



**DEĞİŞİK YAŞ GRUPLARINDA TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİNDE
ALKALEN FOSFATAZ (ALP), AMİNO TERMİNAL PROPEPTİT (PINP),
C-TERMİNAL TELOPEPTİT (CTX), OSTEOKALSİN VE SKLEROSTİN
GEN İFADELERİNİN REAL TIME PCR İLE SAPTANMASI**

Aslıhan ÇOBAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

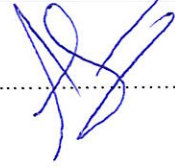
MART 2020

Aslıhan ÇOBAN tarafından hazırlanan “Değişik Yaş Gruplarında Tükürük Örneklerinde Alkalen Fosfataz (ALP), Amino Terminal Propeptit (PINP), C-Terminal Telopektit (CTX), Osteokalsin ve Sklerostin Gen İfadelerinin Real Time PCR ile Saptanması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

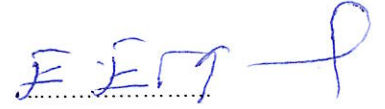
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



İkinci Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Erdal ERGÜNOL

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Kıbrıs Sağlık ve Toplum Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Abdullah TULİ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Çukurova Üniversitesi

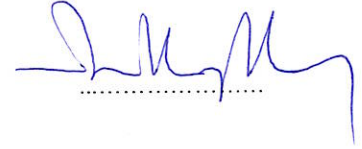
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Neslihan BUKAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

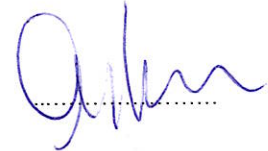
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Doç. Dr. Oytun PORTAKAL

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 12/03/2020

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Aslıhan ÇOBAN

28/02/2020

DEĞİŞİK YAŞ GRUPLARINDA TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİNDE ALKALEN
FOSFATAZ (ALP), AMİNO TERMİNAL PROPEPTİT (PINP), C-TERMİNAL
TELOPEPTİT (CTX), OSTEOKALSİN VE SKLEROSTİN GEN İFADELERİNİN REAL
TIME PCR İLE SAPTANMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Aslıhan ÇOBAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2020

ÖZET

Kemik yapım-yıkım biyobelirteçleri, kemik hastalıklarının takibinde önem taşımaktadır. Bu biyobelirteçlerin miktar tayininde çoğunlukla kullanılan örnekler ise girişimsel uygulama gerektiren serum/plazma veya idrar örnekleridir. Ayrıca radyolojik yöntemlerden kemik dansitometresi kullanılmaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada girişimsel bir işlem gerektirmeyen ve radyasyon maruziyetine neden olmayan tükürük örnekleri kullanılmıştır. Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Kıbrıs Sağlık ve Toplum Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden gönüllü olarak katılmayı kabul eden 45 birey alınmıştır. Katılımcıların yaş aralığı 19-23 ve 50-86 olarak belirlenmiştir. Tüm bireylerde kemik yapımı için amino terminal propeptit, alkalen fosfataz, osteokalsin, yıkım belirteci olarak C-terminal telopeptit ve kemik yapım inhibitörü olarak sklerostin varlığı incelenmiştir. Gardiyan gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Analizler mikro hacim spektrofotometre ve gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir tepkimesi cihazları ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre, yaştan bağımsız olarak amino terminal propeptit, sklerostin, C-terminal telopeptit ve alkalen fosfataz tükürükten elde edilmiş olup osteokalsin tespit edilememiştir. Ölçümlerden elde edilen grafikler incelendiğinde, yaşa bağlı bir ayırım yapılamamış ancak ilgili biyobelirteçlerin gen ifadeleri kıyaslanabilmiştir. Planlanacak ileri çalışmalar ile hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılabileceğini düşünmekteyiz. Tükürük numunelerinden elde edilen bu veriler kemik metabolizması ile ilişkili hastalıkların tanı ve tedavi takibinde etkin bir role sahip olabilecektir.

Bilim Kodu : 1010.1

Anahtar Kelimeler : Biyobelirteç, tükürük, sklerostin, alkalen fosfataz, osteokalsin, amino terminal propeptit, C-terminal telopeptit

Sayfa Adedi : 78

Danışman : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

İkinci Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Erdal ERGÜNOL

DETERMINATION OF SALIVARY LEVELS OF ALKALINE PHOSPHATASE (ALP),
AMINO-TERMINAL PROPEPTIDE (PINP), C-TERMINAL TELOPEPTIDE (CTX),
OSTEOCALCIN AND SCLEROSTIN GEN EXPRESSIONS IN DIFFERENT AGE
GROUPS BY REAL TIME PCR

(M. Sc. Thesis)

Aslıhan ÇOBAN

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALT SCIENCES

March 2020

ABSTRACT

Bone formation and resorption biomarkers are important in the follow-up of bone diseases. Samples used mostly in quantification of these biomarkers are serum / plasma or urine samples that require interventional application. In addition, bone densitometry, which is one of the radiological methods, is used. Saliva samples that do not require an interventional procedure and do not cause radiation exposure were used in this study. 45 individuals who voluntarily agreed to participate in the study from Gazi University Faculty of Medicine and Cyprus University of Health and Social Sciences Faculty of Dental Science were included. The age range of the individuals was determined as 19-23 and 50-86. The presence of amino terminal propeptide, alkaline phosphatase osteocalcin as the bone-formation biomarker, C-terminal telopeptide as the bone-resorption biomarker and sclerostin as bone-formation inhibitor were investigated in all individuals. GAPDH was used as the housekeeping gene. The analyzes were performed with micro volume spectrophotometer and real time quantitative polymerase chain reaction devices. According to the data obtained, regardless of age, the amino terminal propeptide, sclerostin, C-terminal telopeptide and alkaline phosphatase were obtained from saliva and osteocalcin could not be detected. When the graphics obtained from the measurements were examined, no age-related distinction was made, but gene expression of the relevant biomarkers could be compared. We think that patients and control groups can be compared with further studies to be planned. These data obtained from saliva samples may have an effective role in the diagnosis and treatment follow-up of diseases associated with bone metabolism.

Science Code : 1010.1

Key Words : Biomarker, saliva, sclerostin, alkaline phosphatase, osteocalcin,
amino terminal propeptide, C-terminal telopeptide

Page Number : 78

Advisor : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

Co-Advisor : Assist. Prof. Dr. Erdal ERGÜNOL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin en başından beri eğitim hayatımda, çalışma hayatımda ve sosyal yaşamımın her alanında deneyimi, desteği, sabrı ve yol göstericiliği ile yanımda olan, sevgi ve saygı duyduğum çok değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Aylin SEPİC DİNÇEL'e

Tez çalışmalarım boyunca, örneklerin toplanmasındaki katkıları ile birlikte bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen çok değerli hocam, ikinci tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Erdal ERGÜNOL'a

Tezime ait laboratuvar çalışmalarında laboratuvarını bana açan, hem teknik hem de manevi açıdan desteklerini esirgemeyen DS Bio ve Nano Teknoloji Ürün Takip Doğrulama İç ve Dış Tic. A.Ş.'ne,

Tez aşamasında çalışmanın deney aşamaları ve sonuç değerlendirmesinde destek ve bilgileri ile bana büyük katkısı olan, değerli zamanını ayıran sevgili Melike SEVER BAHÇEKAPILI ve Emre TEPEDELEN'e,

Tez çalışmam süresince yanımda olan sevgili annem Hicran ÇOBAN, babam Zafer Bülent ÇOBAN ve ablam Perihan ÇOBAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Hayatımın her alanında olduğu gibi tez çalışmamı hazırlarken her aşamada bana yardımcı olan sevgili Kadir Teoman ETİKCAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca, yolumun kesiştiği, beraber çalışma fırsatı bulduğum değerli hocalarım ve arkadaşlarıma,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemğin Yapısı ve Özellikleri	3
2.2. Kemik Dokusu	3
2.2.1. Kemik dokusunun organik bileşeni.....	3
2.2.2. Kemik dokusunun inorganik bileşeni	7
2.2.3. Kemik dokusu hücreleri	7
2.2.4. Kemik yapım ve yıkım biyobelirteçleri	8
2.3. Nükleik Asitler	10
2.3.1. Nükleotitler	10
2.3.2. DNA	12
2.3.3. RNA	14
2.4. Polimeraz zincir tepkimesi (PCR).....	15
2.4.1. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir tepkimesi	17
2.4.2. Ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi	18
2.4.3. Döngü miktarı (Cq) ve eşik değer döngüsü (Ct) Değerleri.....	19
2.4.4. Gardiyan genler.....	20

	Sayfa
2.4.5. Delta C _t ve delta delta C _t değerleri hesaplanması	20
2.5. Tükürük Numunesi ve Özellikleri.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Belirlenmesi.....	23
3.2. Numune Alım, Hazırlama ve Saklanması	23
3.3. Ölçümler.....	24
3.3.1. Kullanılan alet, gereç ve cihazlar	24
3.3.2. Tükürükten RNA izolasyonu	24
3.3.3. İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlenmesi	25
3.3.4. cDNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümü	26
3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile Analiz	26
3.4.1. Sıcaklık gradient analizi.....	27
3.4.2. Erime sıcaklığı eğrisi oluşturma	28
4. BULGULAR	31
4.1. Çalışma Grubuna Ait Tanımlayıcı Bulgular	31
4.2. Mikrohacim Spektrofotometre Ölçümleri ile Elde Edilen cDNA Bulguları.....	31
4.3. Sıcaklık Gradient Analizi Bulguları.....	32
4.4. Erime Sıcaklığı Analiz Bulguları	45
4.5. Kantitatif PCR Ölçüm Bulguları.....	49
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	65
EKLER.....	71
EK-1. Yerel etik kurul onay formu	72
EK-2. Araştırma anket formu	76
ÖZGEÇMİŞ	78

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kollajen tiplerine göre molekül formülü ve doku dağılımı listesi	4
Çizelge 2.2. Kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçleri	9
Çizelge 3.1. cDNA sentez basamakları.....	26
Çizelge 3.2. Primerlerin baz dizileri	27
Çizelge 3.3. PCR'da kullanılan ayıraçlara ait derişim ve hacimleri	28
Çizelge 4.1. Yaş ile birlikte cDNA.....	31
Çizelge 4.2. GAPDH primere ait sıcaklık değışimine bağı Cq değerleri	33
Çizelge 4.3. ACTB primere ait sıcaklık değışimine bağı Cq değerleri	34
Çizelge 4.4. SOST primere ait sıcaklık değışimine bağı Cq değerleri	35
Çizelge 4.5. SOST primere ait sıcaklık değışimine bağı Cq değerleri	36
Çizelge 4.6. APLP primere ait sıcaklık değışimine bağı Cq değerleri	38
Çizelge 4.7. APLP primere ait sıcaklık değışimine bağı Cq değerleri	39
Çizelge 4.8. COL1A1 primere ait sıcaklık değışimine bağı Cq değerleri	40
Çizelge 4.9. COL1A1 primere ait sıcaklık değışimine bağı Cq değerleri	41
Çizelge 4.10. BGLAP primere ait sıcaklık değışimine bağı Cq değerleri.....	42
Çizelge 4.11. BGLAP primere ait sıcaklık değışimine bağı Cq değerleri.....	43
Çizelge 4.12. Primerlere ait belirlenen optimum çalışma sıcaklıkları.....	44
Çizelge 4.13. Gardiyan gene ait yaşa bağı Cq değerleri.....	50
Çizelge 4.14. ACTB genine ait yaşa bağı Cq değerleri.....	51
Çizelge 4.15. SOST genine ait yaşa bağı Cq değerleri.....	52
Çizelge 4.16. APLP genine ait yaşa bağı Cq değerleri.....	53
Çizelge 4.17. COL1A1 genine ait yaşa bağı Cq değerleri.....	54

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Pürin ve pirimidin bazları	11
Şekil 2.2. Riboz ve deoksiriboz şekerlerinin yapısı	11
Şekil 2.3. DNA'nın yapısındaki bağlar	12
Şekil 2.4. PCR'da döngü ve eşik değerleri	20
Şekil 3.1. Tükürükten RNA toplama ve koruma kabı (NORGEN marka)	23
Şekil 4.1. GAPDH primere ait Cq/RFU grafiği	33
Şekil 4.2. ACTB primere ait Cq/RFU grafiği	35
Şekil 4.3. SOST primere ait Cq/RFU grafiği	36
Şekil 4.4. SOST primere ait Cq/RFU grafiği	37
Şekil 4.5. APLP primere ait Cq/RFU grafiği	38
Şekil 4.6. APLP primere ait Cq/RFU grafiği	39
Şekil 4.7. COL1A1 primere ait Cq/RFU grafiği	40
Şekil 4.8. COL1A1 primere ait Cq/RFU grafiği	41
Şekil 4.9. BGLAP primere ait Cq/RFU grafiği	43
Şekil 4.10. BGLAP primere ait Cq/RFU grafiği	44
Şekil 4.11. GAPDH gardiyan gene ait sıcaklık-RFU grafiği	45
Şekil 4.12. GAPDH gardiyan gene ait sıcaklık-d(RFU)/dT grafiği	45
Şekil 4.13. ACTB primerine ait sıcaklık-RFU grafiği	46
Şekil 4.14. ACTB gen bölgesine ait sıcaklık-d(RFU)/dT grafiği	46
Şekil 4.15. SOST primerine ait sıcaklık-RFU grafiği	47
Şekil 4.16. SOST gen bölgesine ait sıcaklık-d(RFU)/dT grafiği	47
Şekil 4.17. APLP primerine ait sıcaklık-RFU grafiği	48
Şekil 4.18. APLP gen bölgesine ait sıcaklık-d(RFU)/dT grafiği	48
Şekil 4.19. COL1A1 primerine ait sıcaklık-RFU grafiği	49
Şekil 4.20. COL1A1 gen bölgesine ait sıcaklık-d(RFU)/dT grafiği	49

Şekil	Sayfa
Şekil 4.21. Gardiyan gene ait yaşa bağlı Cq eğrileri	50
Şekil 4.22. ACTB genine ait yaşa bağlı Cq eğrileri	51
Şekil 4.23. SOST genine ait yaşa bağlı Cq eğrileri	52
Şekil 4.24. APLP genine ait yaşa bağlı Cq eğrileri	53
Şekil 4.25. COL1A1 genine ait yaşa bağlı Cq eğrileri	54
Şekil 4.26. Yaşa bağlı tüm parametrelerin gen ifadesi analizi	55
Şekil 4.27. Parametrelerin yaşa bağlı gen ifadesi analizi.....	55
Şekil 4.28. P1NP ile GAPDH gardiyan genin karşılaştırılması	56
Şekil 4.29. Sklerostin ve P1NP'nin GAPDH gardiyan genin karşılaştırılması	56
Şekil 4.30. ALP ve P1NP'nin GAPDH gardiyan genin karşılaştırılması.....	57
Şekil 4.31. C-terminal telopeptit ve P1NP'nin GAPDH gardiyan genin karşılaştırılması.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
ACTB	Beta aktin
ALP	Alkalen fosfataz
ATP	Adenozin trifosfat
BGLAP	Osteokalsin
Ca	Kalsiyum
CDK	Siklin bağımlı kinaz
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CMP	Sitidin monofosfat
COL1A1	Kollajen Tip 1
C_q	Döngü miktarı
C_t	Eşik değer döngüsü
CTX	Tip 1 kollajen karboksi terminal çapraz bağlı telopeptit
dATP	Deoksiadenin trifosfat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
dGTP	Deoksiguanin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
dTTP	Deoksitimin trifosfat
ELİZA	Enzim bağlı immunosorbent yöntem
GAPDH	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
GDP	Guanozin difosfat
HPRT-1	Hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz-1
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü
Mg	Magnezyum
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
Na	Sodyum
NANA	N-asetilnörominik asit

Kısaltmalar**Açıklamalar**

NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTX	Tip 1 kollajen amino terminal çapraz bağlı telopeptit
P	Fosfor
P1NP	Prokollajen tip 1 N-terminal propeptit
PCR	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFU	Bağlı Floresan Birim
RFU	Bağlı floresan birimi
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT-qPCR	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SOST	Sklerostin
ssDNA	Tek zincirli DNA
Taq	Thermus aquaticus
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü beta
Tm	Erime sıcaklığı
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik asit
UDP	Üridin difosfat

1. GİRİŞ

İskelet sisteminin tarihçesi M.S.129 yıllarında yaşayan Galen'e kadar dayanmaktadır. Bu sistemin en küçük yapı birimine kemik adı verilir. Kemik yapı vücuda destek sağlamak dışında hematopoezis ve homeostaziste de görev alır. Kemik, hayat boyu metabolik aktivitesini devam ettiren ve sürekli yenilenebilir özelliğe sahip endokrin bir doku olarak da kabul edilmektedir. Kemik yapım ve yıkım metabolizmasında bir denge söz konusudur. Burada rol oynayan ana hücreler osteoklastlar, osteoblastlar ve osteositlerdir. Kemik döngüsü, osteoblastlar ve osteoklastların enzimatik aktivitelerinin ve yapım-yıkım sırasında dolaşıma geçen kemik matriks elemanlarının ölçülmesiyle değerlendirilir. Osteoklastlar, pluripotent hemotopoietik kök hücrelerinden türeyen çok çekirdekli hücrelerdir. Pluripotent mezenkimal öncüllerden köken alan mononükleer hücreler ise osteoblastlardır [1, 2].

Günümüzde kemik yapının ve metabolik özelliklerinin izlenmesinde genellikle radyolojik testler (kemik mineral yoğunluğu ölçümü) ve serum/plazma ve idrar numuneleri kullanılmaktadır. Kemik döngüsü belirteçleri enzim aktivitesi belirteçleri, matriks proteinleri, kollajen yıkım belirteçleri ve kemik döngüsü düzenleyicileri olarak tanımlanabilmektedir [3].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kemik yapım-yıkım biyobelirteçlerinin tükürükten analiz edilebilmesinin önünü açmaktadır [4]. Bu çalışmalarda moleküler tekniklerin kullanımına dikkat çekilmekte, özgüllüğü ve hassasiyeti yüksek sonuçlar ortaya konulmaya çalışılmaktadır. Tükürük örneği kullanımının girişimsel bir işlem gerektirmemesi, çalışmaların günümüzde düşük maliyetli olması tükürük numunesinin araştırma ve hastalık takibinde çok önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmekte ve tanı da kullanılabilirliğinin araştırılmasına imkan vermektedir.

Bu çalışmada, bireylerde girişimsel işlemlerin ve ilişkili risk maruziyetinin azaltılması, tanı ve takipte moleküler tekniklerin kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Tükürük numunesinden RNA izolasyonunu takiben tamamlayıcı DNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen DNA içeriğinde kemik yapım-yıkım biyobelirteçleri varlığı için ilgili biyobelirteçlere ait primerler tasarlanarak, PCR (polimeraz zincir tepkimesi) metodu ile gen ifadesi varlığı tespit edilmiştir. Tükürük numunesinde PCR metodu kullanılarak kemik biyobelirteçlerinin,

gen bölgesi ifade (ekspresyon) analizi biyobelirteç tanımlama çalışmalarında henüz çok yeni olarak öne çıkmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemiğin Yapısı ve Özellikleri

Kemik çoklu işlevlere sahip karmaşık bir organdır. Vücut için yapısal bir bütünlük sağlamaktadır. Birincil yapısal görevlerinin yanı sıra, dokuların korunması, eklemlerin desteklenmesi ve değişik hormonlar tarafından homeostatik olarak düzenlenen kalsiyum, fosfat, sodyum, magnezyum gibi iyonların deposu olarak görev yapmaktadır. Hematopoezisin yürütülmesinde immun sistem ile bir köprü görevi görür.

Kemik statik olmayıp, dinamik olan bir dokudur ve yaşam boyunca sürekli olarak yenilenir. Ana hücre tipleri yıkımdan sorumlu osteoklastlar ve yapımdan sorumlu osteoblastlar ve osteoblastların farklılaşması ile oluşan osteositlerdir. Tüm hücre tipleri sürekli bir döngü şeklinde aktiftirler. Bu döngü, yaş, hormonlar ve çevresel etkenler gibi birçok farklı faktör ile değişmektedir [5, 6, 7].

Kemiğin yeniden yapılanması, yapım ve yıkımın zamansal ve mekansal birlikteliği ile karakterizedir. Bu birliktelik iskelet gelişimi ve normal kemik yapının sürdürülebilmesi için gereklidir. Hücre düzeyinde kemiğin yeniden yapılanması, kemiği oluşturan ve resorbe eden hücrelerin iyileşme, aktivite ve apoptozisine bağlıyken doku düzeyinde bu denge resorbe olan ve olmayan kemik miktarı ile ilişkilidir. Bu her iki mekanizma da kemik mikro çevresinde oluşan ve sistemik hormonlardan etkilenen sitokinler ile lokal ve sistemik olarak otokrin, parakrin ve endokrin yollarla kontrol edilmektedir [7, 8].

2.2. Kemik Dokusu

Kemik dokusunun, ağırlıkça %40'ı organik ve %60'ı inorganik bileşenlerden oluşmaktadır.

2.2.1. Kemik dokusunun organik bileşeni

Kemik dokusunun, %40'ını organik matriks oluşturmaktadır. Organik matriksin ise %90'ı kollajenden meydana gelir. %10'luk kısmını ise proteoglikan, matriks proteinleri, sitokin ve büyüme faktörleri oluşturur [9].

Kollajen, moleküler yapı olarak üçlü heliks geometrisinde, bir α -2 ve iki α -1 zincirinden meydana gelir. Yapısındaki α zincirlerinin değişmesine göre farklı kollajen tipleri oluşmaktadır.

Çizelge 2.1. Kollajen tiplerine göre molekül formülü ve doku dağılımı listesi [10]

Tip	Molekül Formülü	Doğal Polimer	Doku Dağılımı
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2$	Fibril	Deri, tendon, kemik, dentin, fasya)
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Fibril	Kıkırdak, nükleus pulposus, notokord, vitröz cisim, kornea
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibril	Deri, uterus, kan damarları, retiküler lifler, dalak, lenf nodları
IV	$[\alpha 1(IV)]_3$	Non Fibriler (Globuler)	Epitel hücrelerinin bazal laminası, böbrek glomerülleri, lens kapsülü
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	Fibril	Akciğer, kornea, kemik, fetal membranlar; tip I kollajen ile birlikte
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	Non Fibriler	Dermis, kıkırdak, plasenta, akciğerler, damar duvarı, intervertebral disk
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Non Fibriler	Bazal lamina bağlanma lifleri
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2 \alpha 2(VIII)$	Non Fibriler	Endotelyal hücreler, Descemet membran
IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	Non Fibriler	Kıkırdak, vitröz cisim, kornea
X	$[\alpha 3(X)]_3$	Non Fibriler	Hipertrofik kıkırdak
XI	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	Fibril	Kıkırdak, vitröz cisim
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Non Fibriler	Perikondrium, ligamentler, tendon

Çizelge 2.1. (devam) Kollajen tiplerine göre molekül formülü ve doku dağılımı listesi [10]

XIII	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	Non Fibriler	Epidermis, kıl folikülleri, endomisyum, bağırsak, kondrositler, akciğer, karaciğer
XIV	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$	Non Fibriler	Dermis, tendon, damar duvarı, plasenta, akciğer, karaciğer
XV	$[\alpha 1(\text{XV})]_3$	Non Fibriler	Fibroblast, düz kas hücreleri, böbrek, pankreas
XVI	$[\alpha 1(\text{XVI})]_3$	Non Fibriler	Fibroblast, amniyon, keratinosit
XVII	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$	Non Fibriler	Dermal-epidermal bağı
XVIII	$[\alpha 1(\text{XVIII})]_3$	Non Fibriler	Karaciğer, akciğer
XIX	$[\alpha 1(\text{XIX})]_3$	Non Fibriler	İnsan rabdomiyosarkom
XX	$[\alpha 1(\text{XX})]_3$	Non Fibriler	Kornea epiteli, embriyonik deri yapısı, sternal kıkırdak, tendon
XXI	$[\alpha 1(\text{XXI})]_3$	Non Fibriler	Kan damarı duvarı

Kemikte özellikle Tip 1 kollajen bulunmaktadır. Kollajenler, kemik dokusunu stabilize ettiği gibi, hücre farklılaşması ile yapışmayı ve çoğalmayı sağlayarak kemik defektlerinde önemli rol oynamaktadırlar [11].

