

**TÜKÜRÜK α -AMİLAZ AKTİVİTESİNİN FARKLI
YÖNTEMLERLE ÖLÇÜLMESİ VE STRES
FİZYOLOJİSİNDE KULLANIMI**

Özlem BARUTÇU

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sedat YILDIZ**

Yüksek Lisans Tezi -2017

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜKÜRÜK α -AMİLAZ AKTİVİTESİNİN FARKLI YÖNTEMLERLE
ÖLÇÜLMESİ VE STRES FİZYOLOJİSİNDE KULLANIMI**

Özlem BARUTÇU

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sedat YILDIZ**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 2015\82 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2017**

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Özlem BARUTÇU'nun "Tükürük α -Amilaz Aktivitesinin Farklı Yöntemlerle Ölçülmesi ve Stres Fizyolojisinde Kullanımı"** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/05/2017


Prof. Dr. Sinan CANPOLAT
Fırat Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Sedat YILDIZ
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye


Prof. Dr. Süleyman SANDAL
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2017 tarih ve 2017/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tükürük.....	3
2.1.1. Tükürüğün İçeriği	3
2.1.2. Tükürük Bezlerinin Anatomisi	3
2.1.3. Tükürük pH'sı.....	5
2.2. Tükürük Salgılanması	5
2.3. Tükürükte Bulunan İyonlar.....	6
2.3.1. Tükürük İçine İyonların Salgılanması	6
2.4. Tükürükte Bulunan Proteinler	7
2.5. Tükürük α -Amilazı	8
2.6. Tükürük α -Amilazını Etkilemesi muhtemel olan etkenler	9
2.7. Tükürük α -Amilazı ve Otonom Sinir Sistemi.....	11
2.8. α -Amilaz, Otonom Sinir Sistemindeki Değişiklikleri Nasıl Yansıtır?	14
2.9. Tükürük α -Amilazı Plazma Katekolaminleri İçin Bir İndikatör müdür?	14
2.10. Tükürük α -Amilazı Fizyolojik Strese Duyarlı mıdır?	15
2.11. α -Amilaz Enziminin Non-İnvaziv Ölçümü	15
2.12. Deneysel Çalışmalar	15
2.12.1. Sıçanlar Üzerinde Yapılan Deneysel Çalışmalar.....	16
2.12.2. İnsanlar Üzerinde Yapılan Stres Çalışmaları.....	16
2.13. α -Amilaz Aktivitesini Ölçüm Yöntemleri	20

2.13.1. Nişasta-İyodin Yöntemi.....	20
2.13.2. CNPG3 Yöntemi.....	20
2.13.3. DNS Yöntemi	21
2.14. Tezin Amacı.....	21
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. α -Amilaz Enzimi.....	23
3.1.1. α -Amilaz Enzimini Saflaştırma Yöntemi	23
3.2. Nişasta-İyodin Metodu	24
3.2.1. Nişasta Çözeltilisinin Hazırlanması	25
3.2.2. Nişasta-İyodin Metodunda Standart Eğrinin Oluşturulması Protokolü.....	25
3.2.3. PBS Hazırlanması	26
3.2.4. Nişasta-İyodin Testinin Protokolü	26
3.2.5. Nişasta-İyodin Yöntemi Standart Eğrisi	27
3.3. CNPG3 Metodu	29
3.3.1. CNPG3 Metodunda Standart Eğrinin Oluşturulması Protokolü.....	29
3.3.2. CNPG3 Testinin Protokolü.....	29
3.3.3. CNPG3 Yöntemi Standart Eğrisi.....	30
3.4. DNS Metodu	32
3.4.1. DNS Metodunda Standart Eğrinin Oluşturulması Protokolü	32
3.4.2. DNS Testinin Protokolü.....	33
3.4.3. DNS Yönteminin Standart Eğrisi	33
3.5. Deneme	35
3.5.1. α -Amilaz Enzimi İçin Tükürük Toplanması.....	35
3.6. İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Nişasta-İyodin Testi Standart Eğrisi	37
4.2. CNPG3 Testi Standart Eğrisi.....	37

4.3. Dinitrosalisilik Asit Testi Standart Eğrisi	38
4.4. Örneklerin Dondurulup Çözdürülmesinin α -Amilaz Üzerine Etkisi	39
4.5. Profesyonel Okçularda Müsabaka Dönemi α -Amilaz Düzeyleri	40
4.6. Okçuluk Müsabakası Yanıtlarının Genel Karşılaştırmaları	47
4.7. α -Amilaz Düzeyleri Arasındaki Korrelasyonlar:	48
5. TARTIŞMA	49
5.1. Nişasta-İyodin Yöntemi ile α -Amilaz Tayini	49
5.2. Profesyonel Okçularda Nişasta-İyodin Testiyle Belirlenen α -Amilaz Düzeyleri	49
5.3. CNPG3 Yöntemi ile α -Amilaz Tayini	50
5.4. Profesyonel Okçularda CNPG3 Testiyle Belirlenen α -Amilaz Düzeyleri	50
5.5. DNS Yöntemi ile α -Amilaz Tayini	51
5.6. İncelenen Testlerin Birbirleriyle Karşılaştırılması	51
5.7. Stres Fizyolojisinde Nişasta-İyodin Testi ile CNPG3 Testinin Pratik Olarak Karşılaştırılması	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	56
EKLER	64
EK 1: Etik Kurul Onayı	64
EK 2: Özgeçmiş	65

TEŐEKKÜR

Tez çalıŐmalarım esnasında bilgi ve birikimleriyle yardımlarını esirgemeyen, yolumu aydınlatan aynı zamanda yaşamın çok fazla bilgiye sahip olmaktan ibaret olmadığını sevgi, saygı ve insanlık gibi değerlerin varlığını her daim hissettiren saygı duyduğum, kendime örnek aldığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Sedat Yıldız'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Tez süresince, laboratuvar çalışmaları başta olmak üzere birçok konuda yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım; Tuba Özgöçer, Pınar akan ve Cihat Uçar'a;

Herzaman yanımda olan ve bana destek veren aileme;

ÇalıŐmamın gerçekleşmesinde maddi desteklerinden dolayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teŐekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Tükürük α -Amilaz Aktivitesinin Farklı Yöntemlerle Ölçülmesi ve Stres Fizyolojisinde Kullanımı

Amaç: Mevcut çalışmanın amacı α -amilaz enziminin aktivitesini tükürük örneklerinde ölçmek için mevcut üç yöntemi karşılaştırmak ve stres fizyolojisinde kullanılabilirliğini araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Nişasta-iyodin yöntemi, substrat (CNPG3) yöntemi ve dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi çalışılarak avantaj ve dezavantajları ortaya konuldu. Bu yöntemlerin kullanılabilirliğini test etmek için salon Türkiye şampiyonasına katılan, 16-20 yaş arası (n=7), olimpiyat yarış yapan, erkek elit sporculardan alınan tükürük örnekleri kullanıldı. Tükürük örnekleri şampiyona sürecindeki 3 farklı günde (sıralama, eleme, takım atışları) sabah uyanınca 0, 30, 45, 60. dakikalarda alındı. Ayrıca, birinci sıralama ve ikinci gün eleme atışlarında yarışmadan 30 dk ve 15 dk öncesinde, yarışma arasında ve yarışma sonrasında tükürük örnekleri toplandı.

Bulgular: Nişasta-iyodin ve CNPG3 testleri başarılı bir şekilde kurulmuş fakat DNS testinin standart eğrisi başarılı şekilde kurulmasına rağmen numuneler okunmadığı için uygun bulunmamıştır. Testlerin hassasiyetleri ve çalışma aralıkları uygun bulunmuş; nişasta-iyodin testinde 4000 kat, CNPG3 testinde ise 5 kat seyreltme gerekmiştir. Kurulan iki test arasında zayıf fakat istatistiksel olarak belirgin pozitif bir ilişki gözlenmiştir (Lineer regresyon için $R^2=0.048$; $p<0.05$, kuadratik regresyon için $R^2=0.106$; $P<0.01$). Uyanma döneminde ve yarışma sürecinde tükürük α -amilaz aktivitelerinde bireysel farklılıklar vardı.

Sonuç: Nişasta-iyodin ve CNPG3 yöntemleri ucuz, kolay uygulanabilir ve kısa süren yöntemler olup, stres fizyolojisi çalışmalarında kullanılabilir oldukları belirlenmiştir. Nişasta-iyodin testi CNPG3 testine göre daha ucuz olmakla birlikte, CNPG3 testi daha az aşamadan oluşan daha pratik bir testtir.

Anahtar Kelimeler: Tükürük, α -Amilaz, CNPG3, DNS, Nişasta-iyodin, Stres Fizyolojisi

ABSTRACT

Measurement of Salivary α -Amylase Activity by Different Methods and Their Usage in Stress Physiology

Aim: The aim of current study was to compare three available α -amylase methods for saliva and to search for their possible usage in stress physiology.

Material and Method: Starch-iodine method, substrate (CNPG3) method and dinitrosalicylic acid method were studied and their advantages and disadvantages were established. In order to test the performance of these methods, salivary samples were collected from 16 to 20 years old male elite archers (n=7) competing in Turkish indoor championship with olympic bow. Salivary samples were collected immediately following waking up at 0, 30, 45 and 60 min on three different days of the championship (ranking, elimination and team shooting). In addition, during ranking and elimination days, salivary samples were collected at 30 and 15 min before shootings, at half-time, and at the end of the shootings.

Results: Starch-iodine method and CNPG3 tests were successfully established but DNS test appeared unsuitable as the samples could not be read by the standard curve formed. Sensitivity and dynamic range of the methods were suitable and 4000x and 5x dilutions were required for starch iodine method and CNPG3 method, respectively. There was a weak but statistically significant positive correlation between two tests established (For linear regression: $R^2=0.048$; $p<0.05$; For quadratic regression $R^2=0.106$; $P<0.01$). There were individual differences in salivary α -amylase activities both during waking up and competition periods.

Conclusion: It has been determined that starch-iodine and CNPG3 methods are cheap, easily applicable, short and suitable for stress physiology studies. Starch iodine test was cheaper than the CNPG3 but the latter was more practical as it involved less stages.

Key Words: Saliva, α -amylase, CNPG3, DNS, Starch-iodine, Stress physiology

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAUY	: Alfa amilaz uyanma yanıtı
AAUY1	: Sıralama atışları günü- α -amilaz uyanma yanıtı
AAUY2	: Eleme atışları günü- α -amilaz uyanma yanıtı
AAUY3	: Takım atışları günü- α -amilaz uyanma yanıtı
ACh	: Asetilkolin
α	: Alfa
β	: Beta
Ca	: Kalsiyum
Cl	: Klor
CNPG3	: 2- chloro-4-nitrophenly maltotriocide
dk	: Dakika
DNS	: Dinitrosalisilik asit
EY	: Eleme yarışması
EYÖ	: Eleme yarışma öncesi
g	: Gram
HPA	: Hipotalamo-pituiter adrenal aks
HCl	: Hidrojen klorür
HCO₃	: Bikarbonat
K	: Potasyum
L	: Litre
mEq	: Miliekivalan
ml	: Mililitre
mmol	: Milimol
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
n	: Denek sayısı (Adet)
nm	: anometre
non-REM	: Non-rapid eye movement; Hızlı göz hareketinin olmaması

PBS	: Phosphate buffered saline
pH	: Power of Hydrogen; Hidrojen gücü
REM	: Rapid eye movement; Hızlı göz hareketi
SAM	: Sempatik-adreno medullar
SEM	: Standard error of mean; Ortalama standart hata
TSST	: Trier sosyal stres testi
U	: Ünite
µl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Parotis, sublingual ve submandibular tükürük bezlerinin anatomik olarak gösterimi.....	4
Şekil 2.2. Tükürük bezlerinin hücresel yapısı	4
Şekil 2.3. Tükürük pH'sının gösterimi	5
Şekil 2.4. α -Amilaz enziminin 3 boyutlu yapısı. Şekildeki beyaz ve kırmızı renklerden oluşan yapılar α -amilazın aktif bölgeleridir. Gri renkli olan küre kalsiyum iyonunu temsil etmektedir ve enzimin yapısını stabilize edilmesiyle ilişkilidir. Yeşil küre olarak gösterilen klorür iyonu reaksiyona yardımcı olabilmek adına birçok amilazda aktif bölgenin altında bulunmaktadır.	9
Şekil 2.5. Tükürük α -amilaz enziminin strese cevap olarak Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksı (HPA) ve Sempatik-adreno medullar (SAM) aktivitesi sonucu salgılanması.....	13
Şekil 2.6. Tükürüğün salgılanmasında sempatik ve parasempatik sinir sisteminin etkilerinin özeti.....	13
Şekil 2.7. Tükürük kortizol ve α -amilaz salgılamında gün içinde meydana gelen değişiklikler. Çalışmaya 76 sağlıklı erkek ve bayan katılmıştır. Kortizol salgılamında uyanma ile birlikte artış gözlenirken, α -amilaz salgılamında azalma gözlenmiştir. Öte yandan, kortizol salgılamı gece saatlerine doğru en düşük seviyeye inerken α -amilaz salgılamı en yüksek düzeylere çıkmaktadır	17
Şekil 2.8. Tükürük α -amilaz düzeyinin stres uygulanmasını (gri renkle gösterilen zaman dilimi) takiben artışı ve dinlenme döneminde bazal seviyeye geri dönüşü. Bu çalışmada, 27 erişkin katılımcıya TSST (Trier social stress test) adı verilen bir sosyal stres testi uygulanmış ve bunun α -amilaz düzeyini artırdığı belirlenmiştir.....	18

