



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YAŞ TAHMİNİNDE GERÇEK ZAMANLI
KANTİTATİF PZR YÖNTEMİ İLE TREC
ANALİZİNİN KULLANIMI**

Fethiye EKEN AKSOY

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN**

**ANKARA
2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YAŞ TAHMİNİNDE GERÇEK ZAMANLI
KANTİTATİF PZR YÖNTEMİ İLE TREC
ANALİZİNİN KULLANIMI**

Fethiye EKEN AKSOY

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN**

**ANKARA
2020**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yaş Tahmininde Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Yöntemi ile TREC Analizinin Kullanımı” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Fethiye EKEN AKSOY

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalında
Adli Genetik Tezli Yüksek Lisans Programında
Fethiye EKEN AKSOY tarafından hazırlanan
“Yaş Tahmininde Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Yöntemi ile TREC Analizinin
Kullanımı” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak OY ile kabul/ret
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı

Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Yaş Tayini Gerekliliği	1
1.2. Günümüze Kadar Yapılan Yaş Tayini Metotları	3
1.2.1. Kemik Özelliklerinin Yaş ile İlişkisi	3
1.2.2. Diş ile Yaş İlişkisi	10
1.2.3. Telomer ile Yaş İlişkisi	16
1.2.4. NOR Aktivitesi ile Yaş İlişkisi	18
1.2.5. Mitokondri ile Yaş İlişkisi	19
1.2.6. Metilasyon ile Yaş İlişkisi	22
1.2.7. Bugüne Kadar Yapılan Yaş Tahmini Yöntemlerinin Genel Değerlendirilmesi	24
1.2.8. İmmün Sistem ile Yaş İlişkisi	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Çalışmaya Dâhil Edilen Gönüllüler	32
2.2. Sağlıklı Gönüllülerden Örnek Alımı Aşaması	33
2.3. DNA İzolasyon Aşaması	34
2.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşaması	35

2.5. Verilerin İstatistiksel Analizi	45
3. BULGULAR	46
3.1. Örneklem Grubunun Demografik Bilgilerinin ve TREC Değerlerinin Analizi	46
4. TARTIŞMA	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
ÖZET	58
SUMMARY	59
KAYNAKLAR	60
EKLER	64
Ek-1. Etik Kurul Onayı	64
Ek-2. Serpil Akdağ Kan Merkezi İzin Belgesi	65
ÖZGEÇMİŞ	66

ÖNSÖZ

Günümüzde niceleyici analiz araçlarından biri de yaş tayinidir. Birçok farklı metotla belirlenebilen yaş tayini farklı çalışmalarda kullanılabilen önemli bir ölçüt niteliği taşır. Özellikle adli vakalarda yaş tayini gerek kimliklendirme gerek babalık tayini gerekse hukuki açıdan birçok hak ve sorumluluk ölçütü olarak önem arz eder. Birden fazla yaş tayini metodunun bulunmasına rağmen, bu metotlar bazı faktörler sebebiyle kullanımında zorluklar vardır. Çevre koşulları, cinsiyet farklılığı, maliyet bu faktörlerden bazılarıdır. İmmün sistem organlarından biri timüs T lenfosit üretim ve çeşitliliğinden sorumludur. Bu çeşitlilik VDJ kombinasyonu ile sağlanır. Bu kombinasyonda TREC adı verilen dairesel bir DNA parçası oluşur. TREC kararlı bir yapıdır ve hücre proliferasyonunda replike olmaz. Bu durumda; yaş artarken TREC'in azalmasını sağlar. Bu çalışmanın amacı yaş tahmininde gerçek zamanlı kantitatif PZR yöntemi ile TREC analizinin olası kullanımının araştırılmasıdır.

Lisans dönemi yaz stajında laboratuvarına kabulüm sayesinde tanıştığım, yüksek lisans eğitimimde mesleki beceri kazanmam adına verdiği eğitim, gösterdiği çaba ve emekler sayesinde yol aldığım, güler yüzlülüğü, sabrı ve hoşgörüsü sayesinde insan ilişkilerinde daima örnek aldığım kıymetli hocam ve tez danışmanım Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN'a,

Çalışma azmi, karakteri, bilgi ve becerileriyle, immünolojiyi sevmemde büyük katkıları olan, hoşgörülülükleri, çalışmaya içtenlikle teşvik etmeleriyle ve ekibine verdiği değerlerle her konuda örnek teşkil eden Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Alerji ve İmmünoloji Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Aydan İKİNCİOĞULLARI ve Prof. Dr. Figen DOĞU'ya,

Her türlü bilgi, beceri, birikim ve azmini her daim yanı başımda hissettiğim, en zor durumlarda her zaman yardımcı olan meslektaşım, yol ışığım SENEM KOÇAK'a,

Güler yüzlülüğü, yardımseverliği, içtenliğiyle her an yanımda olup desteğini hiç eksik etmeyen değerli meslektaşım DİLAN BAŞTUĞ'a,

Laboratuvar adabı, bilgi ve becerisi kazanmamın temellerini atan, disipliniyle, çalışkanlığıyla her daim örnek teşkil eden kıymetli büyüğüm YONCA EĞİN'e,

Çalışmam için gerekli biyolojik materyallerin sağlanmasında destek olan Serpil AKDAĞ kan merkezine ve güler yüzü ve sıcaklığıyla yardımlarını esirgememiş merkez laboratuvarı sorumlusu Dr. Özlem DOĞAN'a, Hacettepe Üniversitesinden yardımlarını esirgememiş, en zor dönemde yardımcı olan canım arkadaşım, güzel hemşirem Merve ÖZTEKİNOĞLU'a,

Çalışmamda gönüllü olarak yardımcı olan değerli büyüklerim, arkadaşlarım ve kuzenlerime,

Hayatımda her koşulda her zaman yardımları, destekleri, güvenleri ve anlayışlarıyla annelerim Reyhan EKEN ve Rabiye AKSOY'a babalarım Ramazan EKEN ve Burhan AKSOY'a ve kıymetlilerim Damla EKEN, Y. Efe EKEN ve Zeynep AKSOY'a,

Üniversite hayatımdan itibaren hep yanımda olan maneviyatına canı gönülden inandığım en büyük destekçim, hayat arkadaşım canım eşim Gürkan AKSOY'a tüm içtenlik ve samimiyetimle teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATP	Adenozin Tri Fosfat
C _p	Geçiş noktası (Crossing Point)
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNMT	DNA metiltransferaz
EDTA	Etien Diamin Tetra Asetik Asit
GPA	Greulich-Pyle atlası
g	Gram
Mt	Mitokondrial DNA
mRNA	Mesajcı RNA
ml	Mililitre
NORs	Nükleolus organizör bölgeler (Nucleolar Organizer Regions)
s	Saniye
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR: polymerase chain reaction)
RAG	Rekombinasyon aktive edici gen (Recombination-activating gene)
rpm	Dakikada Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)
µl	Mikrolitre
rRNA	Ribozomal RNA
RNA	Ribo Nükleik Asit
SPSS	Sosyal Bilimler İçin İstatistiksel Paket (Statistical Package for the Social Sciences)
TCK	Türk Ceza Kanunu
TREC	T hücre reseptörü eksizyon halkaları (T cell receptor excision cycle)
tRNA	Transfer RNA
TWA	Tanner –Whitehouse atlası

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Üst kol ekstremitesi humerusun anatomik görüntüsü	4
Şekil 1.2. Yaş ilerlemesiyle kemik radyografisinde gözlemlenen morfolojik değişimler gerçekleşen değişimler	5
Şekil 1.3. TW ve GP atlaslarına göre el ve el bileğinde inceleme yapılan kemiklerin anatomik görüntüsü	7
Şekil 1.4. Simfizis pubisin anatomik görüntüsü	9
Şekil 1.5. İşcan ve arkadaşlarının inceleme yaptığı sternum kemiği	10
Şekil 1.6. Çocuklarda maksilla (üst çene) ve mandibulada (alt çene) bulunan dişlere göre oluşturulan grafi	11
Şekil 1.7. Farklı diş tipleri ve gelişimlerinin radyografisi	12
Şekil 1.8. Demirjian Metoduna Göre Oluşturulan Birimler	13
Şekil 1.9. Gustafson'un araştırmaları sonucu dişte yumuşak ve sert doku değişimleri	14
Şekil 1.10. Rasemizasyon tepkimesi	15
Şekil 1.11. DNA ve kromozom yapıları	17
Şekil 1.12. Telomer ve telomeraz yapısı	18
Şekil 1.13. Mitokondrilerin hücre içi dağılımı ve mitokondrial DNA	20
Şekil 1.14. mtDNA'daki delesyona uğrayan 4977 nükleotit çifti bölgesi	22
Şekil 1.15. C nükleotidine metil eklenerek metilasyonun gerçekleşmesi	23
Şekil 1.16. İmmün sistem elemanları ve yanıt çeşitleri	26
Şekil 1.17. T hücre reseptörü α ve β zincir yapısı	27
Şekil 1.18. α ve β zincirleri için VDJ rekombinasyon mekanizması	28
Şekil 1.19. T hücre reseptörünün VDJ rekombinasyon mekanizması ile çeşitlendirilmesi	29
Şekil 1.20. VDJ rekombinasyonu ile TREC oluşum mekanizması	30
Şekil 2.1. Magnesia 16 cihazı ve kullanılan kit örneği	34
Şekil 2.2. DNA'nın moleküler yapısı	36
Şekil 2.3. Çift zincirli DNA'nın denatürasyona uğraması	37
Şekil 2.4. Primerlerin uygun sıcaklıkta kalıp DNA'ya bağlanması	37

Şekil 2.5. Primer uzamasıyla amplifikasyonun tamamlanması	38
Şekil 2.6. Roche LightCycler® 480 PZR cihazı	39
Şekil 2.7. pEX-A128 plazmit haritası	41
Şekil 2.8. Roche LightCycler® 480 PZR cihazı çalışma seçimini gösteren ara yüz	43
Şekil 2.9. Plazmit DNA'larının oluşturduğu standart eğri grafisi	44
Şekil 2.10. Amplifiye olmuş plazmit ve örneklem DNA'larının kalibrasyon eğri grafisi	45
Şekil 3.1. Çalışmaya katılan kadın ve erkek oranı	47
Şekil 3.2. Oluşturulan örneklem gruplarının kendi içerisinde dağılımlarını gösteren kutu grafiği analizi	48



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Örneklem yaş aralığı ve sayısı	33
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primer ve problemlerin nükleotit dizileri	40
Çizelge 2.3. Gerçek zamanlı PZR’de bir birey için kullanılan malzemeler ve miktarları	42
Çizelge 2.4. Gerçek zamanlı PZR protokolü	44
Çizelge 3.1. Çalışmayı oluşturan örneklem frekans ve yüzde değerleri	46
Çizelge 3.2. Yaş grupları ve TREC kopya sayısı ortalamaları	47
Çizelge 3.3. Cinsiyetlere göre gruplar arası TREC kopya sayısının farklılık analizi	52
Çizelge 3.4. TREC kopya sayısının yaş grupları ve cinsiyet üzerindeki dağılımları	53

1. GİRİŞ

1.1. Yaş Tayini Gerekliliği

Bireylerin birbirlerinden ayırt edilmesi ve bireylerin kendi özellikleriyle tanımlanabilmesi denildiği zaman akla ilk gelen öncelikli olarak fenotipik özelliklerdir. Fenotipik özellik; bireyin genetiğinde taşımış olduğu bilginin çevresel faktörlerle dış görünüşüne yansıma halidir. Kısacası genetiğin karakterde gözlenebilir etkisidir (Alberts ve ark., 2008). Cinsiyeti, boyu, kilosu, parmak izi, dişleri, gibi özellikler fenotipik özellikler olarak bilinip bireyin tıbbi kimliğini oluşturlar. Kişinin kimlik tayini denildiği zaman akla ilk gelen unsurlardan biri de yaş tayinidir (Atılğan ve Akkoyun, 2017). Yaş tayini konusu adli bilimler, pediatri ve ortopedi gibi tıbbi bilimlerce sıklıkla gerek duyulan oldukça önemli bir belirteçtir (Baransel-Isır ve Dülger, 2007; Kaplan, 2014).

Adli tıpta yaş tayini gerek kişinin sosyal yaşamında gerekse ceza ya da hukuki davalarınca adli makamlar tarafından istenmektedir (Gündoğmuş, 2017). Sosyal yaşamı kapsayan bu istemler bireyin evlenebilme durumu, emekli olma, askere alınma, öğrenci olma durumu, evlat edinme, doğum kayıtlarının yanlış tutulmasından şüphe duyulması, ehliyet alma gibi konuları içerirler. Bunun yanı sıra hukuki boyutu olan cezai sorumluluk bilincini içermeye durumunu etkileyen cinayet, yasadışı göç, cinsel saldırıya karşı kendini koruyup koruyamayacağının değerlendirilmesi gibi adli konuları ilgilendiren durumlarda da yaş istemi yapılabilmektedir (Baransel-Isır ve Dülger, 2007; Büken, 2017). Yaşayan birey haricinde çeşitli felaketler ve ölümle sonuçlanabilecek kazalar sonrasında da cesetlerde kimliklendirme yapmak amacıyla yaş tayini istemi yapılabilmektedir (Büken, 2017).

Dünya çapında yaş tayini kavramına bakıldığında; gelişmiş ülkeler kimlik tayini amacıyla yaş tespiti isteminde bulunurken, ülkemizde ise bu durum bazı alt başlıkları içeren bir konu halini almıştır (Büken, 2017). Özellikle ülkemizin bazı kırsal bölgelerinde nüfus kayıtlarının sağlıklı yapılamaması, halkın nüfus kayıtları hakkında

gösterdiği bilinçsizlik ve nüfus kaydına önem vermeme gibi bazı temel sebeplerden dolayı çeşitli hatalar ve aksamalar mevcuttur. Yenidoğanların nüfusa geç kaydettirilmesi, ölen bebek kimliklerinin kendinden sonra doğan çocuklara verilmesi, yaşı gizlenmesi ya da yanlış olma durumunda bazı çıkar durumlarının oluşması gibi çeşitli etmenler sayesinde kişinin kimlik yaşı ile var olan gerçek yaşı arasında uyumsuzluk ortaya çıkmaktadır.

Ülkemiz dâhilinde yaş kavramı hem medeni kanun hem de ceza hukuku açısından büyük önem arz etmektedir (Demirkıran ve ark., 2014). Ceza hukuku her ülkede belli düzenlemeler dahilinde olduğu gibi ülkemizde de cezai sorumluluğu belli yaşlar çerçevesinde düzenlemiştir. TCK'nın (Türk Ceza Kanunu) 5237 sayılı kapsamınca ülkemiz çocukları için 0-12, 12-15, 15-18 olarak üç gruba ayırmıştır. Diğer Dünya ülkelerine bakıldığı zaman ise gruplar İtalya'da 0-14, 14-18 olarak düzenlenirken, Fransa 0-13, 13-16, 16-18, 18 ve üzeri olarak düzenlenmiştir. İngiltere 0-7, 7-14, 14-17 olarak üç temel gruba ayırırken, Almanya 0-14, 14-18, 18-21 olarak, Rusya ise 0-14, 14-18, 18-20 olarak gruplama yapmışlardır. Bazı ülkelerde ise gruplama yerine cezai ve sorumluluk yaşına geçiş yaşı olarak belirli sınırlar çizilmiş, bu yaş dâhilinde olanlar sorumlu olarak nitelendirilmişlerdir (Aslan, 2007). Ceza hukukunda var olan bu gruplama belli sınıflamalar dâhilinde suça göre ceza yönteminin belirlenmesini sağlamaktadır. Bu durumda bazı yaşlar özellikle 7, 12, 15 ve 18 gibi cezai durumları etkileyen yaşlar oldukça büyük öneme sahip olmaktadır (Baransel-Isır, 2009).

Bireyin var olan doğru kimlik bilgilerine ulaşamaması yanlış yaptırımlara sebebiyet verebilir. Bu sebeptendir ki yaş tespitinin gerçeğe en yakın ve en doğru sonucu yansıtabilmesi gerekmektedir. En doğru sonuca ulaşabilmek için öncelikle yaş kavramının daha iyi incelenmesi gerekir. Bir birey için yaş kavramı kullanıldığında genellikle bireyin doğduğu tarih temel alınarak hesaplanan kronolojik yaş kavramını belirtir. Kronolojik yaş; gün, ay ve yıl olarak belirtilebilir ve kesindir. Bu bilgiye ulaşmak için doğru olarak doğum tarihi bilgisine sahip olmak gerekir. Diğer bir yandan ise biyolojik yaş kavramı mevcuttur. Biyolojik yaş ise bireyin vücut fonksiyonlarının kalıtımla, beslenmeyle, ekonomik durumla, vücutta var olan bazı patolojik etmenlerle şekillendiği yaş kavramıdır. Kısacası kişinin hücresel olarak fizyolojik durumunun

ortaya konmasıdır. Kronolojik yaş ile biyolojik yaş arasında bir korelasyon mevcuttur. Bu nedenle yapılan tüm çalışmalar kronolojik yaşı doğru tahmin edebilmek için biyolojik yaşı en iyi şekilde tespit edilmesini amaçlamıştır (Garvin ve ark., 2012). Biyolojik yaşı en doğru ve güvenilir olarak saptanabilmesi için günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır ve halen bu çalışmalara destek sağlayabilmek amacıyla da geniş kapsamlı farklı araştırmalar devam etmektedir.

1.2. Günümüze Kadar Yapılan Yaş Tayini Metotları

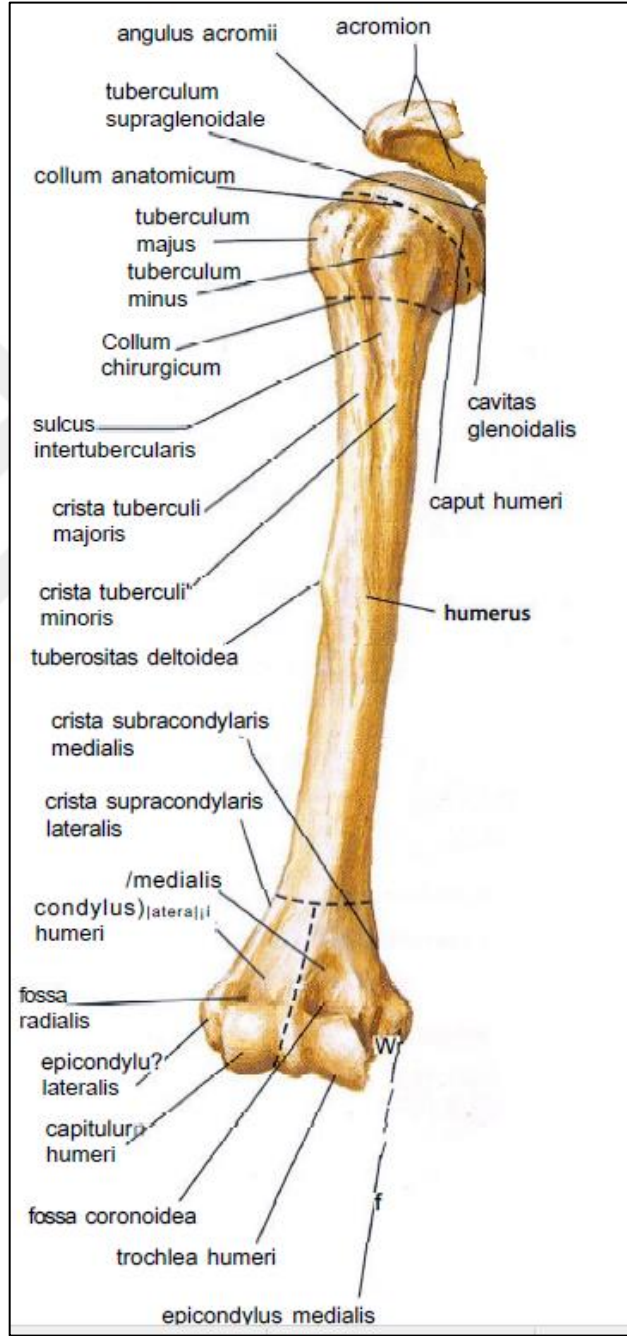
Yaş tayini denildiği zaman bilinen kronolojik yaşa en yakın sonuca ulaşmayı hedefleyen tüm hesaplamaları ve incelemeleri kapsar. Bu amaçladır ki yaş tayini serüveni 1800’lü yılların sonlarına doğru başlamış olup, günümüze kadar halen devam etmektedir. İlk olarak yaşı ilerlemesi yani yaşlanma kavramı temel alınarak bireylerde gözle görülür morfolojik değişimler incelenmiştir. Bu incelemeler saç rengi ve cilt elastikiyet değişimi gibi fenotipik kavramlarla başlasa da sonraları çevresel faktörlerden daha az etkilenen yapılar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bilimin zamanla ilerlemesiyle morfolojik değerlendirmeler yerini kişiye daha özgün olan moleküler tekniklere bırakmıştır.

1.2.1. Kemik Özelliklerinin Yaş ile İlişkisi

Kemik üzerine yapılan çalışmaların başında 1894 yılında yaptığı çalışmalarla bilinen Wachholz gelmektedir (Schrantz, 1959). Wachholz üst kol ekstremitelerinden olan humerustaki (Şekil 1.1.) fizyolojik değişimleri yaklaşık 230 kemik örneğinde analiz etmiş ve kemiğin epifiz, diyafiz ve metafiz bölgelerindeki bu değişimleri cinsiyetleri karşılaştırarak bir yaş tablosu oluşturmuştur. Oluşturduğu tabloda çevresinden topladığı farklı yaş gruplarına ait kemik örneklerinde bulduğu değişimleri kadın ve erkeklerde ayrı ayrı değerlendirerek yaşlara göre sıralandırmıştır. Yaptığı çalışmada kız ve erkek çocukları adölesan dönemi başlangıcına işaret eden epifiz ve diyafiz kaynaşma başlangıcıyla ilk basamağı oluşturmuştur. Sonraki basamaklarla bu

kaynaşmanın ilerleme derecelerinden bahsederek diyafizin merkezinde gelişen ve epifizlere doğru ilerleyen kalsifikasyon oluşumundan sonra oluşan kaviteleri tanımlayarak çalışmasına son vermiştir. Wachholz'un tüm analizleri var olan humerustaki gözle görülür değişimlere dayanmaktadır.

Humerus



Şekil 1.1. Üst kol ekstremitesi humerusun anatomik görüntüsü (Netter, 2014).

1895'te bulunan X ışınları ile incelemeler farklı bir boyut kazanarak araştırmacılar radyolojik alana yönelmişlerdir. Schranz 600'den fazla kemiğin röntgenlerini çekmiş, analiz etmiş ve bulgularını değerlendirmiştir (Schranz, 1959). Schranz çalışma temellerini Wachholz'un araştırmasını inceleyerek edinmiştir. Yenidoğandan başlayarak 100'lü yaş gruplarına kadar içeren kadavra örneklerinden aldığı 600 kadar humerusun analizini gerçekleştirmiştir. Yaptığı çalışmada kemik dokularının genel özelliklerinden bahsetmiş, elde ettiği radyografik kemiklerin değişim özelliklerine göre yaş gruplarını sınıflandırmıştır (Şekil 1.2.).