Proteoglikanlar, protein kor yapısına kovalent bağlarla bağlı glikozaminoglikanların oluşturduğu makromoleküllerdir [12]. Glikozaminoglikanlar ise az miktarda protein ve negatif yüklü şeker zincirlerinden oluşmuş heteropolisakkaritlerdir. Yapılarında amino şeker (D-glukozamin veya D-galaktozamin) ve asidik şeker (glukronik asit veya iduronik asit) bulunur. Bu şeker yapıları sayesinde negatif yüke sahip olurlar [13]. Glikozaminoglikan ve proteoglikanlar, mukus salgılarının kaygan özelliğini sağlarlar, eklemlerde ve tendon kılıflarda sürtünmeyi engellerler, hücre göçü ve kararlılığında önemli rol oynamaktadırlar.

Kondroitin sülfat vücutta en fazla bulunan glikozaminoglikandır. Yapısında N-asetilgalaktozamin ve glukuronik asit bulunmaktadır. Kıkırdak yapısında en çok bulunmakla birlikte kalp kapakçıkları ve kemikte de yerleşim göstermektedir. Dördüncü karbonundan sülfatlanmış olan kondroitin sülfat, kondroitin-4-sülfat olarak adlandırılırken, altıncı karbonundan sülfatlanmış olan kondroitin sülfat, kondroitin-6-sülfat şeklinde adlandırılır [14].

Hyalüronik asit, sülfatlanmamış tek glikozaminoglikandır. Yapısında N-asetilglukozamin ve glukuronik asit bulunmaktadır. Özellikle umbilikal kordda, sinoviyal sıvıda ve gözün vitröz kısmında bulunmaktadır.

Keratan sülfat, asidik şeker içermeyen tek glikozaminoglikandır. Yapısında N-asetilglukozamin ve galaktoz bulunmaktadır. Kemik, saç ve tırnak yapısında bulunmaktadır.

Glikoproteinler, ana yapısı protein olan birimlere oligosakkarit bağlanması ile oluşan kemik matriks proteinlerindendir. Şeker yapıları proteinlere N- glikozidik veya O- glikozidik bağlarla bağlanmaktadır. Glikoprotein yapısına katılan şekerler aktiflenmiş nükleotit şekerlerdir [15]. Bu nükleotit şekerler ise UDP glukoz, UDP galaktoz, UDP ksiloz, UDP N-asetilglukozamin, UDP N-asetilgalaktozamin, GDP fukoz, GDP mannoz, CMP NANA olabilmektedir. Osteopontin, osteonektin, alkalen fosfataz ve osteokalsin kemik dokusunda bulunan başlıca glikoproteinlerdir.

Osteopontin, kemik matriksinde bulunan kollajen olmayan proteinlerinden biridir. Hücre adezyon proteindir. Hem osteoklast hem de osteoblastlara substrat bağlanmasını düzenleyerek adezyonu arttırmaktadır. Dolayısıyla osteopontin, kemik rezorpsiyonunun önemli bir düzenleyicisi olarak kabul görmektedir [16].

Osteonektin, kemik dokusunda kalsiyum bağlayıcı glikoproteindir. Kemik formasyonunun pozitif düzenleyicisidir, osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir. Osteonektin, hidroksiapatit ve kollajene seçici olarak bağlanma özelliğine sahiptir [17].

Osteokalsin osteoblastlar tarafından üretilen, mineralizasyonla ilgili glikoproteindir. Kalsiyumun kemik dokusuna bağlanmasından sorumludur. 1,25 dihidroksivitamin D3

tarafından stimüle edilmektedir. Parathormon tarafından inhibe edilir. Kemik yapım yıkım biyobelirteci olarak idrar ve serumdan ölçülebilmektedir [18]

2.2.2. Kemik dokusunun inorganik bileşeni

Vücutta bulunan magnezyum iyonlarının %60 kadarı, sodyum iyonlarının %50 kadarı, sitratın %70 kadarı ve potasyum iyonlarının küçük bir bölümü kemik dokusunda yer almaktadır. İnorganik veya mineral fraksiyonda önemli miktarda $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ bulunmaktadır. $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ yapısında olan kemik kristalleri hidroksiapatitler grubundadırlar. Hidroksiapatit kemiğe fizyolojik rolleri için gereken güç ve direnci sağlar. Kemik dokusunun sertliğini hidroksiapatit kristalleri sağlamaktadır. Hidroksiapatit kristalleri, kollajen fibriller boyunca paralel seyretmekte ve kollajen matriksi güçlendirmektedir [19]. Hidroksiapatit kristal ağ yapısında yer alan Ca^{+2} , diğer iki değerlikli iyonlar ile yer değiştirebilmekte ve fosfat ve hidroksil iyonları dışında kalan anyonlar, küçük kristallerin meydana getirdiği geniş alanlarda adsorbe edilmektedir.

2.2.3. Kemik dokusu hücreleri

Kemik yapım ve yıkımında, yeniden düzenlenmesinde osteoprojenitör hücreler, osteositler, osteoblastlar ve osteoklastlar yer almaktadır [20].

Osteoprojenitör hücreler, periostun iç tabakasında bulunmakta olup, TGF- β ile uyarıldığında osteoblastlara dönüşebilen öncü hücrelerdir. Bu hücreler, primer mezenkimal hücrelerden köken almaktadırlar.

Osteoblastlar; kemik yapımından sorumlu, aktif protein sentezi yapan modifiye fibroblastlardır. Mezenkim hücrelerinden köken alırlar. Osteoblastlar, tip 1 kollajen, proteoglikan, glikoprotein sentezi yaparlar. Ayrıca matriks kalsifikasyonunda görev alan alkalen fosfataz enzimini de içermektedirler. Osteoblast hücre yüzeyinde D vitamini, IGF-1 ve parathormon reseptörleri bulunmaktadır. Kalsifiye olmamış kemik doku osteoid olarak tanımlanmaktadır. Osteoid doku kalsifiye olunca, yeni meydana gelmiş matriks ile kuşatılan osteoblastlar, osteositlere dönüşmektedirler. Alkalen fosfataz, bu yeni meydana gelen kemik matriksi üretilirken osteoblastlar tarafından salgılanmaktadır. Osteoblastlar, yeni yapılan

osteoid içine doğru ince sitoplazmik uzantılar salarak, erken dönemde hücrel bağlantıyı sağlamaktadırlar [21].

Osteositler, mineralize kemik matriksi ile çevrili lakunada bulunmaktadır. Her lakunada bir osteosit bulunmaktadır. Bu hücreler, osteoblastlardan farklılaşan olgun kemik hücreleridir. Osteositler, kemik matriksinin devamlılığında, kan kalsiyumunun normal sınırlar içinde tutulmasında büyük rol oynamaktadır. Osteosit hücreleri azaldığında, osteoklastik aktivite artış göstermekte ve kemikte rezorpsiyon oluşmaktadır [22].

Osteoklastlar, kemik yıkımında görev alan çok çekirdekli hücrelerdir. Kemik dokuda hawship lakünasında bulunurlar. İçerdikleri asit fosfataz, kollajenaz ve diğer proteolitik enzimler sayesinde kemik dokuyu yıkıma uğratmaktadırlar. Kan kalsiyum regülasyonunda görevli parathormon, osteoklastları aktive etmektedir. Kan kalsiyum miktarı düşünce salgılanan parathormon osteoklastları aktive etmekte böylelikle, kemiklerde gerçekleşen yıkım sonrası açığa çıkan kalsiyum kana geçerek, kan kalsiyum dengesi sağlanmaktadır.

2.2.4. Kemik yapım ve yıkım biyobelirteçleri

Kemik dokusu sürekli yapım ve yıkımın süregeldiği işleyen bir sistem olarak çalışmaktadır. Bu doku içerisinde gerçekleşen yapım ve yıkımlar arasındaki denge bozulduğunda ise hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Kemik dokusunun sürekli işleyen bu sistem içerisinde azalan veya artan kemik dokuya ait bazı biyobelirteçler, bu dokudan kaynaklanan hastalıkların teşhisi ve tedavi takibinde yol gösterici olmaktadır [23, 24].

Kemik yapım yıkım modelinde tanımlanan biyobelirteçler genel olarak; kemik yapım belirteçleri ve kemik yıkım belirteçleri olarak iki grup altında toplanmaktadır. Kemik döngüsü belirteçleri kemik yapım-yıkımı ile ilişkili hücrelerin metabolik aktivitesini gösteren enzimler, yapım-yıkım süresi boyunca dolaşıma salınan kemik matriks-ilişkili belirteçler veya tip 1 kollajen yapım ve yıkım bileşenleridir. Son yıllarda yeni kemik belirteçleri başlığı altında hormon ve farklı proteinler de eklenmiştir [2, 25, 26].

Çizelge 2.2. Kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçleri [2, 25, 26]

KLASİK SINIFLAMA			
YAPIM BELİRTEÇLERİ		YIKIM BELİRTEÇLERİ	
Osteoblast		Osteklast	
Tip 1 prokollajen		Tip 1 kollajen	
Karboksi terminal propeptit (P1CP)		Karboksi terminal çapraz bağlı telopeptit (CTX)	
Intact Amino terminal propeptit (P1NP)		Amino terminal çapraz bağlı telopeptit (NTX)	
Total Amino terminal propeptit (P1NP)		Tip 1 kollajen C-telopeptit (1CTP)	
Kemiğe spesifik alkalen fosfataz (kemik ALP)		Tartarata-dirençli asit fosfataz 5b	
Osteokalsin		Serbest Çapraz Bağlar	
		Piridinolin (idrar)	
		Deoksipiridinolin	
YENİ KEMİK BELİRTEÇLERİ			
KEMİK MATRİKS-İLİŞKİLİ	Kemik Metabolizma Belirteçleri	Hormon	miRNAs
BELİRTEÇLER	Periostin	FGF-23	miR-148a
Dekarboksile osteokalsin (ucOC)	RANK-L	Klotho	mir-125b
Pentosidin	Katepsin K	Osteokalsin	
Homosistein	Sklerostin		
	Dkk-1		
	Sfingozin-1-fosfat		

Alkalen fosfataz (ALP), kemik yapım biyobelirtecidir. Plasental, karsinoplasental, intestinal ve hepatik renal/iskelet olmak üzere dört adet izoenzimi bulunmaktadır. Kemik alkalen fosfatazı osteoblastlar tarafından yapılmaktadır. Alkalen fosfataz, başta nükleik asitler ve alkaloidler olmak üzere alkali ortamda moleküllerden fosfat koparılmasını sağlamaktadır. Serumdaki alkalen fosfatazın en büyük kaynağı karaciğer ve kemiktir. Kemik yapımı biyobelirteci olarak kullanıldığında karaciğer izoenzimi ile %10 oranında çapraz tepkime verme ihtimali bulunmaktadır [27].

Prokollajen tip 1 N-terminal propeptit (P1NP), kemik organik matriksinde bulunmakta, osteoblast ve fibroblastlardan sentezlenmektedir. Prokollajen tip 1, prokollajenin kollajene dönüşmesi sırasında özgül proteazlar tarafından uzaklaştırılan amino terminal ve karboksi terminal uzantılara sahiptir. P1NP, tip 1 kollajen deposunun özgül bir göstergesidir. Kollajen oluşumu sırasında hücre içi boşluğa salınan P1NP, sonrasında kana karışmaktadır. P1NP başlangıçta trimerik kollajen yapıda salınır ancak termal bozunma sonunda monomerik yapıya dönüşmektedir. P1NP düzeyi, kemik hastalıklarında kemik yapımına bağlı olarak osteoblastik aktiviteyi göstermektedir. Sıklıkla kemik oluşumu ve kemik yıkımının önlenmesine yönelik tedavilerin takibinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [21].

Osteokalsin, olgun osteoblastlar tarafından üretilen kollajen olmayan proteindir. Kemik yapımını gösterir, kemiğin mineralizasyon ve oluşumunda da görev almaktadır. Kemik

döngüsünün hızlandığı, arttığı durumlarda serum osteokalsin düzeyleri de artar. Osteoporoz tedavilerinin izlenmesinde kullanılan bir biyobelirteçtir ancak serum düzeyleri diüurnal değişiklik gösterir, stabil değildir [28].

Tip 1 kollajen karboksi terminal çapraz bağlı telopeptit (CTX), tip I kollajen C-telopeptide ait spontan izomerizasyona eğilimli aspartil-glisin motifi (DG) içeren $\alpha 1$ zincirde bulunan 8 amino asitlik epitop olarak bilinen bölgedir. Bu bölge katepsin-K varlığında oluşmaktadır. Her çapraz bağ oluşturan amino asidin iki telopeptit aldehiti ve bir helikal bölgeyi birleştirdiği bilinmektedir. Kemikten salınım oranı osteoklastların yıkım aktivitesini yansıtır. Düzeyleri immün yöntemler ile idrardan ve serumdan ölçülür [29].

Sklerostin, projenitör hücrelerin hücre farklılaşmasında kullandığı WNT sinyal yolağını inhibe ederek osteoblast hücrelerinin farklılaşmasını engellemektedir. Osteositler tarafından üretilen sklerostin dolaşımında bulunmakta ve serum seviyeleri kemik yapımının inhibisyonunu göstermektedir [30].

2.3. Nükleik Asitler

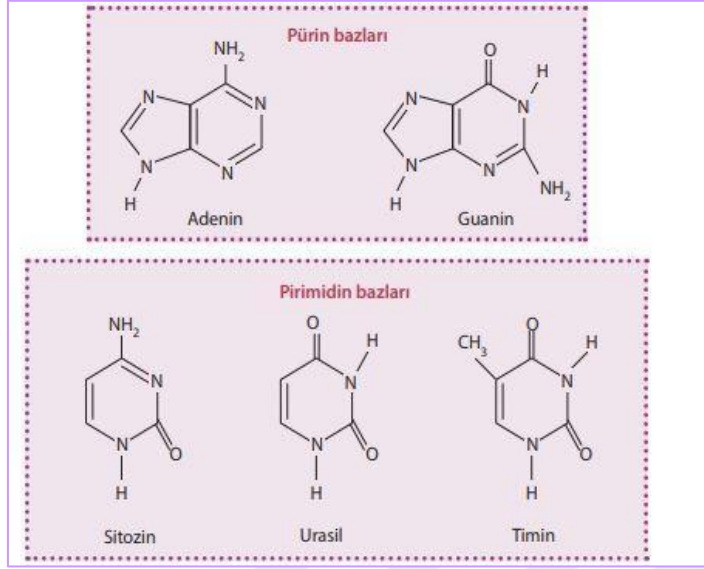
Nükleik asitler, genetik bilginin bir nesilden diğer nesile geçişine izin veren moleküllerdir. Nükleik asitlerin birincil yapısını kovalent bağlar ve beş karbonlu (pentoz) şeker, fosfat ve azotlu heterosiklik baz grubundan oluşan nükleotit dizileri oluşturmaktadır. İkincil yapısını, nükleotit dizilerinde meydana gelen düzenli ve kararlı değişimler oluştururken, üçüncül yapısını hücre veya kromozom formu içerisinde yer alabilmesi için gerçekleştirdiği katlanmalar oluşturmaktadır. Nükleik asitler DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA (ribonükleik asit) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır [31].

2.3.1. Nükleotitler

Nükleik asitler, birçok nükleotitin birleşmesi sonucu oluşan polinükleotitlerdir. Yapılarında pentoz şeker, fosfat ve azot içeren heterosiklik baz bulundurmaktadırlar. Fosfat grubunda bulunan fosforik asit, DNA ve RNA'ya negatif yük kazandırmaktadır.

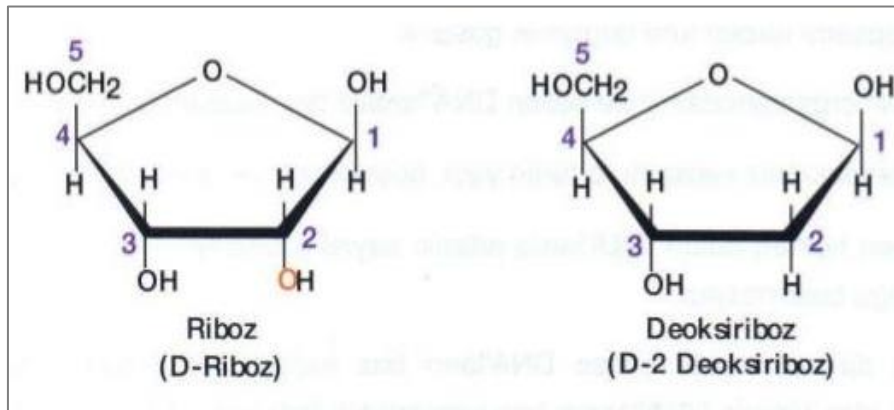
Her nükleik asit, dört ya da beş tip azotlu organik baz içermektedir: Pürin bazları (adenin, guanin), pirimidin bazları (sitozin, timin ve urasil) dir.

Pürin halkası çift halka yapısında olup, bu halkaya ait atomlar amino asit (aspartik asit, glisin ve glutamin), karbondioksit ve tetrahidrofolat gibi değişik bileşiklerden gelmektedir. Pirimidin halkası ise tek halka yapısına sahip olup, bu halkaya ait atomların kaynakları glutamin, karbondioksit ve aspartik asitten gelmektedir [32,33].



Şekil 2.1. Pürin ve pirimidin bazları [34].

Nükleik asitlerin yapısında pentoz şeker yapısı bulunmaktadır. DNA yapısında deoksiriboz, RNA yapısında riboz şeker bulunmaktadır. Riboz şekerin yapısında, deoksiriboz şeker yapısından farklı olarak bir hidroksil (-OH) grubu fazladır [35].



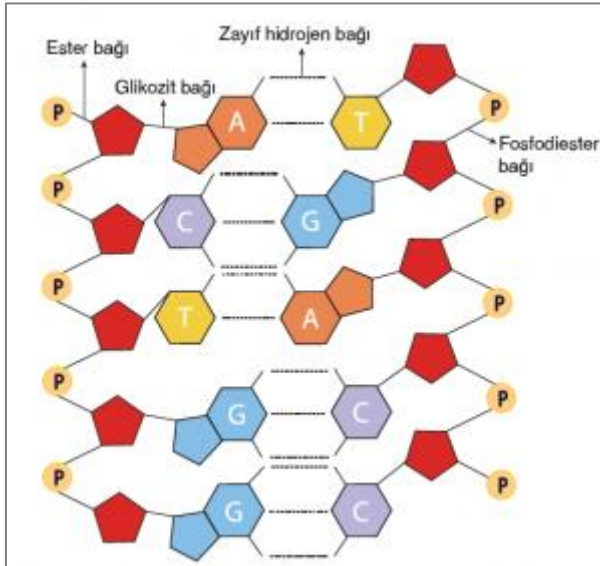
Şekil 2.2. Riboz ve deoksiriboz şekerlerinin yapısı [34].

2.3.2. DNA

Deoksiribonükleik asit, tüm organizmaların ve DNA virüslerinin canlılık faaliyetlerini göstermesi için gerekli genetik materyaldir. Tüm hücrel RNA'ların, enzimlerin, proteinlerin sentezi DNA şifresi ile gerçekleşir. DNA, çift zincirli ve sarmal bir yapıya sahiptir. Zincirler birbirine antiparalel konumda olup, biri 3'-5' yönünde iken, diğer tamamlayıcı zincir 5'-3' yönünde bulunmaktadır [36].

Çift zinciri oluşturan sarmallardan birinde bulunan bazlar, diğer sarmalda bulunan bazlar ile eşleşir. Adenin bazı daima timin ile guanin bazı daima sitozin ile eşleşmektedir. Chargaff kuralına göre bir DNA yapısında bulunan adenin miktarı timin miktarına, guanin miktarı sitozin miktarına eşit olmaktadır [37]. Bu bazlar arasında da hidrojen bağları bulunmaktadır. Adenin ile timin arasında iki hidrojen bağı bulunurken, guanin ile sitozin arasında üç hidrojen bağı bulunmaktadır. Hidrojen bağı sayısına bağlı olarak guanin ile sitozin nükleotitlerinden zengin bir DNA yapısı daha stabildir ve daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır [32].

DNA yapısında fosfat grupları arasında fosfoanhidrit bağı, baz ile şeker arasında N-glikozidik bağı, nükleotitler arasında ise fosfodiester bağı bulunmaktadır.



Şekil 2.3. DNA'nın yapısındaki bağlar

Ortamdaki sıcaklık artışı ve ani pH değişiklikleri DNA'nın denatüre olmasına ve böylelikle çift zincirin açılmasına neden olmaktadır. Çift sarmal yapısının yarısının açıldığı sıcaklık derecesi, DNA'nın erime derecesi olarak tanımlanmakta ve T_m simgesi ile gösterilmektedir.

DNA replikasyonu

DNA'nın kendini eşlemesi, DNA replikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Yarı korunumlu olarak gerçekleşen DNA replikasyonu esnasında, bir zincir kalıp görevi görür ve genetik bilginin aktarıldığı yeni zincir oluşur.

Ökaryotik hücre döngüsü içerisinde G1, S, G2 ve M evreleri bulunmaktadır. M evresi mitozun gerçekleştiği evredir. M fazından sonra hücre G1 adı verilen DNA sentezinin olmadığı evreye girmektedir. Sonrasında S fazına geçer. S fazında DNA sentezlenir ve DNA içeriği iki katına çıkmaktadır. G2 fazında DNA tamiri gerçekleşirken, RNA ve protein sentezi devam etmektedir. G2 fazı, mitozun gerçekleştiği M fazı ile sonlanmaktadır. Bu süreç birçok düzenleyici mekanizma tarafından kontrol edilmektedir. Hücre döngüsünün devam edip etmeyeceğine CDK (siklin bağımlı kinaz) karar vermektedir [32, 38].

DNA sentezi 5'-3' yönünde gerçekleşmektedir. DNA replikasyonunda DNA polimeraz enzimleri görev almaktadır. Replikasyon, ökaryot hücrelerde aynı anda pekçok noktadan başlayıp çift taraflı olarak ilerlemektedir. DNA replikasyonu esnasında DNA polimeraz, kalıp DNA molekülü ve primeri kullanarak sentezi gerçekleştirmektedir [39].

Primer, kalıp zincirde sentezin başlayacağı noktayı belirleyerek, tamamlayıcı olarak bağlanan küçük RNA oligonükleotitlerinden oluşmaktadır. Primer sayesinde serbest bir 3' ucu elde edilir. Primerler, primaz enzim aktivitesi sonucunda sentezlenmektedir. DNA polimeraz, bu primerin ucuna nükleotitleri ekleyerek senteze devam ederken, 3'-5' nükleaz aktivitesiyle de bir yandan yanlış eklenmiş nükleotit varsa düzeltme işlemini gerçekleştirmektedir.