Şekil 2.9. Sağlıklı genç erkeklere (n=30) TSST uygulandığında (gri zaman dilimi) plazma norepinefrin (A) ve epinefrin (B) düzeyleri ile birlikte tükürük α -amilaz düzeyinde ve tükürük akış hızında meydana gelen değişiklikler(C). Stres uygulamasıyla birlikte plazmada norepinefrin ile epinefrinin artış göstermesiyle eşzamanlı olarak tükürükte de α -amilaz düzeylerinde bir artış gözlenmiştir. α -amilaz düzeyinde meydana gelen artışın, tükürükakış hızıyla ilişkili olmadığı da gösterilmiştir.	19
Şekil 2.10. TSST uygulanan sağlıklı erkek ve bayan bireylerde (n=12), tükürük α -amilaz ve plazma norepinefrin düzeylerinde meydana gelen eşzamanlı değişiklikler.....	20
Şekil 2.11. α -amilaz enziminin nişastayı parçalaması ve oluşan ürünler	20
Şekil 2.12. CNPG3 substratının amilaza bağlanması ve açığa çıkan ürünler.....	21
Şekil 2.13. 3,5-DNS'nin indirgeyici şekerle reaksiyona girerek 3-amino-5 nitrosalisilik asidi meydana getirmesi	21
Şekil 3.1. Hazır nişasta solüsyonu ile laboratuvarında hazırlanan nişasta solüsyonunun iodyodun damlatıldıktan sonraki renk oluşumları. Sol tarafta lacivertimsirengin olduğu beherde hazır %1'lik nişasta solüsyonu kullanılırken, sağtarafa kırmızımsı renk oluşumunun gözlemlendiği beherde laboratuvarında hazırlanan %1'lik nişasta solüsyonu kullanılmıştır..	24
Şekil 3.2. Hazır nişasta solüsyonu ile laboratuvarında hazırlanan nişasta solüsyonunun α -amilaz enzimi eklendikten sonraki renk değişimleri.	25
Şekil 3.3. Nişasta-iyodin metodu standart eğri.....	27
Şekil 3.5. CNPG3 metodunun standart eğrisi.....	30
Şekil 3.6. Değişik konsantrasyonlardaki α -amilaz kullanımının oluşturduğu renk değişikliklerinin CNPG3 yöntemiyle gösterilmesi. CNPG3 testinde CNPG3 maddesinin katılımıyla açık sarı ren oluşmakta ve spektrofotometrede okunarak α -amilaz aktivitesi belirlenmektedir.....	31
Şekil 3.7. DNS metodunun standart eğrisi	33
Şekil 3.8. Değişik konsantrasyonlardaki α -amilaz kullanımının oluşturduğu renk değişikliklerinin DNS yöntemiyle gösterilmesi.	34

- Şekil 4.1.**Nişasta-iyodin yöntemine göre artan α -amilaz konsantrasyonlarında optikdansitede meydana gelen değişiklikleri gösteren standart eğri. α -amilaz konsantrasyonlarındaki (ünite/ml) değişikliklerin oluşturduğu renkdeğişimleri spektrofotometrik olarak 580 nm dalga boyunda ölçülmüş ve yukarıdaki standart eğri grafiği elde edilmiştir. Değerler, 5 testte elde edilen değerlerin ortalaması ve standart hatası olarak sunulmuştur. Standart eğrinin 0,06 U/ml ile 1,5 U/ml arasında lineer olduğu belirlenmiştir. 37
- Şekil 4.2.**CNPG3 kromojen substrat yöntemine göre artan α -amilaz konsantrasyonlarında optik dansitede meydana gelen değişiklikleri gösteren standart eğri. Ölçümler 405 nm’de yapılmış olup, 13 standart eğrinin ortalaması olarak sunulmuştur(\pm SEM). Eğrinin 0-7,5 U/mL aralığında lineer olduğu tespit edilmiştir. 38
- Şekil 4.3.**Dinitrosalisilik asit testinde, α -amilaz konsantrasyonlarındaki artışla birlikte optik dansitede meydana gelen değişiklikleri gösteren standart eğri. Standart eğride, 3-30 U/ml arasındaki konsantrasyon farkına karşılık optik dansite de yaklaşık olarak 0,300 birimlik bir değişiklik meydana gelmiştir. 38
- Şekil 4.4.**Örnekleri dondurup çözmenin CNPG3 testinde α -amilaz üzerine etkisi. Grafikte y eksenini, normal bir şekilde yapılan testten elde edilen optikdansite değerlerini gösterirken, x eksenini ise aynı örneklerin dondurulup çözülüp bir sonraki gün çalışılması sonucu elde edilen optik dansite değerlerini göstermektedir. Bu amaçla 11 farklı kişinin tükürük örneği ve 1 standart çözeltisi, 8 defa seri olarak seyreltilmiş ve elde edilen 96 örnek her iki testte de incelenmiştir. Elde edilen veriler, bir defa dondurup çözmenin α -amilaz üzerine olumsuz bir etki oluşturmadığını göstermektedir çünkü her iki test arasındaki uyum % 99,1 oranında bulunmuştur. 39
- Şekil 4.5.**Birey #KS için CNPG3 (sol taraftaki grafikler) ve nişasta-iyodin testleriyle (sağ taraftaki grafikler) elde edilen tükürük α -amilaz düzeyleri. 40
- Şekil 4.6.**Birey #MU için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri. 41
- Şekil 4.7.**Birey #FB için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri. 42
- Şekil 4.8.**Birey #OET için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri. 43

Şekil 4.9. Birey #BB için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri.....	44
Şekil 4.10. Birey #OE için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri.....	45
Şekil 4.11. Birey #BY için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri.....	46
Şekil 4.12. CNPG3 analizlerine göre okçularda (n=7) müsabaka sürecinde uykudan uyanma sonrası α -amilaz düzeylerinde görülen ortalama değişim (sol)ile ok atışlarının yapılması sürecinde (-30, -15, yarışma arası, yarışmasonu) α -amilaz değerleri (sağ). Yarışma süreci ortalama α -amilazdüzeyi, uyanma süreci α -amilaz düzeyinden daha yüksek olarak belirlendi	47
Şekil 4.13. Nişasta-iyodin testiyle belirlenen α -amilaz düzeyleri, gerek uyanma sürecinde gerekse yarışma sürecinde zaman bakımından farklılıklar göstermedi.....	48
Şekil 5.1. Tükürük α -amilaz aktivitesini ölçen üç farklı yöntemin karşılaştırılması.....	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Tükürükte bulunan iyonların oranı ve kanda bulunma oranlarına göre nispi konsantrasyonları	6
Tablo 2.2. Otonom sinir sistemi üzerinden etki eden sempatik ve parasempatik uyarılmaların tükürük salgımadaki etkileri	12
Tablo 3.1. Nişasta-iyodin metodu standart eğri oluşumu için seyreltme oranları	25
Tablo 3.2. Nişasta-iyodin metodunda numunelerin seyreltme oranları	26
Tablo 3.3. PBS çözeltisinin hazırlanması (1000 ml için).....	26
Tablo 3.4. CNPG3 metodu standart eğri oluşumu için α -amilaz enziminin seyreltme oranları	29
Tablo 3.5. CNPG3 metodu için numunelerin seyreltme oranları.....	29
Tablo 3.6. DNS metodu standart eğri oluşumu için α -amilaz enziminin seyreltme oranları	32
Tablo 5.1. Tez kapsamında incelenen testlerin genel özelliklerinin karşılaştırılması.....	52

1. GİRİŞ

Tükürük vücudumuzda bulunan vekolaylıkla elde edilebilen bir sıvı olup son yıllarda önemi giderek artmaktadır (1-3). Bu bağlamda stres fizyolojisinin incelenmesinde de önemli bir medyum olarak kullanılmaktadır (4, 5).Stres algısı oluşturan bazı durumlarda tükürük α -amilazı gibi enzimlerin arttığı ve salgı karakterlerinin değiştiği bildirilmiştir (6).

Tükürük α -amilaz enzimi, tükürük bezleri tarafından üretilen, otonom sinir sisteminin aktivasyonu sonucunda salınan ve nişastayı parçalayan bir enzimdir (7).Hem fizyolojik hemde psikolojik stresörler tükürük α -amilaz enziminin stresle olan ilişkisinin gösterilmesinde kullanılmaktadır. Fakat bu ilişkinin açıklandığı birçok çalışmanın varlığına rağmen, çelişkili sonuçlarla karşılaşmaktadır (8).

Stres hayatın her alanında olan psikolojik, biyolojik ve sosyal etkenlerin etkili olduğu, aynı zamanda yüksek dozdaysa zarar verici etkileri olan bir durumdur. Hem beyinde hemde vücutta eş zamanlı olarak stres ile ilgili değişiklikler oluşmaktadır. Stres araştırmalarının amacı, stresin yükünü en iyi şekilde anlamak ve onu belirleyebilmek için ölçümler geliştirmektir (9).

Stresin non-invaziv ölçümünde bir indikatör olarak tükürük α -amilaz enzimi de kullanılmakta olup, bu ölçümler genellikle substrat (CNPG3) yöntemini kullanmaktadır (10). Bununla beraber tükürük α -amilaz enzimi aktivitesi teorik olarak 3 yöntemle ölçülebilir. Bunlardan nişasta-iyodin yöntemi; α -amilaz enziminin nişastayı parçalaması temeline dayanmaktadır. α -Amilaz enziminin parçalayamadığı nişasta, iyodin ile boyanarak spektrofotometrede okunarak belirlenmektedir. DNS yöntemi ise indirgenen şeker miktarını belirleme esasına dayanmaktadır. Substrat yönteminde ise, CNPG3 substrat görevi görmekte ve enzime bağlandığında sarı bir renk oluşturarak enzimin aktivitesini göstermektedir.

α -Amilaz değişik yöntemlerle ölçülebilirken, bunları birbirleriyle karşılaştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, mevcut tez çalışmasında, α -amilaz enzim aktivitesini ölçen üç metod (nişasta-iyodin metodu, CNPG3 metodu ve Dinitrosalisilik asit metodu) laboratuvarımızda kurulacak ve birbirleriyle maliyet, süre, pratiklik gibi yönlerden karşılaştırılacaktır. Ayrıca bu yöntemler, deneysel bir çalışmada (okçuluk turnuvasında yarışan sporcularda) uygulanacak ve stres fizyolojisinde kullanım potansiyelleri değerlendirilecektir.

Projenin gerçekleşmesi halinde, α -amilaz ölçüm yöntemleri laboratuvarımızda ilk defa olarak kurulacak ve birbirleriyle karşılaştırılarak uygulanabilir yöntemler seçilecektir. Böylece bu testler stres fizyolojisinin incelenmesinde kullanılarak hem ülkemiz için katma değeri oluşturulacak hem de bu konuda bilgi birikimi kazanılacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tükürük

Tükürük ağız içinde ve çevresinde yer alan minör ve majör tükürük bezlerinden ağız boşluğuna salgılanan biyolojik bir sıvı olup, asiner hücreler tarafından salgılanmaktadır (11-13).Majör tükürük bezleri; parotis, submandibular ve sublingual bezlerdir (14). Minör tükürük bezleri ise yanak, damak, ve ağız mukozasının farklı bölgelerinde bulunan, sayıları yaklaşık olarak 700-1000 kadar olan ve genel olarak tükürüğün %10' nu oluşturan bezlerdir. Farklı bezlerden salgılanan sıvıların karışımı tam tükürük olarak adlandırılırken, tek bir bezden salgılanan sıvıya kanal tükürüğü denilmektedir (15).

Tükürük; renksiz, opak ve pH'sı ortalama 6.4-6.9 arasında olan bir sıvıdır. Ağızdan boğaza doğru salgılanan sabit orandaki tükürük koruyucu etkilere sahiptir (16). Bu akış boğazdaki yiyecek kalıntılarının geçişini kolaylaştırmaktadır.

Tükürük uyarılmış tükürük ve uyarılmamış tükürük olarak iki gruba ayrılmaktadır. Uyarılmamış şartlar altında, %20 parotisten , %65 submandibulardan, %7-8 sublingual bezlerden ve %10 da minör bezlerden salgılanmaktadır (17). Uyarılmış tükürük için tükürük salgısının %50'si parotis bezinin katkısı ve diğer bezlerdeki değişikliklerin katkısı ile oluşmaktadır (18-20).

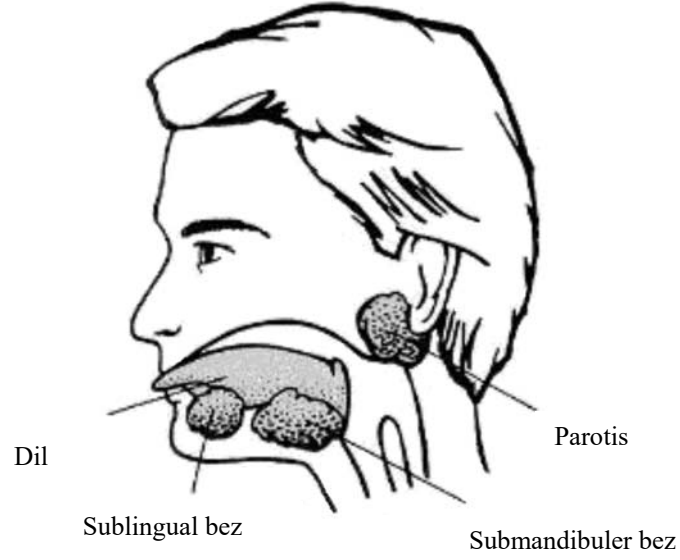
2.1.1. Tükürüğün İçeriği

Tükürüğün içeriğinde %99 su bulunurken, %1 oranında protein ve tuzlar bulunmaktadır. Tükürükte %1 lik oranda organik (amilaz, mukus, maltaz, sodyum ve potasyum rodanür, glikoprotein ve mukopolisakkarit) ve inorganik (sodyum, potasyum, kalsiyum, klor, bikarbonat, kalsiyum karbonat, sülfat, asit ve alkalin fosfatlar, karbondioksit, oksijen, azot ve erimiş amonyak) maddeler bulunmaktadır (21).