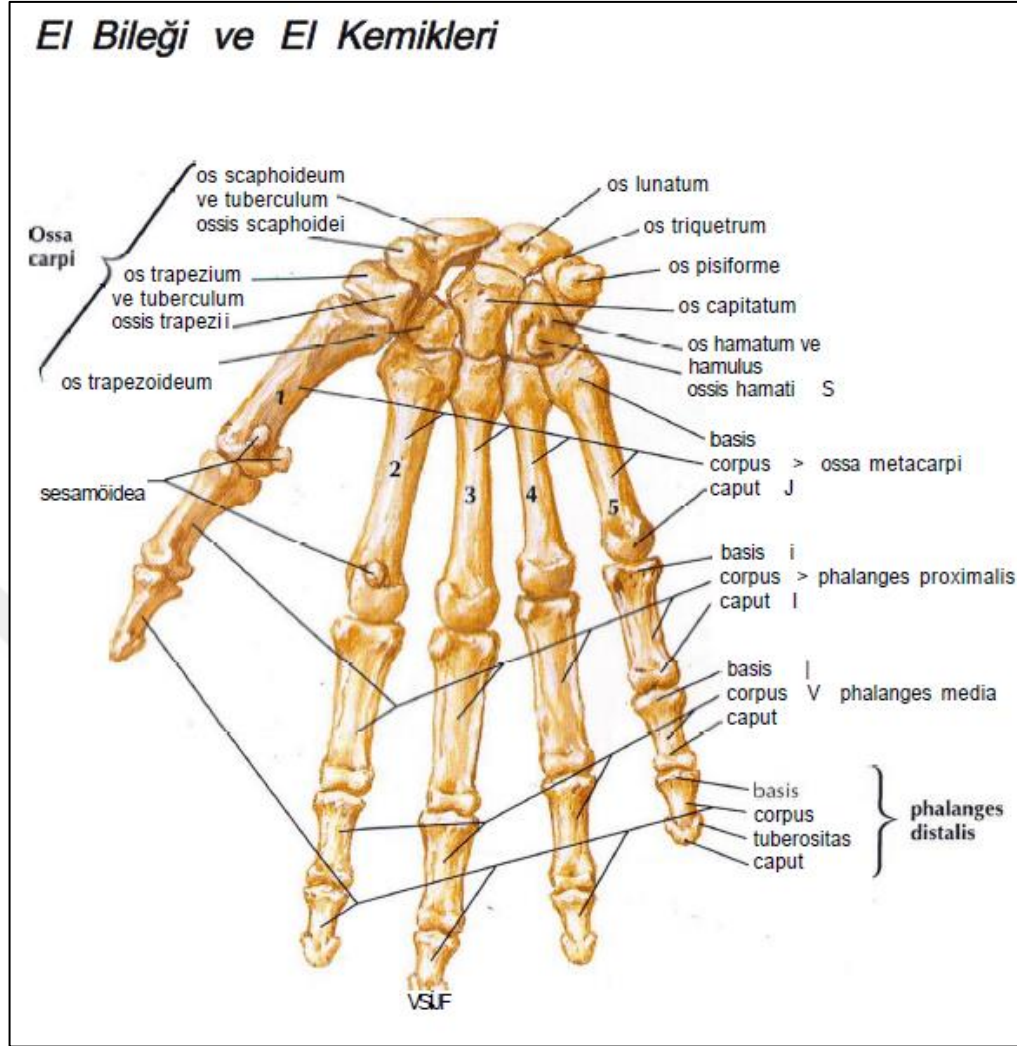


Şekil 1.2. Yaş ilerlemesiyle kemik radyografisinde gözlemlenen morfolojik değişimler (Schranz, 1959).

Almanya Adli Bilimler Enstitüsü ve Humboldt Üniversitesinden Hansen benzer çalışmaları yapmış ve Wachholz ile Schranz'ın sonuçlarını doğrulamıştır (Schranz, 1959). Ayrıca Hansen humerusa ek olarak femur kemiği üzerinde de çalışmalar yapmıştır. Schranz, Hansen ve humerusla ilgili çalışma yapan birçok bilim insanının çalışmalarını incelemiş ve benzer nitelikte sonuçlar elde edildiğini belirtmiştir. Humerus ve femur üzerinde yapılan çok sayıdaki çalışmada çıkarılan genel bir sonuç olarak yaş ilerlemesiyle gözlemlenen ayırt edici özelliklerin femura kıyasla humerusta daha belirgin olduğunu belirtmiştir. Yapılan tüm bu radyolojik incelemelerde her araştırmacı sonuçları kendi ülkeleri için paylaşmış ve benzer sonuçlar olduğunu belirtilmiştir. (Schranz, 1959).

1959’ da Greulich ve Pyle, el ve el bileklerinde incelemeler yapmışlardır (Şekil 1.3.). Farklı yaş gruplarını içeren çocuklar üzerinde 13 yıl boyunca düzenli olarak el radyografileri incelenmiştir. İncelemeler sonunda her bir yaş için belli değerlendirilmeler yapılmıştır. Öncelikli olarak el ve el bileğinde bulunan kemiklerin gelişim aşamaları görsel olarak belirlenmiştir. Ardından kemiklerin ossifikasyon derecelerine göre analizler gerçekleştirilmiştir (Greulich ve Pyle, 1959). Sonuçlar ve görseller kullanılarak Greulich-Pyle atlası oluşturulmuştur ve bu atlas günümüzde de halen kullanılmaktadır.

1962 yılında Tanner, Whitehouse ve arkadaşları farklı yöntemle yeni bir atlas geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu atlasta el ve el bileğindeki kemiklerin her altı ayda tekrar edilmek üzere radyografileri çekilmiştir (Şekil 1.3.). Var olan değişimlerle belli puanlamalar yapılmıştır. Belli aralıklarla yapılan radyolojik görüntülemelerdeki amaç gelişim evrelerinin en iyi şekilde görüntülenmesini sağlamaktır. Gerçekleşen maturasyon evreleri cinsiyete göre ayrılmıştır. El ve el bileğini oluşturan tüm kemikler için oluşturulan görsel ve puanlamalara bakılarak mevcut bireyler hakkında tahminlerde bulunmaktadır. Geliştirilen bu atlas farklı ırklar üzerinde de çalışılarak TW2 ve TW3 olarak güncellenmiştir ve günümüzde de hala kullanılmaya devam etmektedir (Tanner ve ark., 1976).



Şekil 1.3. TW ve GP atlaslarına göre el ve el bileğinde inceleme yapılan kemiklerin anatomik görüntüsü (Netter, 2014).

Ülkemiz adına 1985 yılında Gök bu atlaslardan yararlanarak her bir yaş için el grafilerindeki oluşum ve değişimleri içeren yeni bir atlas hazırlamıştır. Bireylerin el grafilerinin yanı sıra ağırlık, puberte gelişimleri, kıl yapıları, diş gelişimleri ve yapıları, göz değişimleri, ruhsal durum gibi diğer faktörlerin de değerlendirilmesinin en doğru sonuçları vereceğini belirterek hem Greulich-Pyle hem de Tanner-Whitehouse atlaslarını harmanlamıştır (Gök ve ark., 1985).

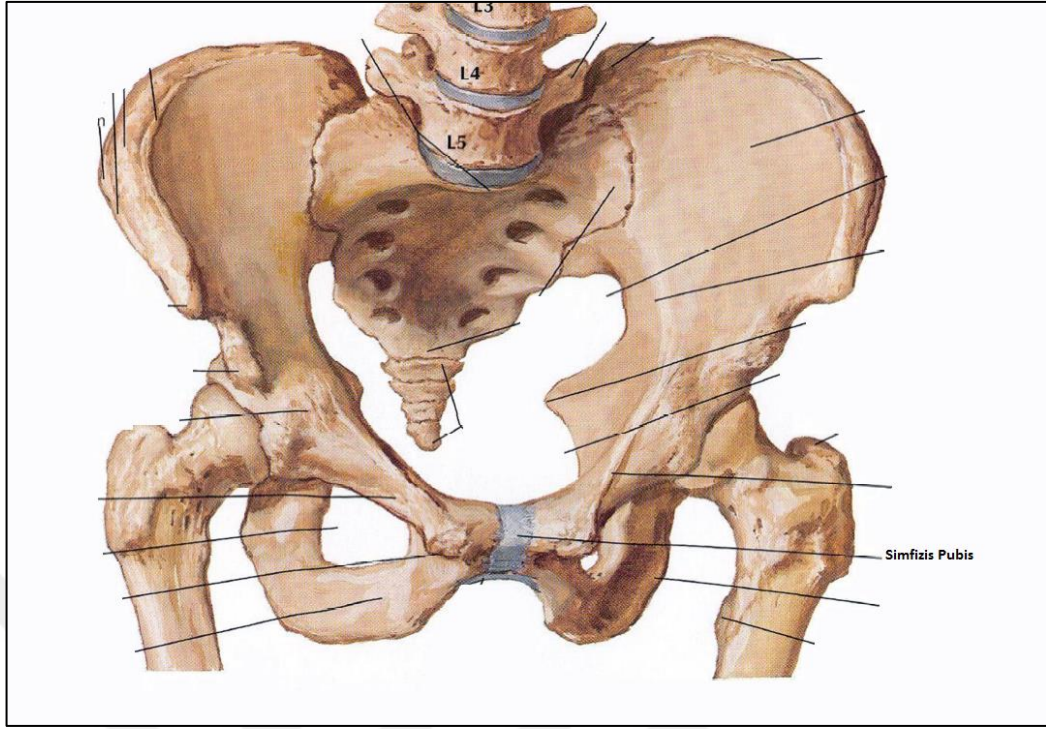
Eklem bölgelerine yakın kemiklerde değişim ve farklılaşmanın daha kolay gözlemlenebileceği düşüncesiyle morfolojik incelemelerle simfizis pubis üzerinde de

alışmalar gerçekleştirilmiştir (şekil 1.4.). Todd yaptığı çalışmalar sonunda pubisi yaş tayini için on alt faza ayırmıştır (Todd-Wingate, 1920). Kemik incelemeleriyle yaş tayininde farklı yöntemler arayan Todd el bileği incelemeleri ardından 1937 yılında bir atlas yayımlamıştır (Akkan, 1982). Yayınlanan bu atlas GPA'ya yol gösterici olmuştur. Ardından Todd ile birlikte çalışan ve ğrencisi olan Cobb, simfizis pubisden sonra çeşitli çalışmalar yaparak kemik anatomilerini değerlendirmiştir. Kafatası eklem bölgelerinde yaptığı çalışmalar sonunda net olarak yaş tayini yapılamadığını, sütur kapanmasının bir yaş tahmini yöntemi olarak kullanılmasının spesifik biyolojik faktörler nedeniyle güvenilmez olduğunu ancak yaş kavramında bir fikir edinilebilmek amacıyla kullanılabileceğini ifade etmiştir (Rankin-Hill ve Blakey, 1994).

Todd ve Cobb'un çalışmalarını inceleyen Brooks kemik çalışmalarına kafatası sütur yapısının arkeolojik kazılardan edinilen insan iskeletlerinde en iyi korunmuş olan yapılar olduğunu fark ederek bu doğrultuda devam etmiştir. Ardından Todd'un simfizis pubis çalışmalarını doğrultusunda farklı niversiteler bünyesinde yerli Amerikalılardan toplanmış olan kemikleri UCMA ve WRU serileri olarak tanımlamış cinsiyetler üzerinde bu analizleri karşılaştırmış ve morfolojik değişimlere göre belli yaş aralıkları oluşturmuştur (Brooks, 1955).

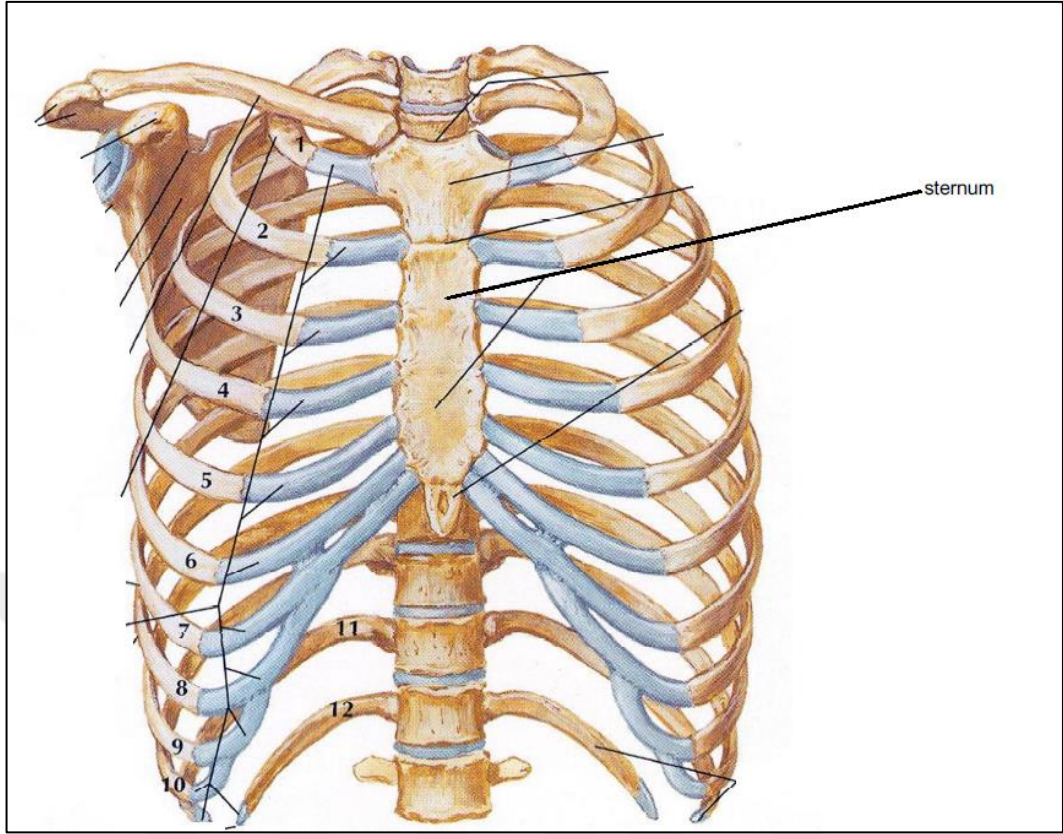
Mckern ve Stewart'da çalışmalarına yine simfizis pubisden devam ederek Kore savaşında hayatını kaybetmiş ve yaşları tam olarak bilinen Amerikalı erkekler üzerinde incelemeler yapmıştır. Yapılan bu çalışmada Brook'a ek bilgiler eklenmiş ancak sadece erkekler ve Amerikalılar üzerinde olduğundan dolaylı içerik kısıtlı kalmıştır.

Avrupa'da Acsádi ve Nemeskéri her iki cinsiyet grubunu da içeren beş farklı simfizis pubis faz grubunu oluşturdukları bir sonuç yayımlamışlardır. 1973 yılında ise Gilbert ve Mckern lm yaşları bilinen kadınlar üzerinde belli incelemeler yaparak simfizis pubis'i yaş tayini için üç alt gruba ayırmışlardır. Meindl ve arkadaşlarının 1985'te yaptığı incelemelerde hem erkek hem de dişi bireyleri içeren pubis araştırmaları yapmıştır ve sonuçlar Todd'un orijinal on aşamalı sisteminin temel bir modifikasyonunu oluşturmuştur (Brooks ve Suchey, 1990).



Şekil 1.4. Simfizis pubisin anatomik görüntüsü (Netter, 2014).

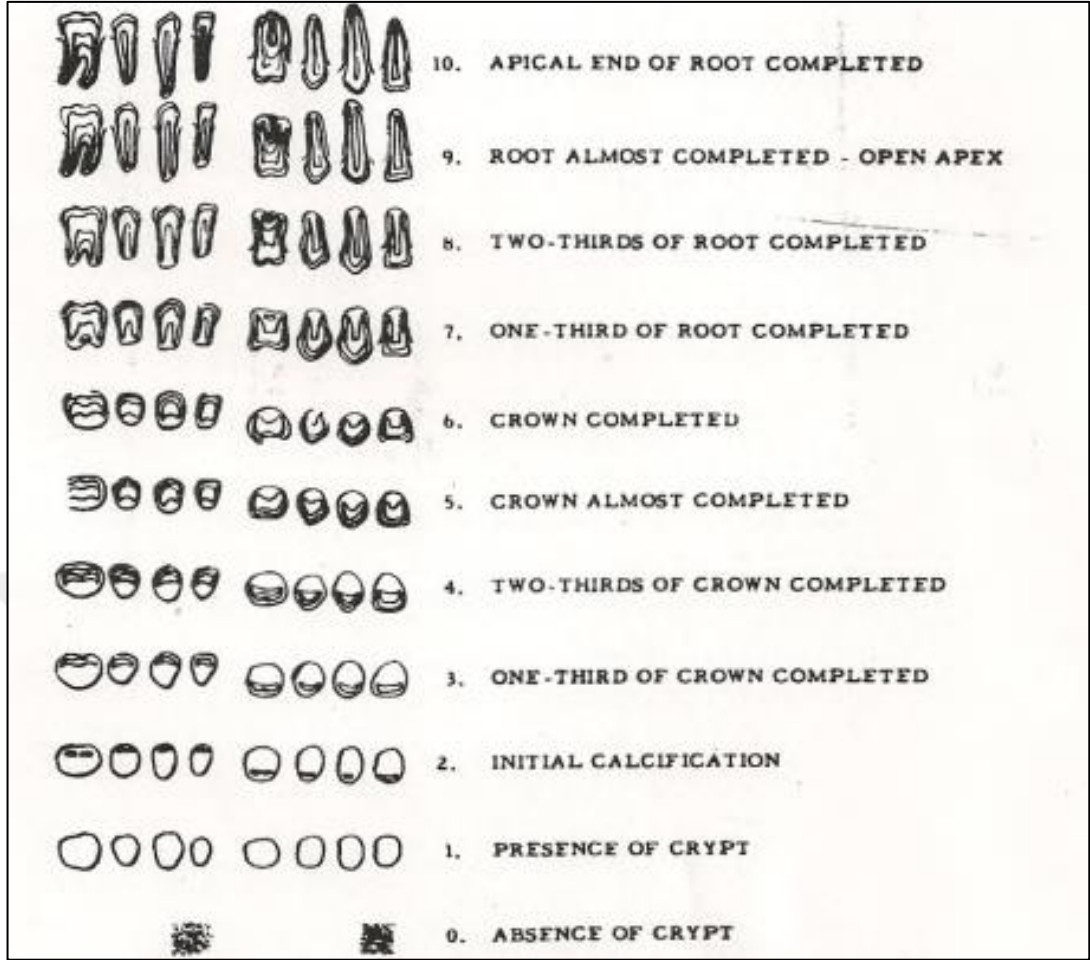
1980li yıllarda ise İşcan ve arkadaşları, Mckern ve Stewart'ın analiz sisteminden etkilenererek kaburga kemiği bölgelerinde çalışmalar yapmıştır. Yaklaşık 93 ölü erkek birey incelenmiş ve bu incelemelerde 17 yaş üstünde sternumda metamorfozların daha iyi gözlem yapıldığına dikkat çekmişlerdir. Yapılan incelemelerde her bir kemiğin oyuk derinliği, oyuk şekli ve oyukların iç kısım duvar yapıları değerlendirilmiştir. Bu çalışma farklı bir kemik grubunda gösterilerek yaş-kemik korelasyonunu kuvvetlendirmiştir (İscan ve ark., 1984).



Şekil 1.5. İşcan ve arkadaşlarının inceleme yaptığı sternum kemiği (Netter, 2014)

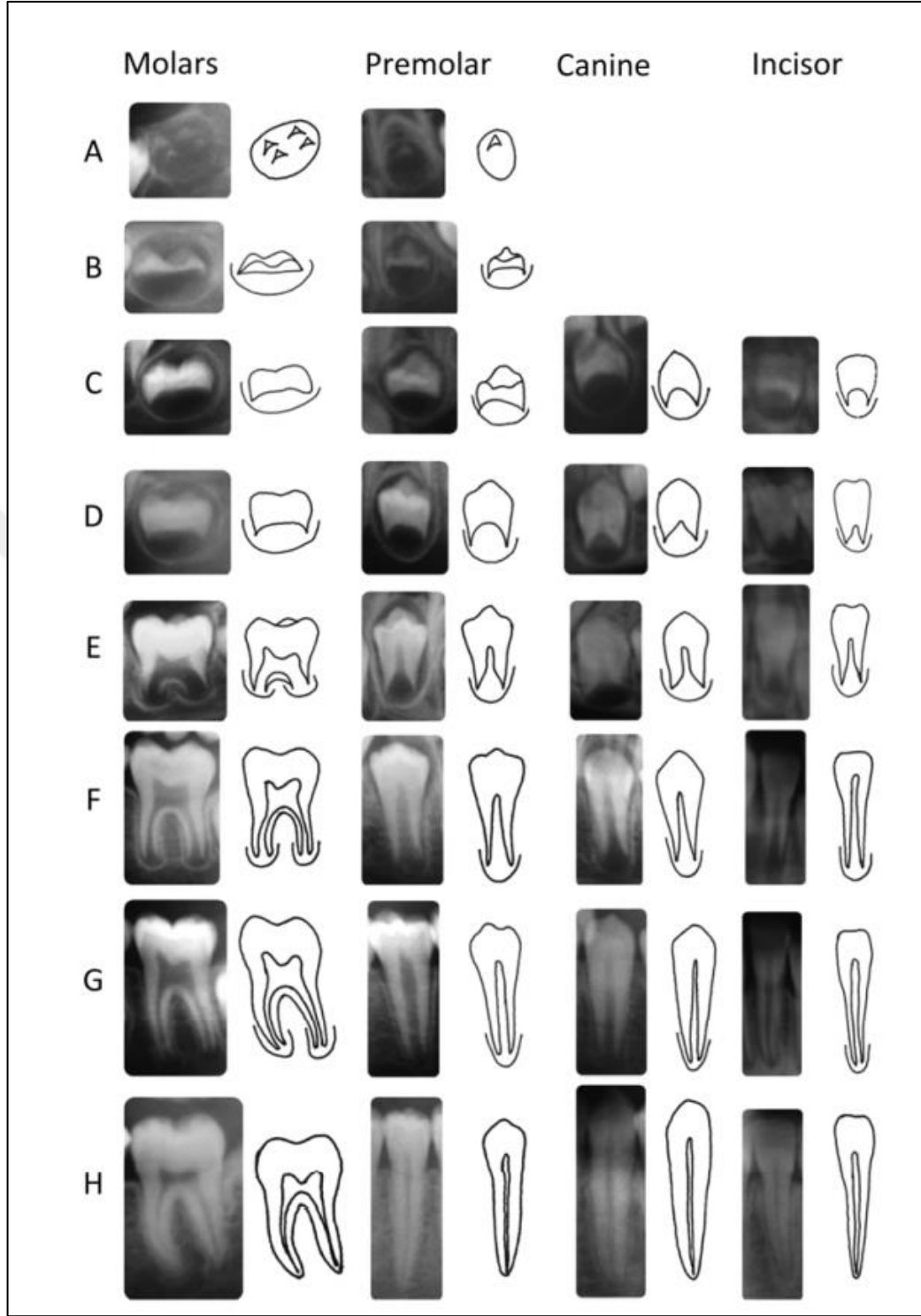
1.2.2. Diş ile Yaş İlişkisi

İnsanlarda yaş belirteçleri içerisindeki çalışmalar morfoloji ve radyografik değerlendirilmeler kapsamında başladığında, kemik yapıları ile birlikte vücutta zamana karşı yapılarını uzun süre koruyan yapılar daha öncelikli araştırma konuları olmuştur. Dental, yani dişler bu yapılardan olup bireyin hayatını kaybetmesi durumunda bile insan vücudundaki birçok dokuya göre daha geç yok olmaktadır. Diş yapılarının alt çene ve üst çene kemiğinde oluşmaya başlamalarından itibaren dişin tam olarak oluşumunun aşama aşama incelenerek belli dönemlere ayrılmasını kapsamaktadır. Öncelikle dişlerde çocuklardan başlanarak diş oluşumdan gelişim ve süt dişlerinin yerini kalıcı dişlere bırakılmasının evreleri radyomorfolojik olarak incelenmiştir (Şekil 1.6.). Bu incelemelerde kız ve erkek çocukları için farklı tablo ve grafikler oluşturulmuş ve belli anomaliteler tartışılmıştır (Nolla, 1960).



