini, özellikle hipotalamus ve hipokampus bölgelerinde ileri yaş bireylerde belirginleştiğini göstermiştir (Stein, L. M. ve ark. 2016). GPR19 gen ekspresyonunun kadınlarda puberte döneminde hormonal değişikliklere bağlı olarak arttığını bildirmiştir (Maurya, S. ve ark. 2023). Bu literatür bulguları, çalışmamızdaki yaşa ve cinsiyete bağlı farklı ekspresyon paternleriyle uyumludur.



Şekil 4 GPR19 cinsiyet ve 2^{-ΔΔCt} average ilişkisi

GPR19, CST1 ve NFE2L2 genlerinin yaş gruplarına göre biyobelirteç değeri; GPR19 Çalışmamız doğrultusunda GPR19 geni, farklı yaş gruplarında belirgin ifade (ekspresyon) değişimleri göstererek yaş tahmininde öne çıkan bir biyobelirteç adayıdır. Tez bulgularına göre GPR19 ekspresyonu çocuklarda (4–9 yaş) çok düşüktür; hatta 4 yaşındaki bir örnekte ortalama

31 kat daha düşük seviyede tespit edilmiştir. Buna karşılık, ergenlik döneminde (14–19 yaş) özellikle kadın bireylerde GPR19 ifadesi keskin biçimde artmaktadır (dişi 14–19 yaş grubunda ~3,47 kat yukarı regülasyon). Bu hormonal ergenlik etkisi literatürce de desteklenmektedir: Örneğin Maurya ve ark. (2023) çalışmasında kadınlarda puberte dönemiyle ilişkili GPR19 ekspresyon artışı bildirilmiştir. Genç yetişkinlerde (24–29 yaş) GPR19 ifadesi ergenlik zirvesinden sonra görece olarak azalmaktadır (tezde bu grupta belirgin bir yukarı regülasyon rapor edilmemiştir). İleri yaşlarda (30+ yaş) ise özellikle erkek bireylerde yeniden yüksek GPR19 ekspresyonu gözlenmiştir (30+ erkek grubunda ~2,88 kat artış) .

Bu çarpıcı artış, GPR19'un yaşlılıkta metabolik ve stres yanıtı süreçleriyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim literatürde GPR19'un yaşlanmaya bağlı moleküler yollarla kesiştiği ve yaşa bağlı disfonksiyonlarda rol oynayabileceği vurgulanmıştır (Maudsley, S., ve ark., 2022).

Sonuç olarak GPR19, ergenlik çağındaki kadınlar ile ileri yaştaki erkekler için yaş tayinine en duyarlı biyobelirteçlerden biridir; bu farklı ekspresyon paternleri sayesinde numunenin ait olduğu yaş grubu ve cinsiyet hakkında önemli ipuçları verebilir.

NFE2L2 (NRF2)

NFE2L2 geni (NRF2), her iki cinsiyette de ergenlik döneminde belirgin derecede yüksek ekspresyon göstermiş ve bu yönüyle geniş kullanım potansiyeli sergilemiştir. Tez çalışmasında 14–19 yaş aralığındaki hem kadın hem erkek örneklerde NFE2L2 ekspresyonu en yüksek düzeydeydi (örneğin dişi 14–19 grubunda ~2,7 kat yukarı regülasyon) . Bu bulgu, NFE2L2'nin özellikle ergenlik dönemini belirlemek için güçlü bir biyobelirteç olduğunu gösterir. Çocuk grubunda (4–9 yaş) ise NFE2L2 dahil tüm üç genin ifadesi çok düşüktü; en küçük çocuk örneklerinde NFE2L2'nin de dahil olduğu gen ifadeleri ortalama onlarca kat azalmış bulundu. Genç yetişkin (24–29 yaş) grubunda NFE2L2'de belirgin bir artış rapor edilmedi, bu da ergenlik sonrası dönemde ifadenin düşüşe geçtiğini düşündürmektedir. İlginç olarak, 30+ yaş grubunda erkek örneklerde NFE2L2 tekrar yükselme eğilimi göstermiştir (~2,88 kat yukarı regülasyon). Bu beklenmedik artış, belki yaşlı bireylerde artan oksidatif stresin NFE2L2'yi telafi edici biçimde aktive etmesiyle açıklanabilir. Genelde NFE2L2 aktivitesinin yaşla birlikte azaldığı bilirse de (Shimizu S. ve ark., 2020), tezdeki bulgular bu genin genç yaşlarda yüksek olup ileri yaşlarda da erkeklerde yeniden yükselebileceğini ortaya koymuştur. Buna göre NFE2L2 özellikle ergenlik çağını (her iki cinsiyette) saptamak için en uygun biyobelirteçlerden biri olarak görülmektedir; genç bireylerin tükürük örneklerinde yüksek NFE2L2 seviyesi, yaş tahmininde güçlü bir gösterge olarak kullanılabilir. NFE2L2, özellikle ergenlik çağını (her iki cinsiyette) saptamak için en uygun biyobelirteçlerden biri olarak görülmektedir; genç bireylerin tükürük örneklerinde yüksek NFE2L2 seviyesi, yaş tahmininde güçlü bir gösterge olarak kullanılabilir.