DNA dizisine özel olarak bağlanan proteinler, başlatıcı proteinler tarafından tanınmaktadır. Ökaryot hücrelerde birden fazla başlangıç noktası bulunmaktadır. Ancak bu başlangıç noktaları arasında 30-300 kilobazlık mesafe bulunmaktadır. Daha sonra DNA helikaz çift sarmalı açar. İki zincirin açılması sonrası meydana gelen uzaysal stresi DNA topoizomera

II giderirken, SSBs (tek sarmal bağlayan proteinler) DNA zincirlerinin tekrar birleşmesini engellemektedir. Sentez her zaman 5'-3' yönünde gerçekleştiği için replikasyon kesikli ve kesiksiz zincir şeklinde gerçekleşmektedir. Lider yani kesiksiz zincir, replikasyon çatalı yönünde DNA polimeraz δ tarafından sentezlenir. Kesikli zincir ise kalıp zincir 5'-3' yönünde gerçekleştiği için RNA primerleri sayesinde sentezlenebilmektedir. RNA primerleri, DNA'da tamamlayıcı noktalara bağlanır. DNA polimeraz δ , ilk primerin olduğu noktada kendisine sağlanan 3' ucunu tanıyarak yapıya bağlanır ve sentez başlar. Bir sonraki RNA primerine kadar sentez bu şekilde devam eder. Bir sonraki RNA primerine yine 3' ucu bağlanarak sentez kesikli devam eder. RNA primerleri arasında DNA parçaları (okazaki fragmanları) sentezlenmiş olur. Bu fragmanlar arasında bulunan RNA primer parçaları DNA polimeraz α tarafından uzaklaştırılır, açıkta kalan uçlar DNA ligaz ile birbirine bağlanır. Bu esnada gerekli enerji ATP'den sağlanmaktadır. Eşleşme çatalı en sonunda sonlanma bölgesine ulaşır ve replikasyon sonlanır [40].

2.3.3. RNA

Çekirdekte sentezlenen DNA şifresinin, sitoplazmaya iletilmesi ve şifrelenen proteinlerin sentezlenmesinde RNA görev almaktadır. RNA yapısında DNA'dan farklı olarak ribonükleik asitler bulunmaktadır ve tek sarmallı bir yapıya sahiptir. Yapısında timin bazı yerine urasil bazı bulunmaktadır.

RNA'nın, ribozunun yapısına katılan rRNA, transkripsiyonda rol alan mRNA, translasyonda görev alan tRNA gibi protein sentezinde önemli görev alan tipleri mevcuttur.

rRNA, RNA polimeraz I tarafından çekirdekçikte sentezlenip, protein sentezinin gerçekleştirileceği bölgeyi oluşturmaktadır. Ökaryotlarda 28S, 18S, 5.8S rRNA alt birimleri mevcuttur.

mRNA, RNA polimeraz II tarafından çekirdekte sentezlenmektedir. Çekirdekteki DNA mesajının sitoplazmaya iletilmesinde görev aldığından en fazla çeşide ve boyut olarak en heterojen yapıya sahip RNA molekülüdür.

tRNA, RNA polimeraz III enzimi tarafından sentezlenmektedir. Gerekli amino asitlerin sentezleneceği bölgeye taşınmasında görev almaktadır. Proteinlerin yapısında yer alan 20 aminoasitin her biri için en az bir tane tRNA molekülü bulunmaktadır [41].

2.4. Polimeraz zincir tepkimesi (PCR)

Polimeraz zincir tepkimesi, in vitro koşullarda belirli bir DNA parçasının enzimatik olarak kopyalanması ve çoğaltılması yöntemidir. PCR, üç temel basamaktan oluşur;

- Hedef DNA'nın denatürasyonu,
- Bağlanma,
- Uzama.

Hedef DNA denatürasyonu işleminin amacı, çoğaltılmak istenen DNA bölgesi için kalıp olarak kullanılacak tek zincirli DNA elde etmektir. Bu işlemde ısı döngüleyici içerisine konulan DNA'nın 95°C sıcaklığa kadar ısıtılarak denatüre edilmesi sağlanır.

Denatürasyonu takiben daha düşük sıcaklıklarda oligonükleotit primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendilerine özgül bölgelere bağlanır. Bu olay çoğunlukla 47-60°C arasında 30-60 sn'de, 50-52°C sıcaklıkta ise 3-5 dakikada gerçekleşir. Uzama aşamasında ısı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Uzama basamağının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve çoğaltılacak DNA'nın uzunluğuna göre değişmekle birlikte, genellikle 70-74°C'de 2 dakika içerisinde gerçekleşir [42].

PCR için gerekli ayıracılar; kalıp DNA, dNTP karışımı, magnezyum klorür, tamponlar ve primerlerdir. Kalıp DNA olarak, arkeolojik, patolojik, histolojik materyaller, dokulardan izole edilmiş bütünlüğünü korumuş veya degrade olmuş DNA örnekleri ile RNA (cDNA elde edilir) kalıp olarak kullanılabilir. dNTP karışımı ise uzama aşamasında nükleotit kaynağı olarak kullanılır. Deoksiribonükleozit trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dördümlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. *Taq* DNA polimeraz, düşük dNTPderişimlerinde (10-100 µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla beraber, normal koşullarda PCR 100 µM dNTP derişimi ile gerçekleştirilir. PCR'de kullanılan magnezyum primer/kalıp etkileşimini sağlamaktadır.

Polimeraz zincir tepkimesi tekniğinin bulunmasından bu yana teknolojiye çok hızlı gelişmeler olmuş ve buna bağlı olarak da çok farklı PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar;

1. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)
2. Kantitatif PCR (qPCR)
3. Ters Transkriptaz PCR
4. Nested PCR
5. Multipleks PCR

Gerçek Zamanlı PCR: Gerçek Zamanlı PCR'nin geleneksel PCR'den farkı, başlangıç DNA miktarının hesaplanabilmesidir. Bu yöntem ile DNA amplifikasyonu, artan floresan ölçümleri ile ilişkilendirip kantitatif sonuçlar elde edilir. "Gerçek Zamanlı PCR"da oluşan ürün miktarı tepkime boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve probaların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun döngü sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir.

Gerçek zamanlı PCR ile geleneksel PCR arasında birçok belirgin fark vardır. Eş zamanlı PCR'de ürünün çoğalması erken evrelerde saptanabilir ve ürün artışındaki (eş zamanlı olarak) 2 kat gibi küçük ifade farklılıkları belirlenebilirken geleneksel PCR'de ancak (tepkime sonunda) agaroz jel elektroforezi ile 10 kat ve üzeri büyük ifade farklılıkları belirlenebilir.

Ters Transkriptaz PCR: RNA moleküllerinden komplementer DNA (cDNA) sentezini, retrovirüslerden izole edilen Revers Transkriptaz enzimi ile gerçekleştirilmesidir. Hassas ve hızlı bir yöntemdir. cDNA sentezlendikten sonra DNA-RNA sarmalı ayrılır, ayrılan DNA dizisi kalıp olarak kullanılarak çift zincirli DNA dizisi çoğaltılır.

Nested PCR: Birbirini takip eden iki polimeraz zincir tepkimesi ile karakterizedir. İlk amplifikasyonda, hedef DNA dizisinin dış bölgesine özgü iki dış primer kullanılır ve uzun bir bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilir. İkinci amplifikasyonda ise ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç kısmına bağlanan iki iç primer kullanılarak kısa bölgenin de çoğaltılması gerçekleştirilir.

Multipleks PCR (mPCR): Multipleks PCR metodunda kalıp DNA üzerinde birden fazla bölge için çoklu primer çifti tasarımı gerçekleştirilir. Sonuç itibarıyla aynı örnek üzerinde çoklu bölgenin çoğaltılmasına imkan sağlar. Net, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir.

2.4.1. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir tepkimesi

En yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerden bir tanesidir. RT-qPCR; Nükleik asitlerin, ışıma veren bir prob veya bir karışım kullanarak miktarının tayin edilmesinde kullanılmaktadır. Polimeraz zincir tepkimesi için çoğaltılacak DNA dizisini içeren kalıp DNA, DNA'ya tamamlayıcı olarak bağlanacak olan kısa (yaklaşık 18-20 baz) baz dizilerinden oluşan oligonükleotit primerler ve *Taq* DNA polimerazlara ihtiyaç duyulmaktadır. *Taq* DNA polimeraz enziminin kofaktörü olarak görev alan Mg^{+2} iyonunun da yeterli miktarda ortamda bulunması önemlidir. Numune içeriğinde bulunan hedef DNA molekülünün kantitatif olarak analizini gerçekleştirebilmek için ise floresan sistemler kullanılmaktadır [42,43].

Kalıp DNA'nın başlangıç miktarının tayininde her bir döngüde açığa çıkan floresan miktarı kaydedilerek, logaritmik faz boyunca PCR görüntülenir.

Başlangıç miktarı ne kadar yüksek ise, eksponansiyel başlangıç fazı o kadar erken döngüye girmektedir. DNA çoğalmasını gözlemleyebilmek için kullanılan floresan sistemler;

- DNA'ya bağlanan karışımlar (SYBR green),
- *Taq* polimeraza bağlı proplar (hidroliz propları),
- İki probun bir araya gelmesi ile gerçekleşen hibridizasyon propları,
- Moleküler işaretleyiciler olarak sıralanabilir.

DNA'ya bağlanan karışımlardan SYBR green, tek zincirli DNA'ya bağlandığında ışıma gerçekleştirmezken, çift zincirli DNA'ya bağlandığında ışıma görülmektedir. SYBR green karışımlar, hedef DNA'ya özgül olmadığından ortamda bulunan tüm çift zincirli DNA'lara bağlanabilmektedir. Bu nedenle hedef DNA'ya özel olarak tasarlanan primerler ile kullanıldığında anlamlı sonuçlar elde edilebilmektedir [44].

Taq polimeraza bağlı proplar, polimeraz zincir tepkimesinin bağlanma evresinde primerlere bağlanmakta ve uzama gerçekleşmektedir. *Taq* polimerazın 5' ekzonükleaz aktivitesi sayesinde proba bağlı floresan açığa çıkmaktadır.

Hibridizasyon proplarında, hedef DNA'ya özęü iki farklı bölgeye bağlanabilen prob tasarlanır ve bu proplar polimeraz zincir tepkimesi esnasında hedef DNA'ya bağlandıklarında iki prob bir araya gelir ve ışıma verir.

Moleküler işaretleyici floresan sistemlerde kullanılacak olan prob, reporter ve quencher boya ile işaretlenir. Normalde sa tokası yapısında olan probta reporter ve quencher boya yan yanadır, hedef DNA'ya bağlandığında bu iki boya birbirinden ayrılır ve ışıma gerçekleşir [45].

Floresan ışıma sonucunda eksponansiyel bir grafik oluşmaktadır. Oluşan grafikte, floresan değerin eşik değeri geçtiği noktaya eşik değer döngüsü anlamına gelen "treshold cycle" denmekte ve C_t olarak gösterilmektedir. C_t değeri, polimeraz zincir ürününün log lineer fazda eksponansiyel olarak artmaya başladığı zamandır [46].

Erime sıcaklık eğrileri, T_m olarak gösterilmektedir. PCR sonucunda hedef DNA'ya özęü primer ve proplarla çoğaltılıp açığa çıkan ürünün aynı erime sıcaklığına sahip olması beklenmektedir. Erime sıcaklığı eğrileri, PCR sonunda açığa çıkan ürünün tamamen hedef DNA'dan mı geldiğini yoksa ortamda özgül olmayan bağlanmalar veya primer dimerleri nedeniyle mi oluştuğunu göstermektedir.

Primer, PCR ürününün miktar tayininde büyük önem taşıdığından tasarımlarının iyi yapılması gerekmektedir. Primer uzunluğu 18-22 baz uzunluğu arasında olmalıdır. Gen dizisi bilinen bir türe ait primer tasarımı yapılmak isteniyorsa NCBI veri tabanı kullanılmalıdır. FASTA formatında elde edilen diziler ile primer blast platformu üzerinden tasarım gerçekleştirilmektedir.

2.4.2. Ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi

Ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi, hücrelerden elde edilen RNA'nın reverse transkriptaz enzimi kullanılarak tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezinin yapıldığı ve gen ifadesi analizlerinde kullanılan bir yöntemdir. Öncelikle cDNA sentezi yapılmak istenen

hücre veya dokudan RNA izolasyonu gerçekleştirilir. RNA izolasyonu sonunda saf olarak elde edilen RNA molekülleri, cDNA sentezinde kullanılmaktadır. RNA'dan ters transkriptaz enzimi ile cDNA'ya dönüştürülen moleküller, kantitatif analiz ve gen ifadesi analizlerinde kullanılabilir [47, 48].

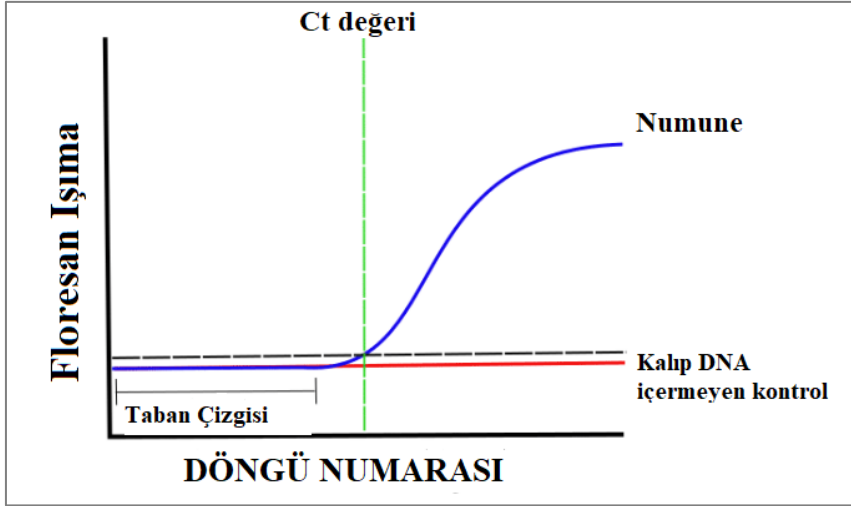
2.4.3. Döngü miktarı (C_q) ve eşik değeri döngüsü (C_t) Değerleri

Real time qPCR, belirlenmek istenen hedef gen bölgesinin mutlak miktarının bulunmasını veya örnekler arası hedef gen bölgesi miktarının karşılaştırmalı olarak tespitinde kullanılmaktadır. PCR tekniğinde miktar belirleme işlemi, amplifikasyon esnasında yayılan floresan ışıma hesaplanarak gerçekleştirilmektedir. Bu ışıma değerleri döngü miktarı (C_q) ve eşik değeri döngüsü (C_t) olarak ifade edilmektedir.

C_t değeri; üstel fazın başladığı bölgede, tepkime eğrisi ile kesişen çizgidir. Miktar belirlemesi yapmak istenilen hedef bölgenin floresan yoğunluğa ulaştığı döngüyü ifade etmektedir.

C_q değeri; tepkime eğrisi ile eşik değerin kesiştiği PCR döngü numarasıdır. Bu değer, örneklerden gerçek bir sinyal saptamak için kaç döngü gerektiğini göstermektedir. C_q değeri hedef kopya sayısı ile ilişkilidir. Düşük C_q değerleri, yüksek miktarda hedef kopya sayısını göstermektedir. C_q değerlerini birçok faktör etkileyebilmektedir. Bunlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

- PCR'da kullanılan bileşenler gelir. Kullanılan süper karışımdaki tuz derişimi ve pH değeri, C_q değerini etkileyen önemli faktörlerdendir. Bu nedenle karışım eğer manuel olarak hazırlanıyorsa mutlaka pH'ı ölçülmeli ve tuz derişimine bağılı çökmeler gözlemlenmelidir.
- FAM boyası (raportör) floresan ışımasının, ROX boyasına (referans boyası) oranı tepkime değerini vermektedir. FAM boyası floresans değerinin değışmediğı varsayıldığında, düşük ROX miktarı yüksek tepkime değerleri üretmektedir.
- Primerlerin özgülüğü, erime sıcaklıkları ve numune kalitesi C_q değerlerini etkilemektedir [49].



Şekil 2.4. PCR’da döngü ve eşik değerleri

2.4.4. Gardiyan genler

Sağlıklı hücrel koşullarda sürekli ve belirli düzeylerde ifade olması gereken özel genlere gardiyan genler (housekeeping genler) denir. Analiz edilecek protein ya da nükleik asit materyallerine göre kullanılabilecek farklı gardiyan genler bulunmaktadır. Örneğin sitoskelet oluşumunda beta aktin ve tübülün beta gardiyan genleri yüksek miktarda ifade edilmektedir. Metabolik enzim genleri GAPDH, HPRT-1 ve bazı ATPazlar olarak sıralanabilmektedir. Bu gardiyan genler yaşamsal faaliyeti olan tüm hücrelerde ifade edildiği için en çok tercih edilen gardiyan genlerdir [50].

2.4.5. Delta C_t ve delta delta C_t değerleri hesaplanması

Delta C_t değeri hedef gen ile normal gen arasındaki eşik değer miktarı farkını ifade etmektedir. Delta delta C_t değeri ise analiz edilen hedef genin C_t değeri ile gardiyan gen arasındaki farktan, normal gen ile gardiyan gen arasındaki fark çıkartılarak hesaplanmaktadır. Diğer bir deyişle; delta C_t değeri sonuçları endojen kontrole göre normalize ederken, delta delta C_t değeri sonuçları gardiyan gene göre normalize etmektedir.

Normalizasyon gerçekleştirildikten sonra $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri hesaplanarak gen ifadeleri hesaplanmaktadır [51, 52].

2.5. Tükürük Numunesi ve Özellikleri

Sindirimde rolü olan ve yapısında birden fazla fonksiyonel immün maddeyi içeren tükürük, oral kavite ve organizma için önemli bir akışkandır [X]. Tükürük içeriğinde organik ve inorganik bileşenler, enzimler ve gazlar bulunmaktadır.

Tükürüğün büyük kısmı (%65) submandibular bezler tarafından üretilmektedir. Parotis bezleri stimülasyona bağlı olarak toplam tükürük hacminin üretilmesine %20 ile %50 oranında katkıda bulunmaktadır. Dil altı bezleri tarafından sadece %5'lik küçük bir kısım salgılanmaktadır. Kalan %10'luk kısım ise ağız boşluğuna gömülü çok sayıda küçük bezler tarafından salgılanır [53].

Tükürük numuneleri tanı ve takip amaçlı kullanılabilecek bir sıvıdır. Son 10 yılda, tükürükten tanı çalışmaları katlanarak ilerlemektedir. Tükürükte çok çeşitli moleküler bileşenleri izlemek ve bunları serum bileşenleriyle karşılaştırarak biyokimyasal, mikrobiyolojik ve immünolojik çalışma yapılabilmektedir [54].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Belirlenmesi

Çalışmaya 19-23 ve 50-86 yaş aralığında bulunan sağlıklı 45 katılımcı alındı. Katılımcılar, tükürük numuneleri toplanmadan önce 1 saat içerisinde dişlerini fırçalamamaları, sigara içmemeleri ve su dışında herhangi bir besin maddesi yiyip içmemeleri konusunda bilgilendirildiler.

3.2. Numune Alım, Hazırlama ve Saklanması

Çalışmamızda örnekleri toplama ve saklama aşamasında RNA'nın iki ay boyunca oda sıcaklığında bozunmasını engelleyen, quarterner amonyum tuzu içeren, NORGEN marka, Saliva RNA Collection and Preservation Devices isimli tüpler kullanıldı. Bu tüpler numune alındıktan sonra hızlı hücre parçalanması sonrası açığa çıkan RNA'nın korunmasını sağlayan tampon içermektedir. Bu durum analitik performansı yüksek sonuçlar elde edilmesini sağlar (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tükürükten RNA toplama ve koruma kabı (NORGEN marka)

Örnek alım işlemi aşamasında;

- Numune verecek olan bireyler ağızlarını su ile çalkaladı ve 10 dk bekledi.
- Toplama hunisi, tüpün ağız kısmına yerleştirildi ve tüp içerisine numune hacmi 2 mL oluncaya kadar tükürme işlemi yapıldı.

- Kit içinde bulunan, tampon solüsyon içeren ampül kırılarak tükürük toplama tüpünün içerisine aktarıldı.
- Toplama tüpünün kapağı sıkıca kapatılarak, 10 saniye boyunca çalkalandı. Tükürük numunesinin ve koruyucu tamponun iyice karışması sağlandı.

Örnek alınan bireylere ait bilgiler EK-2 Araştırma Anket Formu ile kaydedildi. Numuneler, RNA izolasyonu yapılacağı tarihe kadar -40°C buzdolabında bekletildi.

3.3. Ölçümler

3.3.1. Kullanılan alet, gereç ve cihazlar

Kullanılan cihazlar: BioRad CFX 384 Touch Real Time PCR, Colibri Microvolume Spektrometre, IKA marka vorteks, Hermle marka santrifüj, biyolojik kabin, Memmert marka su banyosu, çeşitli hacimlerde ayarlanabilir çok kanallı ve tek kanallı otomatik pipetler.

Kullanılan kimyasallar: Distile/Bidistile su, PCR saflıkta su, tükürükten RNA toplama kabı ve koruma çözeltileri, %96 etanol (Merck), osteokalsin primeri, alkalen fosfataz primeri, amino terminal propeptit primeri, C terminal telopeptit primeri ve, sklerostin primeri, SYBR green karışımı

Kullanılan kitler: Total RNA izolasyon kiti, cDNA sentez kiti,

3.3.2. Tükürükten RNA izolasyonu

Tükürükten RNA izolasyonu için Norgen Total RNA İzolasyon Kiti kullanılmıştır. Kit içeriği ve ayıraçlar:

- Tampon çözelti RL
- Yıkama çözeltisi A
- Sulandırma çözeltisi A
- Mini spin kolonlar
- Toplama tüpleri
- Sulandırma tüpleri

Çalışma adımları:

- RNA toplama ve koruma tüplerine alınan tükürük numuneleri 10 saniye boyunca karıştırıldı.
- 250 µL örnek, RNAaz yoksun tüplere alındı.
- 250 µL RL tampon (RNA Later) örnek üzerine eklendi ve karıştırıldı.
- 250 µL %96'lık etil alkol eklenerek karıştırıldı. Böylelikle lizat çözeltisi hazırlanmış oldu.
- Hazırlanan lizattan 600 µL alınarak, kolon üzerine eklendi ve 3500 G (6000 rpm)'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Bu işlem, tüm lizat çözeltisi bitene kadar tekrar edildi.
- Kolon toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve yeni toplama tüpü yerleştirildi ve kolon yıkama işlemlerine geçildi.
- 400 µL, yıkama çözeltisi A eklendi. 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüpüne biriken sıvı atıldı. Bu yıkama işlemi 3 defa tekrar edildi.
- Son yıkama işleminin ardından, kolon içindeki tüm sıvının toplama tüpüne geçmesi için 2 dk daha santrifüj edildi ve kolonun tamamen kuruması sağlandı.
- Kolona yeni 1,7 mL'lik elüsyon tüpü takıldı.
- 50 µL elüsyon çözeltisi A, kolona eklendi.
- 2 dk boyunca 200 G (2000 rpm)'de santrifüj edildi.
- Kolonda hiç sıvı kalmaması için 14000G'de 1 dk daha santrifüj edildi.
- Tükürükten RNA izolasyonu numunesi, cDNA sentezinde kullanılmak üzere -20°C'ye konuldu.

3.3.3. İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlenmesi

İzole edilen RNA numunelerinden tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezleme işlemleri için, BioRad iScript cDNA Sentez Kiti kullanıldı. Toplam tepkime hacmi 40 µL olarak hesaplandı. Her kuyu için 5x iScript tepkime karışımından 8 µL, iScript Reverse Transkriptaz enziminden 2 µL, RNA numunesinden 6 µL ve nükleaz yoksun özellikli sudan 24 µL eklendi. BioRad marka ısı döngü cihazına yerleştirilen örneklerde aşağıdaki çizelge 3.1'de belirtilen program ayarlanarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1. cDNA sentez basamakları

Priming	5 dakika, 25°C
Ters Transkripsiyon	20 dakika, 46°C
Ters Transkripsiyon İnaktivasyon	1 dakika, 95°C

cDNA sentezi gerçekleştirilen numuneler, kantitatif PCR analizi işlemine kadar -20°C'de saklandı.