Şekil 1.6. Çocuklarda maksilla (üst çene) ve mandibulada (alt çene) bulunan dişlere göre oluşturulan grafi (Nolla, 1960).

Ardından gelen çalışmalarda oluşan ve gelişen tüm dişlerde daha detaylı araştırmalar yapılmıştır. Demirjian ve Tanner'in birlikte yaptığı çalışmada dişlerin olgunluk aşamaları incelenmiş (Şekil 1.7.) ve biyolojik bir süreç olarak tanımlanan olgunluk skoru matematiksel olarak ifade edilmiştir (Liversidge, 2012).



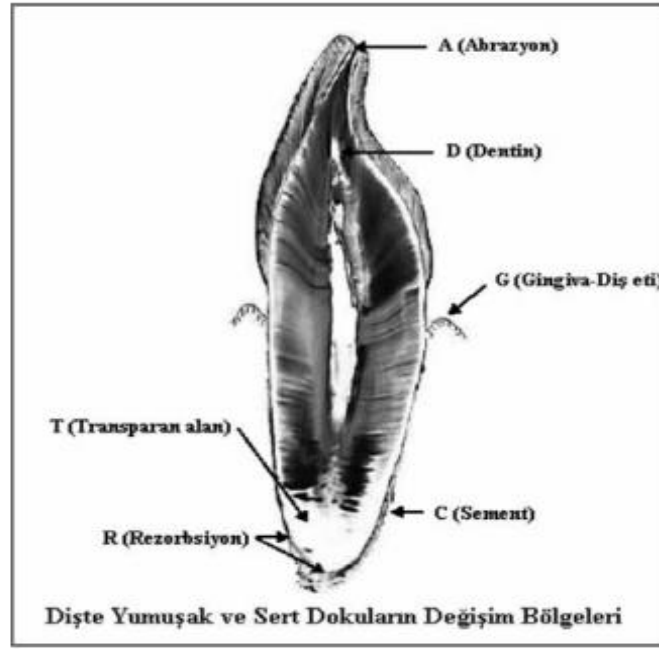
Şekil 1.7. Farklı diş tipleri ve gelişimlerinin radyografisi (Liversidge, 2012).

Demirjian ve Goldstein 1973'te yaptıkları araştırmada sol mandibuladaki 7 dişin analizini yapmış, dişleri A-H birimlerine ayırmış (Şekil 1.8.) ve belli hesaplamalarla skorlama tablosu oluşturmuşlardır (Demirjian ve Goldstein, 1976).



Şekil 1.8. Demirjian Metoduna Göre Oluşturulan Birimler (Afşin ve ark., 2014).

Gustafson'un yaptığı araştırma morfolojik değişimlerin üzerine olmuştur. Özellikle kök yapılarında meydana gelen mineralizasyon değişimleri ve dişi oluşturan yumuşak ve sert doku değişimlerin analizi yapılmış (Şekil 1.9.), yapılan hesaplamalarla yaş grafileri oluşturulmuştur (Gustafson, 1950).

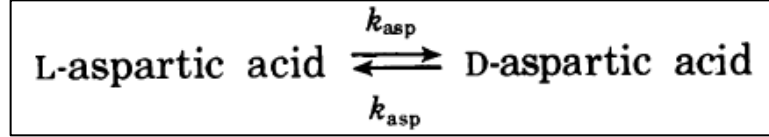


Şekil 1.9. Gustafson'un araştırmaları sonucu dişte yumuşak ve sert doku değişimleri (Afşin ve ark., 2014).

Gustafson'un yaşla birlikte diş yapılarında meydana gelen değişimlerin genel bir analizini yapan Bang ve Ramm bu analizlerin içinde özellikle kök şeffaflığıyla ilgilenmiştir. Yaptıkları detaylı analizler sonunda belli bir yaşa kadar kök dentinin şeffaf kaldığı gözlemlenmiştir. Zamanla diş yapısında meydana gelen intratübüler kanallarda kalsiyum birikmesi sonucu diş kökündeki şeffaflık ortadan kalkmaktadır. Benzer çalışmalar birçok bilim insanı tarafından çalışılmış ve sonuç olarak kök şeffaflığının yaş ile birlikte kalsiyum presipitasyonu sonucu azaldığı belirlenmiştir (Bang ve Ramm, 1970). Kök şeffaflığının analizi çekilmiş tek köklü dişlerden sağlanabilmekteyken zamanla yeni metotların gelişmesiyle yerini bilgisayar sistemli analize bırakmıştır (Drusini ve ark., 1991).

Bir diğer araştırma ise bireylerde yaşla beraber gerçekleşen dişte yapısal olarak meydana gelen değişimler üzerine olmuştur. Yapılan araştırmalarda diş yapısında biriken aminoasit türevlerinden biri olan aspartik asit oranına bakılarak yaş tayini hesaplamaları yapılmıştır. Aspartik asit, amino asit konfigürasyonlarının sapma durumuna göre adlandırılan D ve L formu arasında geçiş yapar (Şekil 1.10.). İnsan sistemlerinde aspartik asitin genellikle L formu daha yaygın olarak gözlemlenir. Bu

konfigürasyon formları arasındaki değişim rasemizasyon olarak adlandırılır (Işık ve Gürgey, 2004).



Şekil 1.10. Rasemizasyon tepkimesi (Helfman ve Bada, 1975).

Aspartik asit rasemizasyonu dişlerin mine, dentin ya da sement bölgeleri gibi farklı bölgelerden kesitler alınarak biyokimyasal olarak incelenen bir yöntemdir. Yapılan bu çalışmada zamana bağlı farklı bölgelerde L formu aspartik asit ve D formu aspartik asit miktarlarına bakılarak bu oranlar için belli hesaplama teknikleri geliştirilmiştir. Sonuç olarak her yıl belirli oranlarda aspartik asitin insan vücudunda daha yaygın olarak görüldüğü L formundan D formuna değişerek hücrelerde birikim yapması yaş tayini için bir belirteç olarak görülmüştür (Helfman ve Bada, 1975).

Diş ile yapılan diğer bir çalışma ise var olan dişlerde meydana gelen morfolojik değişimlerle beraber diş olgusunun insanda nasıl başladığı ve geliştiği ile ilgilidir. Büyüme döneminde bulunan bebeklerde yaklaşık altıncı ay itibarıyla oluşan dişler bebeğin gelişim evreleriyle belli periyotlarda tamamlanır. Tamamlanan süt dişleri yerini ikincil ya da kalıcı dişler olarak bilinen dişlere bırakır. Kalıcı diş evresine bakıldığında süt dişlerinin oluşumundan yerini kalıcı dişlere bırakıncaya kadar olan süreci daha sistematiktir. Bu sebeple bebeklikten çocuklukta süt dişlerinin yerini kalıcı dişlere bırakılıncaya kadarki dönem diş uzunlukları analiz edilmiştir. Diş ile yaş tayini belirleme yönteminin iki ana unsurunu kalsifikasyon ve kök oluşumunun hesaplanması olarak değerlendirilmiştir. Dişlerin dönemsel gelişimlerine göre boyutları değerlendirilerek matematiksel anlamda yaş ile ilişkili bulunmuştur (Aka ve ark., 2009).

Kalıcı dokuların morfolojik ve radyolojik analizleriyle yaş tahmininde bulunma çalışmaları bu araştırmaların başlangıcı olmuştur. 1900'lü yıllarda geliştirilen yöntemler, oluşturulan tablolar ve atlaslardan bazıları hala günümüzde de

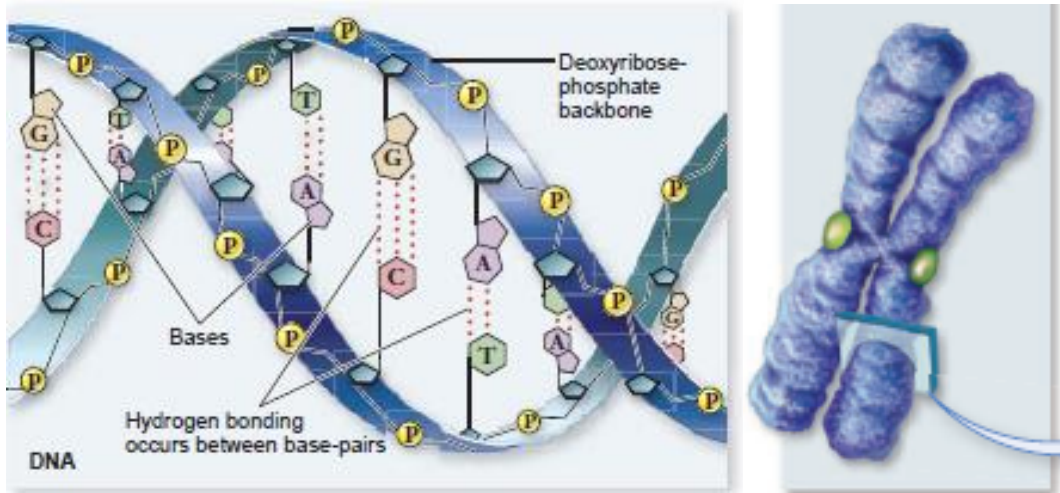
kullanılmaktadır. Gelişen teknoloji var olan metotlara yenilerini ekleyebilme çabasıyla devam ederken yaş tahmini için moleküler çalışmalar da hız kazanmıştır.

1.2.3. Telomer ile Yaş İlişkisi

Bireyin bilinmeyen kronolojik yaşına en uygun yaş tespiti için üzerinde çalışılan biyolojik yaş kavramı yine bireyin en küçük yapı birimi olan hücrelerini de kapsar. Hücresel yaş kavramı var olan hücrelerin fonksiyon ve metabolik aktivitelerinin çeşitli yöntemler aracılığıyla tespitini belirtir. Hücreler yaşam döngüleri boyunca bu aktivitelerini devam ettirme sorumluluğundadır. Yaşın ilerlemesiyle birlikte bu fonksiyonların bir kısmında azalma bir kısmında da tümünden kayıplar olabilmektedir.

1.2.3.1. DNA ve Yapısal Özellikleri

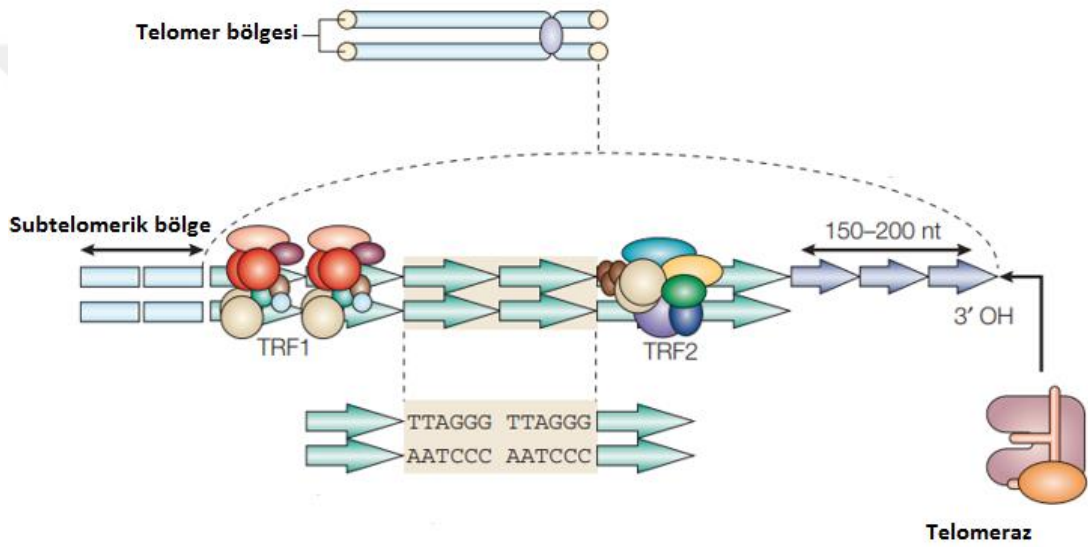
Organizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek amacıyla kendisi için gereken tüm bilgi sisteminin depolandığı kalıtım birimi DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) olarak bilinir. DNA hücrelerin yapı ve fonksiyonlarının düzenlenmesi, kendinden sonraki nesillere bu bilgilerin aktarımı gibi özelliklere sahiptir. DNA hücrelerin oluşumundan, var olan hücrelerin bölünme durumundan ve hatta belli bir evreye ulaştıktan sonra planlı bir şekilde ölümünden sorumludur. Tüm bu bilgi birikimini içinde barındıran DNA'nın bireyin yaşı ile ilgili bilgi taşıma durumu üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. DNA yapısal olarak beş karbonlu deoksiriboz şekeri, fosfat ve azotlu organik bazlardan oluşmaktadır. DNA'lar çift sarmallı yapıya sahiptir. Bu sarmallı yapıda bazların karşılıklı aralarında kurdukları hidrojen bağı ile şekillenmektedir (Şekil 1.11.) (Raven ve ark., 2008, s. 43). DNA'nın yapısındaki bu bazlar adenin, timin, guanin ve sitozindir. Bu dört farklı bazın oluşturdukları farklı dizilimler insan genomunu oluşturur. İnsan genomu yaklaşık altı milyar baz içermektedir. DNA hücre içerisinde nükleusta yer alır. DNA'nın histon adı verilen proteinlerce çevrilmesiyle oluşan yapıya kromatin adı verilir ve DNA nükleusta bu formda bulunur. Hücre normal durumundan hücre bölünmesi evresine geçtiğinde kromatinler kendi aralarında daha sıkı paketlenerek kısalıp kalınlaşmış bir yapı olan kromozomlara dönüşürler.



Şekil 1.11. DNA ve kromozom yapıları (Raven ve ark., 2008).

Kromozomlar üzerinde yapılan çalışmalarda, kromozomu oluşturan kollarının son kısmında tekrar eden nükleotitler bulunmuştur. Bu tekrar eden nükleotit dizilerinin delesyon (kromozomların bir parçasının kopma durumu) ve inversiyon (kopan DNA parçasının 180° dönerek tekrar aynı kromozoma bağlanması durumu) gibi mutasyonlardan daha iyi korunduğu görülmüştür (Alberts ve ark., 2008; Blasco, 2005; McClintock, 1941). Kromozomların terminal kısımlarında bulunan ve onun hücre içinde stabil olmasını sağlayan bu yapılar telomer olarak adlandırılmıştır (Şekil 1.12.). Yapılan bu incelemelerin kökeni bazı hücrelerin belli sayıda hücre bölünmelerinden sonra bölünebilme yeteneklerini kaybetmesiyle başlamıştır. Bölünebilme yeteneğini kısıtlayan etmen incelemeleri kromozomal boyuta ulaştığında bu etmenlerden birinin telomer kısalması olduğu keşfedilmiştir. Bu keşif kromozomların zamanla terminal uçlarında kısalma keşfi olarak başlayıp daha sonra hücre bölünmesiyle ilişkilendirilmiştir (Olovnikov, 1973). Kromozomların stabil olmasını sağlayan telomer bölgeleri heterokromatindir ve özel protein grupları tarafından bağlanan *TTAGGG* dizisinin tandem tekrar dizilerinden oluşur (De Lange, 2002). Çekirdek membranı ile kromozom arasında tutunma görevi görerek kromozomların konumunu ve stabilizasyonunu belirler. Telomer içermeyen kromozomlar korunma durumları daha az olan terminal bölgelere sahiptirler. Bu yapıdaki kromozomlar kararsızdır ve yine benzer yapıdaki kromozomlarla birleşebilir ya da kendi içinde dairesel yapı oluşturabilir (Blackburn, 1991).

Telomer bölgelerindeki nükleotit sayılarının korunmasını sağlayan telomeraz enzimidir yani telomer sentezinden sorumludur. Bu enzim sağlıklı somatik hücrelerde aktive değildir. Bu durum hücre bölünmesi gerçekleştikçe telomeraz aktivitesi olmadığından dolayı telomer kısalmasına sebep olmaktadır. Telomer kısalması hücre bölünmesi ilişkisi böylelikle yaş kavramını oluşturur. Yaşlanma ve hastalık ilişkisi üzerinde yapılan çalışmalarda kromozomların kısa telomer bölgelerine sahip oldukları belirtilmiştir (Blasco, 2005). Böylelikle hücre yaş kavramı dâhilinde telomer kısalması bir belirteç olarak kabul edilmiştir.



Şekil 1.12. Telomer ve telomeraz yapısı (Blasco, 2005).

1.2.4. NOR Aktivitesi ile Yaş İlişkisi

Canlılığa hücre boyutunda bakıldığında zaman genç bireyleri oluşturan hücreler, hücre yaş kavramınca gençlerdir. Bu hücrelerde metabolik olarak anabolik olay bütünlüğü daha fazladır. Bu durum beraberinde daha fazla hücre bölünmesini, DNA'dan daha fazla protein sentezi yapabilmek amacıyla daha fazla transkripsiyonu ve protein sentezini getirir. Genç hücreler yaşlandığında hücre içinde birtakım fonksiyonel gerilemeler ve kayıplar meydana gelir. Bu değişimlerin sebeplerinin daha

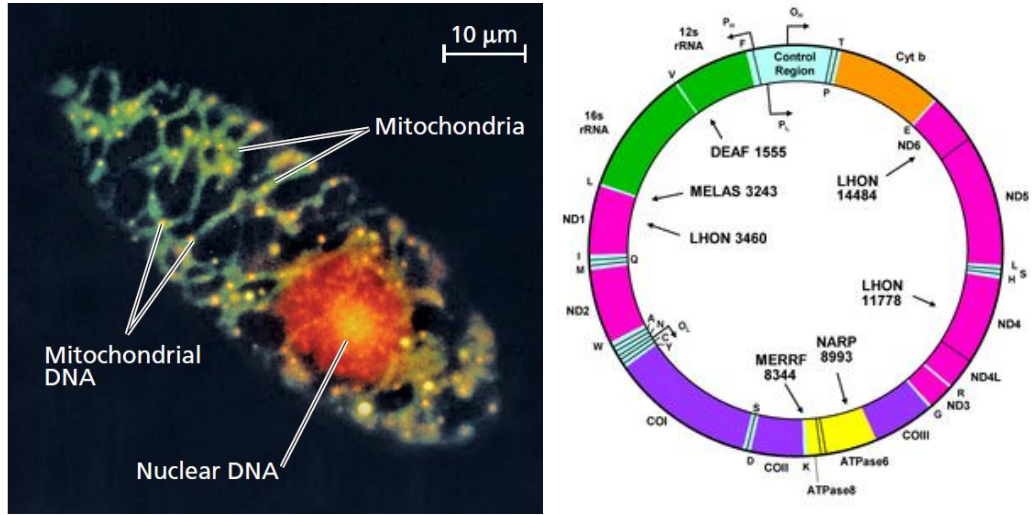
iyi kavranılabilmesini için nükleus (çekirdek) ve nükleolus (çekirdekçik) yapıları üzerinde çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Daha fazla ribozoma ve proliferasyona ihtiyaç duyan genç hücre grupları için kromozomların nükleolus yapılarını oluşturdıkları NORs (nükleolus organizör bölgeler: Nucleolar Organizer Regions) bölgeleri incelenmiştir. NORs bölgeleri nükleolusu oluşturan bölgelerdir ve oldukça aktiftirler. NORs bölgeleri insanlarda bulunan akrosentrik kromozomlardan (var olan kromozom kollarından biri diğerine göre oldukça kısadır) meydana gelmişlerdir. İçerdikleri DNA bölgeleri rRNA'yı (ribozomal RNA) oluşturdıkları için rDNA olarak adlandırılırlar. rDNA bölgeleri arka arkaya sıralanmış ve tekrar dizileri içeren ve transkripsiyon olarak aktif ve transkribe edilmeyen bölgelerden oluşur. Nükleolus içinde rDNA oldukça aktif olarak transkripsiyon görevini gerçekleştirir. Yüksek miktarda ribozom gereken hücreler daha fazla protein sentezi gerçekleştirirler ve bu hücrelerin nükleolus yapıları daha büyüktür. Nükleolusun genel yapısı hücrenin aktivite durumunu yansıtır. Genç hücre ve yaşlı hücre morfolojisinde nükleolus yapısı birbirinden farklıdır (Alberts ve ark., 2008; Imamoglu ve ark., 2005). Bu sebeple NORs bölgelerinin yaş ile ilişkisi incelenmiştir. Hücre bölünmesine hazırlık aşaması olan interfaz evresinde rRNA'yı oluşturacak olan rDNA bölgelerinin bir araya gelerek nükleolusu oluşturması ya da mitoz bölünmede kromozom bölgelerinin en iyi şekilde gözlemlendiği metafaz evresinde NOR bölgelerinin konumları daha belirgindir. Oluşan asidik ortamla gümüş nitrat NOR proteinlerini tarafından gümüş rengine dönerek işaretleme yapar. Bu işaretleme sayesinde nükleolusun NORs bölgeleri hakkında ve nükleolusun genel yapısı hakkında bilgi sahibi olunarak yaş ile arasındaki korelasyon tespit edilmiştir (Baransel-Isır ve ark., 2004).

1.2.5. Mitokondri ile Yaş İlişkisi

Mitokondri hücrelerin enerji kaynağıdır. Bu kaynak hücrelerin metabolik süreçlerinde oksijen kullanılarak vücuda alınan şeker, yağ gibi organik bileşenlerden ATP (Adenozin Tri Fosfat) elde edilmesini sağlar. ATP olarak bilinen enerji kaynağı hücrelerin başlıca kullandıkları enerji kaynaklarıdır. Hücre sitoplazmasına dağılmış halde konumlanmış mitokondriler hücrenin enerji ihtiyacına göre her hücrede farklı

sayıda bulunur. Mitokondrilerin diğer organellerden farklı olarak kendilerine ait kalıtım materyali olan DNA'ları bulunmaktadır. Bu sebeple kendi DNA materyalleri olan Mitokondrial DNA (mtDNA) (Şekil 1.13.) ile replikasyon (DNA'nın kendini eşlemesi), transkripsiyon (DNA'yı oluşturan nükleotit dizilimlerinden RNA nükleotit dizilerini oluşturmaları) ve translasyonu (transkripsiyonla oluşan mesajcı RNA'dan ribozomlarca protein üretiminin yapılması) gerçekleştirebilirler (Alberts ve ark., 2008).