CST1 geni (Cystatin SN), yaş ve cinsiyete göre ifade değişimi gösterse de diğer iki gene kıyasla daha sınırlı bir biyobelirteç işlevi sergilemiştir. Tez bulgularında ergenlik dönemindeki kadınlarda (14–19 yaş) CST1 ekspresyonu hafifçe artmış (~1,73 kat yukarı regülasyon), ancak bu artış GPR19 ve NRF2 kadar belirgin olmamıştır. Genç yetişkin kadınlarda (24–29 yaş) ise CST1 ifadesinin anlamlı derecede düştüğü görülmüştür (~2,2 kat aşağı regülasyon).

Bu durum, CST1 gen ürününün (tükürük proteini Cystatin SN) ergenlikte doruk noktasına ulaşmış ve yetişkinlikte azaldığına işaret etmektedir. Nitekim insan tükürük proteinlerine dair çalışmalar, birçok salya proteininin çocuklukta düşük düzeyde olduğunu, yetişkinliğe doğru arttığını göstermektedir (Ben-Aryeh, H., ve ark., 1990).

Çocuk grubunda (4–9 yaş) CST1 ekspresyonunun çok düşük olması (diğer genlerle birlikte) bu literatür bilgisini destekler niteliktedir. İleri yaşlarda (30+ yaş) CST1 konusunda tezde belirgin bir artış veya düşüş vurgulanmamıştır, bu da bu genin orta yaş ve üzerindeki seviyesinin görece sabit veya zaten düşük kaldığını düşündürür.

Sonuç olarak CST1, tek başına en kuvvetli yaş belirteci olmasa da, özellikle ergenlik sonrası dönemi ayırt etmede destekleyici bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir. Örneğin, yüksek CST1 ekspresyonunun azalması kişinin ergenlik dönemini geride bıraktığını gösterebileceğinden, GPR19 ve NFE2L2 ile birlikte kullanıldığında yaş tayini doğruluğunu artırabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen bulgular, tükürük örneklerinden izole edilen RNA'lar üzerinden belirli genlerin ekspresyon düzeylerinin yaş ve cinsiyetle ilişkili olarak anlamlı farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle GPR19, NFE2L2 ve CST1 genleri, yaşa özgü biyolojik süreçlerin moleküler göstergeleri olabilecek potansiyele sahiptir.

GPR19 geninin, kadınlarda ergenlik döneminde (14–19 yaş), erkeklerde ise ileri yaş grubunda (30+ yaş) yüksek ekspresyon göstermesi, yaş tayini açısından cinsiyet ayrımı yapılmasına olanak tanıyabilecek önemli bir bulgudur.

NFE2L2 geninin her iki cinsiyette de 14–19 yaş aralığında yüksek düzeyde ekspresyon göstermesi, bu genin yaş belirteci olarak geniş bir uygulama potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

CST1 genindeki yaşa ve cinsiyete özgü ekspresyon düşüşleri ise daha sınırlı olmakla birlikte, destekleyici bir belirteç olarak kullanılabilir.

Bu bulgular ışığında, gen ekspresyon profillerinin yaş tayininde kullanılabilirliği doğrulanmış, ancak bu yaklaşımın daha yüksek doğrulukla uygulanabilmesi için daha büyük popülasyonlarda, farklı etnik kökenlerde ve yaş aralıklarında yapılacak ek çalışmaların gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışma, adli bilimler ve yaşa dayalı biyobelirteç araştırmaları açısından önemli bir katkı sunmakta ve tükürüğün non-invaziv bir biyolojik örnek olarak moleküler yaş tayininde kullanılabileceğini göstermektedir.