3.3.4. cDNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümü

Sentezlenen cDNA'lerin mikrohacim spektrofotometrede DNA derişim ölçümleri gerçekleştirildi. Kantitatif PCR analizi öncesi, cDNA derişimi ölçülerek tüm numunelerdeki cDNA derişimleri eşitlenerek, kantitatif PCR ile gen ifadesi çalışmaları gerçekleştirildi.

Çalışma adımları:

- Spektrofotometrenin optik yüzeyi saf su ile temizlendi.
- Cihazda, ssDNA-33 olarak belirtilen ve tek zincirli DNA ölçümünde kullanılan basamak seçildi.
- Örnek sulandırma tamponu A optik yüzey üzerine 1 µL damlatılarak, cihazın 260 nm dalga boyunda kalibrasyonu yapıldı.
- Buz aküsü üzerinde bekletilen cDNA örneklerinin, 260 nm dalga boyunda derişim ölçümleri gerçekleştirildi.

3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR ile Analiz

Analizler için BioRad CFX 384 Touch gerçek zamanlı PCR cihazı kullanıldı. Öncelikle bu analizde kullanılmak üzere primer tasarımları yapıldı. Primer tasarımları için NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanı üzerinden alkalen fosfataz, amino terminal propeptit, C-terminal telopeptit, osteokalsin ve sklerostin proteinlerinin insanlarda belirlenen dizimi (sekansı) elde edildi. Bu sekanslar kullanılarak, BLAST (Basic

Local Alignment Search Tool) programı ile uygun primer tasarımı oluşturuldu. Primere ait tasarımlar Çizelge 3.2’de verildiği gibidir.

Çizelge 3.2. Primerlerin baz dizileri

Primer Adı	Baz Dizisi
Sklerostin (SOST) Forward Primer	5'AGTACCCCGAGCCTCCAC3'
Sklerostin (SOST) Reverse Primer	5'GCTGTACTCGGACACGTCTT3'
Osteokalsin (BGLAP) Forward Primer	5'CTCACACTCCTCGCCCTATT3'
Osteokalsin (BGLAP) Reverse Primer	5'GTGGTCAGCCAACTCGTCA3'
C-terminal telopeptit (COL1A1) Forward Primer	5'GAGGAATTTCCGTGCCTG3'
C-terminal telopeptit (COL1A1) Reverse Primer	5'ACCAGGACGACCAGGTTTT3'
Amino terminal propeptit (ACTB) Forward Primer	5'CAATGTGGCCGAGGACTTTGAT3'
Amino terminal propeptit (ACTB) Reverse Primer	5'AGTGGGGTGGCTTTTAGGATGG3'
Alkalen Fosfataz (ALP) Forward Primer	5'CCTGCCTTACTAACTCCTTAGTGC3'
Alkalen Fosfataz (ALP) Reverse Primer	5'CTTAGCCACGTTGGTGTGA3'

3.4.1. Sıcaklık gradient analizi

Tasarımı yapılan primerlerin, çalıştığı optimum sıcaklık değerlerinin belirlenebilmesi için sıcaklık gradient ve erime sıcaklık analizleri gerçekleştirildi.

Çalışma adımları;

- Tüm örneklerden 5 µL alınarak ortak bir havuz oluşturuldu, iyice karıştırıldı. Derişim, 10 ng/µL 'ye ayarlandı.
- Çizelge 3.4'te verildiği gibi her bir kuyu için; 10 µL SYBR green karışımı, ilgili primere ait 10 µM derişiminde 0,9 µL forward primer ve aynı derişim ve hacimde reverse primer, 3,2 µL PCR saflıkta su, 5 µL hacminde 10 ng/µL derişiminde cDNA örnekleri kullanıldı.

Çizelge 3.3. PCR’da kullanılan ayıraçlara ait derişim ve hacimleri

Ayıraçlar	Kullanılan Derişim	Hacim
SYBR Green Karışımı	1x	10 µL
Forward Primer	10 µM	0,9 µL
Reverse Primer	10 µM	0,9 µL
Su	-	3,2 µL
cDNA	10 µM doğrumu kontrol edermisin aşağıda 30 deniyor kontrol gerekli	5 µL

PCR için oluşturulan protokolde, her bir primer için optimum sıcaklık değeri belirleneceğinden, 48 – 63°C arası sıcaklık değerleri oransal olarak 16 kuyuya dağıtılarak denendi. PCR protokolü çizelge 3.4’te gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.4. Sıcaklık gradient analizi döngü profili özellikleri

	Sıcaklık	Süre
Polimeraz Aktivasyonu ve DNA Denatürasyonu	95°C	30 saniye
Denatürasyon*	95°C	15 saniye
Bağlanma ve Uzama* (Sıcaklık gradient)	48-63°C	10 saniye
*39 defa döngü şeklinde tekrar edildi.		



3.4.2. Erime sıcaklığı eğrisi oluşturma

Erime sıcaklığı değeri, tasarlanan primerin DNA’ya bağlanacağı özgül sıcaklığı göstermektedir. Tasarlanmış olan primer, hedef olmayan bölgelere de bağlanabilir, bu da istenmeyen ürünlerin ortaya çıkmasına neden olur. Erime sıcaklığı aslında primerin istenilen bölgeye özel olarak bağlanacağı sıcaklığı belirtmektedir. Erime sıcaklığı analizi; PCR cihazında 0,05 saniyede 0,5 °C sıcaklık artışı ile 55°C’den 95°C’ye çıkarılıp, okunması ile gerçekleştirildi.

3.4.3. Kantitatif PCR analizi

Her bireye ait cDNA numunelerinin 10 μ M derişimi, sulandırma çözeltisi kullanılarak eşitlendi ve 30 ng/ μ L olacak şekilde seyreltilti. Sıcaklık gradient analizine göre her bir primer için bulunan optimum sıcaklık değerleri kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR kuruldu ve ayrı ayrı analiz edildi. Numunenin içeriğinde, aminoterminal propeptit, sklerostin, C-terminal telopeptit, osteokalsin ve alkalen fosfataz'ın bulunup bulunmadığına bakıldı. İlgili numuneye ait piklerin eşik değer ile kesiştiği noktayı ifade eden C_q değeri sonuçları elde edildi.

3.4.4. Gen ifadesi analizi

Gen ifadesi analizi için, gardiyan gen olarak GAPDH kullanıldı. Analizler normalize ekspresyon $\Delta\Delta C_q$ değeri kullanılarak hesaplandı. Yaşa bağlı, gen ifadeleri karşılaştırıldı.



4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubuna Ait Tanımlayıcı Bulgular

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Kıbrıs Sağlık ve Toplum Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden gönüllü olarak katılmayı kabul eden sağlıklı 45 birey alınmıştır. Çalışma grubunu yaş aralığı 19-23 ve 50-86 olan toplam 26 kadın ve 19 erkek oluşturmuştur.

4.2. Mikrohacim Spektrofotometre Ölçümleri ile Elde Edilen cDNA Bulguları

Tükürükten RNA izolasyonu yapıldıktan sonra, cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tepkime sonunda elde edilen tek zincirli cDNA derişim ölçümleri Colibri marka mikrohacim spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

Örneklerden 1 µL alınarak optik yüzey üzerine damlatıldı. Elde edilen derişim değerlerine göre, tüm tükürük örneklerinden cDNA sentezinin gerçekleştiği görüldü. cDNA'nın yaş ile birlikte derişim değerleri çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Yaş ile birlikte cDNA

Örnek Numarası	Yaş	ssDNA Derişim (ng/ µL)
1	19	651,4
2	20	688,1
3	20	694,7
4	20	671,2
5	20	673,0
6	20	672,2
7	20	633,9
8	20	668,1
9	20	669,4
10	20	489,2
11	20	637,9
12	21	677,1
13	21	656,1
14	21	666,6
15	21	658,8
16	21	670,5
17	21	697,2
18	21	640,3
19	21	709,8

Çizelge 4.1. (devam) Yaş ile birlikte cDNA derişimi

20	21	335,8
21	21	684,3
22	21	726,7
23	21	669,9
24	21	728,5
25	21	709,0
26	22	651,6
27	22	672,0
28	22	712,9
29	22	681,1
30	22	652,6
31	22	739,2
32	22	635,7
33	23	638,3
34	50	653,3
35	50	662,8
36	58	333,9
37	59	685,6
38	62	688,1
39	64	685,6
40	64	699,7
41	65	692,2
42	73	694,6
43	78	653,7
44	80	668,5
45	86	718,8

4.3. Sıcaklık Gradient Analizi Bulguları

Tüm primerlerin, DNA'ya bağlandığı optimum sıcaklığı belirlemek için 48 – 63°C sıcaklık aralığı 16 basamakta denendi. PCR için, tüm cDNA numunelerinden ortak bir havuz oluşturularak, derişimi 30 ng/μL olarak ayarlandı. 20 μL tepkime hacmi için 5 μL cDNA örneği kullanıldı.

C_q değeri, DNA ile primerin özgül olarak bağlandığı, tepkime eğrisi ile eşik değerin kesiştiği döngü sayısını belirtmektedir. Literatürde ilk 5 döngüde görülen floresan ışımlar kapsam dışı tutulmaktadır. Aynı zamanda, 30.döngü ve sonrasında görülen floresan ışımlar da özgül olmayan bağlanmaları göstermektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, 10.döngü ile 30.döngü arasında gerçekleşen floresan ışımlar anlamlı bir bağlanma olduğunu ifade etmektedir.

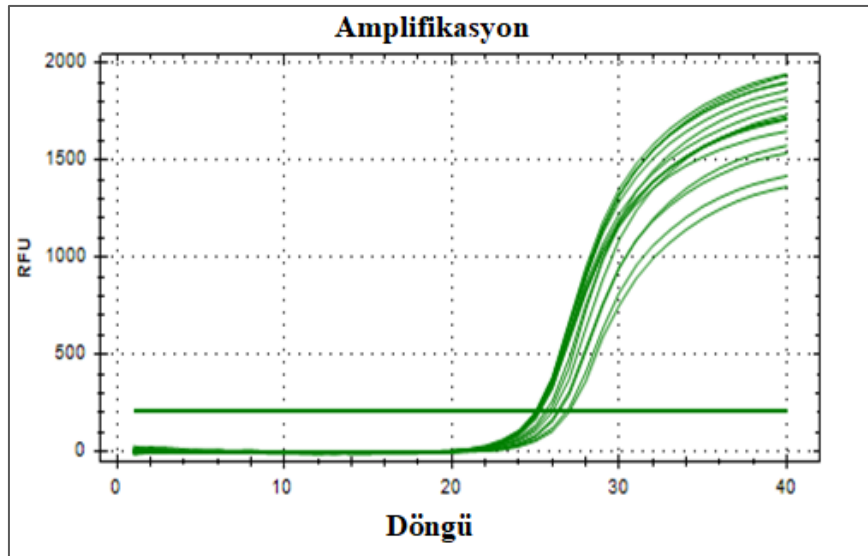
Optimum bağlanma 10.döngü ile 30.döngüler arasında en erken gelen ışımda gerçekleşmektedir.

Gardiyan gen olarak kullanılan GAPDH primere ait, sıcaklık değerlerine bağlı C_q değerlerine ait grafik Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. GAPDH primere ait sıcaklık değişimine bağlı C_q değerleri

Primer Adı	Sıcaklık Değeri	C_q Değeri
GAPDH	63	27,01
GAPDH	62,7	26,81
GAPDH	62,2	26,38
GAPDH	61,6	26,28
GAPDH	60,5	26,02
GAPDH	59,5	25,75
GAPDH	58	25,56
GAPDH	56,5	25,25
GAPDH	54,6	25,09
GAPDH	53,1	25
GAPDH	51,8	25,04
GAPDH	50,6	25,15
GAPDH	49,6	25,12
GAPDH	48,8	25,21
GAPDH	48,3	25,02
GAPDH	48	25,11

GAPDH primere ait RFU (bağıl floresan birim)’e karşı döngü grafiği Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. GAPDH primere ait C_q /RFU grafiği

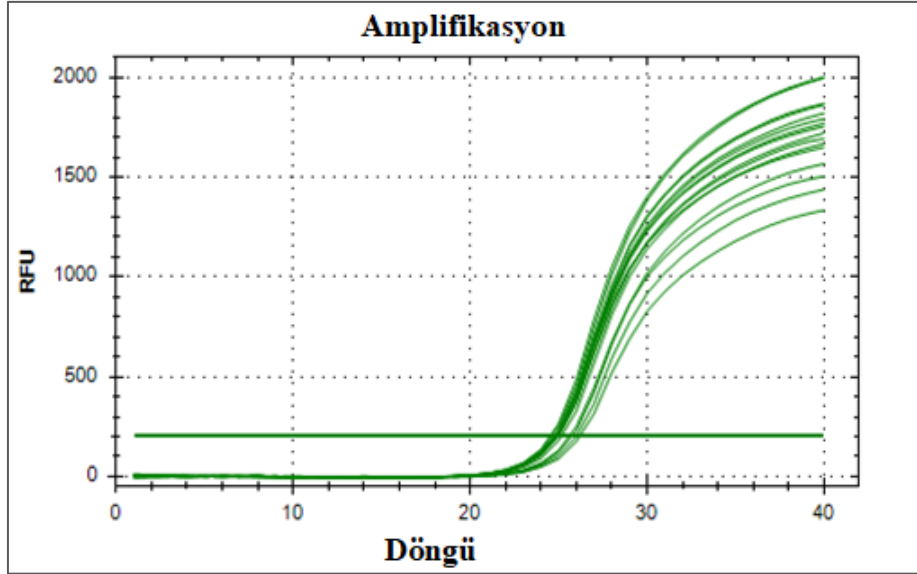
Elde edilen verilere göre GAPDH primerin 48-63°C sıcaklık aralığında C_q değerleri 25-27 aralığında görüldü. Bu aralıkta yer alan tüm sıcaklık değerlerinin GAPDH primeri için uygun olduğu görüldü, ancak optimum sıcaklık değeri 25. döngüde ışıma verdiği 53,1°C olarak belirlendi. Kantitatif PCR ve gen ifadesi değerlendirmesinde bu sıcaklık değeri esas alındı.

Amino terminal propeptiti kodlayan ACTB primere ait, sıcaklık değerlerine bağlı C_q değerlerine ait grafik Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. ACTB primere ait sıcaklık değişimine bağlı C_q değerleri

Primer Adı	Sıcaklık Değeri	C _q Değeri
ACTB	63	26,22
ACTB	62,7	26,04
ACTB	62,2	25,78
ACTB	61,6	25,62
ACTB	60,5	25,18
ACTB	59,5	24,88
ACTB	58	24,87
ACTB	56,5	24,8
ACTB	54,6	24,53
ACTB	53,1	24,82
ACTB	51,8	24,75
ACTB	50,6	24,88
ACTB	49,6	25,02
ACTB	48,8	25,01
ACTB	48,3	24,62
ACTB	48	24,88

ACTB primere ait RFU (bağıl floresan birim)'e karşı döngü grafiği Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. ACTB primere ait C_q/RFU grafiği

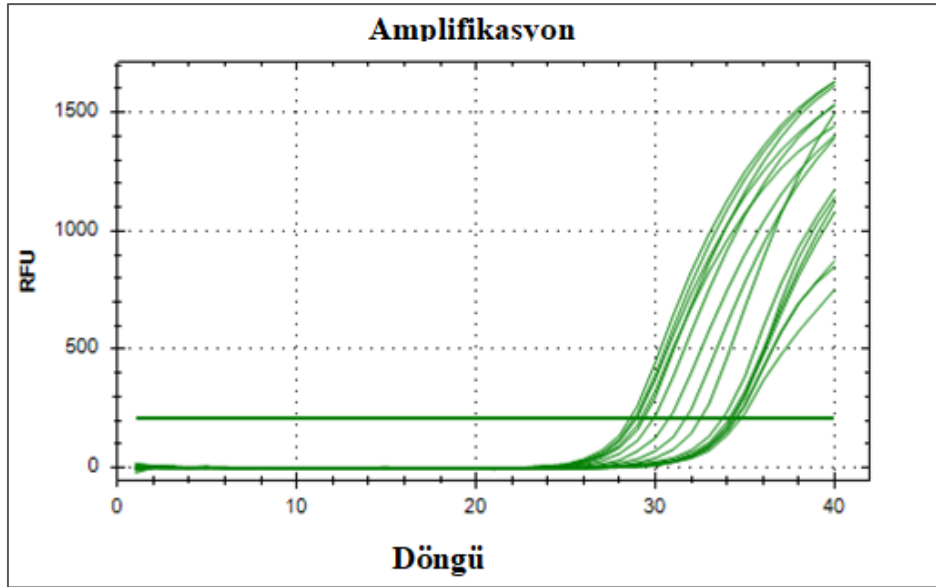
Elde edilen verilere göre ACTB primerin 48-63°C sıcaklık aralığında C_q değerleri 24-26 aralığında görüldü. Bu aralıkta yer alan tüm sıcaklık değerlerinin ACTB primeri için uygun olduğu görüldü, ancak optimum sıcaklık değeri 24,53. döngüde ışıma verdiği 54,6°C olarak belirlendi. Kantitatif PCR tepkimesi ve gen ifadesi analizlerinde bu sıcaklık değeri kullanıldı.

Sklerostini kodlayan SOST primere ait, sıcaklık değerlerine bağlı C_q değerlerine ait grafik çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. SOST primere ait sıcaklık değişimine bağlı C_q değerleri

Primer Adı	Sıcaklık Değeri	C _q Değeri
SOST	63	34,49
SOST	62,7	33,71
SOST	62,2	34,28
SOST	61,6	34,74
SOST	60,5	34,45
SOST	59,5	34,09
SOST	58	34,22
SOST	56,5	32,49
SOST	54,6	31,66
SOST	53,1	30,72
SOST	51,8	29,88
SOST	50,6	29,34
SOST	49,6	29,18
SOST	48,8	28,92
SOST	48,3	28,78
SOST	48	28,55

SOST primere ait RFU (bağıl floresan birim)'e karşı döngü grafiği Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. SOST primere ait Cq/RFU grafiği

Elde edilen verilere göre SOST primerin 48-63°C sıcaklık aralığında C_q değerleri 28-34 aralığında görüldü. Sıcaklık değeri yükseldikçe, C_q değerinde de artış olduğu gözlemlenmiştir. SOST primerinin daha düşük sıcaklıkta daha iyi çalıştığı düşünülerek 40-52 °C aralığında tekrar çalışıldı.

Sklerostini kodlayan SOST primere ait, 40-52 °C sıcaklık değerlerine bağlı C_q değerlerine ait grafik Çizelge 4.5'te verilmiştir.

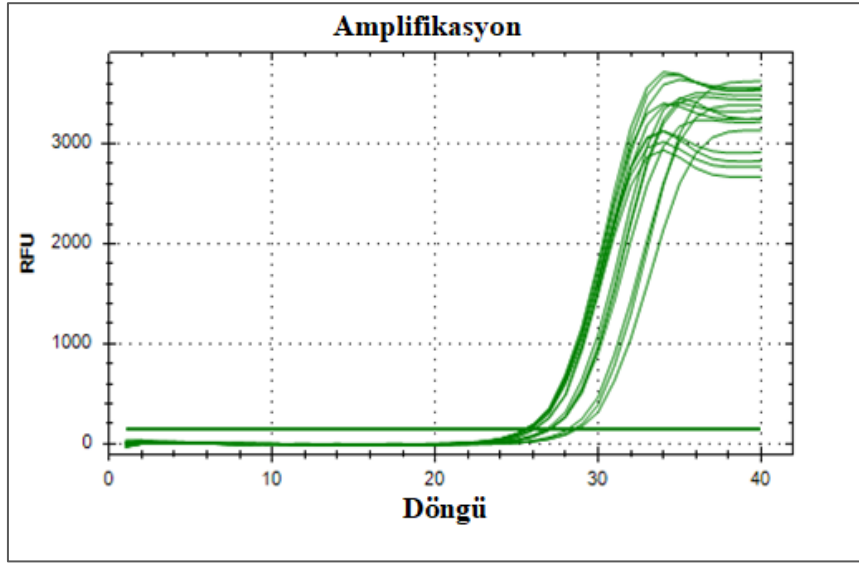
Çizelge 4.5. SOST primere ait sıcaklık değişimine bağlı C_q değerleri

Primer Adı	Sıcaklık Değeri	C_q Değeri
SOST	52	28,11
SOST	51,7	28,64
SOST	51,4	27
SOST	50,9	27
SOST	50	27,04
SOST	49,2	28,43
SOST	48	26,04
SOST	46,8	26,05
SOST	45,3	25,43
SOST	44,1	25,7

Çizelge 4.5. (devam) SOST primere ait sıcaklık değişimine bağlı C_q değerleri

SOST	43	25,44
SOST	42,1	25,5
SOST	41,3	26,7
SOST	40,7	25,46
SOST	40,2	25,6
SOST	40	25,68

SOST primere ait RFU (bağıl floresan birim)'e karşı döngü grafiği Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. SOST primere ait C_q/RFU grafiği

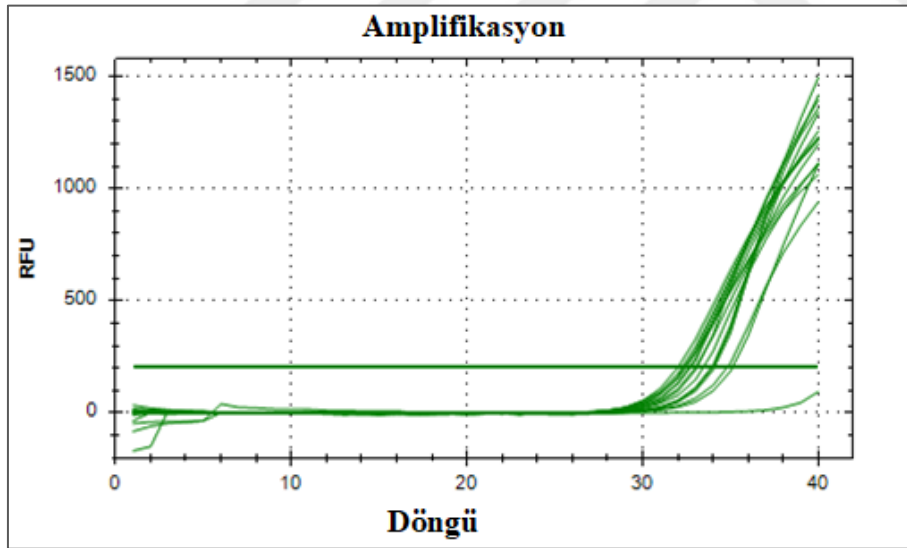
Elde edilen verilere göre SOST primerin 40-52°C sıcaklık aralığında C_q değerleri 25-28 aralığında görüldü. Bu aralıkta yer alan tüm sıcaklık değerlerinin SOST primeri için uygun olduğu görüldü, ancak optimum sıcaklık değeri 25,43. döngüde ışıma verdiği 45,3°C olarak belirlendi. Kantitatif PCR tepkimesi ve gen ifadesi değerlendirmesinde bu sıcaklık değeri kullanıldı.

Alkalen fosfatazı kodlayan APLP primere ait, sıcaklık değerlerine bağlı C_q değerlerine ait grafik Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. APLP primere ait sıcaklık değişimine bağlı C_q değerleri

APLP	63	34,84
APLP	62,7	33,47
APLP	62,2	N/A
APLP	61,6	34,01
APLP	60,5	34,1
APLP	59,5	33,94
APLP	58	33,11
APLP	56,5	35,13
APLP	54,6	32,77
APLP	53,1	33,03
APLP	51,8	32,66
APLP	50,6	32,39
APLP	49,6	32,26
APLP	48,8	32,45
APLP	48,3	32,04
APLP	48	32,46

APLP primere ait RFU (bağıl floresan birim)'e karşı döngü grafiği Şekil 4.5'te verilmiştir.