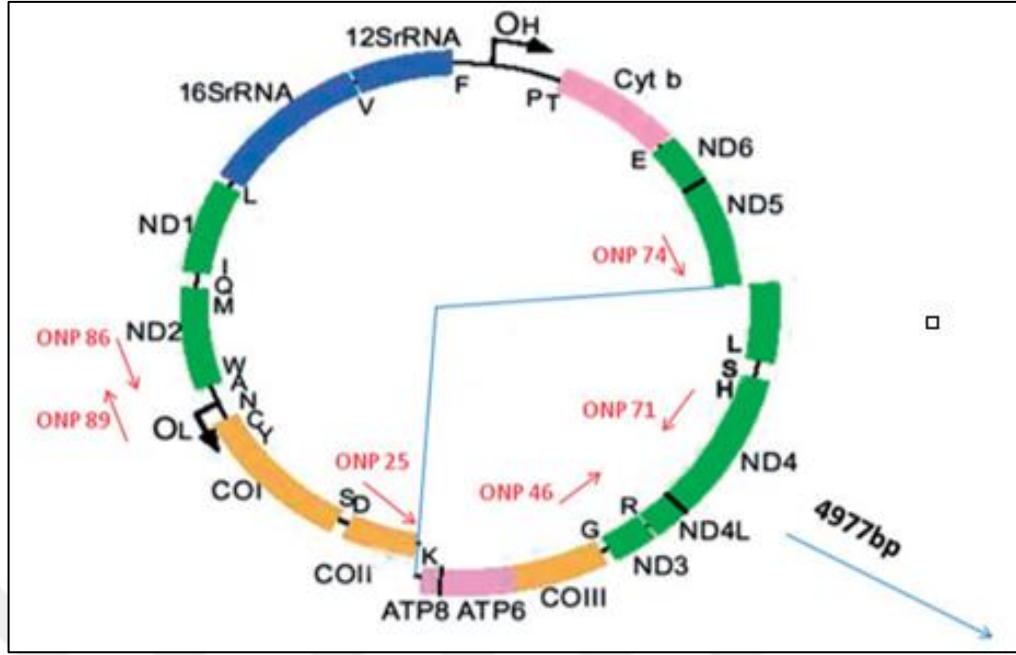
Mt DNA nükleus DNA'sından farklı olarak halkasal yapıdadır. Bu halkasal yapıda biri ağır ve diğeri hafif olmak üzere çift zincirden oluşur. Baz dizilimi olarak ağır olan zincir G (guanin) ve A (adenin) nükleotitlerince daha zenginken hafif zincir ise çoğunlukla C (sitozin) ve T (timin) nükleotitlerini içerir. Mt DNA toplamda 16,569 nükleotit içerir ve bu nükleotitlerden RNA'nın mesajcı RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) olmak üzere üç farklı RNA grubundan 37 adet gen kopyalanmaktadır (Anderson ve ark., 1981).



Şekil 1.13. Mitokondrilerin hücre içi dağılımı ve mitokondrial DNA (Mitochondrial DNA, 2019; Reece ve ark., 2009).

Alınan organik besinlerden hücre için gerekli ATP üreten mitokondriler bu üretim sonrasında bazı reaktif oksijen radikallerini oluştururlar. Bu oluşum enerji

üretmenin bir parçası olarak endojen sebepli ya da kimyasallar, radyoaktivite, sigara dumanı gibi ekzojen kaynaklı olabilmektedir (Gülay ve Karabulut, 2016). Oluşan bu reaktif oksijen solunuma alınan oksijen molekülüyle kıyaslandığı zaman reaksiyona girme eğilimi daha yüksek olan türlerdir. Bu eğilim ise hücre içindeki DNA, protein gibi bileşenlere zarar vermektedir (Harman, 1960). Hücre solunumuyla açığa çıkan ve zarar verme eğiliminde olan bu reaktif oksijenlerin mt DNA'da da zamanla bazı değişimlere yol açtığı görülmüştür. Toplamda 16.569 baz içeren mt DNA, nükleus DNA'sından farklı olarak doğrudan translasyona uğramayan intron bölgelerini içermez. Bu sebeple mitokondride solunum yan ürünleri olarak açığa çıkan reaktif oksijenlerin zarar verme durumu daha mümkündür ve bu zararın nükleus DNA'sındaki gibi bir onarım mekanizması olmadan sık sık replikasyona sebep olduğu bilinmektedir (Clayton ve ark., 1974). Mt DNA'da oluşan değişiklikler zamanla bu baz sayılarında delesyona sebep olmuştur (Anderson ve ark., 1981). Mitokondrinin hücrede sadece ATP kaynağı olmayıp kendi genetik materyali de olduğu için farklı fonksiyonel görevlerde bulunduğu belirtilmiştir. Hücre içi kalsiyum düzenlenmesi, apoptoz (programlanmış hücre ölüm mekanizması), hücre içi sinyal yapıları, inflamasyon aktiviteleri gibi önemli görevlerde üstlenmektedir (Reece ve ark., 2009). Mitokondrilerde zamanla bu aktivitelerin azaldığı ve mtDNA'daki mutasyon sayısının arttığı gözlemlenmiştir (Raju ve Poulouse, 2014). Yapılan incelemeler sonucu mtDNA 4977 baz çiftinde bulunan delesyonların (Şekil 1.14.) yaş kavramı için bir biyobelirteç olarak kabul edilmiştir (Diba ve ark., 2015).

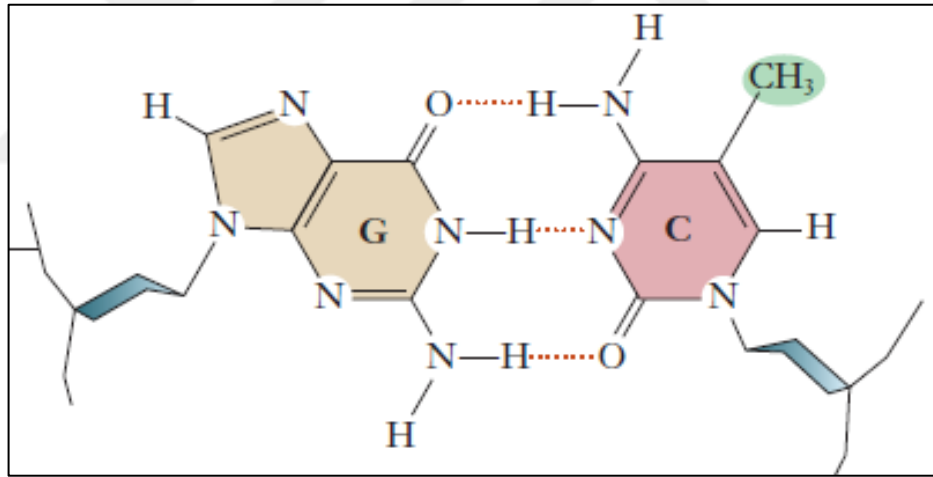


Şekil 1.14. mtDNA'daki delesyona uğrayan 4977 nükleotit çifti bölgesi (Diba ve ark., 2015).

1.2.6. Metilasyon ile Yaş İlişkisi

Yaş kavramı beraberinde yaşlanma kavramını da içerir. Bu kavram ilişkisi var olan bireyin zamanla morfolojik, metabolik, anatomik ve moleküler fonksiyonlarının değişimini ifadeler. Bu değişimler incelenerek yaşlanma kavramının moleküler temelde kazandırdıkları ve kaybettirdikleri fonksiyonel analizlerle yaş kavramının temeline inilmiştir. Fonksiyonel analiz kavramına bakıldığında zaman hücrede yer alan ve genetik bilginin aktarılmasını sağlayan DNA tüm hücreler için aynı yapıdadır yani ortak bir hücreden köken almışlardır. Hücrelerin birbirinden farklılaşmasını sağlayan mekanizma DNA ifadenmesi olarak adlandırılır. Bu durum DNA'daki genetik bilginin farklı hücrelerde farklı kısımlarının ifadenmesine dayanır. Farklı ifadenme ise belli bölgelerin aktive edilmesi ve belli bölgelerin de susturulmasıyla ilişkilidir. Bu ilişkilendirilme DNA dizisiyle bağlantı olmadan yani nükleotit sekansında bir değişiklik gözlemlenmeksizin gerçekleşir ve bu durum epigenetik olarak adlandırılır (Watson ve ark., 2014).

Yaş artışıyla birlikte kronolojik yaşla ilişkili olduğu düşünülen genlerin ifadenmesine bakıldığında ise genlerin spesifik lokuslarında metilasyon seviyesinde farklılıklar gözlemlenmiştir. DNA metilasyonu ile gen ifadenmesinin ilişkisi metillenen bölgenin bulunduğu yere göre şekillenen bir yöntem olup C nükleotidine DNMT (DNA metiltransferaz) enziminin yardımıyla metil eklenmesiyle gerçekleşir (Şekil 1.15.) (Raven ve ark., 2008, s. 317). Genomdaki C ve G nükleotitlerinin oluşturdukları ve CpG adacıkları olarak adlandırılan bu bölgeler DNA metillenmesinin yoğunlaştığı bölgelerdir ve arka arkaya 500 nükleotitten fazla tekrar içermektedir. CpG motifleri promotor bölge olarak adlandırılan ve transkripsiyonun başlama bölgesi olarak bilinen bu bölgede fazla ise buradaki metillenme bu bölgeyi inaktif duruma getirerek genin susturulmasını sağlar. Ayrıca promotor bölge içinde olmayıp genin herhangi bir yerinde bulunan CpG bölgelerindeki bazı metillenmelerin gen ifadesinde artışa yol açtığı belirtilmiştir (Jones, 2012).



Şekil 1.15. C nükleotidine metil eklenerek metilasyonun gerçekleşmesi (Raven ve ark., 2008).

Gen ifadenme seviyelerinde yaşa bağlı değişiklikler, yaşlanma ile birlikte hastalıklara karşı artan duyarlılıklar yaş ile ilgili olabilecek moleküler yollarda değişen bir aktivite olduğuna işaret etmektedir. Çok sayıda araştırmacının oluşturduğu bu çalışmada incelenen binden fazla genin yaşa bağlı olarak ifadenmesi artan ve azalan genler olarak iki ana başlıkta toplanmıştır. Özellikle CpG adacıkları gibi bölgelerde yaş ilerledikçe metillenme oranı artarken genom çapında metilasyon azalır (Hannum ve ark., 2013). DNA replikasyonu ve onarımları, RNA metabolizması,

ribozomal genler, mitokondrial ve metabolik aktivite düzenleyici gibi genlerin zamanla ifadenmesi azalırken; doğuştan ve adaptif immünite hücrelerinin düzenlenmesi, sitokin ve kemokin salınımı, aktin düzenlenmesi, sitoskelet yapısı, yağ asitlerin düzenlenmesini sağlayan genlerde ise artış gözlemlenmiştir. Yapılan bu çalışma farklı bir bakış açısı sağlayarak transkriptomik yaş kavramını ortaya çıkarmıştır (Peters ve ark., 2015).

1.2.7. Bugüne Kadar Yapılan Yaş Tahmini Yöntemlerinin Genel Değerlendirilmesi

Bugüne kadar yaş tayini için yapılan tüm çalışmalar bilimin de ilerleyişiyle var olan metotlara yenilerini ekleyerek gelişimine devam etmektedir. Bireyin fenotipik özelliklerinin değerlendirilmesiyle başlayan bu sürece günümüzde moleküler çalışmaların da hız kazanması destekleyici bir özellik katmıştır. Özellikle yapılan son çalışmalarda bireyin kronolojik yaşına en uygun biyolojik yaş tahmin edebilme bu durumu destekler niteliktedir. Yapılan çalışmalarda bireyin genetik özellikleri, çevresel etmenler, kongenital malformasyonlar, bazı hastalık etkenleri, tüm hücre ve dokularda aynı sonuç bütünlüğünün sağlanamaması, cinsiyet farklılıkları, popülasyonlara özgü değişiklikler gibi temel faktörler daha güvenilir ve doğru yaş tayini için arayışların devamını gerektirmektedir.

Yapılan kemik analizlerinde bireyde var olan ve büyümesini etkileyen bazı durumlar sonuçlarda sapmalara neden olabilmektedirler. Hipotiroidizm kemik yaşında geriliğe sebep olurken Albright sendromu gibi bazı hastalık türleri erken puberteye sebep olabilmektedir (Özsu ve ark., 2015). Turner sendromu gibi kromozomal bir anomali sahibi bir bireyin kemik incelemesi ile kronolojik yaşının belirlenmesinde sapmalara neden olabilmektedir. El ve el bileği analizine dayanan atlaslardan yapılan tahminler en güvenilir kaynakların başında gelmelerine rağmen bireyi radyasyon ile maruziyet zorunda bırakmaktadır.

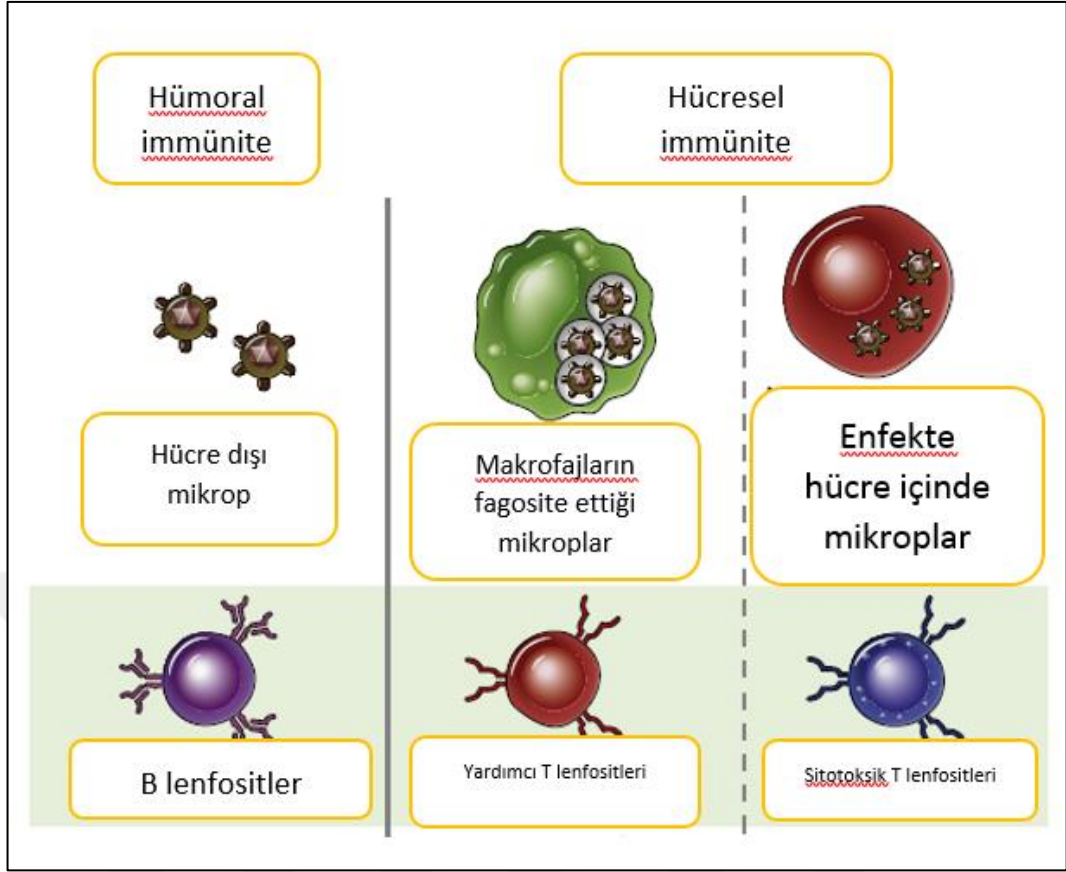
Dişlerden yapılan analizlerde gerek radyasyon etkisi gerekse bazı dişlerin eksik olması bu yöntemlerin en önemli dezavantajlarından. Diş dokusunun gerekli olma zorluğu bu alanda bilim insanlarını yeni arayışlara itmiş ve yeni geliştirilen tekniklerle bilgisayarlı analizi yapılabilir kılmıştır.

Hücrel yapılan analizlerde doğruluk payının artması en büyük avantaj iken, maliyetinin yüksek olması, dokular ya da hücreler arası tutarlı sonuçlar elde edilememesi, kişinin çevresel faktörün etkisinin genetiğine yansımaları gibi faktörler bu yöntemlerin en önemli dezavantajlarından.

Bütün bu genel durum değerlendirildiğinde oldukça önem arz eden yaş konusu için var olan yöntemler geliştirilmeye çalışılmakta ve yeni yöntemlerle de güvenilirliğinin artırılması esas alınmaktadır.

1.2.8. İmmün Sistem ile Yaş İlişkisi

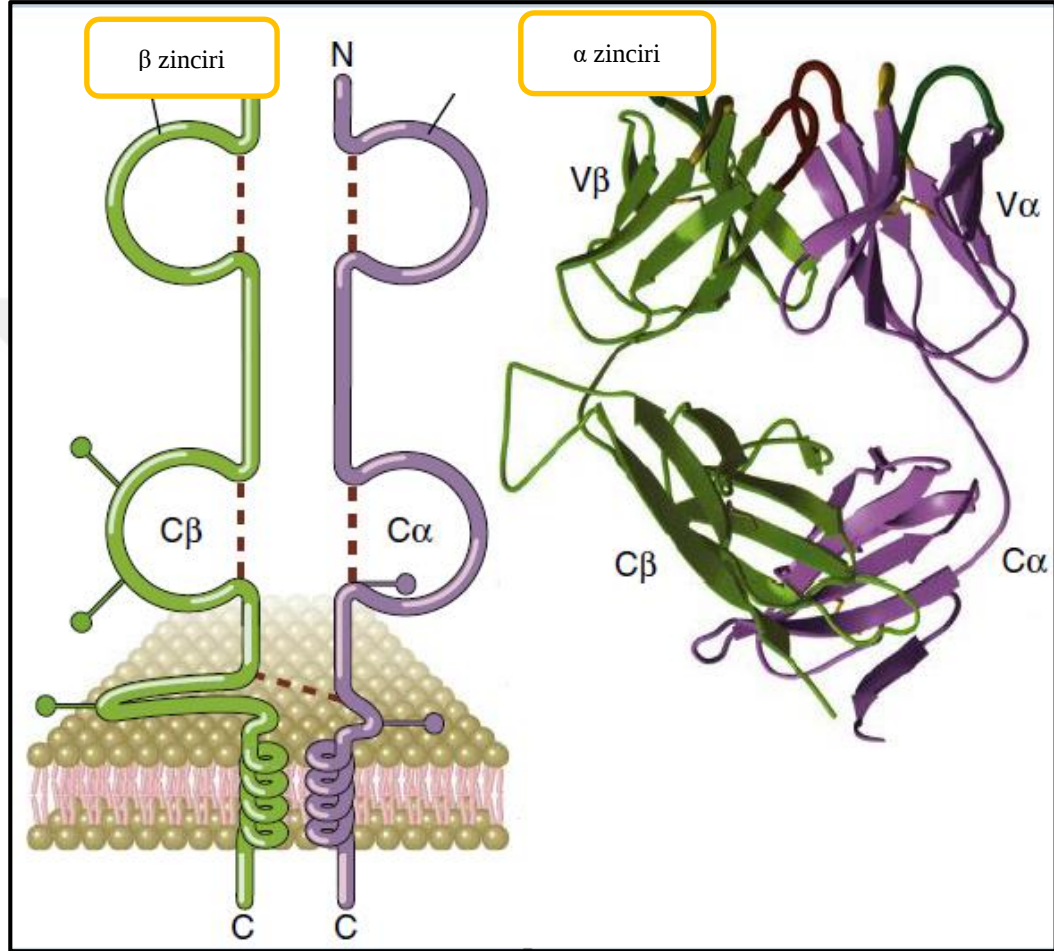
Yaş ilerlemesiyle vücutta fonksiyonel olarak işlev kaybının yaşandığı bir diğer sistem de immün sistemdir. İnsanın doğumundan itibaren hastalık etkeni olan enfeksiyonlara sebep olabilecek tüm etmenlere karşı konulmasını sağlayan sistem immün yani bağışıklık sistemidir. İmmün sistem bebeklikten başlayarak vücudumuza giren tüm patojenlere karşı bir yanıt geliştirir. Oluşan bu yanıt zamanla daha özgül bir savunma sağlar. Bu savunmayı sağlayan hücreler B ve T lenfositler olarak adlandırılır (Şekil 1.16.). Lenfositler immün yanıtlarını farklı yollarla oluşturur. B lenfositler antikor olarak adlandırılan proteinleriyle dolaşım sistemine katılarak bu görevini gerçekleştirir. T lenfositler ise hücre içi immüniteden sorumlulardır. Böylelikle hem hücre içi hem de hücre dışında farklı yollarla birey patojenlere karşı korunmuş olunur.



Şekil 1.16. İmmün sistem elemanları ve yanıt çeşitleri (Abbas ve ark., 2015).

Vücutta immün yanıt oluşturabilecek patojene ait olan proteinlerin yani antijenlerin sayısı oldukça fazladır. Hem hümmoral hem de hücressel olarak bu antijenlere gerekli immün yanıtın oluşmasını sağlayan lenfositler oldukça özelleştirilmiş bir yapıya sahiptir. Bu lenfositler farklı antijenleri en iyi şekilde tanıyıp en kısa sürede gerekli immün yanıtı oluşturabilmek amacıyla her antijene özgü reseptör içerirler. T lenfositler de tıpkı B lenfositler gibi kemik iliğindeki hematopoetik prekürsör hücrelerinden gelişirler. Gelişen bu hücreler öncü lenfositler olarak bilinirler. Öncü T lenfositleri maturasyonlarını tamamlamak amacıyla timusa gönderilirler. Timusa gelen T lenfositleri timusun korteks ve medulla bölgelerinde çeşitli yüzey molekülleri eklenmesiyle olgunlaşmanın tamamlanması sağlanır. Eklenen bu yüzey reseptörleri T lenfositlerde farklılaşmanın başlamasını sağlar (Abbas ve ark., 2015, s. 2). T lenfositler yabancı antijenleri T hücre reseptörü (TCR: T Cell Receptor) adı verilen reseptörler sayesinde tanırırlar. Timusta da T hücre

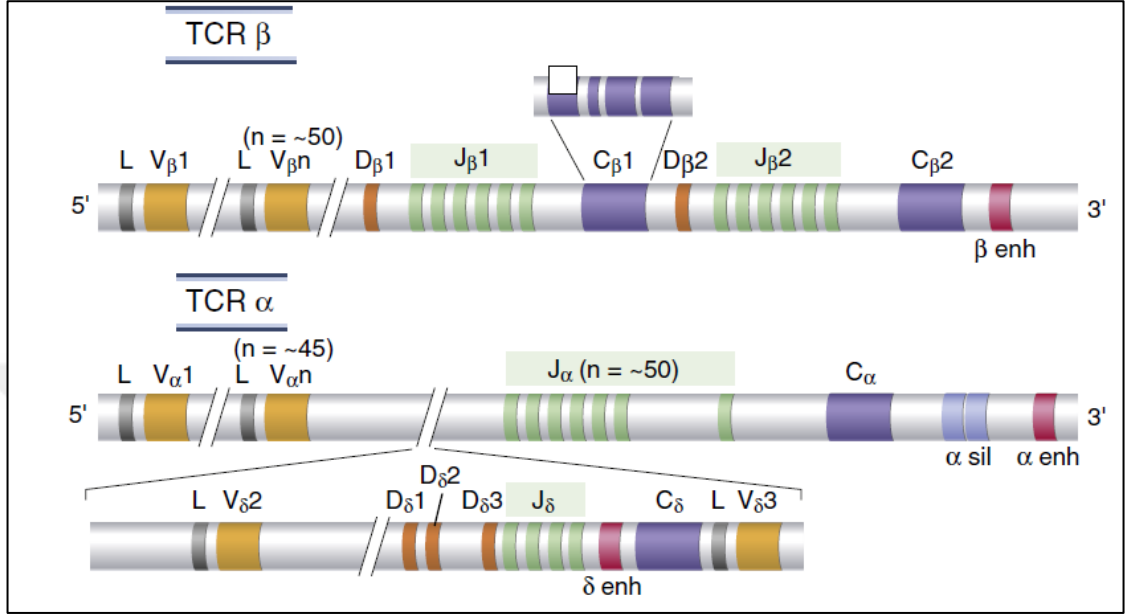
reseptörlerinin oluşumu ve düzenlenme mekanizmaları gerçekleştirilmektedir. Yapısal olarak bu reseptörler α ve β zincirlerinden meydana gelirler (Şekil 1.17.) (Abbas ve ark., 2015, s. 190 ; Murphy, 2012).