KAYNAKLAR

- Aktaş A, Giray B, Aktaş G.,2009.Tükürük Salya ; Özellikleri ve Görevleri Tanı Açısından Değeri. ADO Klinik Bilimler Dergisi, 3(2):361-7.
- Ben-Aryeh, H., Fisher, M., Szargel, R., & Laufer, D. (1990). Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: changes with age. *Archives of oral biology*, 35(11), 929–931.
- Carpenter, G. H. (2013).Tükürüğün salgısı, bileşenleri ve özellikleri. Gıda bilimi ve teknolojisinin yıllık incelemesi, 4, 267–276.
- Dai, Dn., Li, Y., Chen, B. ve diğerleri. CST1'in yüksek ekspresyonu meme kanserinin ilerlemesini teşvik eder ve kötü bir prognozu öngörür. *J Mol Med* 95, 873–886 (2017).
- Daniel K., Jun Z., Teeru B., Athena W. L., Aday Yaşlılık Belirteci Olarak CST1'in Yeni İfadesi, *Gerontoloji Dergisi: Seri A* , Cilt 66A, Sayı 7, Temmuz 2011, Sayfa 723–731,
- de Sousa-Pereira P, Amado F, Abrantes J, Ferreira R, Esteves PJ, Vitorino R. Memeli tükürük peptid ailelerinin evrimsel bir perspektifi: sistatinler, histatinler, statherin ve PRP'ler. *Arch Oral Biol.* 2013;58(5):451–458.
- Dinkova-Kostova, A. T.; Abramov, A. Y. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 88: 179-188.
- Fábían, T. K, et al. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *International journal of molecular sciences*, 2012, 13.4: 4295-4320.
- Karan, M. A., Tufan F. (2010). Yaşlanma Mekanizmaları (Mechanisms of aging) İstanbul Üniversitesi. *Ege Tıp Dergisi / Ege Journal of Medicine* 49(3) Ek / Supplement:11-17.
- Keppler, D., Zhang, J., Bihani, T., & Lin, A. W. (2011). Novel expression of CST1 as candidate senescence marker. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 66(7), 723–731.
- Kwon, S.M., Hong, S.M., Lee, Y.K., Min, S., & Yoon, G. (2019). Hücre yaşlanmasında metabolik özellikler ve regülasyon BMB raporları, 52(1), 5–12.
- Lenee Shrestha, Wujing Dai , Ying Ying Lu , Suizi He , Lingling An ve Qin M. Chen (2025).İnsan, Maymun ve Kemirgenlerin Miyokardında Yaşlanmaya Bağlı Nrf2, Antioksidan ve Detoksifikasyon Genlerinin Azalması. *Fizyoloji* 2025 40 : S1
- Li, D., Wang, Y., Dong, C., Chen, T., Dong, A., Ren, J., Li, W., Shu, G., Yang, J., Shen, W., Qin, L., Hu, L., & Zhou, J. (2023). CST1, OTUB1 aracılığıyla GPX4 protein stabilitesini düzenleyerek ferroptozu inhibe eder ve mide kanseri metastazını teşvik eder. *Onkogen*, 42(2), 83–98.