Şekil 4.5. APLP primere ait C_q/RFU grafiği

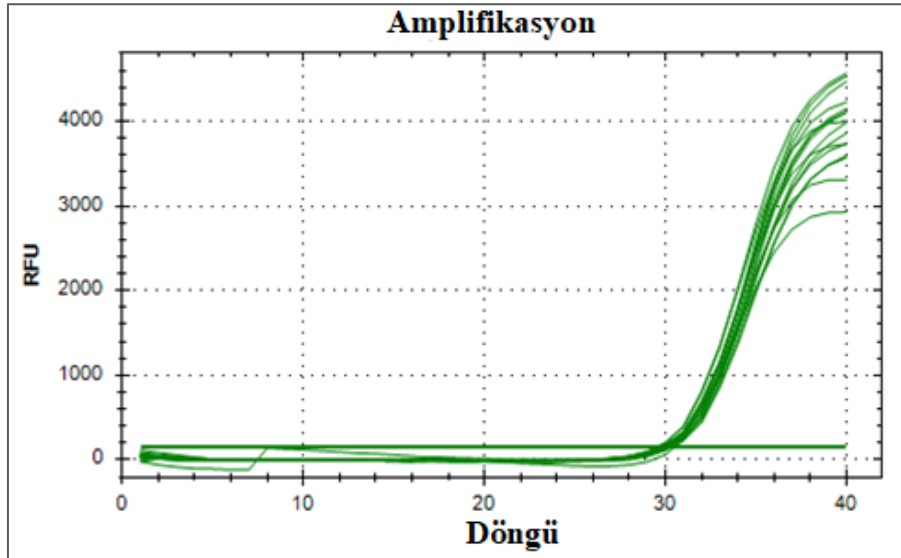
Elde edilen verilere göre APLP primerin 48-63°C sıcaklık aralığında C_q değerleri 32-34 aralığında görüldü. Alkalen fosfatazı kodlayan bu primerde sıcaklık ile korele olmayan yüksek C_q değeri tespit edildi. Numune içeriğinde düşük derişimde bulunduğu düşünöldü. Sıcaklıkla kısmen bir artış göröldüğünden, 40-52 °C aralığında tekrar çalışıldı.

Sklerostini kodlayan APLP primere ait, 40-52 °C sıcaklık değerlerine bağlı C_q değerlerine ait grafik Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. APLP primere ait sıcaklık değişimine bağlı C_q değerleri

Primer Adı	Sıcaklık Değeri	C_q Değeri
APLP	52	30,01
APLP	51,7	29,96
APLP	51,4	29,41
APLP	50,9	29,65
APLP	50	29,66
APLP	49,2	29,87
APLP	48	29,65
APLP	46,8	30,19
APLP	45,3	29,83
APLP	44,1	29,98
APLP	43	30,25
APLP	42,1	30,13
APLP	41,3	29,44
APLP	40,7	30,46
APLP	40,2	29,73
APLP	40	29,76

APLP primere ait RFU (bağıl floresan birim)'e karşı döngü grafiği Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. APLP primere ait C_q /RFU grafiği

Elde edilen verilere göre APLP primerin 40-52°C sıcaklık aralığında C_q değerleri 29-30 aralığında görüldü. APLP primer ile numunenin analizinde genel bir C_q yüksekliğinin devam

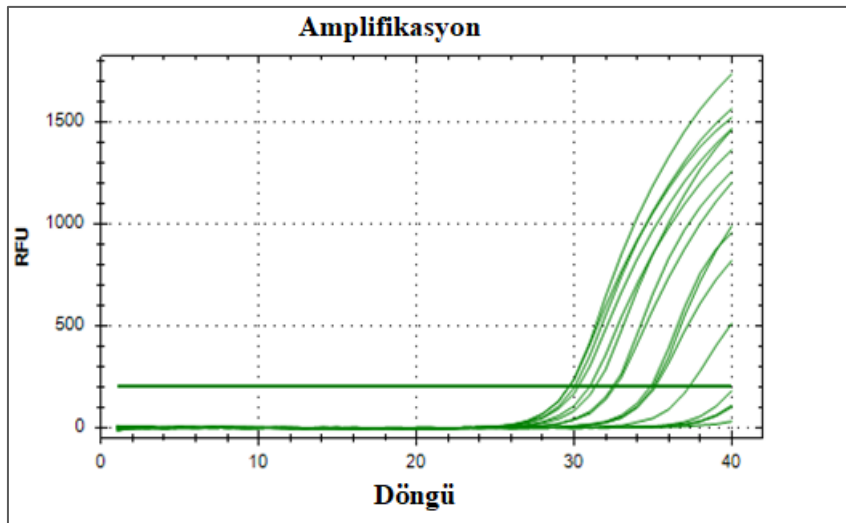
ettiği görüldü. Sınır değerler içinde bulunan APLP primeri için optimum sıcaklık değeri 29,41. döngüde ışıma verdiği 51,4°C olarak belirlendi. Kantitatif PCR tepkimesi ve gen ifadesi değerlendirmesinde bu sıcaklık değeri kullanıldı.

C terminal telopeptiti kodlayan COL1A1 primere ait, sıcaklık değerlerine bağlı C_q değerlerine ait grafik Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. COL1A1 primere ait sıcaklık değişimine bağlı C_q değerleri

Primer Adı	Sıcaklık Değeri	C _q Değeri
COL1A1	63	N/A
COL1A1	62,7	N/A
COL1A1	62,2	37,33
COL1A1	61,6	N/A
COL1A1	60,5	N/A
COL1A1	59,5	35,17
COL1A1	58	34,86
COL1A1	56,5	35,06
COL1A1	54,6	32,48
COL1A1	53,1	32,62
COL1A1	51,8	31,36
COL1A1	50,6	31,02
COL1A1	49,6	30,28
COL1A1	48,8	30,06
COL1A1	48,3	29,7
COL1A1	48	29,72

COL1A1 primere ait RFU (bağıl floresan birim)’e karşı döngü grafiği Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. COL1A1 primere ait C_q/RFU grafiği

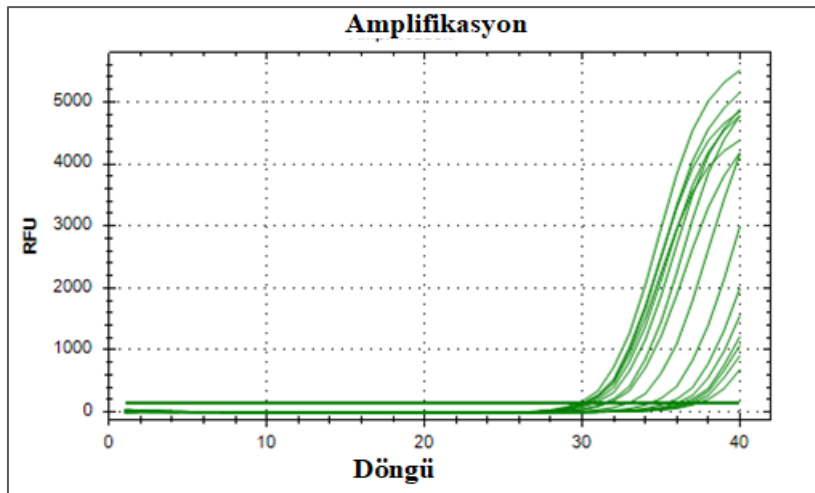
Elde edilen verilere göre COL1A1 primerin 48-63°C sıcaklık aralığında C_q değerleri 29-37 aralığında görüldü. Sıcaklık değeri yükseldikçe, C_q değerinde de artış olduğu gözlemlenmiştir. COL1A1 primerinin daha düşük sıcaklıkta daha iyi çalıştığı düşünülerek 40-52 °C aralığında tekrar çalışıldı.

C-terminal telopeptiti kodlayan COL1A1 primere ait, 40-52 °C sıcaklık değerlerine bağlı C_q değerlerine ait grafik Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. COL1A1 primere ait sıcaklık değişimine bağlı C_q değerleri

Primer Adı	Sıcaklık Değeri	C_q Değeri
COL1A1	52	36,61
COL1A1	51,7	37,29
COL1A1	51,4	36,99
COL1A1	50,9	35,97
COL1A1	50	36,32
COL1A1	49,2	35,3
COL1A1	48	34,26
COL1A1	46,8	32,9
COL1A1	45,3	31,34
COL1A1	44,1	31,58
COL1A1	43	30,71
COL1A1	42,1	30,38
COL1A1	41,3	30,03
COL1A1	40,7	30,1
COL1A1	40,2	29,66
COL1A1	40	30,15

COL1A1 primere ait RFU (bağıl floresan birim)'e karşı döngü grafiği Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. COL1A1 primere ait C_q /RFU grafiği

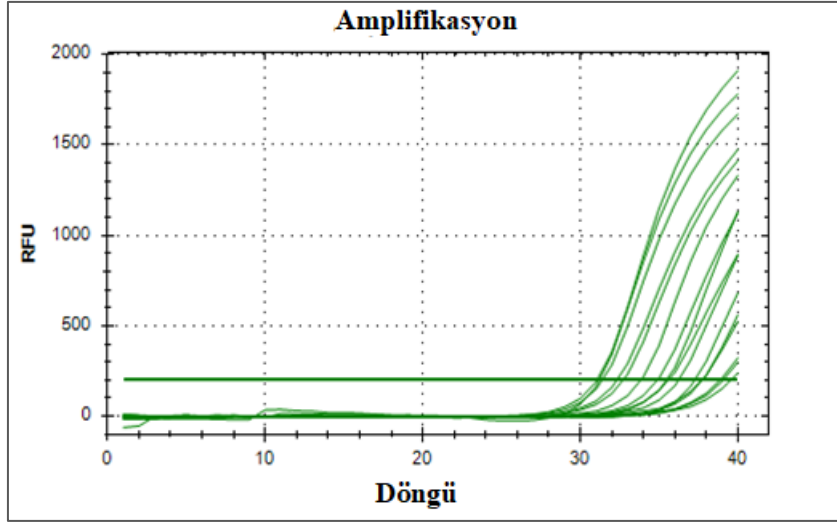
Elde edilen verilere göre COL1A1 primerin 40-52°C sıcaklık aralığında C_q değerleri 29-37 aralığında görüldü. COL1A1 primer ile numunenin analizinde genel bir C_q yüksekliğinin devam ettiği görüldü. Sınır değerler içinde bulunan COL1A1 primeri için optimum sıcaklık değeri 29,66. döngüde ışıma verdiği 40,2°C olarak belirlendi. Kantitatif PCR tepkimesi ve gen ifadesi değerlendirmesinde bu sıcaklık değeri kullanıldı.

Osteokalsini kodlayan BGLAP primere ait, sıcaklık değerlerine bağlı C_q değerlerine ait grafik çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. BGLAP primere ait sıcaklık değişimine bağlı C_q değerleri

Primer Adı	Sıcaklık Değeri	C_q Değeri
BGLAP	63	38,93
BGLAP	62,7	37,77
BGLAP	62,2	39,12
BGLAP	61,6	35,64
BGLAP	60,5	37,3
BGLAP	59,5	39,62
BGLAP	58	36,27
BGLAP	56,5	37,79
BGLAP	54,6	35,5
BGLAP	53,1	34,95
BGLAP	51,8	33,89
BGLAP	50,6	32,76
BGLAP	49,6	32,36
BGLAP	48,8	31,42
BGLAP	48,3	31,23
BGLAP	48	31,09

BGLAP primere ait RFU (bağıl floresan birim)'e karşı döngü grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. BGLAP primere ait C_q/RFU grafiği

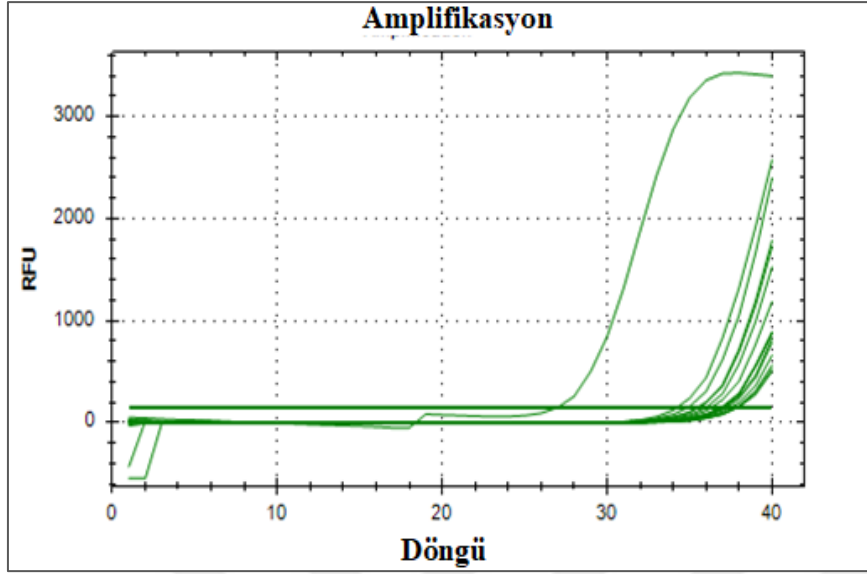
Elde edilen verilere göre BGLAP primerin 40-52°C sıcaklık aralığında C_q değerleri 31-38 aralığında görüldü. BGLAP primeri ile numunenin analizinde genel bir C_q yüksekliği tespit edildi. Numune içeriğinde düşük derişimde bulunduğu düşünöldü. Sıcaklıkla korele bir artış göröldüğünden, 40-52 °C aralığında tekrar çalışıldı.

Osteokalsini kodlayan BGLAP primere ait, sıcaklık değeriğine bağı C_q değeriğine ait grafik Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. BGLAP primere ait sıcaklık değişimine bağı C_q değeri

Primer Adı	Sıcaklık Değeri	C _q Değeri
BGLAP	52	37,83
BGLAP	51,7	37,14
BGLAP	51,4	37,4
BGLAP	50,9	26,88
BGLAP	50	37,07
BGLAP	49,2	37,72
BGLAP	48	36,84
BGLAP	46,8	35,92
BGLAP	45,3	35,45
BGLAP	44,1	36,95
BGLAP	43	35,39
BGLAP	42,1	36,8
BGLAP	41,3	36,24
BGLAP	40,7	34,18
BGLAP	40,2	34,8
BGLAP	40	37,76

BGLAP primere ait RFU (bağıl floresan birim)'e karşı döngü grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. BGLAP primere ait C_q/RFU grafiği

Elde edilen verilere göre BGLAP primerin 40-52°C sıcaklık aralığında C_q değerleri 26-37 aralığında görüldü. BGLAP primer ile numunenin analizinde genel bir C_q yüksekliğinin devam ettiği görüldü. Sınır değerlerin üstünde bulunan BGLAP primeri için optimum sıcaklık belirlenemedi. Numune içeriğinde osteokalsin proteinin bulunmadığı kanısına varıldı. Kantitatif PCR tepkimesi ve gen ifadesi analizlerinde BGLAP parametre olarak değerlendirilmedi.

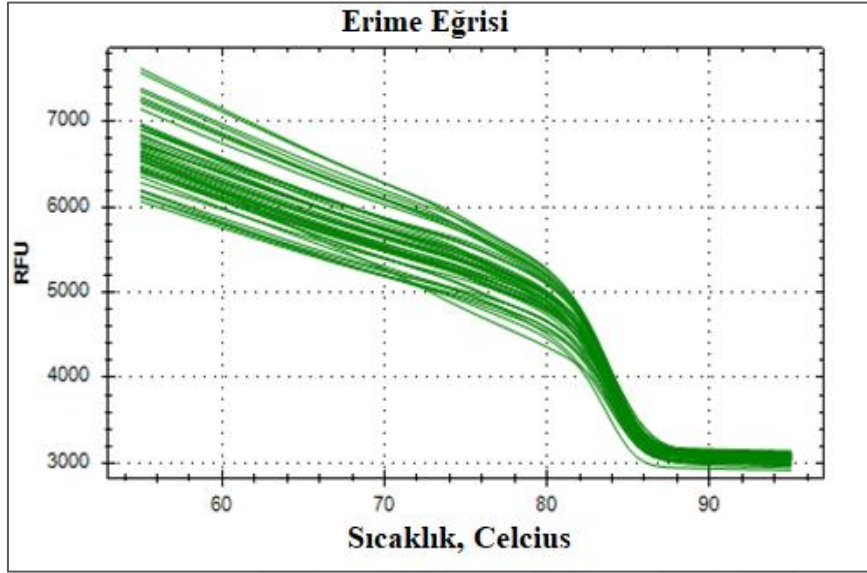
Yapılan sıcaklık gradient analizi neticesinde, her primer için optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Primerlere ait optimum sıcaklık değerleri, çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Primerlere ait belirlenen optimum çalışma sıcaklıkları

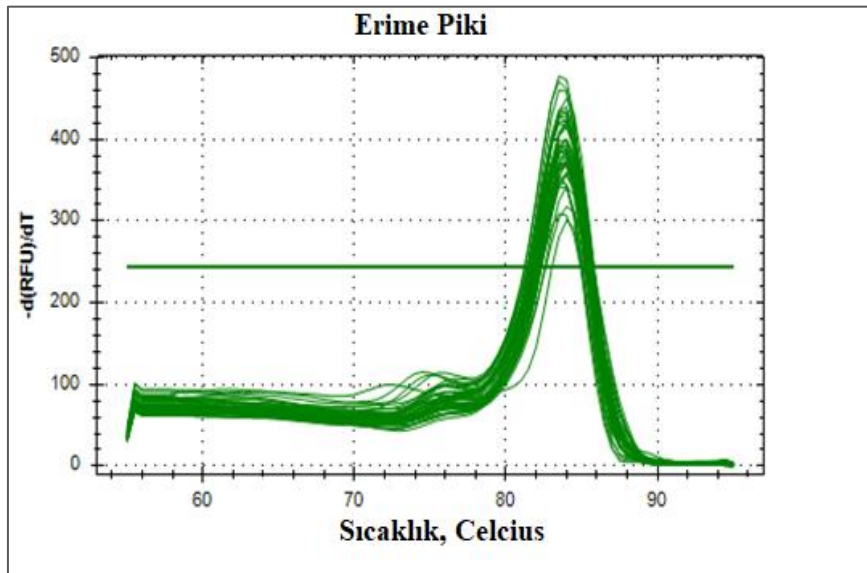
Primer Adı	Optimum Sıcaklık Değeri	C _q Değeri
GAPDH	53,1	25
ACTB	54,6	24,53
SOST	45,3	25,43
APLP	51,4	29,41
COL1A1	40,2	29,66
BGLAP	Belirlenemedi	Belirlenemedi

4.4. Erime Sıcaklığı Analiz Bulguları

GAPDH gardiyan geni için elde edilen erime sıcaklığı analiz bulgularına ait grafikler şekil 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.

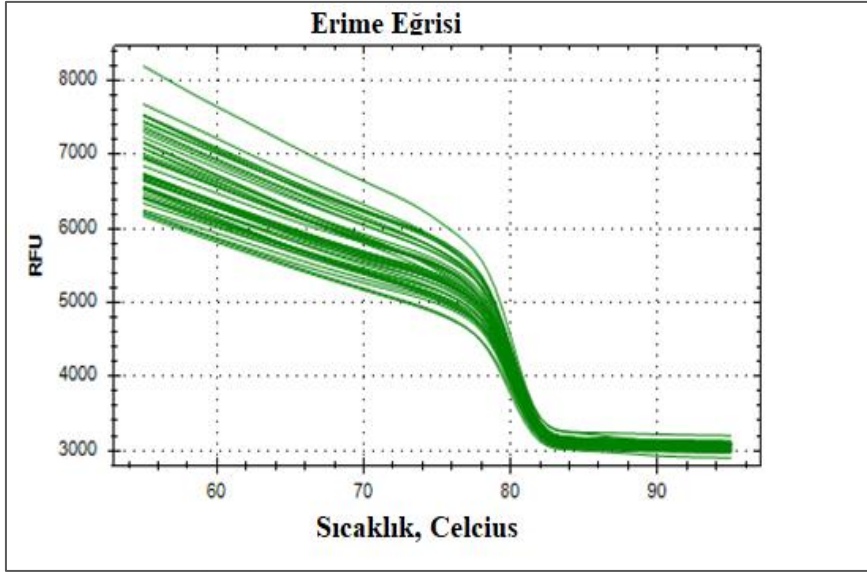


Şekil 4.11. GAPDH gardiyan gene ait sıcaklık-RFU grafiği

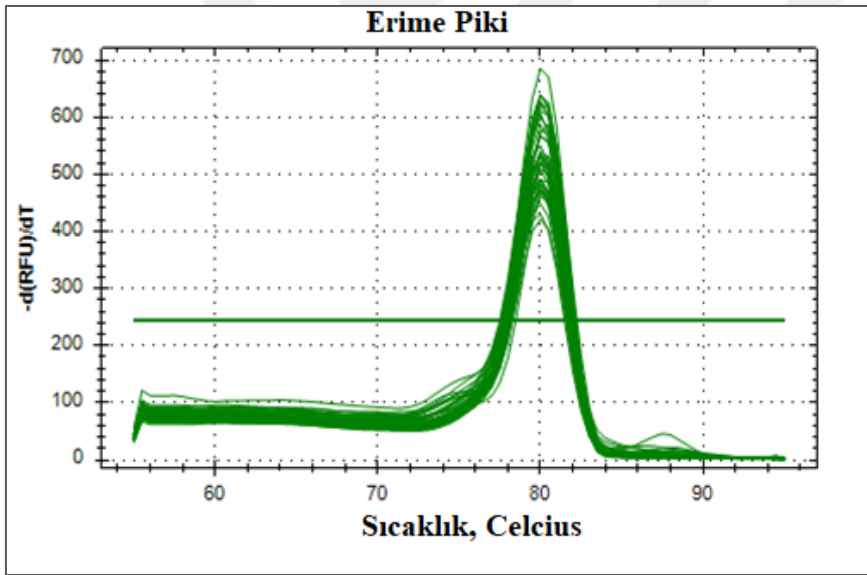


Şekil 4.12. GAPDH gardiyan gene ait sıcaklık-d(RFU)/dT grafiği

Amino terminal propeptidi kodlayan, ACTB geni için elde edilen erime sıcaklığı analiz bulgularına ait grafikler şekil 4.13 ve 4.14'te verilmiştir.