Şekil 1.17. T hücre reseptörü α ve β zincir yapısı (Abbas ve ark., 2015).

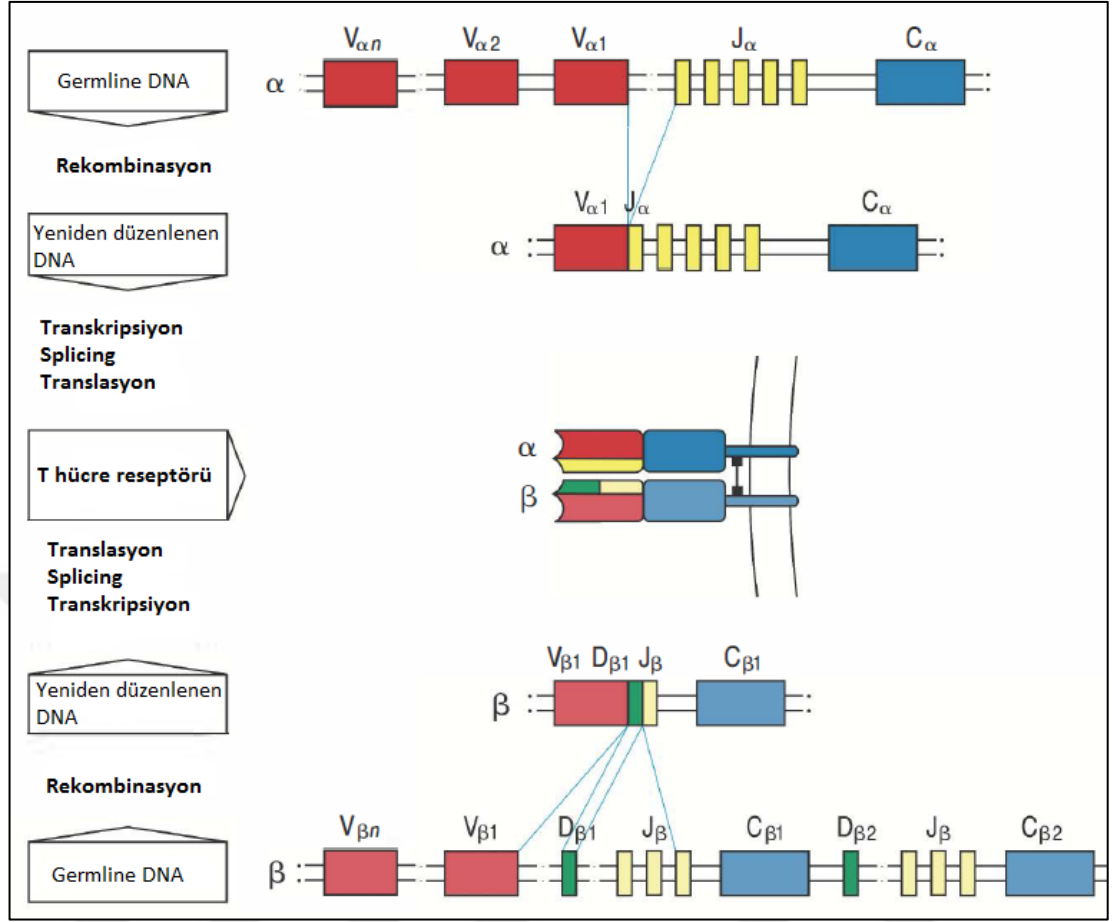
Bu iki farklı zincir grubunun düzenlenme mekanizması VDJ rekombinasyonu olarak bilinmektedir. Bu mekanizma α ve β zincir yapısında farklı olarak düzenlenir. V bölümü değişken (variable) kısmı, D bölümü çeşitlilik (diversity) kısmını, J bölümü de katılma (joining) kısmını niteler (Şekil 1.18.) (Abbas ve ark., 2015, s. 193). Bu bölgelere ek olarak DNA sekansının son kısmında C bölümü yani sabit (constant) bölüm yer almaktadır. T hücre reseptörü düzenlenmesinde her iki zincirde aynı rekombinasyon bölgelerini içermez. α zincir bölgesi düzenlenme için V ve J

bölgelerini içerirken β zincir bölgesi V ve J bölgelerine ek olarak D bölgesini de içermektedir. Her iki zincir için de sabit olan C bölgesi mevcuttur (Murphy, 2012).



Şekil 1.18. α ve β zincirleri için VDJ rekombinasyon mekanizması (Abbas ve ark., 2015).

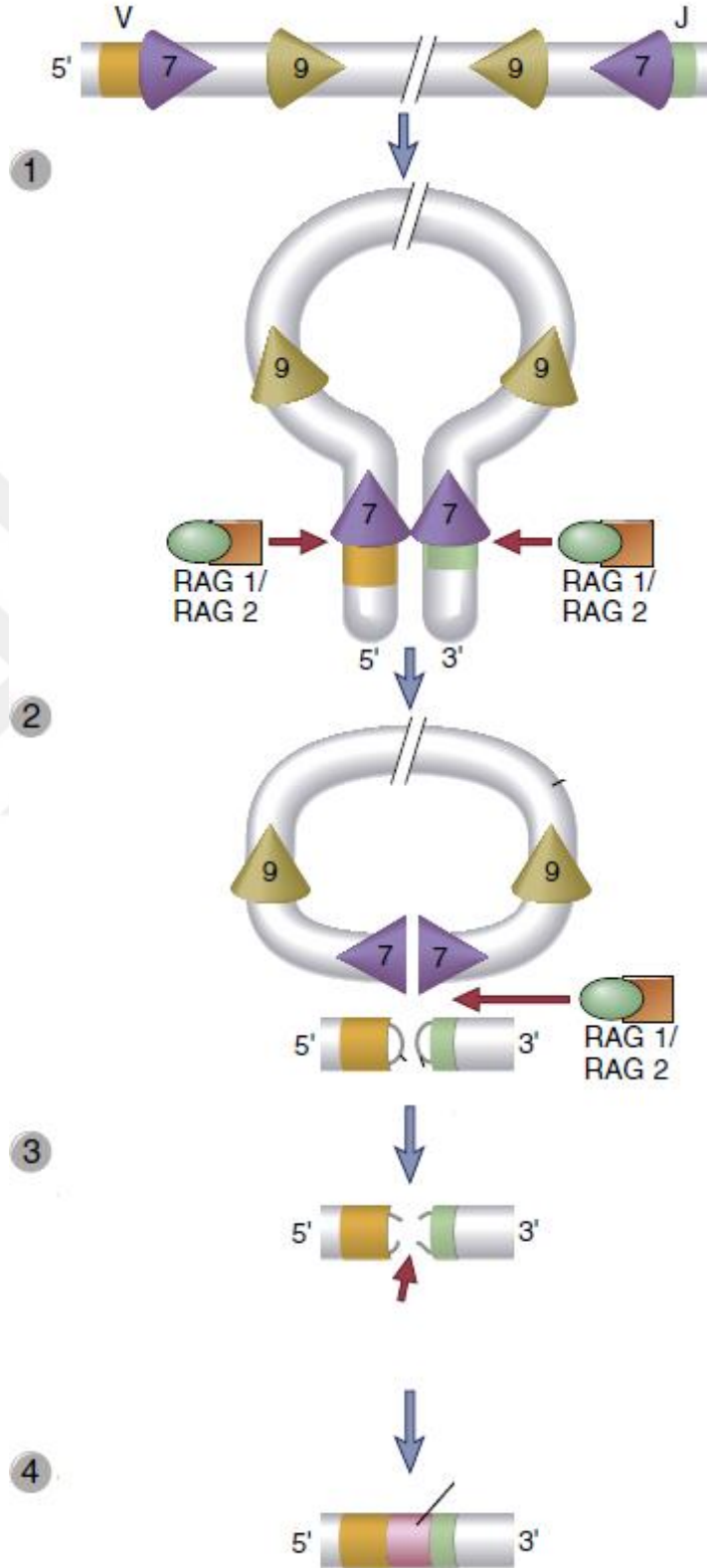
VDJ rekombinasyonu farklı bölgeler içeren nükleotit dizilimlerinde transkripsiyon olabilen bölgeleri yani ekzonları ve transkribe olmayan bölgeleri intronları içerir. Düzenleme esnasında öncelikli olarak D bölgesi J bölgesiyle birleşir. Ardından V ile C bölgeleri eklenir. İtronlar arasına farklı ekzon bölgelerinin yerleşmiş olmasıyla her bir düzenlemede farklı bölgelerin kırılarak çeşitlilik elde edilmiş olunur (Şekil 1.19.).



Şekil 1.19. T hücre reseptörünün VDJ rekombinasyon mekanizması ile çeşitlendirilmesi (Murphy, 2012).

VDJ rekombinasyon mekanizmasını düzenleyen enzim VDJ rekombinaz olarak bilinir ve lenfositleri düzenleyen bu rekombinaz enzimleri RAG1 ve RAG2 (Rekombinasyon aktive edici gen) olarak adlandırılmışlardır ve VDJ rekombinasyon mekanizmasını aktive ederler. RAG1 ve RAG2'nin yardımıyla yapılan bu düzenlemede ortaya çıkan halkasal DNA parçaları TREC (T hücre reseptörü eksizyon halkaları) olarak adlandırılır (Şekil 1.20.). TREC parçaları replike olmazlar ve timopoetik aktivitenin belirteçleridir. DNA'ları kendilerini eşleyemediği için her bir

hücre bölünmesiyle dilue olurlar. Bu durumda yaş alımı ile TREC sayılarında azalma olacağı beklenir.



Şekil 1.20. VDJ rekombinasyonu ile TREC oluşum mekanizması (Murphy, 2012).

Hücre bölünmesiyle sayılarının gittikçe azaldığı düşünülen TREC'in yaş ile bir korelasyonu olup olmadığı hipotezi kurulabilir. Moleküler tekniklerle doğruluğundan emin olunarak, günümüzde aktif olarak kullanılan yaş tahmini tekniklerine en uygun desteğin sağlanabilmesi amacıyla çalışmamızda TREC miktarının kantitatif olarak PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle analizi amaçlanmıştır.

T hücre reseptörünün yeniden düzenlenmesi ve T hücre farklılaşması timopoetik aktivite göstergesini oluşturduğu Hazenberg ve arkadaşları tarafından tanımlanmış, yapılan bu çalışma sonrası Dünya literatüründe TREC üzerine birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Hazenberg ve ark., 2001).

Kore'de gerçekleştirilen bir araştırmada, 172 kişilik örneklem üzerinde çalışmalar yapılmış, korelasyonun analizi için yaşlar çeşitli alt gruplara ayrılmışlardır. Analiz için Cp değerleri karşılaştırılmış ve 60 yaş üstü grupta TREC Cp değerine rastlanılmamıştır. Benzer grup içindeki örnekler tutarlılık gösterip belli bir kopya sayısı ortalamasıyla sonuç vermiştir. Ancak 35-45 yaş grubunda kesin bir düşüş tespit edilmiştir. Yaptıkları çalışmada kendi popülasyonları adına değerlendirme yapmışlardır (Cho ve ark., 2014).

Bir diğer kantitatif TREC çalışması 248 kişilik örneklem ile Çin'de yapılmıştır. Çin'deki çalışma Kore'deki çalışmadan farklı olarak yeni doğan grubundan itibaren örneklem listesini oluşturmuş ve negatif kontrol olarak ise kedi, inek, fare gibi hayvan kanlarını kullanmışlardır. Yapılan çalışma sonuçlarında yeni doğanlarda oldukça yüksek olan kopya sayısı yaş alımı ile birlikte azalmıştır ve 55 yaş üzeri grupta bir kırılma oluşturarak sert bir düşüş göstermiştir (Ou ve ark., 2011).

Hücre bölünmesi ve yaş alımı ile sayılarının gittikçe azaldığı bilinen TREC'in yaş tayinindeki olası katkısı önemlidir. Moleküler tekniklerle doğruluğundan emin olunarak, günümüzde aktif olarak kullanılan yaş tahmini tekniklerine en uygun desteğin sağlanabilmesi amacıyla bu araştırmada, Türkiye'de 10 farklı yaş grubu kapsamındaki 203 sağlıklı gönüllüde TREC miktarının kantitatif olarak PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle analizi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından Karar No: İ3-91-19 onaylanmıştır. Çalışmada sağlıklı gönüllülerden alınan tam kan örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Serpil Akdağ Kan Merkezi bünyesinden gerekli izinler dâhilinde toplanmıştır. Çalışma kapsamındaki deneyler Ankara Üniversitesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adli Genetik laboratuvarında, gerçek zamanlı PZR reaksiyonu Pediatrik İmmünoloji araştırma laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Genel olarak çalışma basamakları aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Serpil Akdağ Kan Merkezinden 203 adet gönüllünün kişisel bilgileri ve kan örnekleri toplanmıştır. Örneklerin toplanmasından önce gönüllüler bilgilendirilmiş gönüllü olur formu okutulmuş, gerekli bilgiler verilmiş ve onayları alınmıştır.
- Alınan tam kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
- İzole edilen DNA'lar PZR yöntemiyle çoğaltılarak kantitatif olarak hesaplamalar yapılmıştır.
- Elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 25.0 tarafından değerlendirilerek yorumlanmıştır.

2.1. Çalışmaya Dâhil Edilen Gönüllüler

Bu tez çalışmasında TREC ile yaş ilişkisini belirlemek amacıyla Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Serpil Akdağ Kan Merkezi bünyesinden gerekli izinler

dâhilinde 203 sağlıklı gönüllüden tam kan örnekleri çalışma kapsamına alınmıştır. Örneklem seçiminde TREC'in doğru bir şekilde hesaplanabilmesi için bazı kriterler belirlenmiştir. Çalışmaya dâhil olma kriteri olarak sağlıklı ve 15-65 yaş grubu içinde olmak olarak belirlenmiştir. Çalışmamızın dışlama kriteri kronik bir hastalığın varlığı olarak seçilmiştir. Sonuçların en iyi şekilde analiz edilebilmesi için 203 kişilik grup 10 alt gruba ayrılmıştır (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Örneklem yaş aralığı ve sayısı.

Grup No	Yaş Aralığı	Örneklem sayısı
1	15-19	22
2	20-24	20
3	25-29	20
4	30-34	20
5	35-39	21
6	40-44	20
7	45-49	20
8	50-54	20
9	55-59	20
10	60-65	20

2.2. Sağlıklı Gönüllülerden Örnek Alımı Aşaması

Çalışmaya dâhil edilen 15-18 yaş grubu çocuklar için hem kendilerine hem de ebeveynlerine gerekli bilgilendirme sağlanmış ve hem çocuk hem de erişkinler için hazırlanmış olan bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ile onayları alınmıştır.

Bu kriterler dâhilinde uygun olan gönüllülerden EDTA'lı tüp içerisinde 2 ml tam kan örneği alınmıştır. Alınan kan örneği bir sonraki basamak olan DNA izolasyonu aşamasına kadar -20 °C koşullarında saklanmıştır.

2.3. DNA İzolasyon Aşaması

DNA izolasyon işlemi hücreyi oluşturan hücre membranını ve nükleus zarını parçalayarak nükleus içindeki genetik materyal olan DNA'nın elde edilmesini sağlamaktır. Hücre içinde bulunan kalıtsal materyal olan DNA tüm genetik bilginin saklandığı depodur. Bireyin tüm özelliklerini içeren bu organik yapı oldukça önemlidir ve DNA'nın en saf şekilde izolasyonunun elde edilmesi oldukça elzem bir konudur. Öncelikle hücre membranının parçalanması sağlanır. Ardından DNA'ya bağlı proteinler proteinaz K adı verilen enzim sayesinde denatüre edilerek uzaklaştırılır. Proteinlerden uzaklaşan DNA'nın hücre içinde var olan diğer tüm organik materyallerden uzaklaşması sağlanır. Elde edilen DNA su ya da Tris HCl gibi solüsyonların içinde muhafaza edilir.

Örneklem grubundan alınan 2 ml EDTA'lı tam kan örneğinden DNA izolasyon çalışması yapılmıştır. İzolasyon aşaması için Anatolia Geneworks firmasına ait olan Magnesia16® robotik izolasyon cihazı kullanılmıştır (Şekil 2.1.). Magnesia16® cihazı tam kan izolasyon kiti olan 102 numaralı kitler yardımıyla tam kandan DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.1. Magnesia 16 cihazı ve kullanılan kit örneği.

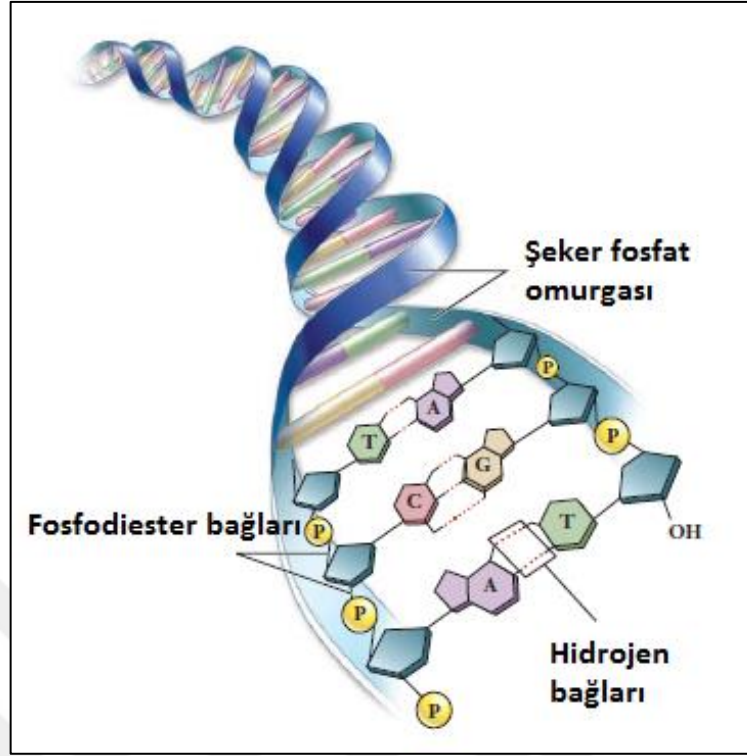
DNA izolasyonu için gerekli tüm aşamalar hazır olarak cihaza yüklenen ve kontaminasyon riskini oldukça düşüren bu kitler sayesinde sağlanmaktadır. 400 µl kan

örneği 1,5 ml eppendorf tüplerine aktarılmış ve üzerine 40 µl proteinaz K enzimi pipetaj yapılarak eklenmiştir. Pipetleme işleminden sonra eppendorflar cihaza yüklenmiştir. 57 dakika süren sürenin sonunda elüsyon tüplerindeki DNA örnekleri alınmıştır. Bu izolasyon yöntemi sayesinde suda çözdürölmüş olarak 200 µl saf DNA eldesi sağlanmıştır. Örneklerin etiketleri şeffaf, -20 °C'ye dayanıklı bantla bantlanmıştır. Bantlama işlemi sonrası örnekler -20 °C 'de saklanmıştır.

2.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşaması

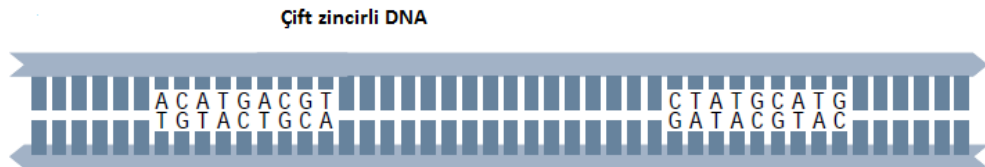
Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu belli miktarda elde edilmiş DNA'nın amplifiye edilmesi sağlanarak gerçekteşen bir çoğaltma yöntemidir. Bu yöntem well plate'in tek bir kuyucuğunda gerçekteşir. Kullanılan işaretleyici moleküller sayesinde anlık olarak miktar hakkında bilgi verir.

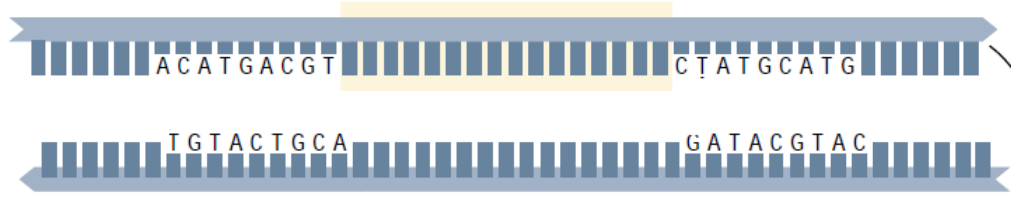
DNA çift zincirli halkasal bir yapıya sahiptir (şekil 2.2.) (Raven ve ark., 2008, s. 43). İçerdiği A (Adenin), T (Timin), G (Guanin) ve C (Sitozin) nükleotitleri karşılıklı olarak adenin karşısına timin ve guanin karşısına sitozin gelecek şekilde konumlanmıştır.



Şekil 2.2. DNA'nın moleküler yapısı (Raven ve ark., 2008).

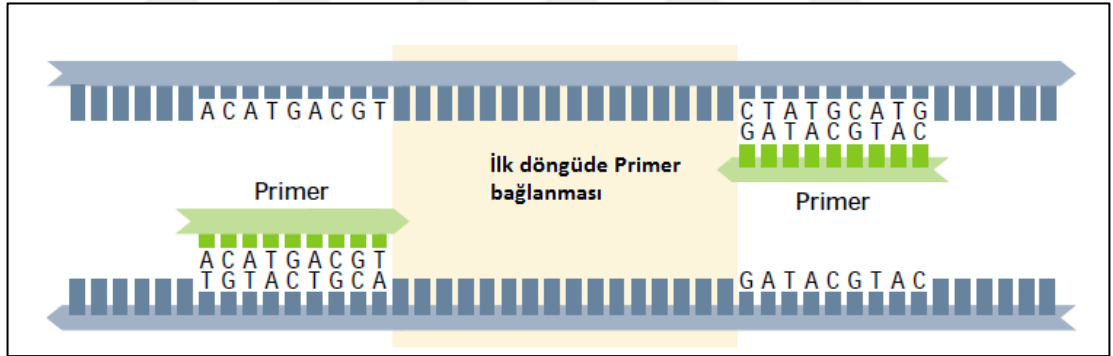
PZR esnasında DNA kendini eşleyerek çoğalttığı için çift zincirli yapı açılır ve iki zincir de karşı zincirini tamamlar. Bu çift zincirli yapının açılabilmesi için PZR'nin ilk basamağı olan denatürasyon basamağı gereklidir. Denatürasyon basamağında sıcaklık arttırarak DNA'nın nükleotitleri arasındaki hidrojen bağları kırılır böylece iki adet tek zincir oluşur (Şekil 2.3.). Nükleotitler arası hidrojen bağları oldukça kuvvetlidir. Bu bağların kopabilmesi için sıcaklığın 93-97 °C'ye kadar çıkarılması gerekir. DNA yapısındaki adenin ve timin nükleotitleri arasında iki, guanin ve sitozin nükleotitleri arasında üç hidrojen bağı bulunmaktadır. Denatürasyon için gereken sıcaklık bu bağların sayısına bağlıdır.