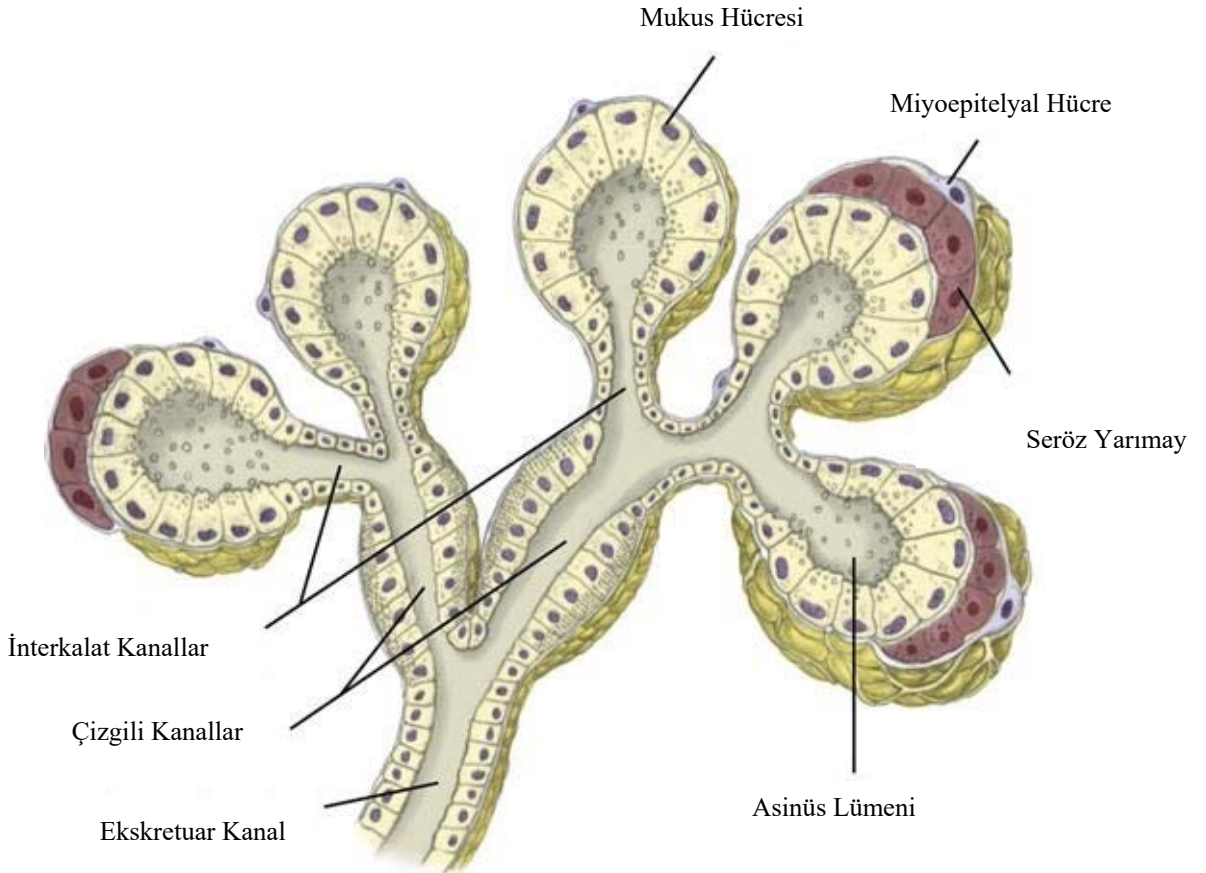
2.1.2. Tükürük Bezlerinin Anatomisi

İnsan yüzünün her bir yanında üç adet tükürük bezi bulunmaktadır. Bu bezler parotis, submandibular ve sublingual bezler olarak adlandırılmaktadır (22) (Şekil 2.1).Tükürük bezleri sindirim sisteminin bir parçasıdır. Bu bezler farklı türde hücreler

içerir; asiner hücreler, çeşitli kanal sistem hücreleri ve miyoepitel hücreler gibi (23) (Şekil 2.2).



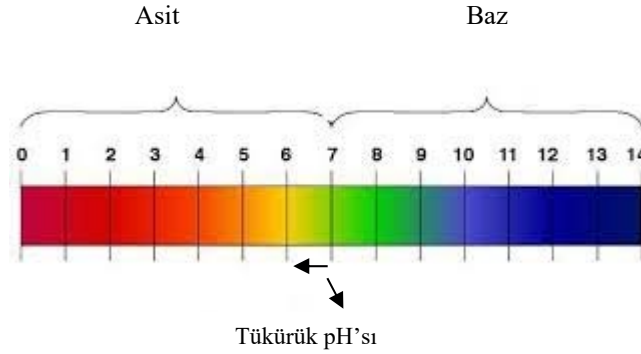
Şekil 2.1.Parotis, sublingual ve submandibular tükürük bezlerinin anatomik olarak gösterimi (24).



Şekil 2.2.Tükürük bezlerinin hücresel yapısı (25).

2.1.3. Tükürük pH'sı

Tükürük pH'sı 6.4-6.9 aralığında değişmektedir (16) (Şekil 2.3). Bazı yiyecek ve içecekler tükürüğün pH'sını değiştirebilmektedir (Limon:2.4, kola:2.5, sirke:2.9, portakal:3.5, kahve:5.0, çay:5.5, süt:6.5 ve su:7.0 vs.).



Günlük hacim(ml) 750-1500 arasındadır.

Şekil 2.3. Tükürük pH'sının gösterimi

2.2. Tükürük Salgılanması

Tükürüğün salgılanması sinirsel olarak kontrol edilmekte olup hormonal kontrolde aldosteron hormonunun etkisiyle olmaktadır (17). Ayrıca besin maddesinin görülmesi düşünülmeside tükürük salgısını uyarmaktadır. Bu bağlamda tükürük salgılanması temel olarak üç temel fazda gerçekleşmektedir;

- Sefalik faz
- Bukkal faz
- Gastrointestinal faz

Sefalik faz, yiyeceklerin düşünülmesi ve kokularının alınması ile başlamaktadır. Beyin korteksinden çıkan impulslar, tükürüğün salgı merkezini uyarak salgılanmasına sebep olmaktadır (26).

Bukkal faz ise ağızdaki dokunma ve tat alma duyularının uyarılması ile başlamaktadır. Besinler ağıza alındıktan sonra ağız mukozasına yaptıkları fiziksel ve kimyasal uyarılar, afferent yollarla salgı merkezine iletilmektedirler (26).

Gastrointestinal faz, mide ve üst sindirim sisteminden gelen refleksler yolu ile uyarılmaktadır. İrrite maddelerin yutulması ile birlikte refleksler de kuvvetlenir. Tükürük de sulandırarak veya nötralize ederek bu irite maddelerin etkisini nispeten önlemektedir (26).

2.3. Tükürükte Bulunan İyonlar

Tükürükte %1 oranında iyon bulunmaktadır. Bu iyonlar temel olarak Na, K, Cl, HCO₃ ve Ca'dur. Bu iyonların tükürükteki düzeyiile kandaki düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 2.1'de verilmiştir. Na iyonu tükürükte 2-21 mmol/L, Cl iyonu 5-40 mmol/L ve Ca iyonu ise 1.2-2.8 mmol/L bulunurken, kandakine göre nispi konsantrasyonları düşüktür. K iyonu tükürükte 10-36 mmol/L bulunmaktadır ve kandakine göre nispi konsantrasyonu artmaktadır. HCO₃ 25 mmol/L bulunurken kandakine göre nispi konsantrasyonu benzerdir (27).Tükürükte bulunan iyonların oranı ve kanda bulunma oranlarına göre nispi konsantrasyonları Tablo 2.1'de şematize edilmiştir.

Tablo 2.1.Tükürükte bulunan iyonların oranı ve kanda bulunma oranlarına göre nispi konsantrasyonları

İçerik	Düzye	Kandakine göre nispi konsantrasyonu
Su (%)	99	
Proteinler ve iyonlar	1	
İyonların miktarı		
Na	2-21 mmol/L	↓(135-148 mmol/L)
K	10-36 mmol/L	↑(3.5-5.5 mmol/L)
Cl	5-40 mmol/L	↓(98-106 mmol/L)
HCO ₃ ⁻	25 mmol/L	= (22-26 mmol/L)
Ca	1.2-2.8 mmol/L	↓ (8.5-10.5 mmol/L)

2.3.1. Tükürük İçine İyonların Salgılanması

Tükürükte özellikle çok miktarda potasyum ve bikarbonat iyonları bulunmaktadır. Fakat sodyum ve klorür iyonlarının konsantrasyonları plazmadan daha azdır. Primer salgı kanallar boyunca ilerler ve tükürüğün içindeki sıvının iyon içeriğini değiştiren iki önemli aktif taşıma gerçekleşir (28).

İlk olarak, sodyum iyonları tükürük kanalında aktif olarak geri emilir ve potasyum iyonları aktif olarak salgılanır. Böylece tükürükteki sodyum konsantrasyonu azalırken, potasyum konsantrasyonu artar. Fakat sodyum geri emilimi potasyum salgılanmasına göre fazla olduğundan tükürük kanallarında yaklaşık -70 milivolt negatiflik oluşturur. Bu bağlamda klorür iyonları pasif olarak geri emilir. Sodyum iyon konsantrasyonuna uyacak şekilde klorür iyon konsantrasyonu düşük düzeye iner (28).

Daha sonra, bikarbonat iyonları kanal lümenine salgılanır. Dinlenme koşullarında tükürükte bulunan sodyum ve klorür iyonlarından her birinin konsantrasyonları plazma konsantrasyonlarının yedide biri ile onda biri arasındadır. Diğer taraftan, potasyum konsantrasyonu yaklaşık plazma konsantrasyonunun yedi katıdır. Bikarbonat konsantrasyonu ise plazmanın yaklaşık 2 veya 3 katıdır (28).

Yüksek miktarda tükürük salgılanması sırasında, asinüslerde primer salgının yapım hızının 20 kat artması sonucu tükürükteki iyonların konsantrasyonları önemli şekilde değişir. Asinüs salgısı kanallar boyunca çok hızlı akar ve salgının kanalda işlenmesi belirgin olarak azalır. Bu nedenle, tükürük bol miktarda salgılandığında, sodyum klorür konsantrasyonu plazmaya oranla yaklaşık yarısı ile üçte ikisi kadar az olurken, potasyum konsantrasyonu plazmaya oranla dört kez daha fazla olur (28).

2.4. Tükürükte Bulunan Proteinler

Tükürükte birçok protein yapılı bileşenler bulunur (albümin, lipaz, amilaz, laktik dehidrogenaz, beta-glukuronidaz, esteraz, peptidaz, fosfataz, ribonükleaz, peroksidaz, karbohidraz, lizozim, musinler, sistatinler, sinir büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, gustin, fibronektin, histatin, immunoglobulin-A, -G ve -M, serum proteinleri, laktoferrin, kreatinin). Fakat tükürük temel olarak iki tip protein salgısı içermektedir (27, 29);

- Seröz salgı, nişasta sindirimini sağlayan α -amilaz (pityalin) enzimini içerir.
- Mukus salgısı, kayganlaştırıcı ve yüzey koruyucu özellikteki müsin içerir.

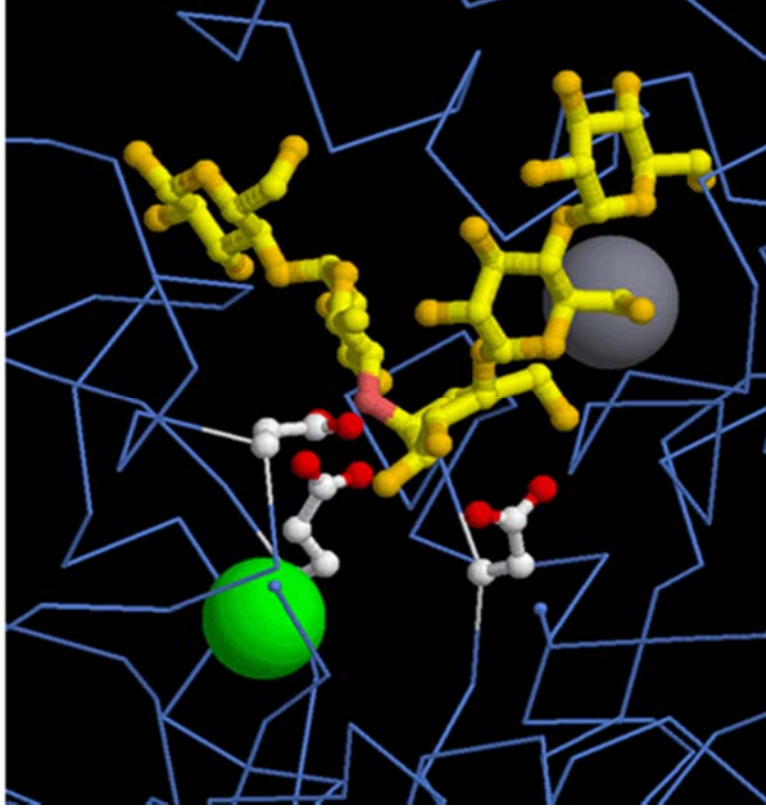
Parotis bezleri seröz tipte salgı yaparken, submandibular ve sublingual bezler hem seröz hem de mukoz tipte salgı yapmaktadırlar. Buna karşılık bukkal bezler sadece mukus salgısı yapmaktadırlar.

2.5. Tükürük α -Amilazı

Tükürük α -amilazı(1,4- α -D-glucan 4-glucanohydrolase; E.C 3.2.1.1) tükürükteki en önemli enzimlerden biridir (30). İlk olarak Leuchs tarafından tükürükte 1831 yılında tanımlanmıştır (31). Daha sonra Magendie tarafından 1846'da serumda ve Cohnheimtarafından 1863'de idrarda tanımlanmıştır. Elman'ın 1929'da akut pankreatitis ile kandaki yüksek seviyeli amilazı ilişkilendirmesi sonucunda α -amilaz enziminin klinik yararı ve ölçümü ile daha çok ilgilenilmesine yol açmıştır (31).

Biri glikozitlenmiş diğeri karbonhidrat içermeyen izoenzimlerin iki ailesinden oluşur. İzoenzimler amino grupların değişik sayılarını içerir ve uygun elektroforetik teknikler kullanılarak ayrılırlar. Glikozitlenmiş formun ağırlığı 57.000 iken nonglikozitlenmiş formun ağırlığı 54.000 dir. Enzimin %80'i parotis bezinden salgılanır (32).