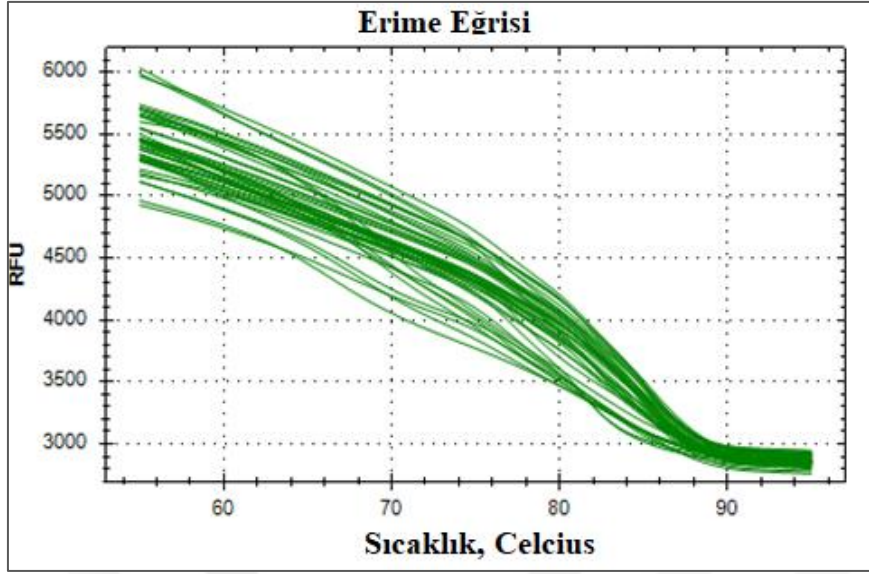


Şekil 4.13. ACTB primerine ait sıcaklık-RFU grafiği

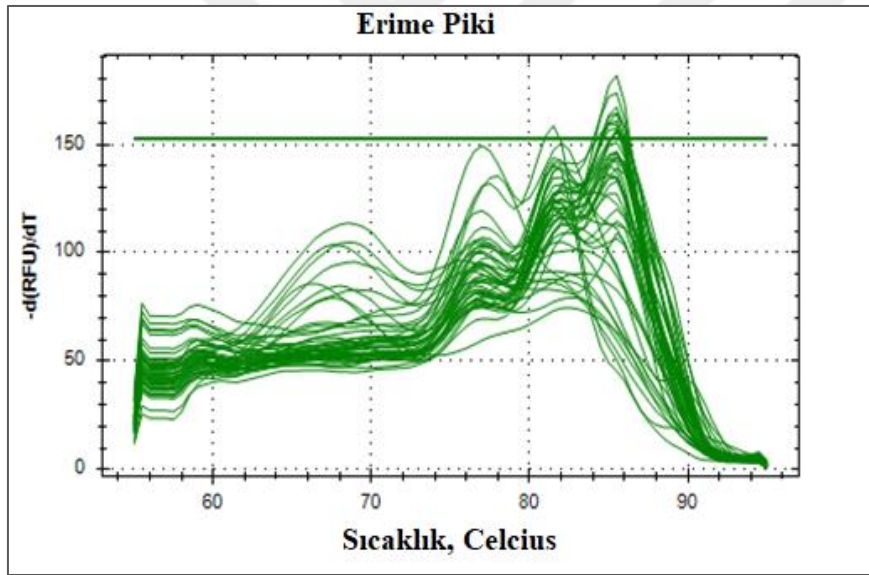


Şekil 4.14. ACTB gen bölgesine ait sıcaklık-d(RFU)/dT grafiği

Sklerostini kodlayan, SOST primeri için elde edilen erime sıcaklığı analiz bulgularına ait grafikler şekil 4.15 ve 4.16'da verilmiştir.

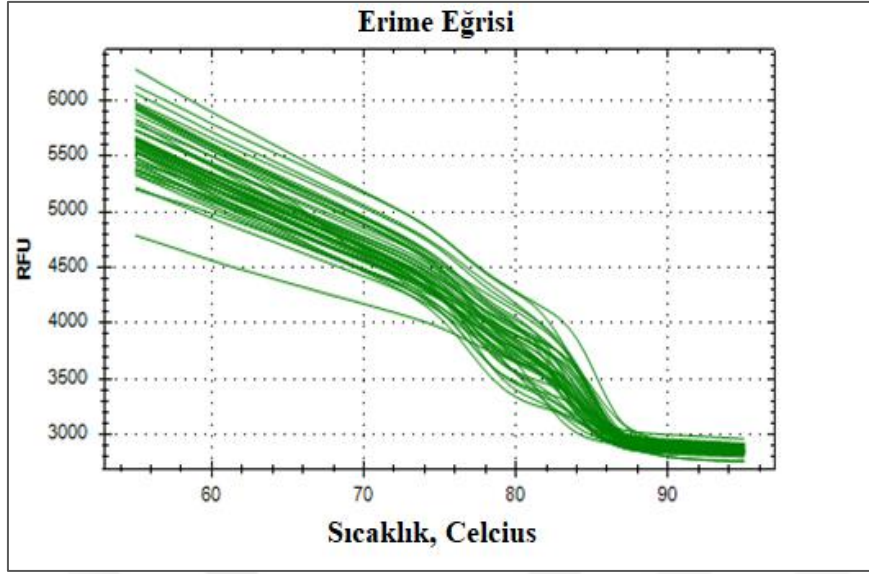


Şekil 4.15. SOST primerine ait sıcaklık-RFU grafiği

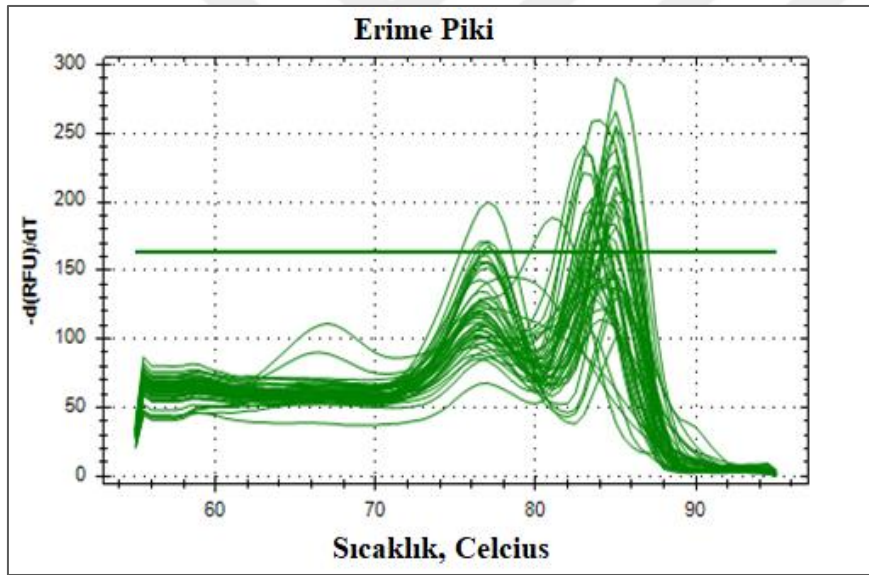


Şekil 4.16. SOST gen bölgesine ait sıcaklık-d(RFU)/dT grafiği

Alkalen fosfatazı kodlayan, APLP primeri için elde edilen erime sıcaklığı analiz bulgularına ait grafikler şekil 4.17 ve 4.18'de verilmiştir.

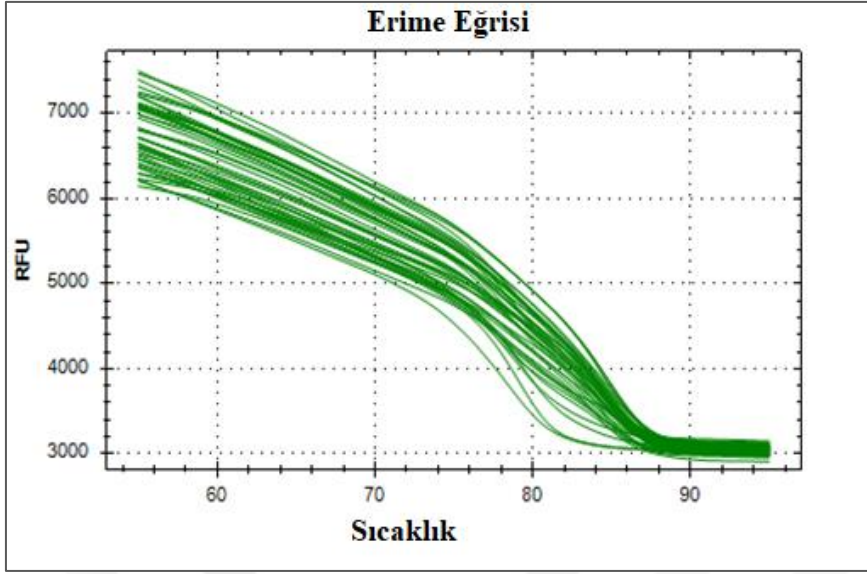


Şekil 4.17. APLP primerine ait sıcaklık-RFU grafiği

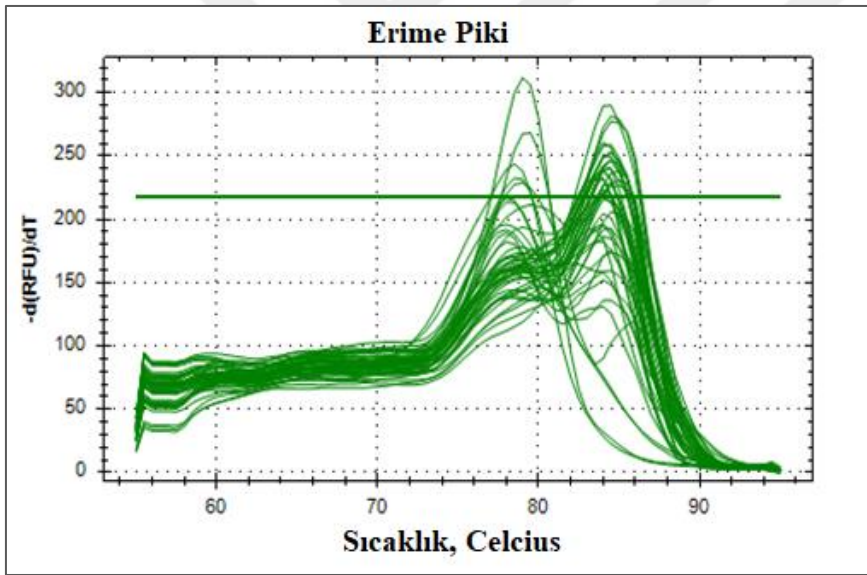


Şekil 4.18. APLP gen bölgesine ait sıcaklık-d(RFU)/dT grafiği

C terminal telopeptidi kodlayan, COL1A1 primeri için elde edilen erime sıcaklığı analiz bulgularına ait grafikler şekil 4.19 ve 4.20'da verilmiştir.



Şekil 4.19. COL1A1 primerine ait sıcaklık-RFU grafiği



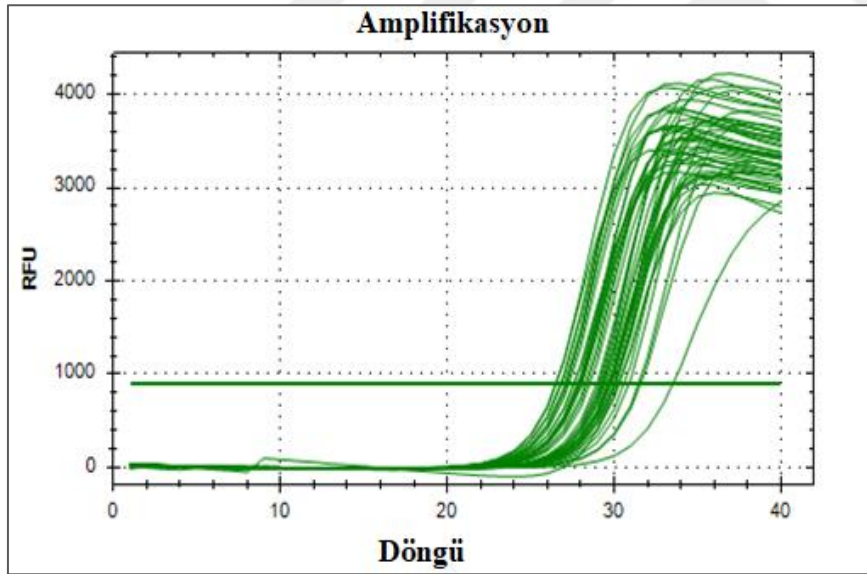
Şekil 4.20. COL1A1 gen bölgesine ait sıcaklık-d(RFU)/dT grafiği

4.5. Kantitatif PCR Ölçüm Bulguları

GAPDH gardiyan gen bölgesi için çalışılan optimum sıcaklık değeri 53,1°C olarak belirlenmişti. Bu sıcaklığa bağlı analiz protokolü yazılarak, kantitatif PCR ölçümü gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucuna ait her bir numuneye ait C_q değerlerinin yaşa bağlı değişimleri çizelge 4.13'de ve örneklere ait C_q eğrileri şekil 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Gardiyan gene ait yaşa bağlı C_q değerleri

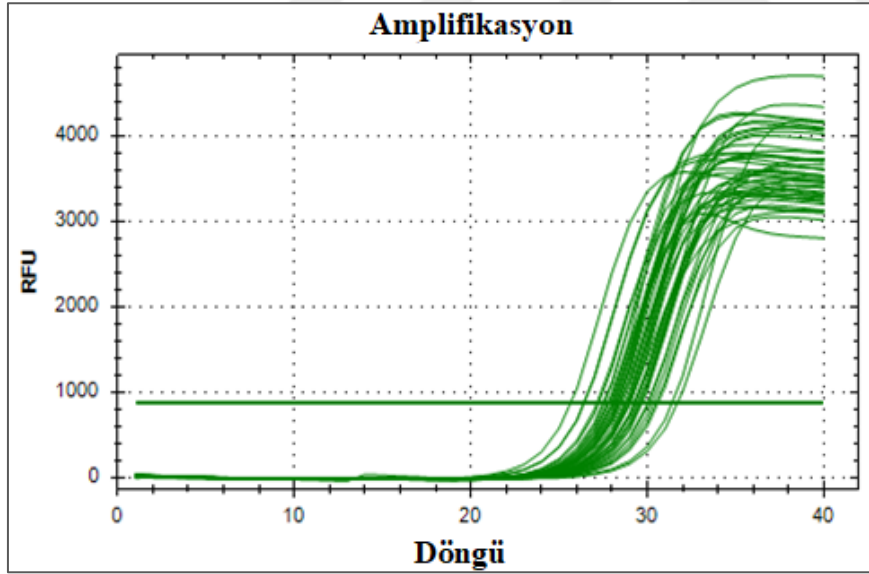
Gen	Yaş	Yaşa bağlı C _q değerleri
GAPDH	19	27,76
GAPDH	20	29,1
GAPDH	21	29,01
GAPDH	22	28,55
GAPDH	23	29,61
GAPDH	50	28,6
GAPDH	58	30,25
GAPDH	59	27,87
GAPDH	62	26,47
GAPDH	64	29,49
GAPDH	65	31,55
GAPDH	73	27,9
GAPDH	78	29,65
GAPDH	80	27,55
GAPDH	86	29,71

Şekil 4.21. Gardiyan gene ait yaşa bağlı C_q eğrileri

Amino terminal propeptiti kodlayan ACTB gen bölgesi için çalışılan optimum sıcaklık değeri 54,6°C olarak belirlenmişti. Bu sıcaklığa bağlı analiz protokolü yazılarak, kantitatif PCR ölçümü gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucuna ait her bir numuneye ait C_q değerlerinin yaşa bağlı değişimleri çizelge 4.14'te ve örneklerle ait C_q eğrileri şekil 4.22'de verilmiştir.

Çizelge 4.14. ACTB genine ait yaşa bağlı C_q değerleri

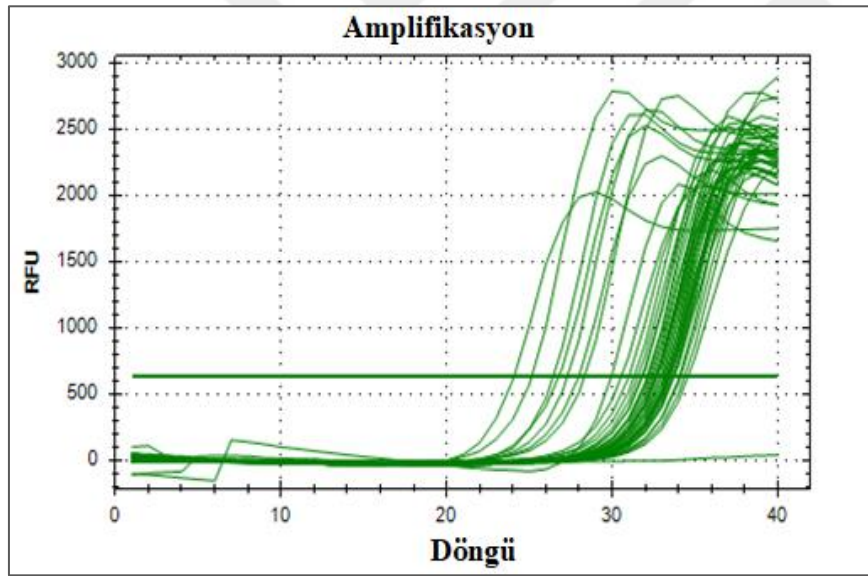
Gen	Yaş	Yaşa bağlı C _q değerleri
ACTB	19	28,03
ACTB	20	28,78
ACTB	21	28,59
ACTB	22	28,18
ACTB	23	28,77
ACTB	50	28,53
ACTB	58	30,28
ACTB	59	28,19
ACTB	62	26,41
ACTB	64	29,63
ACTB	65	31,71
ACTB	73	28,04
ACTB	78	30,04
ACTB	80	29,01
ACTB	86	30,48

Şekil 4.22. ACTB genine ait yaşa bağlı C_q eğrileri

Sklerostini kodlayan SOST gen bölgesi için çalışılan optimum sıcaklık değeri 45,3°C olarak belirlenmişti. Bu sıcaklığa bağlı analiz protokolü yazılarak, kantitatif PCR ölçümü gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucuna ait her bir numuneye ait C_q değerlerinin yaşa bağlı değişimleri çizelge 4.15'te ve örneklerle ait C_q eğrileri şekil 4.23'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. SOST genine ait yaşa bağlı C_q değerleri

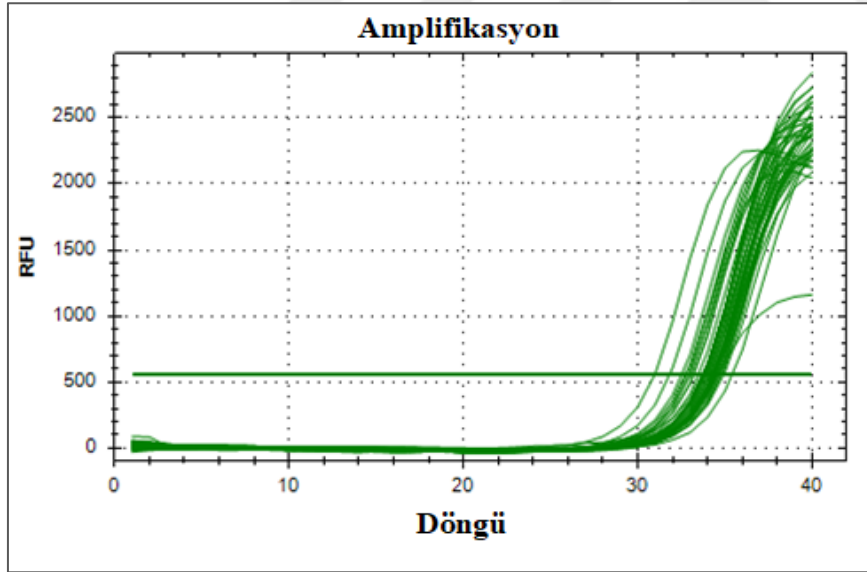
SOST	19	32,66
SOST	20	29,62
SOST	21	32,37
SOST	22	31,58
SOST	23	33,54
SOST	50	33,1
SOST	58	33,74
SOST	59	32,74
SOST	62	31,77
SOST	64	33,51
SOST	65	34,13
SOST	73	32,39
SOST	78	33,4
SOST	80	32,5
SOST	86	33,37

Şekil 4.23. SOST genine ait yaşa bağlı C_q eğrileri

Alkalen fosfatazı kodlayan APLP gen bölgesi için çalışılan optimum sıcaklık değeri 51,4°C olarak belirlenmişti. Bu sıcaklığa bağlı analiz protokolü yazılarak, kantitatif PCR ölçümü gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucuna ait her bir numuneye ait C_q değerlerinin yaşa bağlı değişimleri çizelge 4.16'da ve örneklere ait C_q eğrileri şekil 4.24'te verilmiştir.

Çizelge 4.16. APLP genine ait yaşa bağlı C_q değerleri

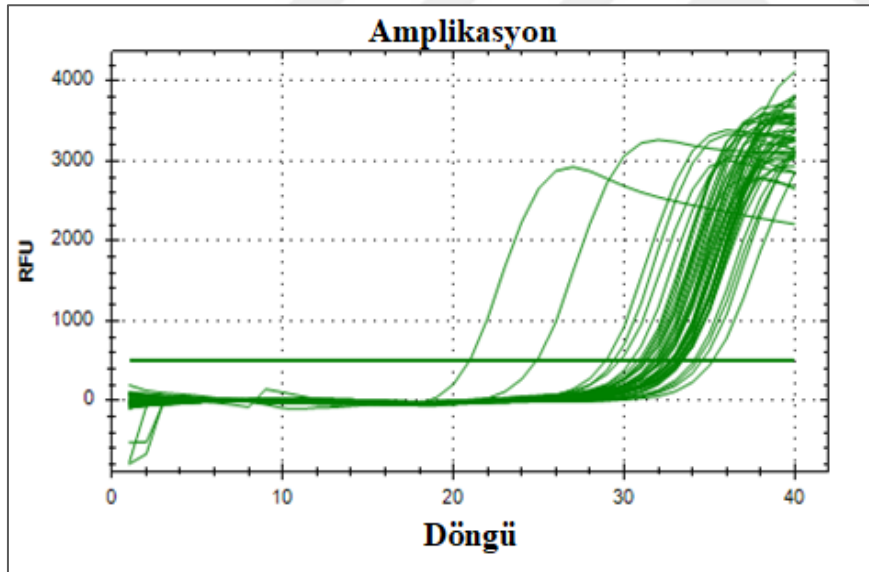
Gen	Yaş	Yaşa bağlı C _q değerleri
APLP	19	29,82
APLP	20	33,47
APLP	21	33,43
APLP	22	34
APLP	23	34,26
APLP	50	34,53
APLP	58	34,4
APLP	59	34,53
APLP	62	33,19
APLP	64	33,99
APLP	65	32,5
APLP	73	33,94
APLP	78	34,42
APLP	80	33,68
APLP	86	34,4

Şekil 4.24. APLP genine ait yaşa bağlı C_q eğrileri

C terminal telopeptiti kodlayan COL1A1 gen bölgesi için çalışılan optimum sıcaklık değeri 40,2°C olarak belirlenmişti. Bu sıcaklığa bağlı analiz protokolü yazılarak, kantitatif PCR ölçümü gerçekleştirildi. Yapılan analiz sonucuna ait her bir numuneye ait C_q değerlerinin yaşa bağlı değişimleri çizelge 4.17'de ve örneklere ait C_q eğrileri şekil 4.25'te verilmiştir.