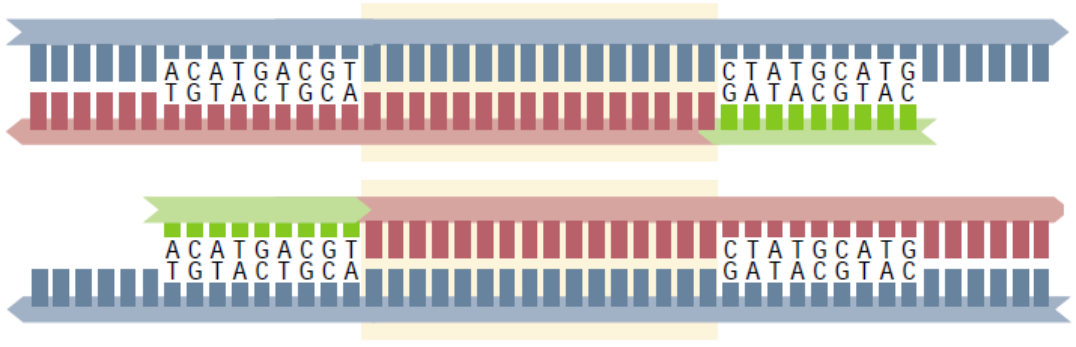
Şekil 2.3. Çift zincirli DNA'nın denatürasyona uğraması.

DNA'nın istenen kısmı çoğaltılabilir. Denatüre olmuş iki ayrı tek zincir halini alan DNA'nın çoğaltılmak istenen kısmının nükleotit dizilimine uygun bir şekilde iki adet primer olarak adlandırılan tek zincirli yapı DNA'ya bağlanır (Şekil 2.4.). Primerler çoğaltılmak istenen kalıp DNA tasarlanırlar. Bu tasarımdaki en önemli faktör primer uzunluğudur. Primer uzunluğu primer ile kalıp DNA arasında bağ oluşum olasılığını belirler. Ayrıca bu uzunluk yeni bağlar için gerekli sıcaklığın belirlenmesinde de aktif rol oynamaktadır. Primer bağlanma sıcaklığı genellikle 55-65°C arasındadır.



Şekil 2.4. Primerlerin uygun sıcaklıkta kalıp DNA'ya bağlanması.

Primerler doğru bölgelere bağlandıktan sonra uzatılarak gerekli çoğalma işlemi tamamlanmış olur (Şekil 2.5.). Bu bağlanmadan sonra zincirin geri kalan kısmının tamamlanması için DNA polimeraz enzimi olan genellikle Taq polimeraz enzimi kullanılır. Taq polimeraz sıcaklığa oldukça duyarlıdır ve genellikle bu sıcaklık 72 °C'dir. Polimeraz sayesinde ortamda bulunan nükleotitler primerin devamı olarak sentezlenir ve amplifikasyon tamamlanmış olur.



Şekil 2.5. Primer uzamasıyla amplifikasyonun tamamlanması.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda var olan kalıp DNA çoğaltılırken oluşan kopya sayısının analizi anlık olarak görüntülenebilir. Gerçek zamanlı PZR’da analiz farklı metotlarla elde edilebilir.

Bu anlık ölçüm reaksiyon ortamına konulan ve dizideki nükleotitin içeriğine uygun olacak şekilde tasarlanmış olan probler aracılığıyla gerçekleşir. Oluşan ürün miktarının analizi için başlangıçta konulan DNA miktarı esas alınarak log fazı olan ilk önemli yükseliş yani problerin floresanlarının ilk gözlemlenebildiği faz Cp (Crossing Point) olarak bilinir ve PZR analiz birimidir. İlk DNA’dan başlamak üzere her bir döngüyle oluşan tüm DNA’lar amplifiye olurlar ve DNA miktarı kısa sürede oldukça yüksek rakamlara ulaşır.

Çalışmamızda tam kanlardan elde ettiğimiz saf DNA’ımızın amplifikasyonunu Roche firmasının LightCycler® 480 II kullanarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Roche LightCycler® 480 PZR cihazı.

Çalışmamızda uygun PZR'nin gerçekleşmesi için gereken primer ve prob dizileri saptanmıştır (Çizelge 2.2.). Yapılan PZR aşamasında anlık hesaplama için floresan işaretli TaqMan problemleri kullanılarak gerekli ölçümler yapılmıştır. TaqMan probe yöntemi amplifikasyonu sağlanacak DNA bölgesine tamamlayıcı olacak şekilde tek zincir içeren problemlerin olduğu yöntemdir. Bu problemler floresan içerirler ve kalıp DNA'nın 3' ve 5' bölgelerinin uygun nükleotit dizilerine göre bağlanırlar. Problemler kalıp DNA'da spesifik bölgelere bağlanmasına rağmen düşük dozda ışık yayarlar. Kalıp DNA üzerinde primer bağlanma bölgelerine bağlanan bu problemler primerin bağlanıp uzama evresi gelinceye kadar anlamlı bir değerde floresan yaymazlar. Primerlerin uzama evresinde Taq polimeraz enzimi proba bağlı floresan kısmını ekzonükleaz yöntemiyle fosfodiester bağlarını keser. Probundan ayrılan floresan kısmı ışıma yapar. Hesaplanan değerler bu mekanizmaya göre gerçekleşir. DNA zincir amplifikasyonu devam ettiği sürece oluşan yeni DNA sayısı artar ve floresanda ona bağlı olarak artış gösterir.

Çalışmamızda PZR'nin doğru değerlendirme yapılabilmesi için internal kontrol amaçlı housekeeping gen olan β aktin kullanılmıştır. Housekeeping genler

hücresinin temel fonksiyonlarının devamı için gerekli genler olup tüm hücrelerde ifadenmesi olan önemli genlerdir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan primer ve problemlerin nükleotit dizileri.

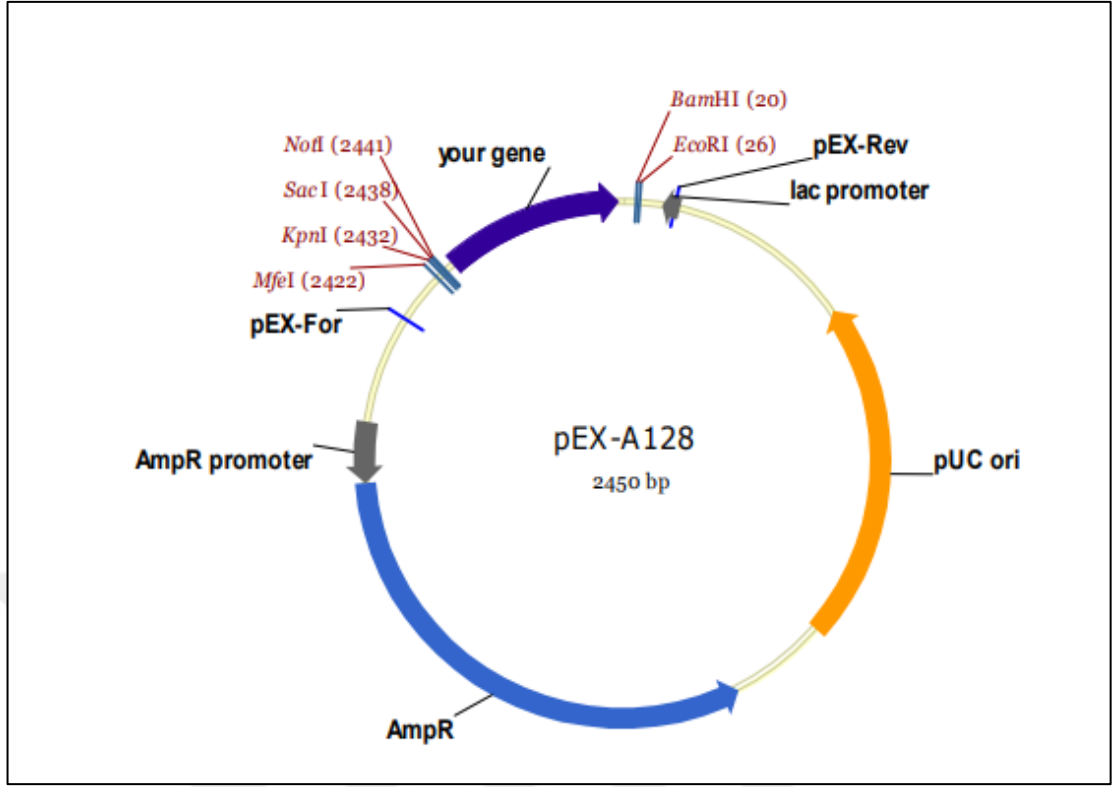
TREC Primer Nükleotit Dizisi
TREC İleri 5' CACATCCCTTTCAACCATGCT 3'
TREC Geri 5' GCCAGCTGCAGGGTTTAGG 3'

TREC Prob Dizisi
5'-FAM - ACACCTCTGGTTTTTGTAAGGTGCCCACT - 3'TAMRA

B-AKTİN Primer Nükleotit Dizisi
B-Aktin İleri 5' TCACCCACACTGTGCCCATCTACGAG 3'
B-Aktin Geri 5' CAGCGAACCGCTCATTGCCATGG 3'

B-AKTİN Prob Dizisi
5'-JOE ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT 3'TAMRA

Bu tez çalışmasında Cp değerlerine karşılık gelecek doğru DNA kopya sayılarının hesaplanması için belirteç oluşturabilecek TREC geni içeren plazmitler kullanılmıştır. Plazmitler genellikle bakterilerin sitoplazmasında bulunan ve kromozomdan farklı olarak halkasal yapı içeren DNA parçasıdır. Çalışmamızda TREC ve beta aktin DNAlarını içeren pEX-A128 vektör plazmiti kullanılmıştır (Şekil 2.7.). TREC genine sahip olan plazmitler 10 kez seri dilüsyon yapılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Elde edilen bu eğrilere göre TREC ile yaş korelasyonu için bir cut off değeri hesaplanmıştır.



Şekil 2.7. pEX-A128 plazmit haritası.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonun uygulanma aşamaları olarak;

- Kullanılacak olan TREC ve β aktine ait primer ve probler 10 pmol ana konsantrasyonlarından 1'e 10 oranında sulandırılır.
- Ayrı bir eppendorf tüpünde ddH₂O, belli konsantrasyonlarda TREC ve β aktin primer ve problemleri ve New England Biolabs'a ait Luna® Universal qPCR Mastermix eklenmiştir. Mastermix PZR'nin gerçekleşebilmesi için gerekli nükleotitler olan dinükleotittrifosfatları (dNTPs; dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), uzamanın sağlanması için gerekli enzim olan Taq DNA polimerazı ve primerlerin kalıp DNA ile daha iyi eşleşmesini kolaylaştıran Magnezyumu içermektedir.

Çizelge 2.3. Gerçek zamanlı PZR’de bir birey için kullanılan malzemeler ve miktarları.

Reaksiyonda bir örnek için (µl)		
	TREC	β aktin
İleri primer (10 pmol)	0,5 µl	0,5 µl
Geri primer (10 pmol)	0,5 µl	0,5 µl
Prob (10 pmol)	0,5 µl	0,5 µl
Mastermix	10 µl	
ddH ₂ O	2 µl	
DNA	5 µl	
Toplam	15 µl miks + 5 µl DNA: 20 µl	

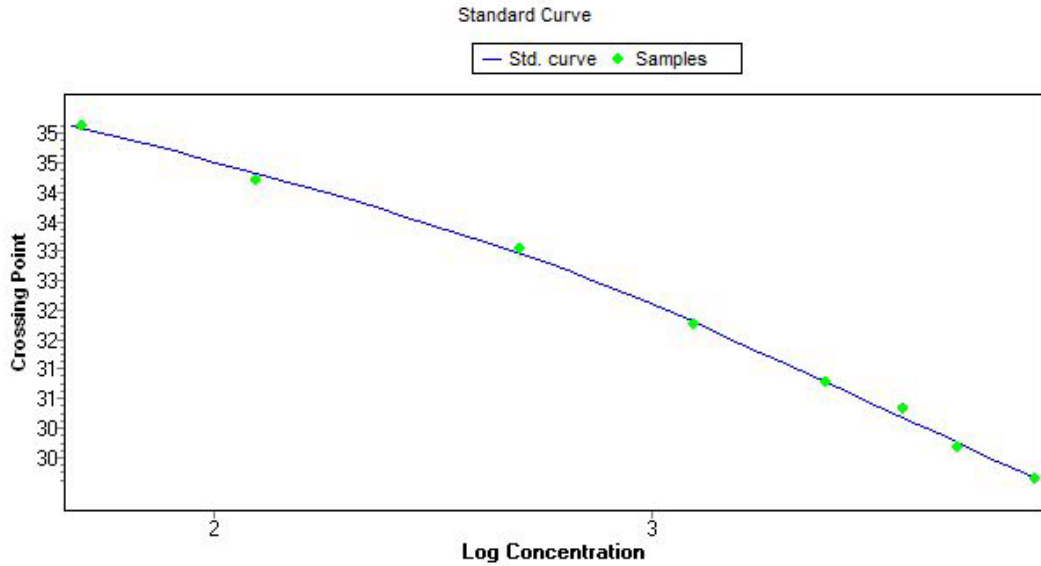
- PZR reaksiyonu için kalıp DNA’nın gerekli kısımlarının çoğaltılması gerekmektedir. Bunun için her bir bireyin 5 µl kalıp DNA’sı kullanılır.
- Çift zincir olan kalıp DNA’nın her iki zincirinin de çoğaltılması için gerekli bölgelerin tespitini sağlayan ileri ve geri primerler kullanılmıştır. DNA’nın çoğaltılma işleminin anlık olarak tespiti sağlayan probalar kullanılmıştır. Hem primerler hem de prob 10 pmol 0,5 µl hacminde kullanılarak 20 µM (pmol/µl) konsantrasyonuyla optimizasyonu sağlanmıştır (Çizelge 2.3.).
- PZR’den en verimli sonucun alınabilmesi için gerekli dNTP’leri ve bufferi ve kofaktörleri içeren Mastermixten her bir birey için 10 µl ve ddH₂O’dan 2 µl kullanılmıştır.
- Oluşturulan miks 96’lık well plate’lere her bir kuyucuğa 15 µl miktarda olacak şekilde dağıtılmıştır.
- Miks dağıtıldıktan sonra kuyucuklara 5 µl olacak şekilde ilk 8 kuyucuğa seri dilusyonla konsantrasyonları belirlenmiş plazmit DNA’ları yüklenmiştir.

Uygun protokol seçimleri yapıldıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonun 3 ana temel başlığı olan denatürasyon, primer bağlanması ve primer uzaması aşamaları için en etken faktör sıcaklık faktörüdür. Uygun bir şekilde amplifikasyonun gerçekleşebilmesi için çalışmamızda en verimli sonuçlara ulaştığımız sıcaklık grafisi ve döngüleri şu şekilde gerçekleşmiştir (Çizelge 2.4.):

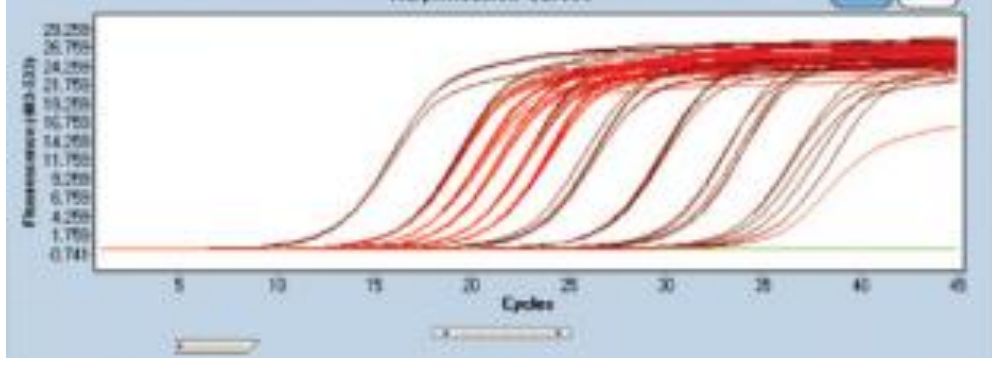
Çizelge 2.4. Gerçek zamanlı PZR protokolü.

Denatürasyon	95 °C	10 s	X 1 Döngü
Primer bağlanması	95 °C	10 s	X 45 Döngü
	58 °C	1dk	
Primer uzaması	72 °C	1 s	X 1 Döngü
	40 °C	30 s	

Yapılan PZR sonrası standart olarak verilen plazmit DNA'larının oluşturduğu standart eğriye göre örneklerin Cp ve konsantrasyon hesaplamaları elde edilmiştir (Şekil 2.9.) (Şekil 2.10.).



Şekil 2.9. Plazmit DNA'larının oluşturduğu standart eğri grafisi.



Şekil 2.10. Amplifiye olmuş plazmit ve örneklem DNA'larının kalibrasyon eğri grafisi.

2.5. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışma sonrasında elde edilen tüm verilerin değerlendirilmesi için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 25.0 analiz programı kullanılmıştır. Analizde tüm veriler %95'lik güven aralığında ve anlamlılık derecesi $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada TREC ile yaş arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığının analizinin yapılması için ki-kare (chi-square) testi ve grup içindeki TREC kopya sayılarının dağılımı için Kruskal Wallis analizi uygulanmıştır.

Örneklem grubunun genel demografik bilgilerinin içerisinde yaş ve cinsiyet olduğu için yüzde hesaplamaları yapılmıştır.

3. BULGULAR

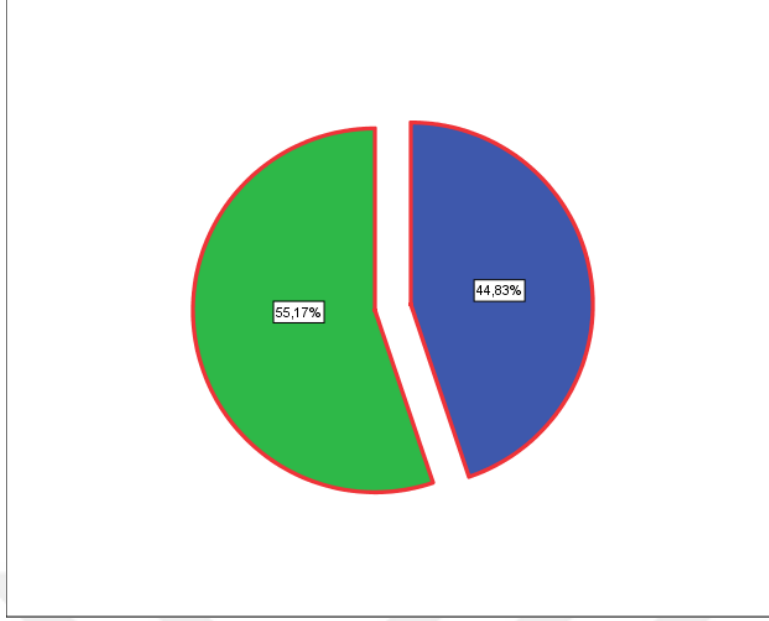
3.1. Örneklem Grubunun Demografik Bilgilerinin ve TREC Değerlerinin Analizi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Serpil Akdağ Kan Merkezinden çalışma grubuna alınan 203 sağlıklı gönüllünün yaş aralığı 15-65 yaş grubu arasından seçilmiştir. Olgu seçiminde bireylerin kronik bir hastalığının olmamasına dikkat edilmiştir. Oluşturulan 203 kişilik örneklem 10 alt gruba ayrılarak yaş ile TREC korelasyonunun daha iyi incelenmesi hedeflenmiştir.

Oluşturulan 10 alt grupta örnek alımı esnasında bireylerin demografik bilgisi olarak cinsiyet bilgileri kaydedilmiştir. Çalışmamıza seçilen 203 gönüllüden %44,8'i (91) kadın, %55,2'si (112) erkektir (Çizelge 3.1.) (Şekil 3.1.).

Çizelge 3.1. Çalışmayı oluşturan örneklem frekans ve yüzde değerleri.

CİNSİYET				
	Sıklık	Yüzde	Geçerli Yüzde	Kümülatif Yüzde
Kadın	91	44,8	44,8	44,8
Erkek	112	55,2	55,2	55,2
Toplam	203	100	100	



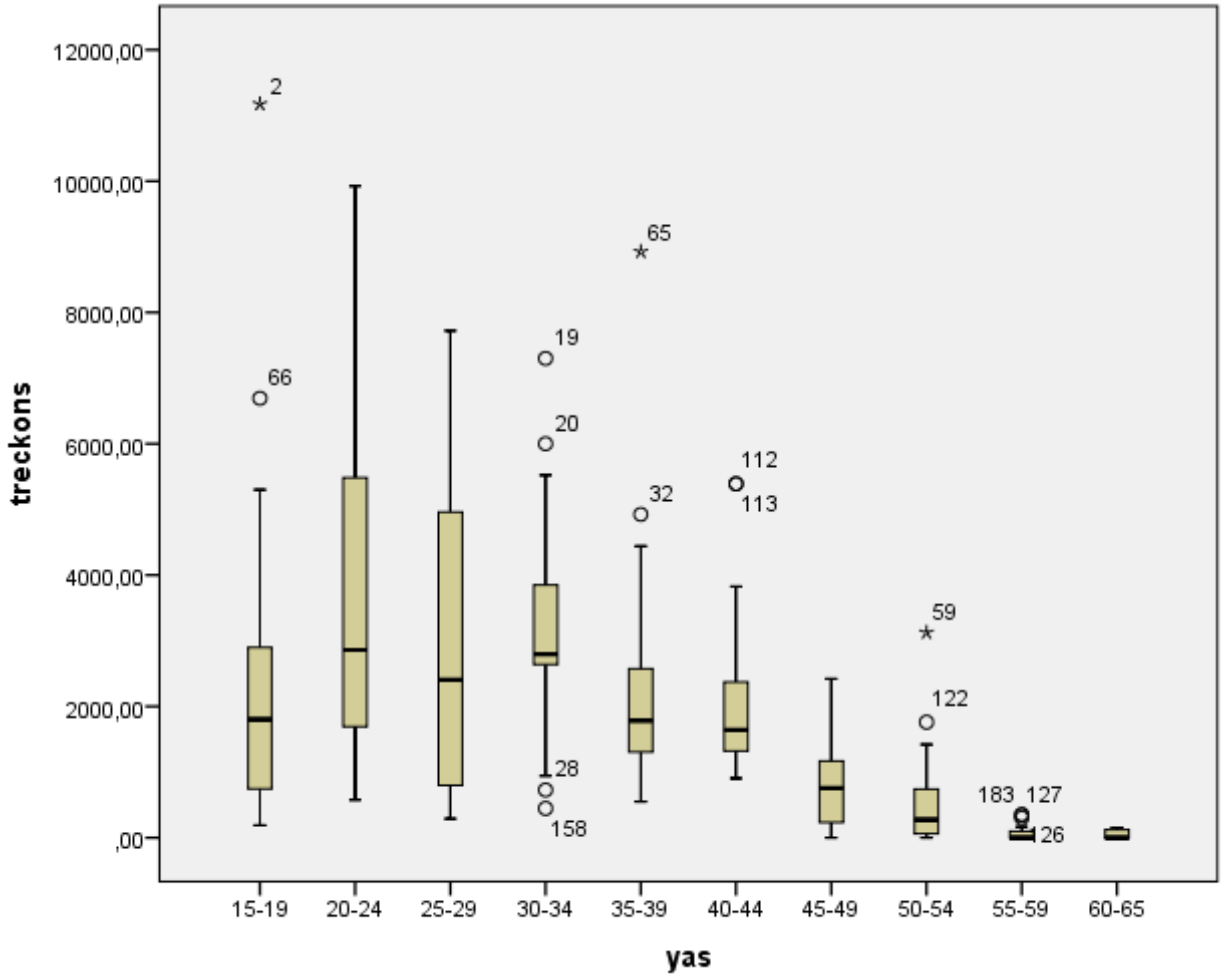
Şekil 3.1. Çalışmaya katılan kadın ve erkek oranı.