Ayrıca α -amilaz, nişastayı glikoz ve maltoza α -1,4 bağlarını hidroliz eden kalsiyum içeren bir metalloenzimdir (33, 34). Geleneksel olarak, bu enzimin ağız boşluğunda nişastanın sindirimini başlattığı düşünülmekteydi (34).Fakat son yıllardaki kanıtlar α -amilazın önemli bir anti-bakterial fonksiyona da sahip olduğunu göstermektedir. Pankreatik ve tükürük α -amilazından başka; α -amilaz aktivitesi diğer normal doku ve sıvılardada gözlenmektedir. Bunlar; akciğer, ter, lökosit, trombosit, kolostrum ve süt, gözyaşı, bademcik, tiroit, karaciğer, safra, endometrium, semen, fallop tüpü, amniyotik sıvı, servikal mukoza, bağırsak mukozası, prostat bezi, seminal vezikül ve kadın genital sistemidir (35). Şekil 2.4'de α -amilaz enziminin 3 boyutlu yapısı görülmektedir.



Şekil 2.4. α -Amilaz enziminin 3 boyutlu yapısı. Şekildeki beyaz ve kırmızı renklere oluşan yapılar α -amilazın aktif bölgeleridir. Gri renkli olan küre kalsiyum iyonunu temsil etmektedir ve enzimin yapısının stabilize edilmesiyle ilişkilidir. Yeşil küre olarak gösterilen klorür iyonu reaksiyona yardımcı olabilmek adına birçok amilazda aktif bölgenin altında bulunmaktadır.

2.6. Tükürük α -Amilazını Etkilemesi muhtemel olan etkenler

Çok sayıda faktör tükürük α -amilaz aktivitesini değiştirmektedir (36). Bunlar aşağıda sıralanmaktadır;

- Cinsiyet
- Yaş
- Sigara
- Alkol
- Tıbbi ilaçlar
- Kafein
- Yiyecekler
- Diş fırçalama
- Egzersiz
- Kişilik

- Somatik ve psikiyatrik hastalıklar

Cinsiyet: Mevcut çalışmalarda amilaz aktivitesinde cinsiyet farklılığına dair bir bulgu saptanamamıştır (37). Yoshihiro ve ark. (2016)'da yapmış oldukları çalışmada kaçınılması gereken kişilik bozukluğu olan 93 kişi ve 355 hasta olmayan kontrol üzerinde çalışmışlardır. Akut fiziksel ve psikososyal strese karşı α -amilaz yanıtında cinsiyetin rolünü incelemiş ve tükürük α -amilaz düzeyinin kadınlar ve erkekler arasında bir fark göstermediğini bildirmişlerdir (38).Günümüzde de akut amilaz yanıtlarında hiçbir cinsiyet farklılığı tanımlanmamıştır. Sadece gebelik dönemlerinde strese verilen tepkilerin zayıfladığı bildirilmiştir (39-41).

Yaş: Bazal amilaz aktivitesi yeni doğan bebeklerde görülmez. Bundan sonrada ilk 3 yıl içinde erişkin seviyelere ulaşmak için sürekli olarak artar. Bazal amilaz aktivitesi ömür boyunca değişmez ve yaşlılıkta sabit kalır. Yenidoğanda akut stres tepkileri yoktur; ergenlik döneminde yetişkinlik derecesine ulaşmak için çocukluktan itibaren artmaya başlar. Yaşlılık döneminde akut stres tepkileriyle ilgili hiçbir veri bulunmamaktadır (42, 43).

Sigara: Tütün dumanının amilaz aktivitesini akut olarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Sigara içme alışkanlığı olan kişilerde akut strese verilen cevap hakkında belirgin veriler yoktur. Ahmadi-Motamayel ve ark. (2016)'da sigara içen ve içmeyen 510 kişi üzerinde α -amilaz seviyesini incelemek için yapmış oldukları çalışmada; α -amilaz seviyesinde artış olduğunu fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (44). α -Amilaz ile ilgili yapılacak olan çalışmalarda sigara içenlerin hariç tutulması önerilmektedir (45).

Alkol: Yapılan çalışmalar incelendiğinde kesin olarak ortaya konulan veriler yoktur fakat bazı çalışmalarda kronik içicilerde düşük amilaz gözlemlendiği bildirilmiştir (46, 47).

Tıbbi ilaçlar: Adrenerjik agonistler ve antagonistler, tükürük α -amilaz üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Bu ilaçların kullanılması kontrol edilmeli veya hariç tutulmalıdır.

Kafein: Akut uygulama amilaz aktivitesini uyarabilmektedir. Deneylere katılmadan 1 saat önce akut kafein tüketimi önlenmelidir.

Yiyecek: Karbonhidrat tüketimi yüksekpopülasyonlarda bazal amilazın daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Deneylere katılmadan 1 saat önce su hariç yeme ve içme olmaması gerektiği tavsiye edilmektedir.

Egzersiz: Literatürlerden elde edilen bulgulara göre fiziksel egzersizin genel olarak tükürük α -amilazını yükselttiği görülmektedir. Yapılan bir çalışmada 7 kadın ve 8 erkek sporcunun egzersiz programlarında tükürük α -amilazı ve tükürük kortizolüne verilen tepki incelenmiş ve tükürük α -amilaz miktarının arttığı görülmüştür (48).

Somatik ve psikiyatrik hastalıklar: Düşük ve yüksek amilaz konsantrasyonlarına bağlı somatik hastalıklar görülmektedir. Bu hastalıklar göz önüne alınarak çalışmalar yapılmalıdır.

2.7. Tükürük α -Amilazı ve Otonom Sinir Sistemi

Otonom sinir sistemi istem dışı çalışan, iç organ düz kaslarını kontrol eden bir sistemdir. Somatik aktiviteler sonucu oksijen ihtiyacının artması, kaslarda kan dolaşımı artışının sağlanması, iç organlarda etken olan otonom aktiviteyle sağlanmaktadır. Otonom sinirler sadece iç organ düz kaslarındaki kassal aktiviteleri düzenlemez, bazı hormonların salgılanmasında uyarılarak hormonal bir etkide sağlamaktadır (49). Örneğin stres koşullarında böbrek üstü bezinden epinefrinin salgılanması ve birçok organı etkilemesi bu duruma örnektir.

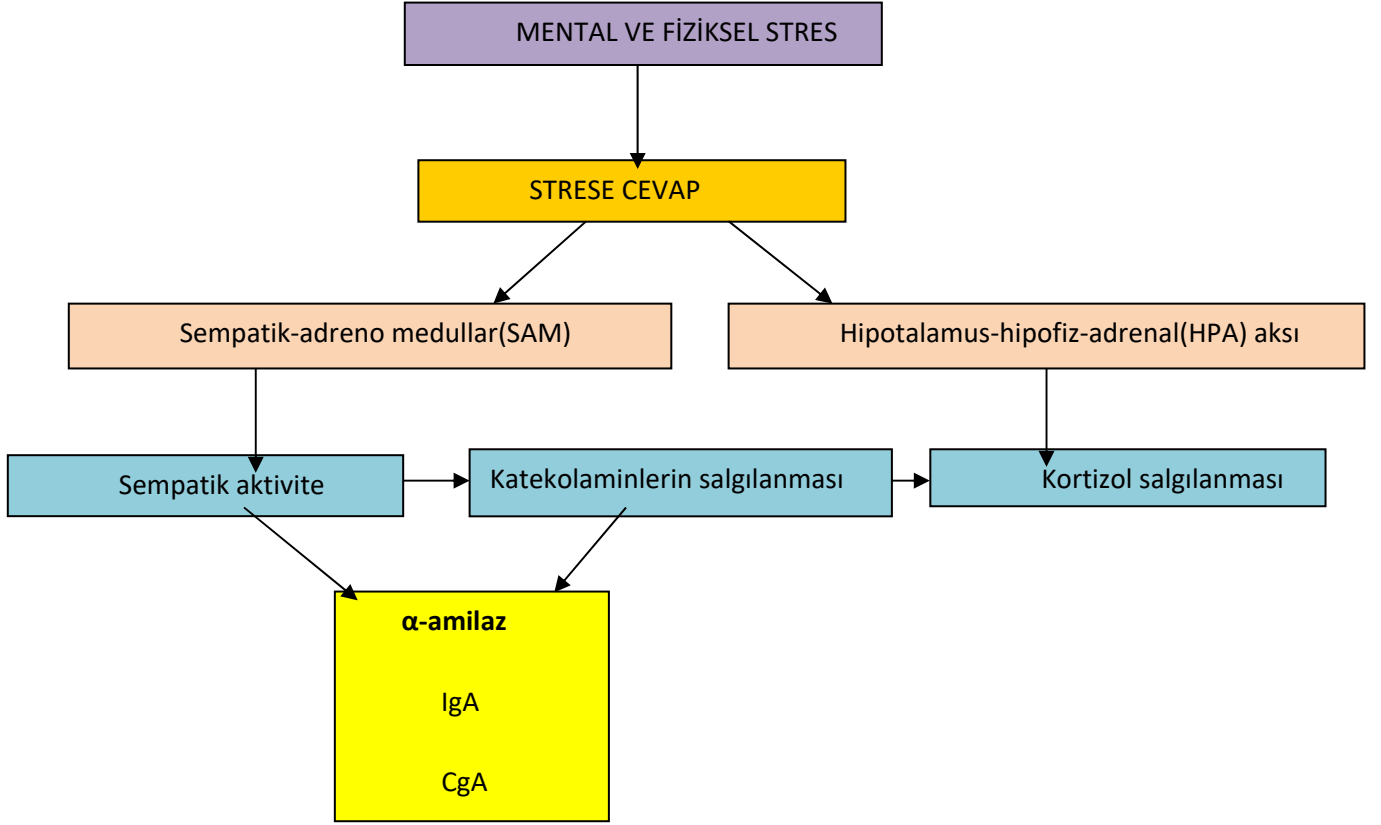
Otonom sinir sisteminin etkisi sempatik ve parasempatik kollar üzerinden gerçekleşir. Otonom sinir sistemi üzerinden etki eden sempatik ve parasempatik uyarılmaların tükürük salgılamadaki etkileri Tablo 2.2’de gösterilmektedir. Sempatik ve parasempatik otonom sinirler omurilikten çıkan afferent ve efferent yollar aracılığıyla kontrol edilirler. Sempatik sinirlerin ganglionları omuriliğin hemen dışında bulunur ve sempatik sinirlerin preganglionik efferentleri torako-lumbal bölgeden çıkarlar. Parasempatik ganglionlar ise sinirlendirdikleri organın yakınında bulunmaktadır ve preganglionik sinirleri ise kranio-sakral bölgesinden çıkar. Sempatik ve parasempatik sinirlerin aynı organ üzerindeki etkileri birbiriyle antagonisttir (49).

Parasempatik nöronlar muskarinik ACh reseptörlerini etkileyerek işlev görmektedirler (50, 51). Sempatik nöronlar ise α - ve β -adrenerjik reseptörler yoluyla etkilerini göstermektedirler (44). α -Adrenerjik reseptörlerin α -1 ve α -2 adlı alt tipleri vardır. α -1; Ca^{++} değişimlerinde rol oynarken, α -2 adenilat siklazı inhibe etmektedir (52). β -Adrenerjik reseptörler β -1 ve β -2 olarak ikiye ayrılmaktadır. β -1 reseptörünün görevi adenilat siklazı stimüle etmek ve α -amilazı uyarmaktır, β -2 reseptörünün görevi ise adenilat siklazı stimüle etmektir (53). Tükürük α -amilazı β -adrenerjik uyarılara cevap olarak tükürük bezlerinden salgılanmaktadır (52, 54).

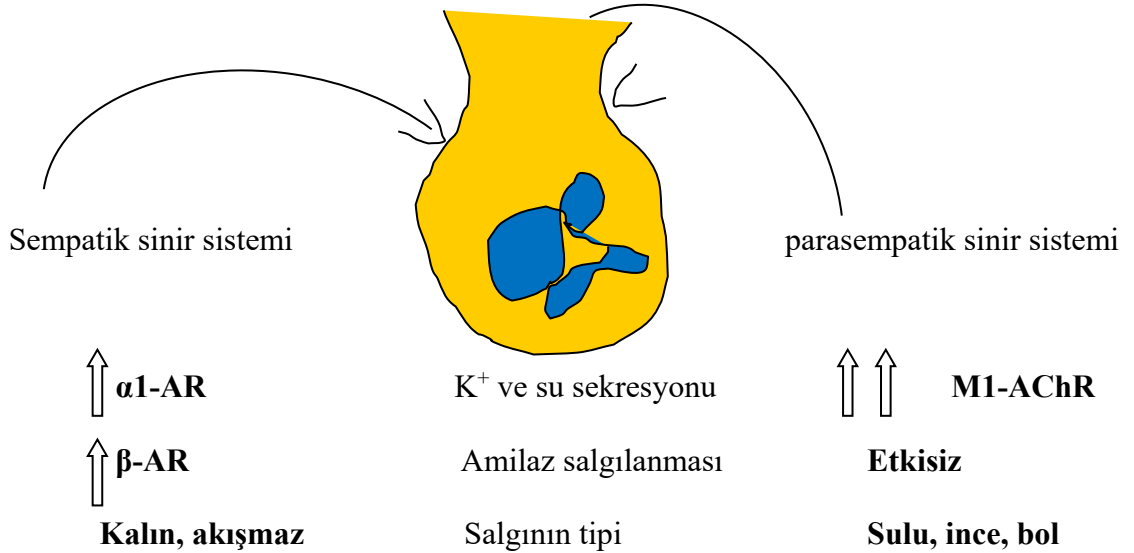
Tablo 2.2. Otonom sinir sistemi üzerinden etki eden sempatik ve parasempatik uyarılmaların tükürük salgımadaki etkileri (55).

Sempatik Uyarı	Parasempatik Uyarı
Vazokonstriksiyon	Vazodilatasyon
Salgı yapımında azalma	Salgı yapımı artar
Mukus bir salgı oluşur	Sulu bir salgı oluşur
pH azalır	pH artar
Akış hızı azalır	Akış hızı artar

Esasen strese karşı vücudun cevabı 2 yolak üzerinden olmaktadır. Bunlardan, SAM sistemi, sempatik deşarja yol açarak veya katekolaminlerin salgılanması yoluyla α -amilaz aktivitesini artırabilirken, hipotalamo-pitiüter-adrenal eksen aktivitesi de kortizol salgılanması yoluyla vücudun strese karşı savaşımını aktive etmektedir (56-59)(Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Tükürük α -amilaz enziminin strese cevap olarak Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksı (HPA) ve Sempatik-adreno medullar(SAM) aktivitesi sonucu salgılanması (2).