Çizelge 4.17. COL1A1 genine ait yaşa bağlı Cq değerleri

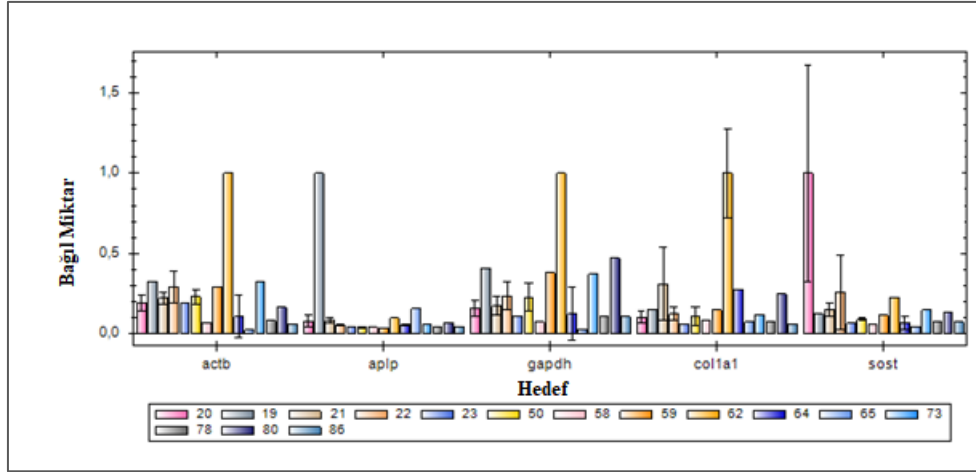
Gen	Yaş	Yaşa bağlı Cq değerleri
COL1A1	19	32,03
COL1A1	20	32,59
COL1A1	21	31
COL1A1	22	32,33
COL1A1	23	33,35
COL1A1	50	32,52
COL1A1	58	32,87
COL1A1	59	32,07
COL1A1	62	29,32
COL1A1	64	31,18
COL1A1	65	33,08
COL1A1	73	32,38
COL1A1	78	33,03
COL1A1	80	31,34
COL1A1	86	33,38



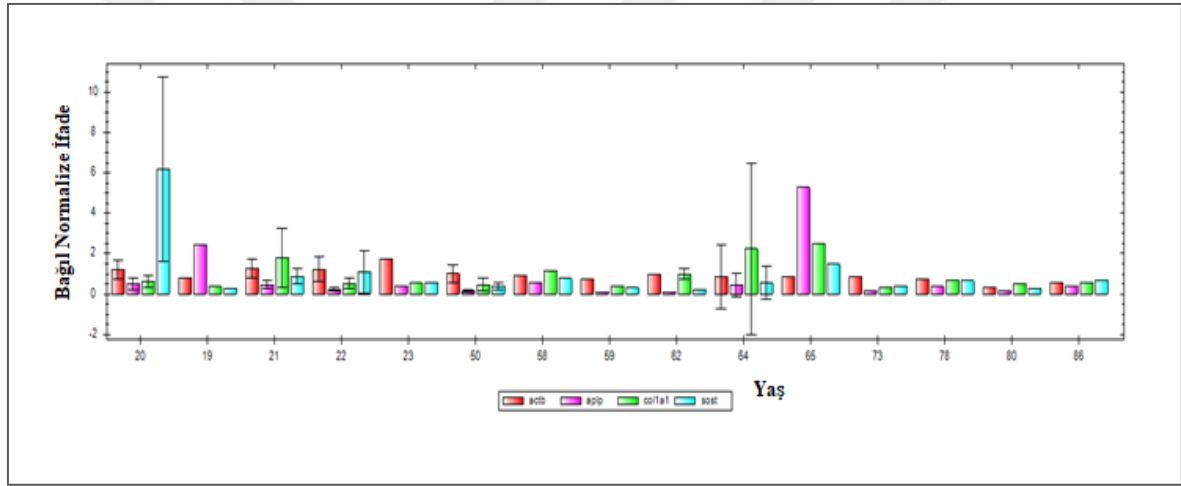
Şekil 4.25. COL1A1 genine ait yaşa bağlı Cq eğrileri

4.7. Gen ifadesi Analizi

Gen ifadesi, aynı miktarda mRNA'dan oluşturulan cDNA miktarının ölçülmesi şeklinde hesaplanmaktadır. Bu çalışmada mutasyon olmadığı halde, tetikleyici faktörler nedeniyle gen ifadesindeki olası değişikliklerin analizini gerçekleştirdik.

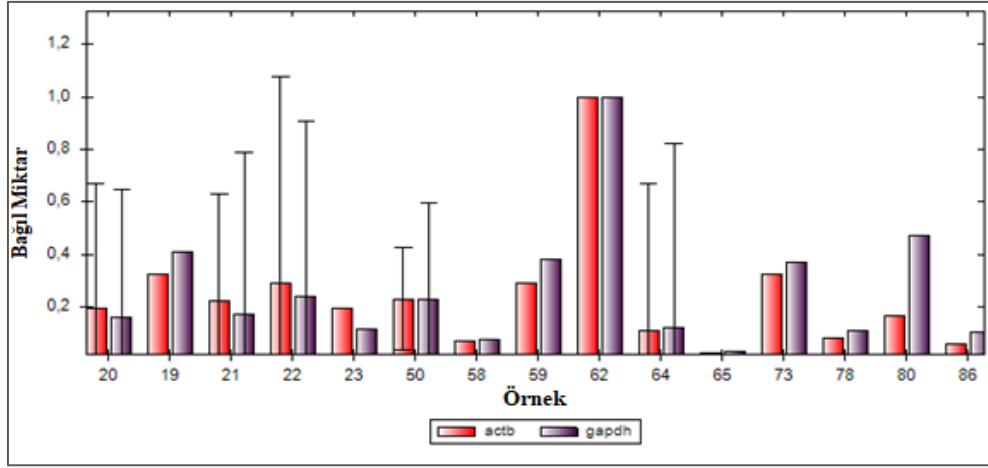


Şekil 4.26. Yaşa bağlı tüm parametrelerin gen ifadesi analizi



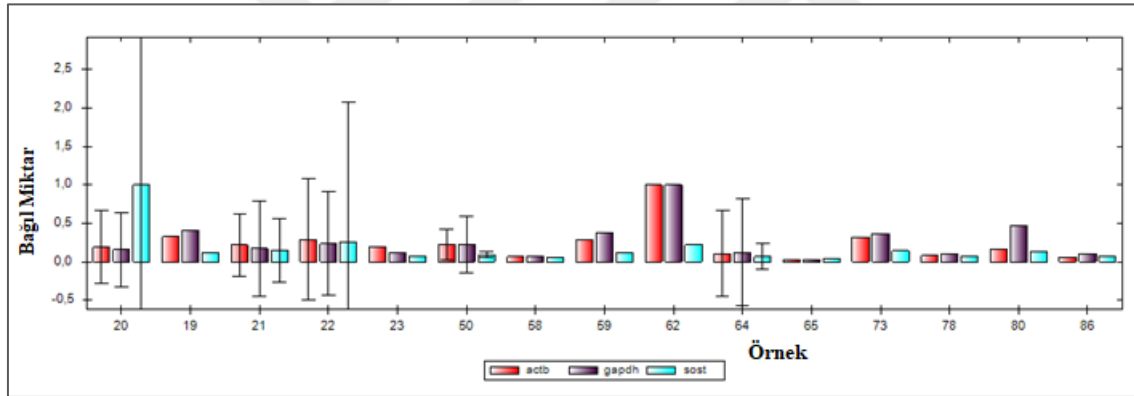
Şekil 4.27. Parametrelerin yaşa bağlı gen ifadesi analizi

Şekil 4.26 ve 4.27'deki veriler incelendiğinde, gardiyan gen de göz önünde bulundurularak tükürük numunesinde ilgili parametrelerin gen ifadelerinin olduğu gözlemlenmiştir.



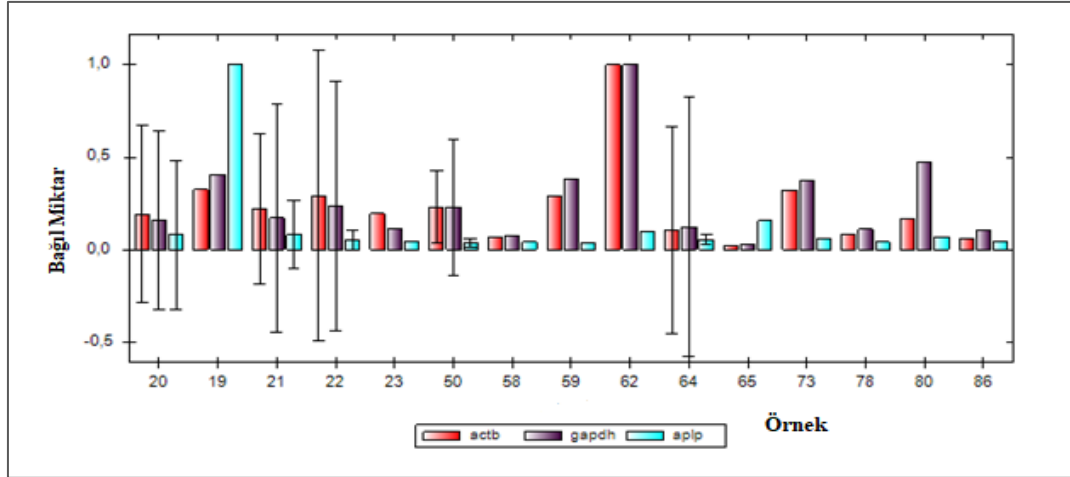
Şekil 4.28. P1NP ile GAPDH gardiyan genin karşılaştırılması

Şekil 4.28.'de verilen veriler incelendiğinde, P1NP kemik yapım biyobelirtecinin gardiyan gen ile yaklaşık olarak aynı oranda ifade edildiği gözlemlendi.



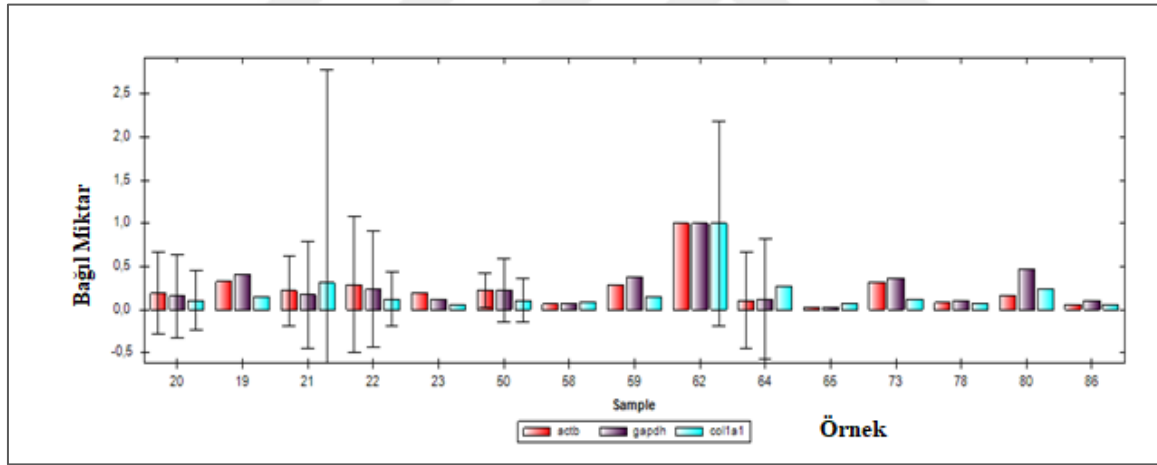
Şekil 4.29. Sklerostin ve P1NP'nin GAPDH gardiyan genin karşılaştırılması

Şekil 4.29.'da verilen veriler incelendiğinde, kemik yapım inhibitörü belirteci olan sklerostinin P1NP kemik yapım biyobelirtecisi ve gardiyan gen ile karşılaştırıldığında sapma miktarının fazla olduğu ve tutarlı bir gen ifadesi gözlemlenmediği görüldü.



Şekil 4.30. ALP ve P1NP'nin GAPDH gardiyan genin karşılaştırılması

Şekil 4.30.'da verilen veriler incelendiğinde, kemik yapım belirteci olan alkalen fosfatazın, yine kemik yapım belirteci olan P1NP ve gardiyan gen ile karşılaştırıldığında genel olarak daha az ifade edildiği ve tutarlı bir gen ifadesi gözlemlenmediği görüldü.



Şekil 4.31. C-terminal telopeptit ve P1NP'nin GAPDH gardiyan genin karşılaştırılması

Şekil 4.31.'de verilen veriler incelendiğinde, kemik yıkım belirteci olan C-terminal telopeptit, kemik yapım belirteci olan P1NP ve gardiyan gen ile karşılaştırıldığında genel olarak daha az ifade edildiği ve tutarlı bir gen ifadesi gözlemlenmediği görüldü.



5. TARTIŞMA

Kemik döngüsü, osteoklastların ve osteoblastların enzimatik aktivitelerinin ve yapım-yıkım sırasında dolaşıma geçen kemik matriksi elemanlarının ölçülmesiyle değerlendirilir. Kemik yapımına ait biyokimyasal belirteçler arasında alkalen fosfataz, osteokalsin ve tip I prokollajen, yıkıma ait ise kollajen tip I telopeptidler, tartarata dirençli asit fosfataz, hidroksiprolin, piridinolin, deoksihidrinolin, ve hidroksilizin glikozidler bulunmaktadır. Halen, serum/plazma ve idrar numunelerinden çalışılan kemik döngüsü belirteçlerinin klinik kullanılabilirliği yönünden faydası ve birinin diğerine olan üstünlüğü tartışmalıdır. Bunların yanında radyolojik görüntülemelerde kemiğe bağlı hastalıkların teşhis ve tedavisinde altın standart olarak kabul edilmektedir.

Yapılan bu çalışma ile bireylerde girişimsel işlemlerin ve ilişkili risk maruziyetinin azaltılması, öncelikle takipte ancak tanıda da kullanılabileceği düşünülen kemik döngüsü

belirteçlerinden yapım belirteci olarak prokollajen tip 1 N-terminal propeptit (P1NP), osteokalsin, alkalen fosfataz, yıkım belirteci olarak tip 1 kollajen karboksi terminal çapraz bağlı telopeptit (CTX) ve lokal kemik yapım inhibitörü olan sklerostin tükürük numunelerinden moleküler tekniklerden kantitatif PCR analizi ile gen ifadeleri üzerinden çalışılmıştır.

Tip I kollajen üç polipeptit zincirinden oluşan çözünürlüğü düşük, sentezi hücre içinde tamamlanan fibröz proteindir. Üçlü sarmal yapıda bir $\alpha 2$ (I) zincirden ve iki benzer $\alpha 1$ (I) zincirden oluşan tip I kollajen N ve C terminal uzantıları içeren tip I prokollajen olarak sentezlenir. Hücre dışında prokollajen molekülü, üçlü sarmal göstermeyen terminal propeptitlerinin enzimatik kesilmesi ile kollajene çevrilir [55]. Prokollajen tip 1 N-terminal propeptit (P1NP) kemik yapımına bağlı olarak osteoblastik aktiviteyi göstermektedir.

Kemik yıkımı sürecinde ise osteoklast kaynaklı tartarata dirençli asit fosfataz (TRAP) ve katepsin K, olgun tip 1 kollajen 3'lü sarmalıda içerecek şekilde kemik matriks bütünlüğünü bozar ve karboksi ve amino terminal telopeptit içeren parçaların ayrılmasına neden olur (CTX ve NTX). CTX ölçümü için tasarlanan yöntem özgül aminoasit dizilimlerini tespit etmeye yöneliktir ve osteoklastik kemik yıkım aktivitesi için belirteç olarak kabul edilmektedir [56]. Seruma ek olarak idrar numunesinden de çalışılabilmektedir.

Yapılan analizlerde, tükürük numunelerinden prokollajen tip 1 N-terminal propeptit gen bölgesini kodlayan ACTB primeri ve tip 1 kollajen C-terminal çapraz bağlı telopeptit COL1A1 primeri kullanılarak gen ifade varlığı değerlendirilmiştir.

Klinik uygulamalarda kemiğe özgüllük ve klinik çalışmadaki performansı nedeniyle kemik döngüsü belirteçlerinin, serumdan ölçümü tercih edilmektedir. Bu belirteçler, kırık riskinin ve bireyin oral bifosfonat tedavisinin takibinde, kemik mineral yoğunluğu ölçümlerinin yanında önerilmektedir. “International Foundation of Osteoporosis (IOF)” ve “International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)” grupları son raporlarında; bir kemik yapım belirtecini (serum P1NP) ve bir kemik yıkım belirtecini (serum β CTX-1) karşılaştırılan yöntemler ile tayinini, kırık riskinin tahmin edilmesi ve erişkinlerde osteoporoz tedavisinin izlenmesi için standart analiz ölçüm yöntemi olarak önermiştir [57, 58].

Çalışmamızda diğer yapım belirteçleri olan ve osteoblast hücrelerinin fonksiyonunu gösteren alkalen fosfataz, APLP primeri kullanılarak tükürükten tespit edilmiştir ancak vücut kalsiyum dengesinden sorumlu olan osteokalsin, BGLAP primeri kullanılarak tükürükten tespit edilememiştir. Kemik yapım inhibitörü olan sklerostin ise SOST primeri kullanılarak tespit edilmiştir.

Veri analizlerine göre amino terminal propeptit yaştan bağımsız olarak 45 bireyde de gözlemlendi. Aynı protokoller uygulanarak çalışılan sklerostin, C-terminal telopeptit ve alkalen fosfataz düzeyleri amino terminal propeptit ile karşılaştırıldığında düşük olarak görülsede tükürük numunesinden elde edilerek gen ifadesi varlığı gözlemlenmiştir. Ancak elde edilen Cq değerleri ve erime sıcaklığı eğrisinde meydana gelen dimer oluşumları göz önünde bulundurulduğunda ilgili kemik döngüsü belirteçlerinin tükürük numunesinde ileri moleküler çalışmalar ile değerlendirilmesi gerekmektedir. Tükürük numunelerinde osteokalsinin varlığı gözlemlenememiştir.

Frodge ve ark. (2008) çalışmalarında periodontal hastalığı bulunan grupta tükürük numunelerinden kemik döngüsü belirteçlerini ELİZA yöntemi ile değerlendirmişler ve tümör nekrozis faktör α (TNF- α) düzeylerinin hasta grubunda yükseldiğini, C telopeptit piridinolin (ICTB) ve nükleer faktör kapp B ligand reseptör aktivatörü (RANKL) düzeylerinde anlamlı bir fark olmadığını görmüşlerdir [59].

Bee ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, osteonektin ve osteokalsin düzeylerini tükürük numunelerinden enzim immunosorbent yöntem ile çalışarak alveolar kemik kaybı ile karşılaştırmışlar ancak osteokalsin miktarı tükürük örneğinde çok düşük miktarda tespit edilmiştir [60]. Bu çalışmaya benzer şekilde yapmış olduğumuz çalışma sonucunda da tükürük örneklerinde osteokalsin varlığı tespit edilememiştir. Ancak çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak analizlerimizi polimeraz zincir tepkimesi ile gerçekleştirdik.

Totan ve ark.'ı (2006) yaptıkları araştırmada, periodontal hastalıklar ile alanin amino transferaz, aspartat amino transferaz ve alkalen fosfataz enzimleri arasındaki ilişkiyi tükürük numuneleri kullanarak otoanalizörde (Hospitex, DiaSys-Diagnostic Systems, Holzheim, Germany) tükürük numuneleri için adapte edilen ve IFCC tarafından önerilen kinetik metot ile çalışmışlar ve araştırmalarının sonucunda alkalen fosfataz düzeylerinin hasta grubunda daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [46].

Binder ve ark. (1987) ise gingival sıvı numunesinden alkalen fosfataz düzeylerini tespit ederek yüksek değerleri periodontal hastalığın bir sonucu olan alveolar kemik kaybı ile ilişkilendirmişlerdir [27]. Diğer benzer bir çalışmada da Kumar ve ark.'ın (2011) periodontal hastalıkların tanısında kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla tükürükten elde edilen ALP düzeylerinin otoanalizörde ölçümlerini gerçekleştirmişlerdir. Analiz sonuçlarına göre diş eti kanaması, süpurasyon gibi periodontal hastalığı bulunan bireylerin tükürük örneklerindeki ALP düzeylerinin yüksek olduğunu görmüşlerdir. Periodontal hastalığa bağlı alveolar kemik kaybının da yüksek olmasının tükürük ALP düzeyinde yüksekliğe neden olabileceğini belirtmişlerdir [61]. Biz araştırmamızda alkalen fosfatazın, tükürük örneklerinden PCR çalışması ile ifade edildiğini gözlemledik, ancak çalışma yaş grupları arasında bir korelasyon tespit etmedik. Ayrıca tükürük numunelerinden alkalen fosfataz miktar tayini Beckman Coulter AU otoanalizörde IFCC tarafından önerilen ve serum/plazma örneklerinde kullanılan, pH 10,4'de fosfat akseptörü olarak magnezyum ve çinko iyonlarının ve 2-amino-2-metil-1-propanolün (AMP) mevcudiyetinde p-nitro-fenilfosfatın (pNPP) p-nitrofenole (pNP) dönüşme oranının ölçülmesiyle yapıldı. pNP oluşumuna bağlı absorbands değişim oranı 410/480 nm'de bikromatik olarak ölçülerek numunedeki ALP aktivitesi ile doğru orantılandığında numunelerimizde ALP düzeyinin tespit edilebilir aralıkta olmadığını gözlemledik.

Önalan ve ark. çalışmalarında sklerodermalı hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda, serum ve tükürük numunelerinden ELİZA yöntemi ile sklerostin düzeylerini analiz etmişler ve hasta serum ve tükürük örneklerinde sklerostin düzeylerinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır [62]. Son yıllarda sklerostinin lokal bir kemik yapım inhibitörü olmasına dikkat çekilerek miktar tayini yönünde yapılan çalışmalar artmaktadır. Çalışmamızda tükürük numunelerinden RNA izolasyonu sonrasında moleküler çalışmalar sonucunda sklerostin gen ifadesi varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada polimeraz zincir tepkimesinin özgül ölçümü çok önemlidir. Elde etmiş olduğumuz sklerostin piklerinde, erime sıcaklığı analizi gerçekleştirildiğinde saflığının düşük olduğu gözlemlendi. Bu nedenle, ilgili literatüre dayanarak ölçümünü yapmış olduğumuz sklerostin piklerinin aslında tükürükte varlığını fakat primer tasarımı revizyona gidilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Miricescu ve ark. (2014) yapmış oldukları bir çalışmada kronik periodontit tanılı hastalar ile kontrollerin tükürük numunelerinde ELİZA yöntemi ile tip 1 kollajen karboksi terminal çapraz bağlı telopeptit düzeylerini tespit ettiklerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu belirtmişlerdir [57].

Literatür incelendiğinde kemik yapım-yıkım biyobelirteçlerinin tükürükten analizleri genellikle periodontal hastalıkların teşhisi için kullanılmıştır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada kemik metabolizması ile ilişkili hastalıkların tanı ve takibinde kullanılabilecek prokollajen tip 1 N-terminal propeptit (P1NP), osteokalsin, alkalen fosfataz, tip 1 kollajen karboksi terminal çapraz bağlı telopeptit (CTX) ve sklerostin tükürük numunelerinden moleküler tekniklerden kantitatif PCR analizi ile gen ifadeleri üzerinden çalışılmıştır. Literatürde, kemik yapım biyobelirteçlerinden olan P1NP varlığının tükürükten tespitinin polimeraz zincir tepkimesi analizi ile yapılmış ilgili bir veriye ulaşamadık. Kemik döngüsü belirteçlerinin miktar tayini rutinde çok sık kullanılmamakla birlikte serum örnekleri tercih edilmektedir. Çalışmamızda tükürük örnekleri ve bu örneklerden yapım-yıkım belirteçleri için rutin kullanımda olmayan PCR tekniğini kullanarak değerlendirme yaptık.

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde tükürük numunelerinden P1NP'nin ölçülebileceğinin mümkün olduğunu düşünmekteyiz. İleri çalışmalarda P1NP'nin tükürükteki düzeylerinin karşılaştırılabilmesi için standart eğri oluşturularak, hasta ve kontrol grupları arasındaki korelasyon ve yaşa bağlı daha geniş gruplara ait veriler değerlendirilebilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada 19-23 ve 50-86 yaş gruplarındaki bireylerin tükürük örneklerinden kemik döngüsü belirteçlerinden yapım belirteci olarak prokollajen tip 1 N-terminal propeptit (P1NP), osteokalsin, alkalen fosfataz, yıkım belirteci olarak tip 1 kollajen karboksi terminal çapraz bağlı telopeptit (CTX) ve lokal kemik yapım inhibitörü olan sklerostin gen ifadeleri üzerinde çalışılmıştır. Osteokalsin dışında tüm kemik yapım-yıkım biyobelirteçlerinin tükürük gen ifadeleri tespit edilmiştir.