- Lira-Junior, R., Åkerman, S., Gustafsson, A. ve diğerleri. Tükürükte koloni uyarıcı faktör-1'in yaş, sigara kullanımı ve oral ve sistemik hastalıklarla ilişkisi. *Sci Rep* 7 , 7280 (2017). (Lira-J.R. ve ark. 2017)
- Liu, Y. ve Yao, J. (2019). Kanserde sistatin SN'nin araştırma ilerlemesi. *OncoTargets ve terapi*, 12, 3411–3419.
- Liu, Y., Ma, H., Wang, Y., Du, X. ve Yao, J. (2019). Sistatin SN, Meme Kanserinde ER α /PI3K/AKT/ER α Döngü Yolunu Düzenleyerek Hücre Proliferasyonunu Etkiler. *OncoTargets and Therapy*, 12, 11359–11369.
- Maudsley, S., Walter, D., Schrauwen, C., Van Loon, N., Harputluoğlu, İ., Lenaerts, J., & McDonald, P. (2022). Intersection of the Orphan G Protein-Coupled Receptor, GPR19, with the Aging Process. *International journal of molecular sciences*, 23(21), 13598.
- Maudsley S, Schrauwen C, Harputluoğlu İ, Walter D, Leysen H, McDonald P. GPR19, Yaşlanma Süreciyle İlişkili Stres Tepkilerinin Çoklu Moleküler Yönlerini Koordine Ediyor. *Int J Mol Sci*. 2023 Mayıs 9;24(10):8499.
- Maurya, S.; Tripathi, S.; Singh, A. Doğum sonrası gelişim sırasında adropinin ve reseptör ifadesinin ontogenisi ve ergenlik öncesi farenin yumurtalığındaki pro-gonadal rolü. *Steroid Biyokimyası ve Moleküler Biyoloji Dergisi*, 2023, 234: 106404.
- Motohashi, H. ve ark. "Transkripsiyon faktörlerinin Maf ve CNC ailelerinden oluşan düzenleyici ağın entegrasyonu ve çeşitliliği." *Gen* 294. 1-2 (2002): 1-12.
- O'Connell, Maria A. ve John D. Hayes. "Sağlık ve hastalıkta Keap1/Nrf2 yolu: tezgahtan kliniğe." *Biyokimya Derneği İşlemleri* 43.4 (2015): 687-689.
- Oh SS, Park S, Lee KW, Madhi H, Park SG, Lee HG, Cho YY, Yoo J, Dong Kim K. Ekstraselüler sistatin SN ve katepsin B, anormal glikojen birikimini inhibe ederek hücre yaşlanmayı önler. *Hücre Ölümü Dis*. 2017 Nisan 6;8(4):e2729.
- Öksüzokyar, M. M. Eryiğit, S. Ç. , Ögüt Düzen, K. , Erdoğan Mergen, B. , Sökmen, Ü. N. & Ögüt, S. (2016). Biyolojik Yaşlanma Nedenleri ve Etkileri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4 (1) , 0-0. Retrieved from.
- Rose, MR, Flatt, T., Graves, JL, Greer, LF, Martinez, DE, Matos, M., ...ve Shahrestani, P. (2012). Yaşlanmak nedir? *Genetikte sınırlar*, 3, 134.
- Saklatvala J., Nagase H., Salvesen G., Magnus Abrahamson , Marcia Alvarez-Fernandez , Carl-Michael Nathanson; Sistatinler. *Biyokimya Sosyete Sempozyumu* 1 Eylül 2003; 70 179–199.
- Shimizu S, Mimura J, Hasegawa T, Shimizu E, Imoto S, Tsushima M, ve diğerleri. (2020) NRF2 promotöründeki tek nükleotid polimorfizmlerinin yaşlanmayla birlikte vasküler sertlikle ilişkisi. *PLoS ONE* 15(8): e0236834.

- Silva-Palacios, A. Ostolga- Chavarría, M., Zazueta, C., & Königsberg, M. (2018). Nrf-2: Yaşlanma sırasında moleküler ve epigenetik düzenleme. Yaşlanma araştırma incelemeleri, 47, 31–40.
- Stefan Kastner, Tilman Voss, Simon Keuerleber, Christina Glöckel, Michael Freissmuth, Wolfgang Sommergruber; İnsan Akciğer Kanseri Hücrelerinde G Protein-Bağlantılı Reseptör 19'un Ekspresyonu S-Fazına Girişle Tetiklenir ve G2 –M Hücre Döngüsü İlerlemesini Destekler. Mol Cancer Res 1 Ekim 2012; 10 (10): 1343–1358.
- Stein, L. M.; Yosten, G. LC; Samson, W. K. Adropin beyinde su içmeyi engellemek için etki eder: yetim G proteinine bağlı reseptör GPR19 ile olası etkileşim. Amerikan Fizyoloji Dergisi-Düzenleyici, Bütünleştirici ve Karşılaştırmalı Fizyoloji, 2016, 310.6: R476-R480.
- Suh, J. H., vd. Nrf2'nin transkripsiyonel aktivitesindeki düşüş, lipoik asitle geri döndürülebilen yaşa bağlı glutatyon sentezi kaybına neden olur. Ulusal Bilimler Akademisi Bildirileri, 2004, 101.10: 3381-3386.
- Wang, Kun, vd. Çürüğe yatkın bireylerin tükürük proteomunda yaşa özgü varyasyonların iTRAQ tabanlı kantitatif analizi. Translasyonel tıp dergisi, 2018, 16: 1-14.
- Zenkov, NK, ve diğerleri. "Nrf2 düzenlemesinin labirentleri." Biyokimya (Moskova) 82 (2017): 556-564.



ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Önsan KÜTÜKOĞLU, Eğitim hayatımı Adana ve Niğde de tamamladı. 2008 yılında Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji lisans bölümünden mezun oldu. 2010 yılından bu yana özel sektörde biyoloji öğretmeni olarak aktif çalışmaktadır. 2015 yılında Niğde Üniversitesi Eğitim Fakültesi 'nde pedagojik formasyonunu aldı. 2021 yılı Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi olarak çalışmalarına başladı.