Şekil 2.6. Tükürüğün salgılanmasında sempatik ve parasempatik sinir sisteminin etkilerinin özeti

2.8. α -Amilaz, Otonom Sinir Sistemindeki Değişiklikleri Nasıl Yansıtır?

Fizyopatolojik analizlerde sıklıkla kullanılan vücut sıvısı kan ve idrar olup tükürüğün de önemi giderek artmaktadır. Tükürük örneklerinin ağrısız, non-invaziv bir şekilde toplanması, herhangi bir ekipmana ihtiyaç duyulmaması ve en önemlisi stres parametrelerinde önemli bir yere sahip olan enzim ve hormonları içerisinde barındırması sebebiyle son yıllarda bilimsel çalışmalarda kullanılan bir parametre haline gelmiştir (35).

Plazma örneği elde edebilmek invaziv bir girişim gerektirmektedir. Bu tür bir uygulama dakişilerin strese girmelerine sebep olabilmekte ve analiz sonuçlarını değiştirebilmektedir. Ayrıca kan almak için eğitim almış bir personele ihtiyaç duyulmaktadır. Öte yandan, idrar örnekleri non-invaziv ve acısız elde edilebilmekte olmasına rağmen, tüketilen su miktarından etkilenmesi ve toplanmasının nispeten zor olması nedeniyle bilimsel çalışmalarda kullanımı daha düşüktür (35).

Psikonöroendokrinolojik araştırmaların özel bir alanı stres üzerine odaklanmaktadır. Hayatın her alanında etkili olan stresin çok fazla olması vücuda zararlı etkiler vermektedir. Bu yüzden stres araştırmalarının amacı, stresin yükünü en iyi şekilde anlamak ve onu belirleyebilmek için ölçümler geliştirmektir. Bu sebeple son yıllarda stres parametreleri üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. Stresle ilişkili değişiklikler için geçerli ve güvenli ölçümler uygulanmalıdır. Ayrıca, numunelerin kolay alınması ve strese yol açmaması da gereklidir. Tükürükte α -amilaz enzim aktivitesinin ölçümü bu kriterleri sağlamakta ve strese ilişkili değişiklikleri yansıtan bir parametre olarak kullanılmaktadır. Tükürük α -amilazı, tükürük bezleri tarafından otonom sinir sisteminin aktivasyonu sonucunda salgılanan bir enzimdir. Fizyolojik stressörler de psikolojik stressörler kadar tükürük α -amilazının stresle olan ilişkisinin gösterilmesinde kullanılmaktadır (35).

2.9. Tükürük α -Amilazı Plazma Katekolaminleri İçin Bir İndikatörmüdür?

Bilimsel çalışmalar çeşitli stres koşullarında tükürük α -amilazının artmasının, α -amilazın stres belirteci olabileceğini düşündürmüştür. Son yapılan çalışmalar (fiziksel stres; koşu, egzersiz, sıcak ve soğuğa maruz bırakma ve fizyolojik stres; sınav) tükürük α -amilaz salınımı ile stresli koşullar arasında bir ilişki olduğunu ve hem fiziksel hem de psikolojik stres altında konsantrasyonunun arttığını göstermektedir. Bu artışa plazma katekolaminlerindeki (epinefrin ve norepinefrin) artış eşlik etmektedir (60). Sonuç

olarak tükürük α -amilaz enziminin plazma katekolaminleri için (özellikle norepinefrin) bir indikatör olduğu görülmektedir (61).

2.10. Tükürük α -Amilazı Fizyolojik Strese Duyarlıdır?

Stres eksenleri hipotalamo-pituiter-adrenal (HPA) ve sempato-adreno medullar (SAM) eksenlerdir (62). HPA aksının son ürünü kortizol olup stres çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Öte yandan α -amilaz da SAM'ın bir göstergesi olup bu konuda da son yıllarda önemli çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (63).

Yapılan çalışmalarda fizyolojik stres koşulları altında α -amilazın arttığı bildirilmiştir. α -Amilazın stres durumlarında artışının mekanizması veya fizyolojik faydası henüz tam olarak açıklanmamıştır.

2.11. α -Amilaz Enziminin Non-İnvaziv Ölçümü

Tükürük α -amilaz enzimi vücuttan kolay elde edilebilen bir sıvı olması ve stres parametresi olarak kullanılması açısından stres araştırmalarında önem arz etmektedir.

α -Amilaz enziminin tükürükte ölçümünün avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Ağrısız, non-invaziv ölçüm olması
- Tükürük örneklerinin tüm zamanlarda uyku hariç kolaylıkla toplanabilir olması
- Stres şartlarında iyi bir materyal olması
- Beyaz önlük korkusunun giderilmesi
- Birden fazla örnek alınmasında kolaylık sağlaması
- Ekipman ve tıbbi personele ihtiyaç duyulmaması
- Ekonomik ve kullanımının kolay olması
- Uzun süre saklanabilmesi (oda sıcaklığında 3 hafta, dondurucuda uzun süre saklanabilir)

Tüm bu avantajlarından dolayı son yıllarda tükürük α -amilaz analizi stres araştırmaları için tercih edilmektedir.

2.12. Deneysel Çalışmalar

Tükürük α -amilazı ile ilgili olarak yapılan çalışmalar iki grup altında toplanabilir. Sıçanlarda yapılan çalışmalar çoğunlukla farmakolojik ajanların uygulanmasını veya cerrahi operasyonları kapsarken; insanlarda yapılan çalışmalar ise çoğunlukla stres eksenin aktivitesini belirlemeye yönelik olmuştur.

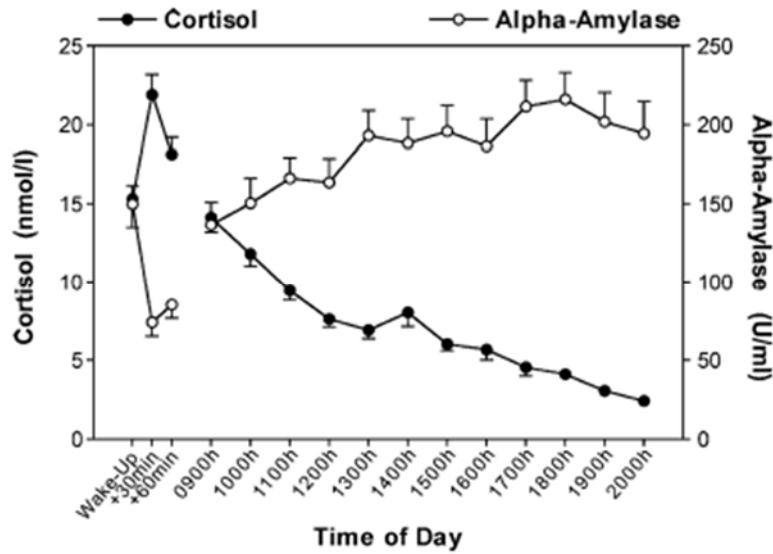
2.12.1.Sıçanlar Üzerinde Yapılan Deneysel Çalışmalar

Bu çalışmalar sempatik ve parasempatik farmakolojik ajanların α -amilaz ile ilişkisini ortaya koymak üzere yapılmışlardır. Batzri ve arkadaşları, ratların parotis bezlerinde tükürük α -amilazının salınımında beta adrenerjik reseptörlerin önemli olduğu belirlenmiştir (64, 65). Busch ve arkadaşları, ratların parotis ve submandibular bezlerinde amilaz salınımındaki farklılıkları araştırmışlardır. İsoproterenol denilen beta adrenerjik agonisti kullanmışlardır. İlaç alındıktan sonra submandibular bezde bir değişiklik gözlenmezken, parotis bezinde α -amilaz salınımında önemli bir artış belirlemişlerdir (66, 67). Daha sonra aynı çalışmada atenolol (β -1 antagonisti) ve butoxamine(beta 2 antagonisti) ilaçları ayrı ayrı verilmiştir. Butoxamine α -amilaz salınımını inhibe etmezken, atenolol'un inhibe ettiği görülmüştür (50). Anderson ve arkadaşları, ratlara ayrı ayrı sempatik ve parasempatik uyarı vermişlerdir. Sempatik uyarı sonucunda; tükürük akış hızında azalma gözlenirken, toplam protein artmıştır. Parasempatik uyarı sonucunda; tükürük akış hızında artış gözlenirken, protein içeriğinde azalma gözlenmiştir. Daha sonra bu ratlara adrenalectomi yapıldığında, α -amilazda düşüş gözlemiştir (68).Bu çalışmalar sonucunda, sıçanlarda α -amilaz salınımında adrenal katekolaminlerin önemli olduğu ve salınımın β -1 adrenerjik reseptörler yoluyla oluştuğu belirlenmiştir.

2.12.2. İnsanlar Üzerinde Yapılan Stres Çalışmaları

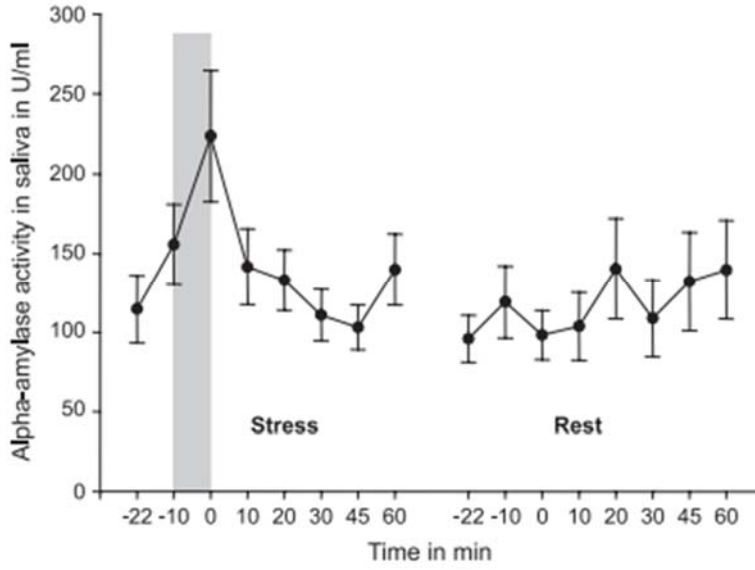
İnsanlarda ısı stresinin, psikolojik stresin ve farmakolojik ajanların tükürük α -amilaz salınımı üzerine etkileri incelenmiştir. Bu bağlamda, Speirs ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada kişiyi belinden aşağıya soğuk suya (4-5°C) maruz bırakmışlar ve sonrasında da isoprenalin ve propanalol verilmişlerdir. İsoiprenalin'in α -amilaz seviyesini yükselttiği, propanalol'un ise düşürdüğü gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, insanlarda da amilaz sekresyonunun sempatik kontrolle oluştuğubelirlenmiştir(69).Bosch ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada sınavdan 30 dakika önce, 2 hafta sonra ve 6 hafta sonra tükürük örnekleri almışlardır. Stres koşullarında amilaz üretiminin arttığı fakat tükürük akış hızının değişmediği belirlenmiştir (70). Laurikainen ve arkadaşları, timolol maleat denilen beta bloke edici bir ilaç kullanmışlardır. Kişi ilacı kullandıktan sonra amilaz seviyesinde düşüş gözlenmiştir (71).Gilman ve arkadaşları, bir grup kişiyi 8 gün boyunca basınca maruz bırakmışlardır. Çalışma sonunda α -amilaz konsantrasyonunda önemli bir artış

gözlenmiştir (72). Skosnik, bir grup kişiye stres içerikli bir video izletmiştir. Videoyu izledikten 15 dakika sonra α -amilazda önemli bir artış bulunmuştur (73). Noto, bir grup kişiye stresli video izlettirirken, bir grup kişiyede dinlendirici video izlettirmiştir. Stres içerikli video izleyenlerde kortizol ve α -amilazda artış görülürken; dinlendirici video izleyenlerde kortizolde değişiklik gözlenmemiş fakat α -amilaz seviyesinde düşüş gözlenmiştir (74). Rohleder ve arkadaşları, sabahın erken saatlerinde kortizol seviyesinde artış gözlenirken, öğleden sonra belirgin şekilde düşüş gözlemiştir. Aksine; α -amilaz seviyesi sabahın erken saatlerinde düşükken, öğleden sonra belirgin şekilde artmıştır. Yani kortizol ile α -amilaz arasında ters bir ilişki bulunmuştur (75). Başka bir çalışmada 27 sağlıklı yetişkin birey TSST (Trier social stress test) olarak bilinen sosyal stres testine maruz bırakılmış ve 10, 20, 30, 45 ve 60. dakikalarda tükürük örnekleri alınmıştır. Strese maruz bırakıldıktan sonra α -amilaz düzeyinde önemli bir artışın gözlendiği bildirilmiştir (Şekil B). Nater ve arkadaşları, 30 sağlıklı bireyde TSSTve zihinsel aritmetik protokolü sırasında alınan numunelerde; sempatik aktivite artışına bağlı olarak α -amilaz düzeyinde anlamlı bir artış belirlenmiştir. Aynı çalışmada, plazma norepinefrin ve epinefrin konsantrasyonu stres testinin başlamasından 15-20 dakika sonra pik yapmış ve bu artış tükürükte α -amilaz düzeyinin artışıyla paralel seyretmiştir (76) (Şekil C). Başka bir çalışmada da 12strese maruz kalan bireylerde tükürük α -amilaz enzimlerinde artışın yine plazma noradrenalin düzeylerinin artışıyla eşzamanlı olduğu belirlenmiştir (75) (Şekil D).