Öncelikle polimeraz zincir tepkimesi öncesinde tüm numunelere ait cDNA derişimleri mikrohacim spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler neticesinde 300-700 ng/ μ L derişimi aralığında sonuçlar elde edilmiştir. OD 260/280 oranları, spektrofotometrede saf DNA ve RNA ölçümlemlerini vermektedir. Bu oranın $1,8 \pm 0,1$ değerinde olması ölçülen DNA ve RNA'nın saflığını vermektedir. Bu değer aralığı dışındaki veriler, ölçülen numunede protein, RNA veya ortamda başka bir kirliliğin bulunduğunu göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada, çalışmaya dahil edilen tüm numune derişimlerinin değerlerine karşılık OD 260/280 oranlarının $1,8 \pm 0,1$ aralığında olduğunu belirledik.

cDNA derişimölçümleri sonrasında, tüm numune derişimleri $30 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 'ye sabitlendi. Tasarlanmış olduğumuz primerlerin optimum çalışma sıcaklıklarının belirlenebilmesi için sıcaklık gradient analizleri gerçekleştirildi. Belirlenen optimum sıcaklık değerleri kullanılarak erime sıcaklığı analizleri ve kantitatif polimeraz zincir tepkimesi gerçekleştirildi. Elde ettiğimiz erime sıcaklığı analizlerinde gardiyan gen olan GAPDH ve amino terminal propeptite ait primerlerin, beklendiği gibi dimer oluşturmada tek bir pik verdiği görüldü. Bu sonuç, GAPDH ve ACTB primerleri için kantitatif polimeraz zincir tepkimesinde görülen piklerin ilgili primerlere ait olduğunu ifade etmektedir. Ancak SOST, BGLAP, COL1A1, APLP primerlerine ait erime sıcaklığı eğrilerinde yüksek derecede dimer oluşumu gözlemlendi. Bu durumun sebebinin ilgili primerlere ait optimum çalışma sıcaklıklarının düşük olmasından kaynaklandığını göstermektedir. İleri de yapılacak çalışmalarda, PCR için kullanılan primer, su, karışım ve DNA miktarı optimizasyon çalışmaları yapılması gerektiği takdirde bu parametrelere ait yeni primerlerin tasarlanmasının gerektiği düşünüldü.

Kantitatif PCR analizi sonucunda elde edilen veriler, ilk 5 döngü ve 30. döngü sonrası dışlanarak değerlendirildi. Çünkü bu döngülerin özgül olmayan ışımalardan kaynaklanan yanlış pozitiflik verdiği bilinmektedir. Grafikler C_q 'ya karşı bağıl floresan birimi ifade eden RFU'ya karşılık gelecek şekilde çizildi ve bu kapsamda değerlendirildiğinde, osteokalsin haricindeki tüm parametrelere ait ışımlar anlamlı olarak görüldü ve tükürükte tespit edilmesi istenen biyobelirteçlerin bulunduğuna karar verildi. Osteokalsine ait sonuçlarda tükürükte analiz edilememesinin birçok sebebi olmakla birlikte başlıca sebepleri; PCR için kullanılan karışım oranlarının uygun olmaması, primer tasarımı hata olması, numune derişiminde düşüklük, optimum sıcaklık aralığının belirlenememesi olabilir. Bu nedenle ileriki çalışmalarda bu koşullar göz önünde bulundurularak, PCR sisteminde optimizasyona gidilecektir.

Yapmış olduğumuz analizler neticesinde amino terminal propeptidin tükürükte ifade edildiği ve elde edilen PCR piklerinin erime sıcaklığı analizleri ile amino terminal propeptide ait olduğu doğrulanmıştır.

Kemik yapım-yıkım biyobelirteçlerinin tükürük RNA numunelerinden izolasyonu sonrasında elde edilen veriler karşılaştırıldığında yaşa bağlı bir korelasyon gözlemlenmemiştir. Gelecek çalışmalarda yaş gruplarının detaylandırılması, hasta ve kontrol grupları ile analiz yapılması, serum ve idrar numuneleri ile karşılaştırma yapılması uygun olacaktır.

Gerçekleştirilen analizlerin aynı zamanda Western Blot ve ELİZA analizleri ile birlikte karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi öngörülmektedir.

Sonuç olarak; kemik yapım-yıkım biyobelirteçlerinin girişimsel bir yöntem olmayan tükürük numunelerinden analizinin yardımcı ve erken tanıyı destekleyici etkin bir role sahip olabileceği düşünülmektedir. Gelecek çalışmalarda, yapılan bu analizlerin daha fazla örnek ile ve kemiğe bağlı hastalığı bulunan bireyler ile sağlıklı kontrollerin olduğu gruplarda çalışılmasının uygun olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Szulc, P. and Delmas, P. D. (2008). Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis International*, 19(12), 1683-1704.
2. Chapurlat, R. D. and Confavreux, C. B. (2016). Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology*, 55(10), 1714-1725.
3. Adami, S., Zivelonghi, A., Braga, V., Fracassi, E., Gatti, D., Rossini, M., Olivieri, F. M. and Viapiana, O. (2010). Insulin-like growth factor-1 is associated with bone formation markers, PTH and bone mineral density in healthy premenopausal women. *Bone*, 46(1), 244-247.
4. Bullon, P., Goberna, B., Guerrero, J. M., Segura, J. J., Perez-Cano, R. and Martinez-Sahuquillo, A. (2005). Serum, saliva, and gingival crevicular fluid osteocalcin: their relation to periodontal status and bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of Periodontology*, 76(4), 513-519.
5. Urist, M. R. (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150(3698), 893-899.
6. Yin, H., Wang, J., Wu, M., Ma, Y., Wang, S. and Su, Q. (2019). Preventive effects of evodiamine on dexamethasone-induced osteoporosis in zebrafish. *BioMed Research International*, 2019, 6.
7. Nishizawa, Y., Nakamura, T., Ohta, H., Kushida, K., Gorai, I., Shiraki, M., Fukunaga, M., Hosoi, T., Miki, T., Chaki, O., Ichimura, S., Nakatsuka, K. and Miura, M. (2005). Guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis (2004). *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2(23), 97-104.
8. Lewiecki, E. M. (2010). Benefits and limitations of bone mineral density and bone turnover markers to monitor patients treated for osteoporosis. *Current Osteoporosis Reports*, 8(1), 15-22.
9. Morgan, E. F., Barnes, G. L. and Einhorn, T. A. (2013). The bone organ system: form and function. R. Marcus, D. Feldman, D.W. Dempster, M. Luckey, J.A. Cauley (Eds.). *Osteoporosis* (pp.). San Diego: Academic Press, 3-20.
10. Gelse, K., Pöschl, E. and Aigner, T. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), 1531-1546.
11. Viguet-Carrin, S., Garnero, P. and Delmas, P. D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*, 17(3), 319-336.
12. Kjellen, L. and Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annual Review of Biochemistry*, 60(1), 443-475.
13. Höök, M., Kjellén, L., Johansson, S. and Robinson, J. (1984). Cell-surface glycosaminoglycans. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 847-869.

14. Kasinathan, N., Volety, S. M. and Josyula, V. R. (2016). Chondroitinase: A promising therapeutic enzyme. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 474-484.
15. Robey, P. G. (2002). Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. J. Bilezikian, T. J. Martin, T. Clemens, C. Rosen (Eds.). *Principles of bone biology*. Bethesda: Academic Press, 225-237.
16. Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, A. and Heinegård, D. (1990). Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4473-4475.
17. Bilezikian, J. P., Raisz, L. G. and Martin, T. J. (Eds.). (2008). *Principles of bone biology*. Connecticut: Academic press. 17(1), 335-349.
18. Lian, J. B. and Gundberg, C. M. (1988). Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (226), 267-291.
19. Bandyopadhyay-Ghosh, S. (2008). Bone as a collagen-hydroxyapatite composite and its repair. *Trends Biomater Artif Organs*, 22(2), 116-124.
20. Sims, N. A. and Gooi, J. H. (2008, October). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(5), 444-451.
21. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. and Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*, 2015, 17.
22. Schaffler, M. B., Cheung, W. Y., Majeska, R. and Kennedy, O. (2014). Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcified Tissue International*, 94(1), 5-24.
23. Christenson, R. H. (1997). Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical Biochemistry*, 30(8), 573-593.
24. Iwasaki, E., Morakote, N., Chaovitsaree, S. and Matsuo, H. (2013). Bone mineral density and bone turnover among young women in Chiang Mai, Thailand. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, 59(5), 149-156.
25. Ataman Ş. ve Yalçın P. (2012). *Romatoloji*. Ankara: MN Medikal ve Nobel Tıp Kitabevi, 1141-1155.
26. Kuo, T. R. and Chen, C. H. (2017). Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomarker Research*, 5(1), 18.
27. Binder, T. A., Goodson, J. M. and Socransky, S. S. (1987). Gingival fluid levels of acid and alkaline phosphatase. *Journal of Periodontal Research*, 22(1), 14-19.
28. Morse, L. R., Sudhakar, S., Lazzari, A. A., Tun, C., Garshick, E., Zafonte, R. and Battaglini, R. A. (2013). Sclerostin: a candidate biomarker of SCI-induced osteoporosis. *Osteoporosis International*, 24(3), 961-968.

29. Rosen, H. N., Moses, A. C., Garber, J., Iloputaife, I. D., Ross, D. S., Lee, S. L. and Greenspan, S. L. (2000). Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcified Tissue International*, 66(2), 100-103.
30. Hale, L. V., Galvin, R. S., Risteli, J., Ma, Y. L., Harvey, A. K., Yang, X., Cain, R.L., Zen, Q., Frolik, C.A., Sato, M., Schmindt, A.L. and Geiser, A.G. (2007). PINP: a serum biomarker of bone formation in the rat. *Bone*, 40(4), 1103-1109.
31. Totan, A., Greabu, M., Totan, C. and Spinu, T. (2006). Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: possible markers in periodontal diseases? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(5), 612-615.
32. King, K. L. and Cidlowski, J. A. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Review of Physiology*, 60(1), 601-617.
33. Weissmann, B., Bromberg, P. A. and Gutman, A. B. (1957). The purine bases of human urine. *The Journal of Biological Chemistry*, 224, 407.
34. Nelson, D. L., Cox M. M. (2013). Nükleotitler ve nükleik asitler. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 271, 302.
35. Dejaegere, A. P. and Case, D. A. (1998). Density functional study of ribose and deoxyribose chemical shifts. *The Journal of Physical Chemistry A*, 102(27), 5280-5289.
36. Crick, F. H. C. and Watson, J. D. (1954). The complementary structure of deoxyribonucleic acid. *Mathematical and Physical Sciences*, 223(1152), 80-96.
37. Brazda, V., Fojta, M. and Bowater, R. P. (2020). Structures and stability of simple DNA repeats from bacteria. *Biochemical Journal*, 477(2), 325-339.
38. Bell, S. P. and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 333-374.
39. Salas, M. (1991). Protein-priming of DNA replication. *Annual Review of Biochemistry*, 60(1), 39-71.
40. Kunkel, T. A. and Bebenek, K. (2000). DNA replication fidelity. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 497-529.
41. Gürdöl, F. and Ademoğlu, E. (2010). Biyokimya. (İkinci baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti, 148-177.
42. Cox, M. M., Doudna, J. A. and O'Donnell, M. (2012). *Molecular biology: Principles and practice*. New York, NY.: WH Freeman and Company, 364.
43. Fleck, A. and Munro, H. N. (1966). The determination of nucleic acids. *Methods of Biochemical Analysis*, 14, 113-176.

44. Morrison, T. B., Weis, J. J. and Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24(6), 954-958.
45. Josefsen, M. H., Löfström, C., Hansen, T., Reynisson, E. and Hoorfar, J. (2012). Instrumentation and fluorescent chemistries used in qPCR. (Filion M.). Quantitative real-time PCR in applied microbiology. Caister: Academic Press, 27-52.
46. Bubner, B. and Baldwin, I. T. (2004). Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 23(5), 263-271.
47. Leong, D. T., Gupta, A., Bai, H. F., Wan, G., Yoong, L. F., Too, H. P., Chew, F. T. And Hutmacher, D. W. (2007). Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials*, 28(2), 203-210.
48. Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C. and Bishop, D. J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PloS One*, 13(5), 196438.
49. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994.
50. Eisenberg, E. and Levanon, E. Y. (2013). Human gardiyan genes, revisited. *Trends in Genetics*, 29(10), 569-574.
51. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z. and Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71.
52. Lovén, J., Orlando, D. A., Sigova, A. A., Lin, C. Y., Rahl, P. B., Burge, C. B., Levens, D. L., Lee, T. I. and Young, R. A. (2012). Revisiting global gene expression analysis. *Cell*, 151(3), 476-482.
53. Mandel, I. D. (1987). The functions of saliva. *Journal of Dental Research*, 66(1), 623-627.
54. Streckfus, C. F. and Bigler, L. R. (2002). Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Diseases*, 8(2), 69-76.
55. Maeda, K., Kobayashi, Y., Koide, M., Uehara, S., Okamoto, M., Ishihara, A., Kayama, T., Saito, M. and Marumo, K. (2019). The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5525.
56. Bhattoa, H. P. (2018). Laboratory aspects and clinical utility of bone turnover markers. *Ejifcc*, 29(2), 117.
57. Miricescu, D., Totan, A., Calenic, B., Mocanu, B., Didilescu, A., Mohora, M., Spini, T. and Greabu, M. (2014). Salivary biomarkers: relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 72(1), 42-47.

58. Vasikaran, S. D., Bhattoa, H. P., Eastell, R., Heijboer, A. C., Jørgensen, N. R., Makris, K., Umer, C., Kanis, J. A., Cooper, C., Silverman, S. and Cavalier, E. (2020). Harmonization of commercial assays for PINP; the way forward. *Osteoporosis International*, 31, 409–412.
59. Frodge, B. D., Ebersole, J. L., Kryscio, R. J., Thomas, M. V. and Miller, C. S. (2008). Bone remodeling biomarkers of periodontal disease in saliva. *Journal of Periodontology*, 79(10), 1913-1919.
60. Ng, P. Y. B., Donley, M., Hausmann, E., Hutson, A. D., Rossomando, E. F., & Scannapieco, F. A. (2007). Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and in vitro studies. *Federation of European Microbiological societies Immunology & Medical Microbiology*, 49(2), 252-260.
61. Kumar, R. and Sharma, G. (2011). Salivary Alkaline Phosphatase level as Diagnostic marker for periodontal disease. *Journal of International Oral Health*, 3(5), 81-86.
62. Önalın, E., Oral, A. Ç., Oral, K., Aydın, S., Karataş, A. and Dönder, E. (2019). Sclerostin levels in blood and saliva in patients with scleroderma. *Firat Tıp Dergisi*, 24(4), 215-218.





EK-1. Yerel etik kurul onay formu

Sayın Araştırmacı,

TOBB-ETÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunmuş olduğunuz GENÇ, ERIŞKİN VE YAŞLI BİREYLERİN TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİNDE ALKALEN FOSFATAZ (ALP), ALMİNO-TERMİNALPROPEPTİT(PINP), C-TERMİNAL TELOPEPTİT(CTX), OSTEOKALSİN VE SKLEROSTİN DÜZEYLERİNİN PCR YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI. başlıklı, 13.05.2019 tarih ve KAEK-118/045 sayılı araştırmanız/projeniz kurulumuz tarafından etik açıdan onaylanmıştır.

Projenizin/araştırmanızın makale haline getirilmesi durumunda "Bu proje/araştırma TOBB-ETÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır, (kabul sayısı/tarih)" cümlesine; eğer makaleniz İngilizce yazılacaksa "This Project/study is approved by TOBB-ETÜ Clinical Research (approval number/date)" cümlesine yer verilmesi gereklidir.

Prof. Dr. Nejat AKAR
TOBB ETÜ Tıp Fakültesi
KAEK Bşk.

EK-1. (devam) Yerel etik kurul onay formu

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	TOBB ETÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU			
	ETİK KURULUN ADRESİ	TOBB ETÜ TIP FAKÜLTESİ SUAM YAŞAM CAD. NO.5 06510 SÖĞÜTÖZÜ/ANKARA			
	TELEFON	0 (312) 292 99 95			
	FAX	0 (312) 220 13 44			
	E-POSTA	tobbetutip.kaek@etu.edu.tr			

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	GENÇ, ERİŞKİN VE YAŞLI BİREYLERİN TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİNDE ALKALEN FOSFATAZ (ALP), ALMİNO-TERMINALPROPEPTİT(PINP), C-TERMINAL TELOPEPTİT(CTX), OSTEOKALSİN VE SKLEROSTİN DÜZEYLERİNİN PCR YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL NO	KAEK-118/045			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI ADI SOYADI	PROF. DR. AYLIN SEPİCİ DİNÇEL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	TIBBİ BİYOKİMYA			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ			
	DESTEKLEYİCİ ÜNVANI /YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	Faz			
		Gözlemsel ilaç çalışması			
		Tıbbi cihaz klinik araştırması			
		In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları			
İlaç dışı klinik araştırma		AKADEMİK AMAÇLI BİYOLOJİK ÜRÜNLERLE YAPILAN KLİNİK ARAŞTIRMA			
	Diger ise belirtiniz				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLAR ARASI ☐	

DEĞERLENDİRİLEN	BELGE ADI	TARİHİ	VERSİYON NUMARASI	DİLİ		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	24.07.2019	KAEK-118/045	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diger ☐

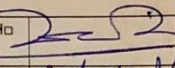
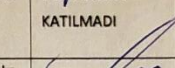
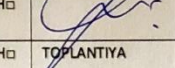
EK-1. (devam) Yerel etik kurul onay formu

	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	24.07.2019	KAEK-118/045	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	AÇIKLAMA				
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ					
	SİGORTA					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	GAZİ ÜNİVERSİTESİ BAP KURULU'NA 25.000 TL İÇİN BAŞVURU YAPILACAK.				
	BIYOLOJİK METARYEL TRANSFER FORMU	KIBRIS SAĞLIK VE TOPLUM BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ GİRNE/KIBRIS				
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ					
	İLAN					
	YILLIK BİLDİRİM					
	SONUÇ RAPORU					
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ					
	DİĞER					
KARAR BİLGİLERİ	KARAR NO:039	TARİH: 24.07.2019				
	GENÇ, ERİŞKİN VE YAŞLI BİREYLERİN TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİNDE ALKALEN FOSFATAZ (ALP), ALMİNO-TERMINALPROPEPTİT(PINP), C-TERMINAL TELOPEPTİT(CTX), OSTEOKALSİN VE SKLEROSTİN DÜZEYLERİNİN PCR YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI. KONULU ARAŞTIRMA DOSYASI İNCELENMİŞ VE KAEK 'CE DOSYA ONAYLANMIŞTIR.					

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	TOBB ETÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU STANDART ÇALIŞMA YÖNTEMİ ESASLARI						
BAŞKANIN UNVANI/ADI SOYADI	PROF. DR. M. NEJAT AKAR						

Unvanı/ Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurum	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım	İmza
Prof. Dr. Nejat Akar	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	TOBB ETÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. H. Gökhan Tulunay	Kadın Hastalıkları ve Doğum	TOBB ETÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Osman Eroğlu	Biyomedikal Mühendisliği	TOBB ETÜ Mühendislik Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Meriç Çolak	Biyoistatistik	BAŞKENT ÜNİ. Sağ. Bil. Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	TOPLANTIYA KATILMADI
Doç. Dr. Devrim Güner	Tıbbi Farmakoloji	TOBB ETÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	

EK-1. (devam) Yerel etik kurul onay formu

Doç. Dr. Olgun Değirmenci	Ceza Hukuku	TOBB ETÜ Hukuk Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Dr. Öğr. Üye P. Elif Ekmekçi	Tıp Tarihi ve Etik	TOBB ETÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Dr. Öğr. Üye A. Savaş Çelebi	Kardiyoloji	TOBB ETÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	TOPLANTIYA KATILMADI
Dr. Öğr. Üye Şahika Baysun	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	TOBB ETÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Dr. Banu Buruk	Tıp Tarihi ve Etik	TUBİTAK	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	TOPLANTIYA KATILMADI
Nur Baykan	Filoloji	Emekli (Kurum dışı üye)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	

Etik Kurul Başkanı

Ünvanı Adı/Soyadı: Prof. Dr. M. Nejat AKAR

İmza:



EK-2. Araştırma anket formu

ARAŞTIRMA ANKET FORMU

Adı :..... Soyadı :.....

Mesleği, işi : Doğum Tarihi :

Adresi; ev :

İş :

Telefon ev : İş Mobil

Cinsiyet: Kadın Erkek

Boy: Kilo: BMI:

Sigara kullanıyor musunuz? Evet Hayır

Kahve, kola gibi içecekler tüketiyor mu? Tüketiyorsa ne sıklıkla tüketiyor?

Kahve Çay Gazlı İçecek Alkollü İçecek

Beslenme şeklinizi nasıl tanımlarsınız? (Ör : Vejeteryan gibi özellikli bir şey varsa yazılacak)

1. Şu anda herhangi bir tedavi görüyorsunuzuz? İlaç kullanıyorsunuzuz? Varsa isimleri ve kullanım şekli dozu, kaç yıldır kullanıyor?

2. Herhangi bir hastalığınız var mı, geçirdiniz mi?

Kalp hastalıkları ☐ Şeker hastalığı ☐ , Tansiyon sorunu ☐ epilepsi (sara) ☐

Ateşli romatizma ☐ Eklem romatizması ☐ , Guatr (Troid tabletleri) ☐ , Kan hastalıkları

İlaç alerjisi ☐ Zührevi hastalık ☐ , Sarılık ☐ , Astım, saman nezlesi ☐ , Böbrek karaciğer bozuklukları ☐ akciğer hastalıkları ☐ , sinüzit ☐ , AIDS ☐

3. Baş ve boyun bölgesinde radyoterapi gördünüz mü?

4. Cerrahi müdahale veya yaralanma sonrası kanama uzun sürer mi?

5. Bunların dışında herhangi bir tıbbi sorunuz var mı? Geçirilmiş kırık hikayesi varmı? Hangi kemik?.....

6. Sürekli kontrolünde olduğunuz doktorunuz var mı?

7. Soygeçmiş:

EK-2. (devam) Araştırma anket formu

8. Osteoporoz ile ilgili hikaye varmı, dexta çekilmişmi, menapoz yaşı ne, ilaç kullanıyorsa adı ve süresi,

Hamilelik, düşük, adet ve menapoz bilgileri :

İLK DURUM

55 54 53 52 51 61 62 63 64 65

18 17 16 15 14 13 12 11 21 22 23 24 25 26 27 28

48 47 46 45 44 43 42 41 31 32 33 34 35 36 37 38

85 84 83 82 81 71 72 73 74 75

4 3

D : Çürük

Total Protez Alt ☐ Üst ☐

M : Çekim

F : Dolgu

Parsiyal Protez Alt ☐ Üst ☐

Kr : Kron

Ps : Periodontal sorun

İp : İmplant

Kron veya köprü ayağı _____

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇOBAN Aslıhan.
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 10.10.1989/Aydın
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 05546589086
 e-mail : auaslihan@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya	Devam Ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi Biyoloji	2011
Lise	Aydın Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2007

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2017-Devam ediyor	DS Bio ve Nano Teknoloji Ürün Takip Doğrulama A.Ş.	Üretim Sorumlusu
2016-2017	BOME Sanayi Ürünleri Dış Ticaret A.Ş.	AR-GE Sorumlusu
2009-2010	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Genom Bilim Bölümü	Stajyer

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Absolute quantification of cell free, circulating DNA from plasma, urine and saliva
 FEBS OPEN BIO, 2019

Hobiler

Yüzmek, kitap okumak, seyahat etmek



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..