Çalışmamızda yaş ile TREC kopya sayısı arasındaki ilişki daha iyi incelenebilmesi amacıyla yaş grupları arasında ortalama kopya sayıları ve Cp değerleri kıyaslamaları yapılmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Yaş grupları ve TREC kopya sayısı ortalamaları.

Oran İstatistik Değeri TREC Cons/Cinsiyet				
Grup	Ortalama	Medyan	Maksimum	Minimum
15-19	2591,1136	1801,2500	11175,00	189,00
20-24	3534,7000	2860,0000	9925,00	578,00
25-29	2919,2500	2405,0000	7720,00	290,00
30-34	3142,6000	2795,0000	7300,00	447,00
35-39	2303,2857	1782,5000	8925,00	550,00
40-44	2116,4500	1642,5000	5391,00	904,00
45-49	791,1250	755,0000	2420,00	,00
50-54	557,3600	276,5000	3125,00	,00
55-59	69,5200	,000	356,00	,00
60-65	42,6000	,000	155,00	,00
Total	1816,9734	1240,0000	11175,00	,00

Oluşturulan 10 alt grubun her biri beş yaşı kapsamakta olup, grupların kendi içerisinde maksimum, minimum, medyan ve ortalama değerleri hesaplanmış ve bu değerler kutu grafiği (box plot) ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.). Kutu grafiği grupların kendi içerisinde maksimum, minimum, medyan, 25. ve 75. çeyrek sonuçlarını belirtmektedir. Bu sonuçlar üzerinde durulan değişkenin sıklık dağılımı hakkında bilgi vermeyi amaçlar. Oluşan her bir kutuda dağılım merkezi, değişkenlerin yayılımı hakkında bilgiler vermektedir.



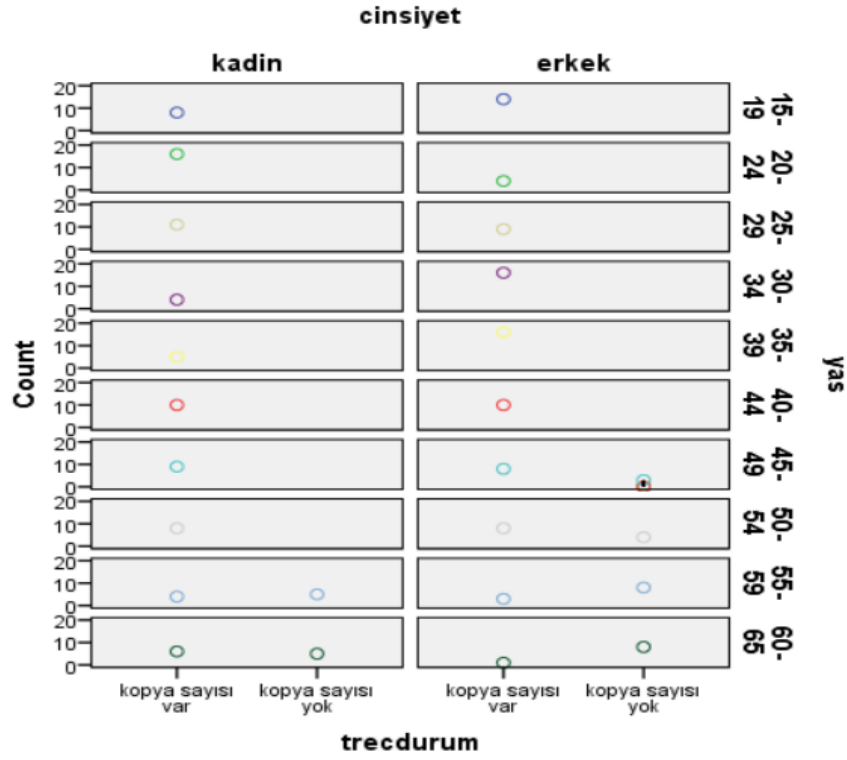
Şekil 3.2. Oluşturulan örneklem gruplarının kendi içerisinde dağılımlarını gösteren kutu grafiği analizi.

Yapılan analiz sonunda kutuların üstünde yer alan üst çizgi her bir grubun maksimum değerini, alt çizgi minimum değerini, kutuların içerisinde yer alan çizgi medyanyı ifade etmektedir (Şekil 3.2.). 20-24 yaş grubundan itibaren kopya sayılarında düşüş olduğu bu analizle doğrulanırken, özellikle 55-59 ve 60-65 yaş gruplarında minimum ve medyan değerlerinde çakışma gözlemlenmiştir. Bu çakışma bu iki grupta

TREC d           sebebiyle kopya sayısı değeri olmayan bireylerin (değer olarak sıfır verilmiştir) sayıca fazla olduğunu ve ortanca değer olan medyanın da sıfır olarak belirlendiğini göstermektedir. Yapılan analizde yaş grupları arasında, ya  ın ilerlemesiyle TREC kopya sayısında d           beklenmektedir. İlk grup olan 15-19 yaş grubu 20-24 yaş grubundan daha d       TREC kopya sayısı içermekte olup TREC kopya sayısının değeri beklenen sonucun altında bulunmuştur.

Grupları belirten kutuların üzerinde yer alan yıldı  lı işaretlemeler grup içerisinde sonuçları ağır    olan bireyleri gösterirken yuvarlak olarak belirtilen değerler ise u   değerler olarak nitelendirilir.

Yapılan incelemede TREC d           sebebiyle Cp ve kopya sayısı tespit edilemeyen bireyler mevcuttur. TREC kopya sayısı tespiti yapılamayan bireyler 45-49 yaş grubu üzerinde görülmeye ba  lanmı  tır. TREC kopya sayısı tespiti yapılamama ile cinsiyet arasındaki ilişki incelendiğinde erkeklerde 45-49, kadınlarda ise 55-59 yaş gruplarına denk geldiği gözlemlenmiştir (  ekil 3.3.). Çalışmamızda bireylerin %83,74'  nde TREC kopya sayısının tespiti sağlanırken, %16,26'sında sağlanamamıştır.



Şekil 3.3. Ortalama TREC kopya sayısının var-yok analizi ve cinsiyet üzerine dağılımları.

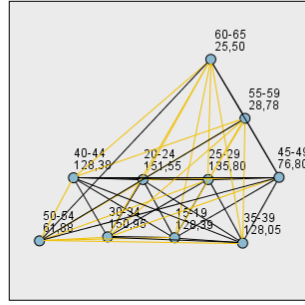
203 kişiden oluşan örneklemin verileri incelendiğinde standart sapmalar gözlemlenmiş, değerlerin dağılımı simetrik olmadığından değerler normal dağılım göstermemiştir. Normal dağılım göstermeyen grupların medyanları arasındaki ilişki anlamlılığı değerlendirilmesi için ANOVA testinin non-parametrik gruplar için analizi yapılan Kruskal Wallis değerlendirilmesi yapılmıştır. Gruplar arası kopya sayısında farklılık yoktur hipotezi Kruskal Wallis değerlendirilmesi sonucunda $p < 0,05$ bulunarak reddedilmiş ve var olan farklılık anlamlı bulunmuştur. 45-49, 50-54 ve 60-65 yaş gruplarının kopya sayılarındaki değişiklik diğer gruplarla kıyaslanmış ve farklılıkları anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.4.).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of treckons is the same across categories of yas.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Pairwise Comparisons of yas



Each node shows the sample average rank of yas.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
60-65-55-59	3,275	18,533	,177	,860	1,000
60-65-50-54	36,375	18,533	1,963	,050	1,000
60-65-45-49	51,300	18,533	2,768	,006	,254
60-65-35-39	102,548	18,311	5,600	,000	,000
60-65-40-44	102,875	18,533	5,551	,000	,000
60-65-15-19	102,886	18,107	5,682	,000	,000
60-65-25-29	110,300	18,533	5,952	,000	,000
60-65-30-34	125,450	18,533	6,769	,000	,000
60-65-20-24	126,050	18,533	6,801	,000	,000
55-59-50-54	33,100	18,533	1,786	,074	1,000

55-59-45-49	48,025	18,533	2,591	,010	,430
55-59-35-39	99,273	18,311	5,421	,000	,000
55-59-40-44	99,600	18,533	5,374	,000	,000
55-59-15-19	99,611	18,107	5,501	,000	,000
55-59-25-29	107,025	18,533	5,775	,000	,000
55-59-30-34	122,175	18,533	6,592	,000	,000
55-59-20-24	122,775	18,533	6,625	,000	,000
50-54-45-49	14,925	18,533	,805	,421	1,000
50-54-35-39	66,173	18,311	3,614	,000	,014
50-54-40-44	66,500	18,533	3,588	,000	,015
50-54-15-19	66,511	18,107	3,673	,000	,011
50-54-25-29	73,925	18,533	3,989	,000	,003
50-54-30-34	89,075	18,533	4,806	,000	,000
50-54-20-24	89,675	18,533	4,839	,000	,000
45-49-35-39	51,248	18,311	2,799	,005	,231
45-49-40-44	51,575	18,533	2,783	,005	,242
45-49-15-19	51,586	18,107	2,849	,004	,197
45-49-25-29	59,000	18,533	3,183	,001	,065
45-49-30-34	74,150	18,533	4,001	,000	,003
45-49-20-24	74,750	18,533	4,033	,000	,002

Şekil 3.4. Kruskal Wallis analiziyle kopya sayıları farklılıklarının anlamlılık değerlendirilmesi.

Kopya sayılarında var olan değişiklikler gruplara göre cinsiyetlerle kıyaslanmış ve 20-24 yaş grupları hariç diğer tüm gruplarda anlamlı bir farklılığa rastlanılmamıştır. Diğer dokuz grup için hem erkek hem de kadınlardaki veriler birbiriyle uyumlu olup sadece 20-24 yaş grubunda kadın ve erkeklerdeki TREC kopya sayılarındaki farklılık ki-kare testiyle anlamlı bulunmuştur (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. Cinsiyetlere göre gruplar arası TREC kopya sayısının farklılık analizi.

Cinsiyet-Yaş Çapraz Tablolama													
			15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-65	Total
	Kadın	Sayı	8	16	11	4	5	10	9	8	9	11	91
		% Cinsiyet	8,8	17,6	12,1	4,4	5,5	11,0	9,9	8,8	9,9	12,1	100
		% Yaş	36,4	80	55	20	23,8	50	45	40	45	55	44,8
		% Toplam	3,9	7,9	5,4	2,0	2,5	4,9	4,4	3,9	4,4	5,4	44,8
	Erkek	Sayı	14	4	9	16	16	10	11	12	11	9	112
		% Cinsiyet	12,5	3,6	8,0	14,3	14,3	8,9	9,8	10,7	9,8	8,0	100
		% Yaş	63,6	20,0	45,0	80,0	76,2	50,0	55,0	60,0	55,0	45,0	55,2
		% Toplam	6,9	2,0	4,4	7,9	7,9	4,9	5,4	5,9	5,4	4,4	55,2
	Toplam	Sayı	22	20	20	20	21	20	20	20	20	20	203
		% Cinsiyet	10,8	9,9	9,9	9,9	10,3	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	100
		% Yaş	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		% Toplam	10,8	9,9	9,9	9,9	10,3	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	100

Cinsiyet-Yaş Çapraz Tablolama												
			15-19	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-65	Total
	Kadın	Sayı	8a	11a	4a	5a	10a	9a	8a	9a	11a	75
		% Cinsiyet	10,7	14,7	5,3	6,7	13,3	12,0	10,7	12,0	14,7	100
		% Yaş	36,4	55	20	23,8	50	45	40	45	55	41,0
		% Toplam	4,4	6,0	2,2	2,7	5,5	4,9	4,4	4,9	6,0	41,0
	Erkek	Ayarlanmış kalan	-0,5	1,4	-2,0	-1,7	0,9	0,4	-0,1	0,4	1,4	
		Sayı	14a	9a	16a	16a	10a	11a	12a	11a	9a	108
		% Cinsiyet	13	8,3	14,8	14,8	9,3	10,2	11,1	10,2	8,3	100
		% Yaş	63,6	45,0	80,0	76,2	50,0	55,0	60,0	55,0	45,0	59,0
		% Toplam	7,7	4,9	8,7	8,7	5,5	6,0	6,6	6,0	4,9	59,0
	Toplam	Ayarlanmış kalan	-0,5	-1,4	2,0	-1,7	-0,9	-0,4	-0,1	-0,4	-1,4	
		Sayı	22	20	20	21	20	20	20	20	20	183
		% Cinsiyet	12,0	10,9	10,9	11,5	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9	100
		% Yaş	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		% Toplam	12	10,9	10,9	11,5	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9	100

Çalışmaya katılan 91 kadının ortalama TREC kopya sayısı 753, 112 erkeğin ise 733'tür. Yapılan tüm değerlendirmeler sonrasında TREC kopya sayısının yaşa göre dağılımında cinsiyet üzerindeki etkileri incelenmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4.). Yaş gruplarının bazılarında TREC'in kopya sayısının düşüklüğü sebebiyle kopya sayıları tespit edilememiştir.

Çizelge 3.4. TREC kopya sayısının yaş grupları ve cinsiyet üzerindeki dağılımları.

Cinsiyet-Yaş- TREC durum Çapraz Tablolama													
			15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-65	Total
TREC Kopya Sayısı Tespit Edilen	Kadın	Sayı	8	16	11	4	5	10	9	8	4	6	81
		% Cinsiyet	9,9	19,8	13,6	4,9	6,2	12,3	11,1	9,9	4,9	7,4	100
		% Yaş	36,4	80	55	20	23,8	50	52,9	50,0	57,1	85,7	47,6
		% Toplam	4,7	9,4	6,5	2,4	2,9	5,9	5,3	4,7	2,4	3,5	47,6
	Erkek	Sayı	14	4	9	16	16	10	8	8	3	1	89
		% Cinsiyet	15,7	4,5	10,1	18,0	18,0	11,2	9,0	9,0	3,4	1,1	100
		% Yaş	63,6	20,0	45,0	80,0	76,2	50,0	47,1	50,0	42,9	14,3	52,4
		% Toplam	8,2	2,4	5,3	9,4	9,4	5,9	4,7	4,7	1,8	0,6	52,4
	Toplam	Sayı	22	20	20	20	21	20	17	16	7	7	170
		% Cinsiyet	12,9	11,8	11,8	11,8	12,4	11,8	10,0	9,4	4,1	4,1	100
		% Yaş	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
		% Toplam	12,9	11,8	11,8	11,8	12,4	11,8	10,0	9,4	4,1	4,1	100

Cinsiyet-Yaş- TREC durum Çapraz Tablolama													
			15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	50-54	55-59	60-65	Total
TREC Kopya Sayısı Tespit Edilemeyen	Kadın	Sayı							0	0	5	5	10
		% Cinsiyet							0	0	50,0	50,0	100
		% Yaş							0	0	38,5	38,5	30,3
		% Toplam							0	0	15,2	15,2	30,3
	Erkek	Sayı							3	4	8	8	23
		% Cinsiyet							13,0	17,4	34,8	34,8	100
		% Yaş							100	100	61,5	61,5	69,7
		% Toplam							9,1	12,1	24,2	24,2	69,7
	Toplam	Sayı							3	4	13	13	33
		% Cinsiyet							9,1	12,1	39,4	39,4	100
		% Yaş							100	100	100	100	100
		% Toplam							9,1	12,1	39,4	39,4	100

4. TARTIŞMA

Günümüzde niceleyici analiz araçlarından biri olan yaş tayini hem adli hem de tıbbi bilimler için oldukça önemli bir konudur. Yaş kavramı tıbbi bilimlerde doğru tanı ve tedaviyi etkilerken adli bilimlerde ise bireyin hak ve sorumluluk sınırlarını belirlemektedir. Ülkemizde daha önceki dönemlerde sistematik bir şekilde yaş verilerinin tutulmaması, ölen çocukların kimliklerinin kendinden sonraki kardeşlerinde kullanılması ya da bireyi olumlu olarak etkileyecek bir unsurdan dolayı kasıtlı olarak yaş değişikliğine gidilmesi gibi birçok faktör doğru ve kesin yaş tayini ihtiyacını destekler niteliktedir. Adli vakalarda oldukça önemli bir yere sahip olan kimliklendirme unsurunun ana etkenlerinden biri de yaştır. Gerek canlı gerekse ölü bir bireyde fenotipik özelliklere bakılarak tahmini yaş değerlendirmesine göre daha ciddi ve somut kanıtlara ihtiyaç vardır (Baransel-Isır, 2009).

Yaş kavramı ciddiyetinin farkındalığı kişilerde farklı yöntemlerle analiz etme ihtiyacı oluşturmuştur. Öncelikli olarak sadece bireyin fenotipik özelliklerine bakılarak belli tahminler yürütülse de zamanla bu kavramlar yerini daha bilimsel yöntemlere bırakmıştır.

Yaş tayini ile ilgili bilinen ilk ciddi çalışma temelleri 1800'lü yılların sonuna doğru atılmaya başlanmıştır. Wachholz ile başlayan çalışmalar daha çok morfolojik değişimlere dayanmaktaydı. Ardından gelen çalışmalar X ışınlarının keşfiyle hem morfolojik hem de radyolojik olarak devam etmiştir. Humerusla başlayan kemik çalışmaları, diğer uzun kemiklerden olan femur, tibia ve ulna gibi kemiklerle devam etmiştir. Uzun kemiklerde epifiz diyafiz yapılarında meydana gelen değişiklikler başlıca kemik yaşı için analiz standartlarını oluşturmuştur. Ardından gelen kafatası sütür kaynaşması, simfizis pubiste meydana gelen değişimler, klavikula ve sternum gibi göğüs kemik analizleriyle yapılan araştırmalar çeşitlenmiştir (Schrantz, 1959).

Kemik çalışmalarının ardından vücutta kemik doku kadar yapısının kalıcı olması sebebiyle dişler incelenmiştir. Demirjian ve Goldstein dişleri olgunluk derecelerine göre sınıflandırmışlardır (Demirjian ve Goldstein, 1976). Dişlerde gerçekleşen morfolojik değişimler üzerine Gustafson, dişin sert ve yumuşak doku analizlerini gerçekleştirmiş, kök apex değişimlerinden bahsetmiştir. Kök şeffaflığının temelleri Gustafson ile atılmış ardından yapılan birçok çalışmayla bu yöntem bilgisayar sistemiyle birleştirilmiştir (Gustafson, 1950).

İncelemelerin hücresel boyut kazanmasıyla hücresel yaş kavramı ortaya çıkmış hücre içinde genetik bilgi kaynağı olan DNA üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Telomerlerin analizi, Mitokondrial DNA’lardaki delesyon birikimleri, metillenen özel bölgelerin keşfi gibi birçok özelleşmiş konuyla daha güvenilir yaş tayinini hedeflemişlerdir. Yaş ile metillenme arasındaki ilişki birden fazla bilim insanınca ortaya konulmuş hatta bazı bölgelerin metillenmesi Hannum saati, Horvath saati gibi adlandırılmalarla tanımlanmıştır.

Adli ve tıbbi bilimlerce doldukça önemli bir yere sahip olan yaş kavramı konusu var olan yöntemlerin geliştirilmeye çalışılması ve yeni yöntem arayışlarının gerekliliğini vurgulamaktadır. Günümüz çalışmaları var olan ve çeşitli sebeplerle uygulanabilirliği tartışılan metotlara daha güvenilir, daha kolay uygulanabilir ve maddi açıdan daha rahat çözüm üretilebilir olması hedeflerini içeren ve bilimle birlikte ilerleyen yeni arayışlardır. Özellikle son dönemde yaş tahmini konusu yaşlanma kavramıyla bağdaştırılarak kazanılan ve kaybedilen fonksiyonlara yönelme sağlanmıştır. Bu fonksiyonların tespiti sonrası var olan genle ilişkisi yaş tahminin tümünden gelim yöntemiyle analizini hedeflemektedir.

Çeşitli genlerin fonksiyonlarının arttığı, çeşitli genlerin de fonksiyonlarının azaldığı immün sistem ile yaş korelasyonu tez çalışmamamızın temelini oluşturmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda genetik ve epigenetik etmenlerin elde edilen sonuçlarda stabilizasyonu sağlayamadığından, hedeflenen çalışma bu etmenlerin sonuçlarımızı etkilemeyecek bir biyobelirteç arayışından doğmuştur.

TREC, T lenfosit gelişimi sırasında T-hücresi reseptörü (TCR) gen lokuslarında meydana gelen eksizyonel yeniden düzenleme işlemi ile timositlerde üretilen sirküler bir DNA parçacığdır. TREC sirküler DNA parçacıkları stabillerdir, mitoz sırasında çoğalmazlar ve bu nedenle her hücre bölünmesinde zamanla dilüe olurlar. TREC normal T hücre gelişimini gösteren bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Yaş ile birlikte hücre bölünme sayısının artışı gözlemlenirken zamanla TREC miktarı azalması beklenecektir. Dünya’da benzer çalışmalar yapılmış ve kendi ülkeleri adına yaş ile TREC miktarı korelasyonu anlamlı bulunmuştur.

TREC’lerin miktar tayininin yapılabilmesi amacıyla alınan tam kan örneğinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ardından miktar tayini yapabilmek amacıyla da gerçek zamanlı PZR yapılmıştır. PZR’de miktar tayini yapabilmek için belirteç olarak kopya sayısı bilinen plazmitler kullanılmıştır. Ayrıca deney içerisinde pozitif kontrol grubu olarak her hücrede aktif rol oynayan housekeeping geni olan β aktin de çalışılmıştır.

Yapılan çalışmamız 15-65 yaş grubu 203 kişilik sağlıklı gönüllüden elde edilen verileri içermektedir. Çalışmamızı kısıtlayan etmenlerden birisi çalışılacak bireyin immün sistemi etkileyebilecek herhangi bir hastalığa sahip olmaması gerektiğidir. Bu koşullar haricinde T lenfosit düzenlenmesinin bebeklik evresinden itibaren şekillendiğı bilinen bir gerçek olup yaptığımız çalışma ülkemiz adına immün sistem yaş ilişkisi üzerine yapılacak çalışmaların ön çalışması niteliğinde olmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız 203 kişiden oluşup 15-65 yaş aralığındadırlar. Örneklem grubumuz kopya sayılarını iyi değerlendirebilmek amacıyla 10 farklı alt yaş grubundan oluşmaktadır. TREC'in kopya sayısının yaşla azaldığı bilinmektedir ancak ülkemizde ilk kez yapılan tez çalışmasında kendi popülasyonumuz için oluşturduğumuz 10 alt yaş grubu için ortalama TREC kopya sayıları tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarımız mevcut literatürü desteklemektedir. Kore’ de yapılan çalışmada 60 yaş, Çin’de yapılan çalışmada 55 yaş üzerinde olan TREC kırılma noktasının, cinsiyet ile olan ilişkileri incelendiğinde erkeklerde 45-49, kadınlarda ise 55-59 yaş gruplarına denk geldiği gözlemlenmiştir.