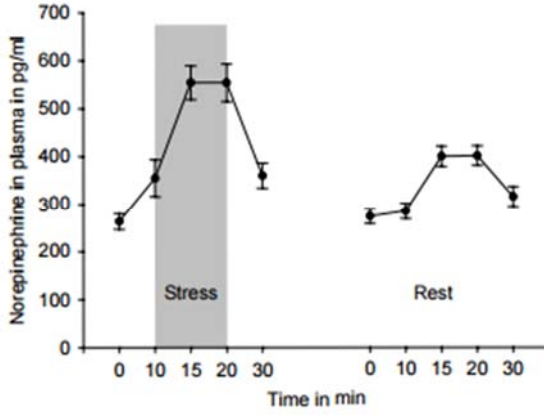
Şekil 2.7. Tükürük kortizol ve α -amilaz salınımında gün içinde meydana gelen değişiklikler. Çalışmaya 76 sağlıklı erkek ve bayan katılmıştır. Kortizol salınımında uyanma ile birlikte artış gözlenirken, α -amilaz salınımında azalma gözlenmiştir. Öte yandan, kortizol salınımı gece

saatlerine doğru en düşük seviyeye inerken α -amilaz salınımı en yüksek düzeylere çıkmaktadır (77).

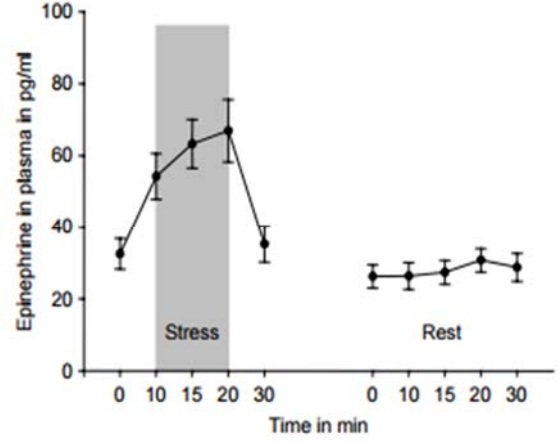


Şekil 2.8. Tükürük α -amilaz düzeyinin stres uygulanmasını (gri renkle gösterilen zaman dilimi) takiben artışı ve dinlenme döneminde bazal seviyeye geri dönüşü. Bu çalışmada, 27 erişkin katılımcıya TSST (Trier social stress test) adı verilen bir sosyal stres testi uygulanmış ve bunun α -amilaz düzeyini artırdığı belirlenmiştir.

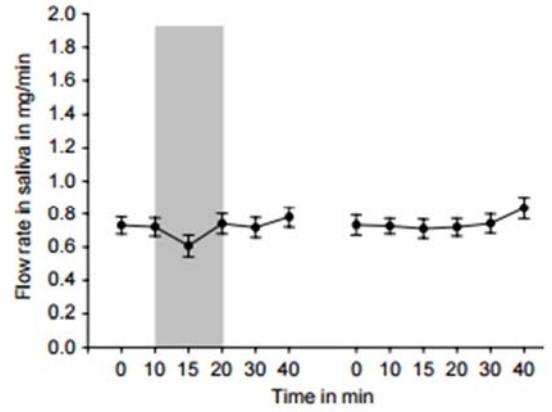
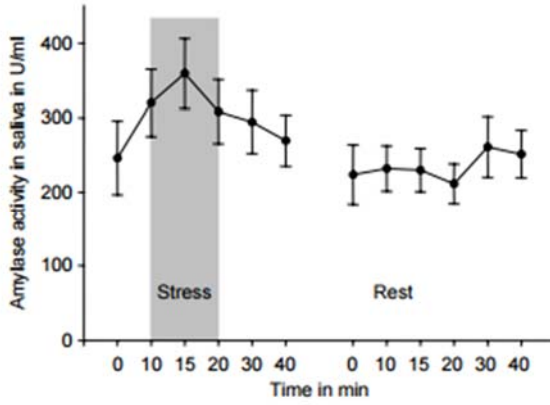
A)



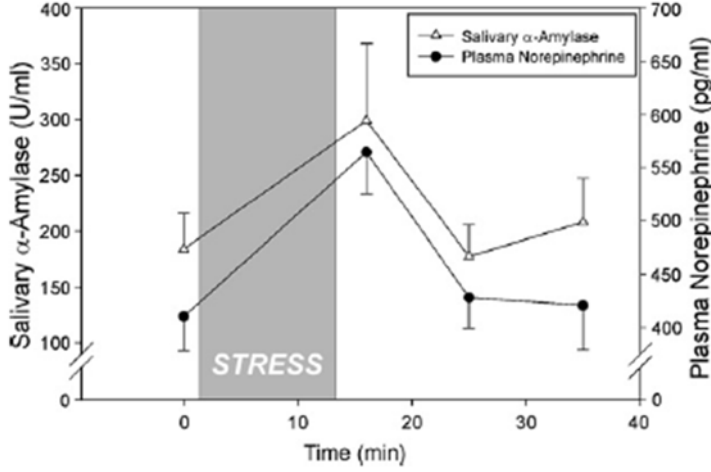
B)



C)



Şekil 2.9. Sağlıklı genç erkeklere (n=30) TSST uygulandığında (gri zaman dilimi) plazma norepinefrin (A) ve epinefrin (B) düzeyleri ile birlikte tükürük α -amilaz düzeyinde ve tükürük akış hızında meydana gelen değişiklikler (C)(76). Stres uygulamasıyla birlikte plazmada norepinefrin ile epinefrinin artış göstermesiyle eşzamanlı olarak tükürükte de α -amilaz düzeylerinde bir artış gözlenmiştir. α -Amilaz düzeyinde meydana gelen artışın, tükürük akış hızıyla ilişkili olmadığı da gösterilmiştir.



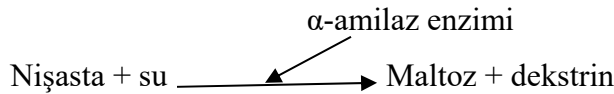
Şekil 2.10. TSST uygulanan sağlıklı erkek ve bayan bireylerde (n=12), tükürük α-amilaz ve plazma norepinefrin düzeylerinde meydana gelen eşzamanlı değişiklikler (75).

2.13. α-Amilaz Aktivitesini Ölçüm Yöntemleri

2.13.1. Nişasta-İyodin Yöntemi

Nişasta-iyodin metodunun amacı, α-amilaz enziminin glikozlar arasındaki bağı kırarak nişasta ile iyodin arasında bir etkileşim oluşturması (Şekil 2.11) ve mavi-mor renk açığa çıkartmasıdır. Böylece α-amilazın aktivitesini ölçebilmektir.

Nişasta amiloz ve amilopektin denilen iki gruptan oluşmaktadır. Amiloz lineer bir moleküldür. Birbiri ardınca dizilen glikoz moleküllerinden dolayı bir sarmal oluştururlar. İki tane amiloz molekülü birbirine sarılarak bir çifte sarmalda oluşturabilmektedir. İyot molekülleri bu sarmalların içerisine girerek mavi-mor bir renk oluştururlar. Amilopektin ise çalı gibi merkezden dallanan bir şekle sahiptir(78).

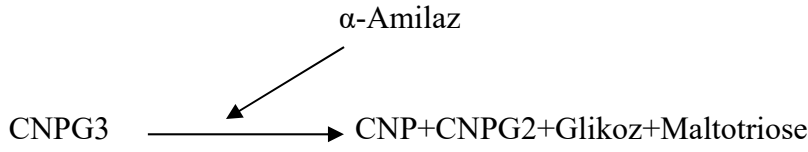


Şekil 2.11. α-Amilaz enziminin nişastayı parçalaması ve oluşan ürünler

2.13.2. CNPG3 Yöntemi

CNPG3 metodunun esas amacı bir substrat gibi enzime bağlanarak işlev görmesidir. Enzim substratına bağlanır ve sarı bir renk oluşturur. Böylece α-amilazın

aktivitesi ölçülebilmektedir(79, 80). CNPG3 substratının amilaza bağlanması ve açığa çıkan ürünler Şekil 2.12’de gösterilmiştir.

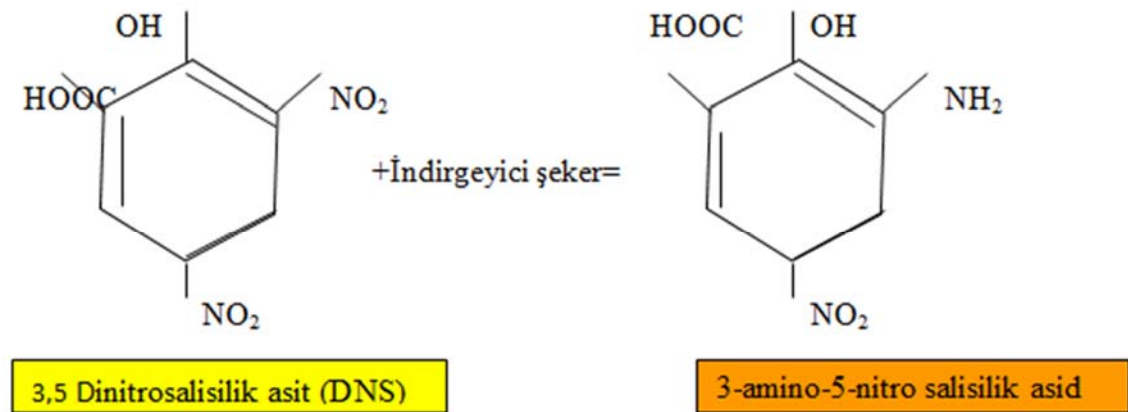


Şekil 2.12. CNPG3 substratının amilaza bağlanması ve açığa çıkan ürünler

2.13.3. DNS Yöntemi

DNS metodu α -amilaz aktivitesini ölçmek için kullanılan bir yöntem olup(81), indirgenen şeker miktarını ölçmeye dayalıdır. Bir numunedeki indirgeyici şeker konsantrasyonunu tahmin edebilmek için DNS yöntemi kullanılmaktadır. İndirgeyici şekerler, reaktiflerin çoğunu azaltma özelliğine sahip olan serbest karbonil grubunu içerirler. Tüm monosakkaritler ve bazı disakkaritler indirgeyici şekerlerdir (82).

3,5-DNS indirgeyici şekerlerle reaksiyona girdiğinde turuncu renkte 3-amino-5 nitrosalisilik asit meydana gelir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. 3,5-DNS’nin indirgeyici şekerle reaksiyona girerek 3-amino-5 nitrosalisilik asidi meydana getirmesi

2.14. Tezin Amacı

Tükürük α -amilaz enzimi stresin objektif olarak ortaya konmasını sağlayan bir belirteç olduğundan, mevcut tezin amacı tükürükte α -amilaz enziminin aktivitesini

ölçen üç yöntemi kurarak karşılaştırmak ve stres fizyolojisinde kullanılabilirliğini araştırmaktı. Bu bağlamda, tez çalışması iki aşamadan oluşmuştur: (1) Nişasta-iyodin, CNPG3 ve DNS yöntemlerini kurarak alfa-amilaz enzim aktivitesini tükürükte ölçerek avantaj ve dezavantajlarını ortaya koymak, (2) Bu yöntemlerle ölçülen alfa-amilaz aktivitesinin fizyolojik şartlar altında değişimini izlemek üzere ulusal okçuluk yarışmasına katılan profesyonel okçularda sabah uyanma döneminde ve yarışma sürecinde alfa-amilaz enzim aktivitesini belirlemektir.

3. MATERYAL VE METOT

Mevcut tez çalışmasında, α -amilaz enzim aktivitesini ölçmek için aşağıda sıralanan analizler yapılmıştır.

- α -amilaz enzimi ile ilgili yapılan çalışmalar
- Nişasta-iyodin metodu çalışmaları
- CNPG3 metodu çalışmaları
- DNS metodu çalışmaları
- Profesyonel okçularda α -amilaz aktivitesinin ölçümü

3.1. α -Amilaz Enzimi

Çalışmada kullanılmak üzere aspergillus oryzae'dan elde edilen amilaz ticari olarak satın alınmıştır. α -Amilaz enziminin saf suda çözündüğü bildirilmiş olmasına rağmen, birçok deneme yapılmış fakat tam çözünme sağlanamamıştır. Öte yandan, insan tükürüğünden α -amilaz enzimini saflaştırmak için birtakım çalışmalar yapılmıştır. Fakat saflaştırma işlemi belli bir düzeye ulaşamadığından insan tükürüğünden elde edilen α -amilaz enzimi ticari olarak satın alınmış ve PBS'de tam olarak çözünmüştür.

Çalışmalara tükürükten elde edilen α -amilaz enzimi ile devam edilmiştir. Testlerin standart eğrileri oluşturulmuş olup, bu amaçla α -amilaz enzimi farklı oranlarda sulandırılmıştır.

3.1.1. α -Amilaz Enzimini Saflaştırma Yöntemi

İnsan tükürüğünden α -amilaz enziminin saflaştırılabilmesi için kullanılan yöntem aşağıda özetlenmiştir;

- 3 ml'lik tükürük toplandı.
- 1,5 ml'lik iki tüpe alındı ve 8.000 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
- Her bir tüpten 1 ml süpernatant alındı.
- Üzerlerine 600 μ l ethanol damla damla eklendi.
- 10.000 rpm de 10 dk santrifüj edildi.
- Her iki tüpten 1ml süpernatant alındı.
- Üzerlerine 60 μ l PBS, 50 μ l glikojen reaktifi ve 80 μ l ethanol eklendi.
- Tüpler 5 dk buz üzerinde tutuldu.
- Tüplerin süpernatant kısımları boşaltıldı.

- Tüplerde kalan pelet üzerine 750 µl su, 72 µl PBS ve 600 µl etanol eklendi.
- 5.000 rpm de 3 dk santrifüj edildi.
- Süpernatantları boşaltıldı.
- Pelet kısımların üzerine 400 µl PBS eklendi.
- Spektrofotometrede 280 nm’de okundu.

3.2. Nişasta-İyodin Metodu

Nişasta-iyodin metodunda ilk olarak nişasta ile ilgili çalışmalar yapıldı. Hazır olarak aldığımız nişasta %1 lik oranında sıcak suda, soğuk suda, kaynar suda ve buzlu suda hazırlandı. Daha sonra aynı oranda iyodin damlatılarak renk oluşumu gözlemlendi. Öte yandan, %1’lik nişasta solüsyonu hazır olarak alındı ve aynı işleme tabi tutuldu. Tüm nişasta-iyodin tepkimeleri sonucu oluşan renkler karşılaştırıldı ve mevcut çalışma için en uygun nişasta-iyodin çözeltisinin hazır sıvı olan çözelti olduğuna karar verildi (Şekil 3.1 ve 3.2).



Şekil 3.1. Hazır nişasta solüsyonu ile laboratuvarda hazırlanan nişasta solüsyonunun iyodin damlatıldıktan sonraki renk oluşumları. Sol tarafta lacivertimsi rengin olduğu beherde hazır %1’lik nişasta solüsyonu kullanılırken, sağ tarafta kırmızımsı renk oluşumunun gözlemlendiği beherde laboratuvarda hazırlanan %1’lik nişasta solüsyonu kullanılmıştır.



Şekil 3.2.Hazır nişasta solüsyonu ile laboratuvarında hazırlanan nişasta solüsyonunun α -amilaz enzimi eklendikten sonraki renk değişimleri.

3.2.1.Nişasta Çözeltisinin Hazırlanması

Nişasta soğuk suda çözünmez fakat sıcak suda çözünür. Nişasta çözeltisi hazırlayabilmek için 1g nişasta 100 ml suda çözdürüldü (%1).

3.2.2.Nişasta-İyodin Metodunda Standart Eğrinin Oluşturulması Protokolü

Standart eğri oluşumunda α -amilaz birçok kez sulandırılarak en uygun konsantrasyonun aşağıdaki gibi olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 3.1.Nişasta-iyodin metodu standart eğri oluşumu için seyreltme oranları

STANDARTLAR	U / ml
1.standart	30
2.standart	3
3.standart	1,5
4.standart	0,6
5.standart	0,3
6.standart	0,15
7.standart	0,06

Numunelerin okunabilmesi için belli bir aralığa kadar numuneler seyreltildi. Deneyin yapılma yoluyla yapılan bu işlemler sonunda numuneler yine de okunmadıysa tekrar seyreltilerek testte yeniden çalışıldı. Bu amaçla seyreltme işlemlerinde tampon solüsyon (PBS) kullanıldı.

Tablo3.2.Nişasta-iyodin metodunda numunelerin seyreltme oranları

SULANDIRMA ORANLARI
1
1/10
1/100
1/500
1/1000
1/2000
1/4000
1/10000

3.2.3. PBS Hazırlanması

Numunelerin sulandırılması ve metotların çalışması için PBS tampon çözeltisi (pH=7,2) aşağıdaki gibi hazırlanmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3.PBS özeltisinin hazırlanması (1000 ml için)

NaH₂PO₄.H₂O (g)	1,265
Na₂HPO₄.12H₂O (g)	12,100
NaCl (g)	8,500
Thimerosal (g)	0,200

3.2.4. Nişasta-İyodin Testinin Protokolü

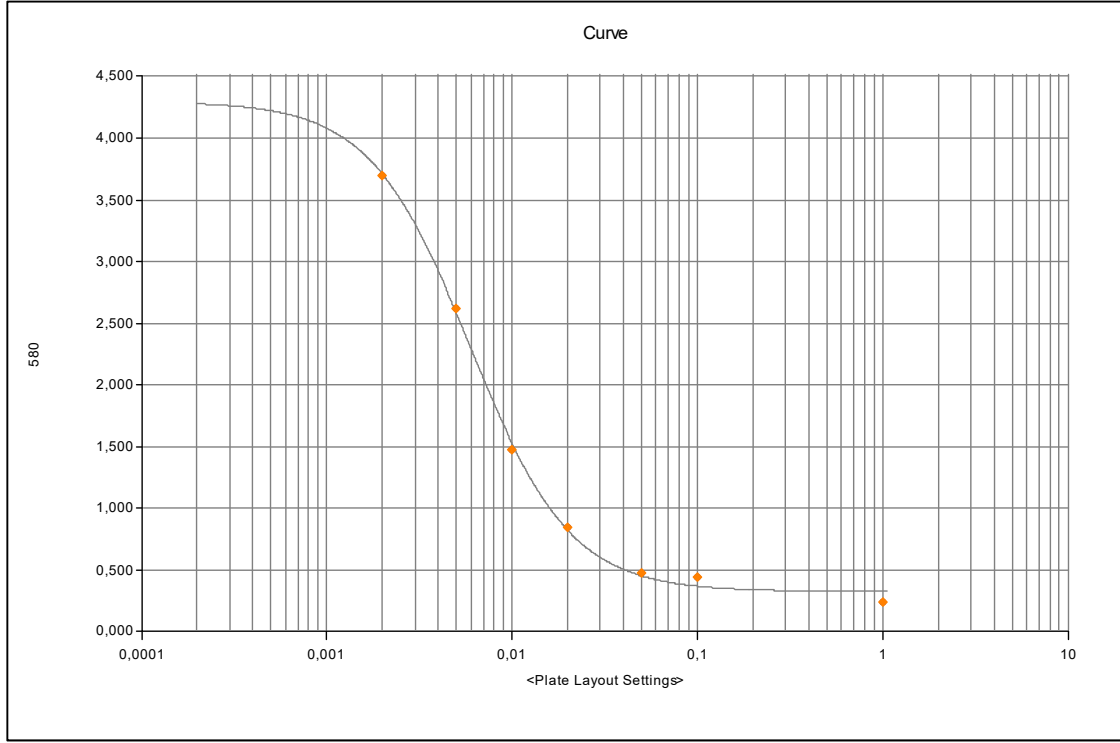
Tükürük örneklerinden α -amilaz aktivasyonunu belirleyebilmek için nişasta-iyodin yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin çalışma protokolü aşağıda özetlenmiştir;

- 40 μ l nişasta solüsyonu her kuyucuğa pipetlendi.
- Tüm kuyucukların üzerine 40 μ l tükürük(α -amilaz) eklendi.(5-10 saniye hafifçe çalkalandı.)
- 30 dakika etüvde(50 derecede) inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklara 20 μ l HCl solüsyonu eklendi.

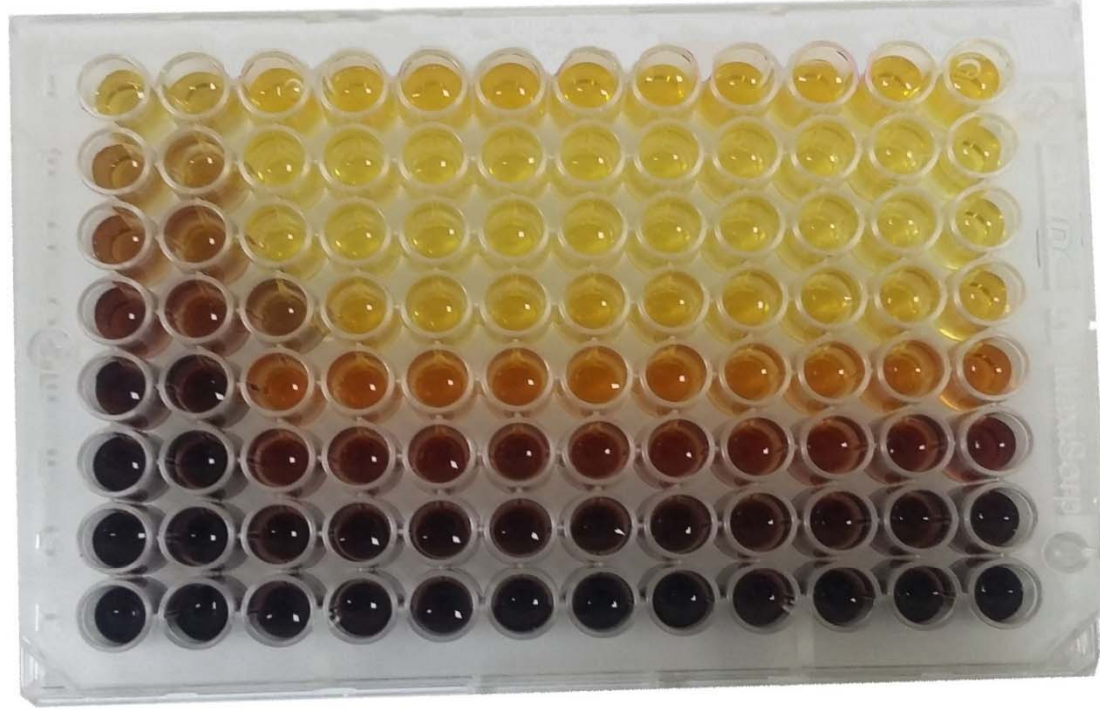
- Tüm kuyucuklara 100 µl iyodin çözeltisi eklendi.
- Plak okuyuculu spektrofotometrede 580 nm'de okundu(83).

3.2.5. Nişasta-İyodin Yöntemi Standart Eğri

Nişasta-iyodin yönteminde kullanılan dışarıdan hazır olarak aldığımız aspergillus oryzae'dan elde edilmiş α-amilaz çeşitli oranlarda sulandırılarak standart eğri oluşturuldu.



Şekil 3.3.Nişasta-iyodin metodu standart eğri



Şekil 3.4.Değişik konsantrasyonlardaki α -amilaz kullanımının oluşturduğu renk değişikliklerinin nişasta-iyodin yöntemiyle gösterilmesi. Nişasta-iyodin testinde sarıdan koyu kahverengiye doğru giden bir renk oluşmaktadır. Bu renk spektrofotometre de okutularak enzimin aktivitesi ölçülmektedir.

3.3.CNPG3 Metodu

CNPG3 kromojeni ticari olarak pazarlanan bir substrattır(84). PBS içerisinde direkt çözünür ve açık sarı bir renk oluşturur. Testin uygulanabilmesi için bir standart eğri oluşturuldu. Bu standart eğrinin oluşumunda α -amilaz enzimi farklı oranlarda birçok kez sulandırıldı.

3.3.1.CNPG3 Metodunda Standart Eğrinin Oluşturulması Protokolü

Standart eğri oluşumunda birçok kez sulandırılmalar yapılmış olup en uygun sulandırmanın aşağıdaki gibi olduğuna karar verilmiştir.

Tablo 3.4. CNPG3 metodu standart eğri oluşumu için α -amilaz enziminin seyreltme oranları

STANDARTLAR	U / ml
1.standart	30
2.standart	15
3.standart	7,5
4.standart	6
5.standart	3,75
6.standart	3

Numunelerin okunabilmesi için belli bir aralığa kadar numuneler seyreltildi. Tüm numunelerin okunmadığı zamanlarda numuneler farklı oranlarda tekrar seyreltilerek okundu. Seyreltme işlemleri PBS ile yapıldı.

Tablo3.5.CNPG3 metodu için numunelerin seyreltme oranları

NUMUNELER	SULANDIRMALAR
1.numune	1
2.numune	1/5

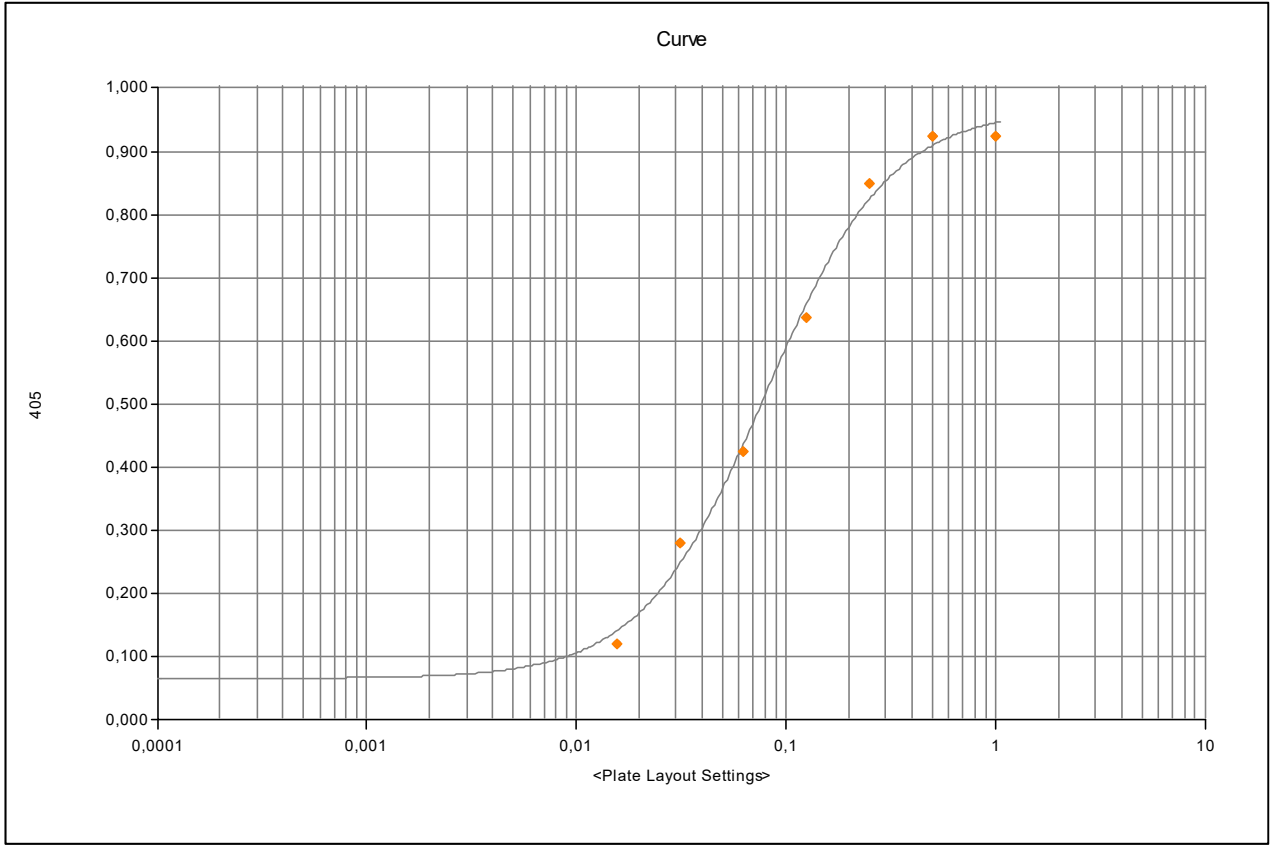
3.3.2. CNPG3 Testinin Protokolü

Tükürük örneklerinden α -amilaz aktivasyonunu belirleyebilmek için CNPG3 yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin çalışma protokolü aşağıda özetlenmiştir;

- 175 µl PBS solüsyonu her kuyucuğa pipetlendi.
- Tüm kuyucukların üzerine 5 µl tükürük (α -amilaz) eklendi. (5-10 saniye hafifçe çalkalandı.)
- 1 saat (37 derecede) inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklara 20 µl CNPG3 solüsyonu eklendi.
- Plak okuyuculu spektrofotometrede 405 nm'de okundu (84-86).