Yaptığımız çalışma kapsamında yaş tayini tespiti gereken bireylerin kantitatif TREC analizi özellikle genç dönemde kronolojik yaşının belirlenemeyeceği ancak, bulunduğu yaş grubu kategorisi tespit edilebilir sonucuna varılmıştır.

TREC kopya sayıları ve Cp değerinin yaş üzerindeki etkilerinin daha iyi araştırılması açısından örneklem sayısı genişletilebilir.

ÖZET

Yaş Tahmininde Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Yöntemi İle TREC Analizinin Kullanımı

Günümüzde niceleyici analiz araçlarından biri de yaş tayinidir. Birçok farklı metotla belirlenebilen yaş tayini farklı çalışmalarda kullanılabilen önemli bir ölçüt niteliği taşır. Özellikle adli vakalarda yaş tayini gerek kimliklendirme gerek babalık tayini gerekse hukuki açıdan birçok hak ve sorumluluk ölçütü olarak önem arz eder. Birden fazla yaş tayini metodunun bulunmasına rağmen, bu metotlar bazı faktörler sebebiyle kullanılamamaktadır. Çevre koşulları, cinsiyet farklılığı, maliyet bu faktörlerden bazılarıdır. İmmun sistem organlarından biri timüs T lenfosit üretim ve çeşitliliğinden sorumludur. Bu çeşitlilik VDJ kombinasyonu ile sağlanır. Bu kombinasyonda TREC adı verilen dairesel bir DNA parçası oluşur. TREC kararlı bir yapıdır ve hücre proliferasyonunda replike olmaz. Bu durumda; yaş artarken TREC'in azalmasını sağlar. Bu çalışmanın amacı yaş tahmininde gerçek zamanlı kantitatif PZR yöntemi ile TREC analizinin kullanımının araştırılmasıdır. Çalışmamız 203 kişiden oluşup 15-65 yaş aralığındadırlar. Örneklem grubumuz TREC kopya sayılarını iyi değerlendirebilmek amacıyla 10 farklı alt yaş grubundan oluşmaktadır. TREC kopya sayısının yaşla azaldığı bilinmektedir ancak bu tez çalışmamızda kantitatif PZR TREC analizi ülkemizde ilk kez yapılmıştır. Kendi popülasyonumuz için oluşturduğumuz 10 alt grup için ortalama TREC kopya sayıları tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarımız mevcut literatürü desteklemektedir. Kore'de yapılan çalışmada 60 yaş, Çin'de yapılan çalışmada 55 yaş üzeri olan TREC kırılma noktası, çalışmamızda 55-59 yaş grubunda tespit edilmiştir. Bu kırılma noktasının, cinsiyet ile olan ilişkileri incelendiğinde erkeklerde 45-49, kadınlarda ise 55-59 yaş gruplarına denk geldiği gözlemlenmiştir. Yaptığımız çalışma kapsamında kantitatif TREC analizi ile özellikle genç dönemde kronolojik yaşının belirlenemeyeceği ancak, bulunduğu yaş grubu kategorisi tespit edilebilir sonucuna varılmıştır. TREC kopya sayıları ve Cp değerinin üzerindeki etkileriyle daha güçlü bir ilişki kurmak için örnek sayısı genişletilebilir.

Anahtar Kelimeler: PZR, TREC, Yaş tahmini

SUMMARY

TREC Analysis By Real-Time PCR Method In Age Estimation

One of the quantitative analysis tools is age determination in today. Many different methods of determining age is an important criterion that can be used in different studies. Especially in forensic cases, age determination is important as a determination of both paternity and legal rights. The issue of identification is very important for judicial cases. Despite the availability of more than one age determination method, these methods can not be used due to some factors. Environmental conditions, gender differences, cost are some of these factors. One of the immune system organs is the thymus T lymphocytes are responsible for the production and diversity. This variety is provided by the VDJ combination. A circular DNA fragment called TREC is formed in this combination. TREC is a stable construct and does not replicate in cell proliferation. The main purpose of this study is to provide the age determination quantitatively via of TREC. The aim of this study was to investigate the use of TREC analysis by real-time quantitative PCR in age estimation. Our study consisted of 203 people and ranged between 15-65 years. Our sample group consisted of 10 different age groups in order to evaluate the number of TREC copies well. It is known that the number of copies of TREC decreases with age, but our thesis study is the first one doing quantitative PCR TREC analysis in our country. The average number of TREC copies was determined for 10 age subgroups for our own population. Our research results support the current literature. The TREC breakpoint, which was 60 years in Korea and over 55 in China, was determined in the 55-59 age group in our study. When the relationship between gender and this break point is examined, it is observed that it corresponds to 45-49 age group in men and 55-59 age group in women. Within the scope of our study, it was concluded that the chronological age cannot be estimated by the quantitative TREC analysis of the individuals who need to be determined, but the age group category can be determined. The number of samples can be expanded for a better correlation on the effects of TREC copy numbers and Cp on age.

Key Words: PCR, TREC, Age estimation

KAYNAKLAR

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S (2015).CELLULAR and MOLECULAR IMMUNOLOGY
8th Ed.. Elsevier,
- AFŞİN H, KARADAYI B, BÜYÜK Y (2014). Adli diş hekimliğinin adli bilimlerdeki rolü - Bölüm 1:
felaket kurbanlarının kimliklendirilmesi ve adli olaylarda dişlerden yaş tahmini. *J For Med.*
3: 275-286.
- AKA S, CANTÜRK N, DAĞALP R, YAĞAN M (2009). Age determination from central incisors of
fetuses and infants. *Forensic Science International.* **184**: 15-20.
- AKKAN N (1982). Kemik yaşı saptanmasında kullanılan GreulichPyle ve Tanner-Whitehouse
medodlarının karşılaştırılması. *İÜ Dış Hekimliği Fakültesi Diş ve Çene Ortapedisi Birimi*, **16**:
1-9.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2008).MOLECULAR
BIOLOGY OF THE CELL 5th Ed. *Garland Science.* **36**: 3-78.
- ANDERSON S, BANKIER AT, BARRELL BG, DE BRUIJN MH, COULSON AR, COULSON
J,YOUNG G (1981). Sequence of the organization of the human mitochondrial
genome.*Macmillan Journals.* **290**: 457-465.
- ASLAN B. (2007). Ceza hukukunda yaş küçüklüğünün etkisi. Yüksek lisans tezi. İzmir.
- ATILGAN M, AKKOYUN M (2017). Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalından
Yaş Tayini İstenen Olguların Değerlendirilmesi. *Adli Tıp Bülteni.* **1**: 34-39.
- BARANSEL-ISIR A, BAKIR K, UÇAK R, DÜLGER HE (2004).Agnor yöntemi ile insan
epidermisinden yaş tespiti. *Fırat Tıp Dergisi.* **3**:75-78.
- BANG G, RAMM E (1970). Determination of age in humans from root dentin transparency. *Acta
Odontol Scand.*, **1**: 3-35.
- BARANSEL-ISIR A (2009). Adli hekimlikte yaş tayini. *Klinik Gelişim*, **2**: 222-234.
- BARANSEL-ISIR A, DÜLGER HE (2007). 1998-2005 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi adli tıp
anabilim dalında raporlandırılan yaş tayini olgularının irdelenmesi. *J Foren Med.*, **4**: 1-6.
- BLACKBURN EH (1991). Structure and function of telomeres. *Nature Journal*, **6319**: 569-573.
- BLASCO MA (2005). Telomeres and Human Disease: Aging, Cancer and Beyond. *Nature Journal*, **8**:
611-622.
- BROOKS S, SUCHY J (1990). Skeletal age determination based on the os pubis: a comparison of the
Acsadi Nemeskeri and Suchy-Brooks methods. *Human Evolution*, **5**: 227-238.
- BROOKS ST (1955). Skeletal age at death: the reliability of cranial and pubic age indicators. *Am J
Phys Anthropol.*, 567-597.
- BÜKEN B (2017). Yaş tayinlerinde uygulamada karşılaşılan sorunlar. 6. tıp hukuku günleri: yaş tayini).
Adli Tıp Uzmanları Derneği, 51-58.

- GARVIN HM, CABO LL, GIPSON DR, OVERBURY RS, PASSALACQUA NV, UHL NM (2012). Developments in Forensic Anthropology: Age at-Death Estimation. A Companion to Forensic Anthropology, 202-223.
- CHO S, GE J, KIM K, LEE HY, LEE DS, SEO SB (2014). Age estimation via quantification of signal-joint T cell receptor excision circles in Koreans. *ScienceDirect*, **3**: 135-138.
- CLAYTON DA, DODA JN, FRIERDBERG EC (1974). The Absence of a Pyrimidine Dimer Repair Mechanism in Mammalian Mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **7**: 2777-2781.
- DE LANGE T (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*. **4**: 532-540.
- DEMİRJİAN A, GOLDSTEİN H (1976). New systems for dental maturity based on seven and four teeth. *Annals Of Human Biology*, **5**: 411-421.
- DEMİRKIRAN SD, ÇELİKEL A, ZEREN C, ARSLAN M (2014). Yaş tespitinde kullanılan yöntemler. *Dicle Tıp Dergisi*. **1**: 238-243.
- DİBA L, ARDEBİLİ S M, ZGHARESOURAN J, HOUSHMAND M (2015). Age-related decrease in mtDNA content as a consequence of mtDNA. *Informa Healthcare*. **27**: 1-5.
- DRUSİNİ A, CALLIARİ I, VOLPE A (1991). Root Dentine Transparency: Age Determination of Human Teeth Using Computerized Densitometric Analysis. *American Journal Of Physical Anthropology*, **1**: 25-30.
- EH M (1983). Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain. *Science*, **4604**: 1407-1408.
- GÖK Ş, ERÖLÇER N, ÖZEN C (1985). ADLİ TIPTA YAŞ TAYİNİ 2. Baskı, *Adli Tıp Kurumu Yayınları*, **1**: 1-65.
- GREULICH WW, PYLE SI (1959). Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 513.
- GUSTAFSON G (1950). Age determinations on teeth. *The Journal Of The American Dental Association*, 45-54.
- GÜLAY MŞ, KARABULUT H (2016). Serbest Radikaller. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Dergisi*, **1**: 50-59.
- GÜNDOĞMUŞ ÜN (2017). Yaş tayininde adli tıp kurumu 2. ihtisas kurulu uygulamaları. 6. tıp hukuku günleri: yaş tayini. *Adli Tıp Uzmanları Derneği Yayını*. 47
- HANNUM G, GUİNNY J, HUGHES G, SADD A S, ZHAO L, ZHANG L, ZHANG K (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Cell Press*, **2**: 1-9.
- HARMAN D (1960). The Free Radical Theory of Aging: Effect of Age on Serum Copper Levels. *J Gerontol.*, **20**: 38-40.
- HAZENBERG MD, VERSCHUREN MC, HAMANN D, MIEDEMA F, VAN DONGEN JJ (2001). T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med.*, **11**: 631-640.

- HELFMAN PM, BADA JL (1975). Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans. *PNAS*. **8**: 2891–2894.
- IŞIK U, GÜRGEY K (2004). Kuvaterner Aminoasit Jeokronolojisi. *Mavi Gezegen*, 4-8.
- İMAMOĞLU N, DEMİRTAŞ H, DONMEZ-ALTUNTAŞ H, HAMURCU ZİLTEN A (2005). NOR Expression Increases on Metaphase Chromosomes of Down Syndrome Lymphocytes in Concordance With Mitogen Concentration in Culture Medium. *Cytometry Part B*, **1**: 36-39.
- ISCAN MY, LOTH SR, WRIGHT RK (1984). Metamorphosis at the Sternal Rib End: A New Method to Estimate Age at Death in White Males. *American Journal Of Physical Anthropology*, **65**: 147-156.
- JONES PA (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature*. **7**: 484-492.
- KAPLAN A (2014). 12 yaş ve üstü pediatrik yaş gurubunda kemik yaşı tayini için çekilen el bileği grafisinde kullanılan Greulich-Pyle ve Tanner-Whitehouse yöntemlerinin karşılaştırılması. uzmanlık tezi.
- KARABAKIR B (2015). Adli Olguların Canlıda Yaş Tayini Açısından İncelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul.
- LIVERSIDGE HM (2012). The assessment and interpretation of Demirjian, Goldstein and Tanner's dental maturity. *Informa healthcare*, **5**: 412-431.
- MADNESS S (1952). Introduction to Molecular Genetics and Genomics. 1-131
- MCCLINTOCK B (1941). The stability of broken ends of chromosomes in Zea Mays. *Genetics*. **2**: 234-282.
- Mitochondrial DNA. NIH (national institutes of health) Erişim adresi: [<https://ghr.nlm.nih.gov/mitochondrial-dna#>]. Erişim tarihi: 13 Eylül 2019
- MURPHY K (2012). Janeway's Immunobiology. *Garland Science*, 169-186.
- NETTER FH (2014). ATLAS OF HUMAN ANATOMY. *Elsevier*, **4**: 1-163.
- NOLLA CM (1960). The Development of the Permanent Teeth. *J Dent Child.*, **27**: 254-266.
- OLOVNİKOV AM (1973). A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Elsevier*, **1**: 181-190.
- OU X, SHI Y, SUN H, XIE B, WU X, YANG Z, ZHAO H, (2011). Detection and quantification of the age-related sjTREC decline in human peripheral blood. *Int J Legal Med*. **4**: 603-608.
- ÖZSU E, YEŞİLTEPE MUTLU G, ÇİZMECİOĞLU FM, HATUN Ş (2015). McCune Albright Sendromu ve büyüme hormonunda aşırı salgılanma: olgu sunumu. *Türk Pediatri Arşivi*. **2**: 114-117.
- PETERS MJ, JOEHANES R, PILLING LC, SCHURMANN C, CONNEELY KN, POWELL J, REINMAA E, SUTPHIN GL, ZHERNAKOVA A, SCHRAMM K, WILSON YA, KOBES S, TUKIAINEN T, NABEC/UKBEC CONSORTIUM, RAMOS YF, GÖRING HH,

FORNAGE M, LIU Y, GHARIB SA, STRANGER BE, DE JAGER PL, AVIV A, LEVY D, MURABITO JM, MUNSON PJ, HUAN T, HOFMAN A, UITTERLINDEN AG, RIVADENEIRA F, VAN ROOIJ J, STOLK L, BROER L, VERBIEST MM, JHAMAI M, ARP P, METSPALU A, TSEREL L, MILANI L, SAMANI NJ, PETERSON P, KASELA S, CODD V, PETERS A, WARD-CAVINESS CK, HERDER C, WALDENBERGER M, RODEN M, SINGMANN P, ZEILINGER S, ILLIG T, HOMUTH G, GRABE HJ, VÖLZKE H, STEIL L, KOCHER T, MURRAY A, MELZER D, YAGHOOTKAR H, BANDINELLI S, MOSES EK, KENT JW, CURRAN JE, JOHNSON MP, WILLIAMS-BLANGERO S, WESTRA HJ, MCRAE AF, SMITH JA, KARDIA SL, HOVATTA I, PEROLA M, RIPATTI S, SALOMAA V, HENDERS AK, MARTIN NG, SMITH AK, MEHTA D, BINDER EB, NYLOCKS KM, KENNEDY EM, KLENGEL T, DING J, SUCHY-DICEY AM, ENQUOBAHRİE DA, BRODY J, ROTTER JI, CHEN YD, HOUWING-DUISTERMAAT J, KLOPPENBURG M, SLAGBOOM PE, HELMER Q, DEN HOLLANDER W, BEAN S, RAJ T, BAKHSHI N, WANG QP, OYSTON LJ, PSATY BM, TRACY RP, MONTGOMERY GW, TURNER ST, BLANGERO J, MEULENBELT I, RESSLER KJ, YANG J, FRANKE L, KETTUNEN J, VISSCHER PM, NEELY GG, KORSTENJE R, HANSON RL, PROKISCH Hİ FERRUCCI L, ESKO T, TEUMER A, VAN MEURS JB, JOHNSON AD (2015). The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. *Nature*, **6**: 1-14.

RANKIN HILL LM, BLAKEY ML (1994). W. Montague Cobb (1904-1990): Physical Anthropologist, Anatomist, and Activist. *American Anthropologist*. **96**: 74-96.

RAJU R, POULOSE N (2014). Aging and Injury: Alterations in Cellular Energetics and Organ Function. *Aging and disease*, **2**: 101-108.

RAVEN PH, JOHNSON GB, MASON KA, LOSOS JB, SINGER SR (2008). BIOLOGY 9th Ed. McGraw.-Hill,

REECE JB, MINORSKY PURRY LA, CAIN ML, WAASERMAN SA, JACKSON RB (2009). CAMPBELL BIOLOGY 9th Ed. Pearson, 110-124.

SCHRANZ D (1959). Age Determination from the Internal Structure of the Humerus. *Am J Phys Anthropol*, **4**: 273-277.

TANNER JM, WHITEHOUSE RH, GOLDSTEIN H, HEALY MR, MARSHALL WA (1976). Assessment of skeletal maturity and prediction of adult height (TW2 method). *To Journal of the Royal Statistical Society*, **1**: 488.

TODD WINGATE T (1920). Age changes in the pubic bone. *American Journal of Physical Anthropology*. **3**: 285-386.

WATSON JD, BAKER TA, BELL SP, GANN A, LEVINE M, LOSICK R (2014). MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE 5th Ed. Pearson.1-814.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı

İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU	
ETİK KURULUN ADI	ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
TELEFON	0312 595 82 27
FAKS	0312 310 63 70
E-POSTA	tipinsanetik@ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Yaş tahmininde gerçek zamanlı kantitatif PZR yöntemi ile TREC analizinin kullanımı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.N.Lale ŞATIROĞLU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Adli Tıp			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ	☐	BİREYSEL ARAŞTIRMA	☐
		DOKTORA TEZİ	☐	DİĞER	☐
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kesitsel Araştırma			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	☒	ÇOK MERKEZLİ	☐	
			ULUSAL	☒	
			ULUSLARARASI	☐	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:13-91-19	Tarih: 12 Eylül 2019
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Nuray YAZIHAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile ilişkisi	İmza
Prof.Dr.Nuray YAZIHAN	Fizyopatoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Serenay ELGÜN ÜLKAR	Tıbbi Biyokimya	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hakan ERGÜN	Tıbbi Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Hatice İLGIN RUHI	Tıbbi Genetik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevim AYDIN	Histoloji ve Embriyoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Berna SAVAŞ	Tıbbi Patoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Yasemin YAVUZ	Biyoistatistik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Deniz BALCI	Genel Cerrahi	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Yüksel ÜRÜN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Sinem CİVRİZ BOZDAĞ	Hematoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Cihangir AKYOL	Genel Cerrahi	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Başak Ceyda MEÇO	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Halil ÖZDEMİR	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Mustafa Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☐ H ☒	

Ankara BAYKAL KLİNİK
A.Ü.T.F. İnsan Araştırmaları
Etik Kurulu
Aslı Güler

Ek-2. Serpil Akdağ Kan Merkezi İzin Belgesi



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hastaneler Başhekimliği
Cebeci Araştırma ve Uygulama Hastanesi
Hastane Müdürlüğü, İdari ve Mali İşler Şefliği



Sayı : 15255985-604.02.01[774.99]-E.23865
Konu : Fethiye EKEN'in Tez Projesi hk. Cevap

15.08.2019

ADLİ TIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi : a) 29.07.2019 tarihli ve 72446162-604.02.01-E.40087 sayılı yazınız.
b) Serpil Akdağ Kan Merkezinin 06.08.2019 tarihli ve 10848047-604.02.01-E.23213 sayılı yazısı.

İlgi (a) sayılı yazınızda bahsi geçen, Anabilim Dalınız öğretim üyelerinden Prof.Dr.N.Lale ŞATIROĞLU TUFAN'ın danışmanlığını yaptığı Adli Genetik Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Fethiye EKEN'in "Yaş tahmininde gerçek zamanlı kantitatif PZR yöntemi ile TREC analizinin kullanımı" başlıklı yüksek lisans tezi konusunda, Hastanemiz Serpil Akdağ Kan Merkezi başışçılardan örnek kan numunelerinin alınmasının uygun görüldüğü, Gönüllü Onam Formu ile birlikte örnekleri toplamak için tez konusunda görevli kişinin Serpil Akdağ Kan Merkezinde bulunması gerektiği, ilgi (b) sayılı yazı ile bildirilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

e-imzalıdır

Prof. Dr. A.Rüçhan AKAR
Başhekim

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Tıp Fak.Cad. 06260 Dikimevi - Mamak - Ankara
Tel. No : 0312 595 63 60 Belgegeçer No : 0312 362 34 41
E-Posta : cebbsk1@medicine.ankara.edu.tr

Bilgi için: Yıldız KILINÇKAYA
Memur
Telefon No:(312) 595 63 62

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Fethiye

Soyadı: EKEN AKSOY

Doğum Yeri ve Tarihi: YAŞİHAN-23.05.1992

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Evli

Askerlik Durumu: -

İletişim Adresi ve Telefon: Cevizlidere mah. Ceyhun Atuf Kansu cad. Avcı Apt. 151-5 Çankaya-ANKARA 0506 480 98 56

II- Eğitim

2017-2019: Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Adli Genetik Yüksek Lisans

2011-2016: Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü- Temel Bilimler Fakültesi -Moleküler

Biyoloji ve Genetik

2006-2010: Nefise Andiçen Lisesi

2003-2006: Leyla Kahraman Sevim Ertenü İlköğretim Okulu

1999-2003: Mehmet Kemal Dedeman İlköğretim Okulu

Yabancı Dil: İngilizce

III- Ünvanlar

2016: Moleküler Biyolog

IV- Mesleki Deneyimi

2012 (Ocak): Dr. Nafiz KÖREZ Devlet Hastanesi - Biyokimya Laboratuvarı - Gönüllü

Stajyer

2013 (Temmuz-Ağustos): Gazi Üniversitesi-Tıbbi Genetik Laboratuvarı-Gönüllü

Stajyer

2014 (Temmuz-Ağustos): Gülhane Askeri Tıp Akademisi-Hematoloji Laboratuvarı-

Stajyer

2014 (Ağustos-Eylül): Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi- Pediatri Moleküler Genetik

Laboratuvarı-Gönüllü Stajyer

2015 (Temmuz-Ağustos): Hacettepe Üniversitesi - Sinirbilim ve Psikiyatri Enstitüsü

V- Bilimsel Etkinlikleri

315S132 nolu proje TUBİTAK bursiyerliği

‘Farklı İzolasyon Protokolleriyle Guthrie Kartı Kurutulmuş Kan Örneklerinden Elde Edilen DNA’ların Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Analizi’ başlıklı poster sunumu-5. Klinik İmmünoloji Kongresi.

Ağır Kombine İmmün Yetmezlik (AKİY) hastalarının erken tanısını sağlayan TREC analiz yönteminin kurulması ve retrospektif olarak 5030 Guthrie örneğinde ölçülmesi-5. Klinik İmmünoloji Kongresi, Poster birinciliği ödülü.

Yenidoğan Guthrie Kart Örneklerinin Farklı Saklama Koşullarının TREC ve β -Aktin Analizi Üzerine Etkisinin İncelenmesi-5. Klinik İmmünoloji Kongresi.

VI- Diğer Bilgiler

13. USK (Ulusal Sinirbilim Kongresi) - 2015.

14. İÜGEN Uluslararası Katılımlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu.

5. Klinik İmmünoloji Kongresi - 2018.