3.3.3. CNPG3 Yöntemi Standart Eğrisi

α -Amilaz enziminin çeşitli oranlarda sulandırılması ile standart eğri oluşturulmuştur.



Şekil 3.5.CNPG3 metodunun standart eğrisi



Şekil 3.6.Değişik konsantrasyonlardaki α -amilaz kullanımının oluşturduğu renk değişikliklerinin CNPG3 yöntemiyle gösterilmesi. CNPG3 testinde CNPG3 maddesinin katılımıyla açık sarı renk oluşmakta ve spektrofotometrede okunarak α -amilaz aktivitesi belirlenmektedir.

3.4. DNS Metodu

DNS testi için ilk olarak DNS çözeltisi hazırlandı.

DNS maddesinin hazırlanması: 100 ml DNS hazırlamak için 1 g DNS 50 ml distile suda çözüldü.

Potasyum sodyum tartarate: Diğer ismi Rochelle tuzudur. 1 molar hazırlanmıştır.

DNS Reaktifi: 1 g DNS 50 ml distile suda çözüldü. 20 ml NaOH ve 28.2 g Rochelle tuzu eklendi. Son olarak distile su kullanılarak 100 ml ye tamamlandı(78).

3.4.1. DNS Metodunda Standart Eğrinin Oluşturulması Protokolü

Standart eğri oluşumunda birçok kez sulandırılmalar yapılmış olup numuneleri okuyabilecek uygun bir standart eğri oluşturulamamıştır.

Tablo3.6.DNS metodu standart eğri oluşumu için α -amilaz enziminin seyreltme oranları

STANDARTLAR	U / ml
1.standart	30
2.standart	3
3.standart	0,3
4.standart	0,03

Test için uygun standart eğri oluşturuldu fakat numuneler seyreltilmelerine rağmen standart eğri aralığında renk yoğunluğu elde edilmedi. Ayrıca DNS testinde kaynatma gibi bir aşama bulunmaktadır. Birkaç örnek için kolay gibi görünse de bir çok numune okunması gerektiğinde pratik gözükmemektedir. Ağız kapalı tüpler içerisinde kaynatma gerçekleşse de tüplerin içerisine su girişi olabilmektedir.

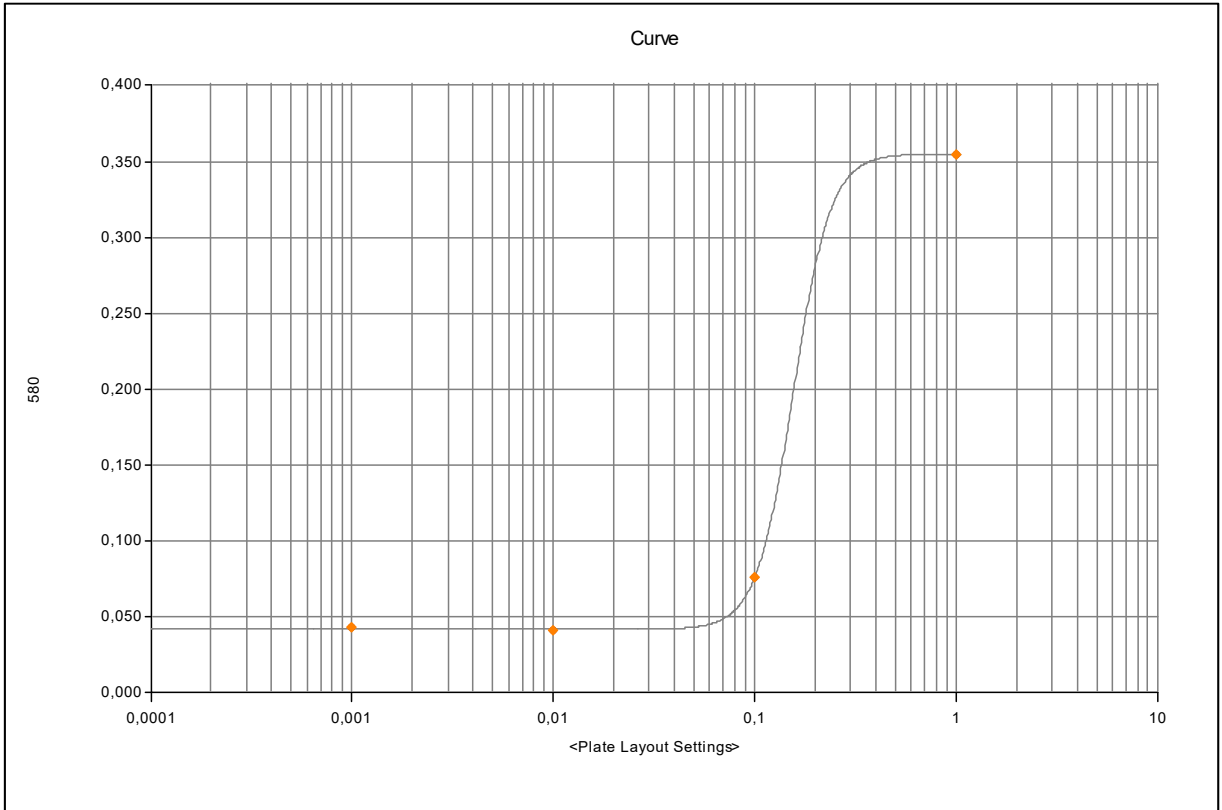
3.4.2. DNS Testinin Protokolü

Tükürük örneklerinden α -amilaz aktivasyonunu belirleyebilmek için DNS yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin çalışma protokolü aşağıda özetlenmiştir;

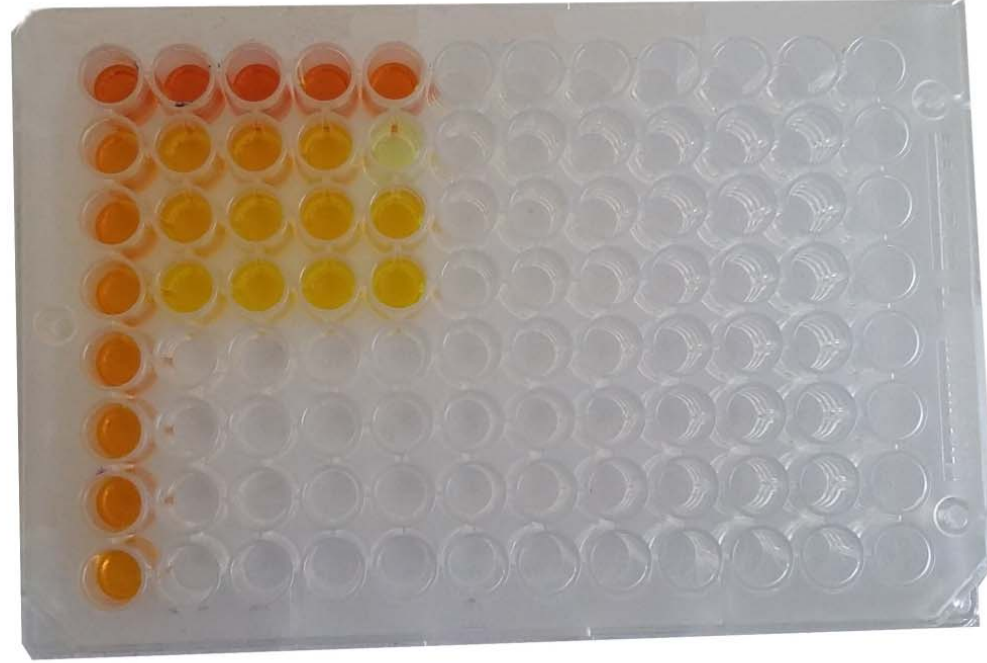
- Her tüpe 0,9 ml substrat ve 0,1 ml enzim eklendi.
- 5 dakika 37 derecede inkübe edildi.
- 1 ml DNS eklendi.
- 10 dakika kaynatıldı ve soğumaya bırakıldı.
- Plak okuyucu spektrofotometrede 540'nm de okundu(87,88).

3.4.3. DNS Yönteminin Standart Eğrisi

α -amilaz enzimi çeşitli oranlarda sulandırılarak standart eğri oluşturulmaya çalışıldı fakat istenilen sonuç elde edilemedi.



Şekil 3.7.DNS metodunun standart eğrisi



Şekil 3.8.Değişik konsantrasyonlardaki α -amilaz kullanımının oluşturduğu renk değişikliklerinin DNS yöntemiyle gösterilmesi.

3.5.Deneme

Bu yöntemlerin kullanılabilirliğini test etmek için salon Türkiye şampiyonasına katılan, 16-20 yaş arası (n=7), olimpik yayla atış yapan, erkek elit sporcunun tükürük örneklerinin bir kısmı α -amilaz (n=140) yönünden incelenmiştir. α -Amilaz analizi yapılan tükürük örnekleri, kapsamlı bir çalışma için alınan örneklerin bir kısmını içermektedir. Söz konusu kapsamlı çalışmanın etik kurul onayı, yürütücü araştırmacının başvurusunu yaptığı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmış olup (OMÜ KAEK 2017/98, Ek:1) başvuruda örneklerin α -amilaz yönünden İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında analiz edileceği belirtilmiştir. Tükürük örnekleri şampiyona sürecindeki 3 farklı günde (sıralama atışları-1. Gün, eleme atışları-2. Gün ve takım atışları-3.gün olmak üzere sabah uyanınca 0, 30, 45, 60. dakikalarda alınmıştır. Ayrıca, birinci sıralama ve ikinci gün eleme atışlarında yarışmadan 30dkve 15 dk öncesinde, yarışma arasında ve yarışma sonrasında α -amilaz analizi için tükürük örnekleri toplanmıştır (89). Sporcuların tükürük α -amilaz seviyeleri nişasta-iyodin yöntemi ve CNPG3 yöntemleriyle ölçülmüştür.

3.5.1. α -Amilaz Enzimi İçin Tükürük Toplanması

Katılımcı bireylerden α -amilaz örneklerinin alınması için aşağıdaki şekilde bir uygulama protokolü hazırlanmıştır(90). Her katılımcıya örnek verme ile ilgili bilgilendirmeler yapılmış ve hazırlanan protokol şeması, ölçeklerle birlikte bireylere verilmiştir. Uygulama aşamaları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:

1-İlk olarak deneklere üzerinde isimlerinin ve dakikaların yazılı olduğu tüpler verilmiştir.

2-Tükürük numunelerini vermeden önce denekler diş fırçalama, yeme içme sigara kafein alma gibi durumlardan uzak tutulmaları için bilgilendirilmiştir.

3-Tükürük numuneleri pasif akış yöntemiyle (passive drool) alınmıştır. Bu amaçla çene göğüs kafesine doğru eğilerek, kendiliğinden ağız içine dolan tükürük tüpe aktarılacak şekilde numuneler toplanmıştır.

4-Alınan tükürük numuneleri, denekler ile iletişime geçilerek gün içerisinde toplanmış ve laboratuvarında -20 derecede muhafaza edilmiştir. Numuneleri gün içerisinde laboratuvara getiremeyen deneklerin ise numuneleri aynı gün kendi buzdolaplarının -20 derece bölmesinde dondurmaları sağlanmıştır. Numuneler laboratuvara getirildiğinde

-40 C’de hemen dondurulmuş ve analizler yapılana kadar burada tutulmuştur (91, 92).

3.6. İstatistiksel Analiz

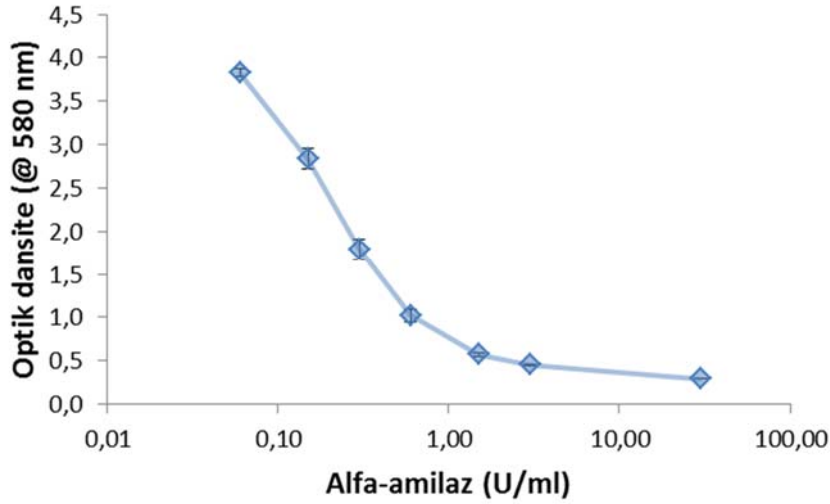
Verilerin analizinde MINITAB (ABD) istatistik programı kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak sunuldu. Standart eğrilerin oluşturulmasında 4-parametre lojistik eğri kullanıldı (Gen5, BioTek Synergy, ABD). Nişasta-iyodin testi ile CNPG3 testi arasındaki ilişki Pearson korelasyonu ile ortaya konuldu. Okçularda α -amilaz değişimi ile ilgili analizler paired-testi ile belirlendi.

4. BULGULAR

α -Amilaz analizleri; nişasta-iyodin testi, CNPG3 kromojen substrat testi ve dinitrosalisilik (DNS) asit testleriyle yapılmış ve elde edilen standart eğriler Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3’de sunulmuştur.

4.1. Nişasta-İyodin Testi Standart Eğrisi

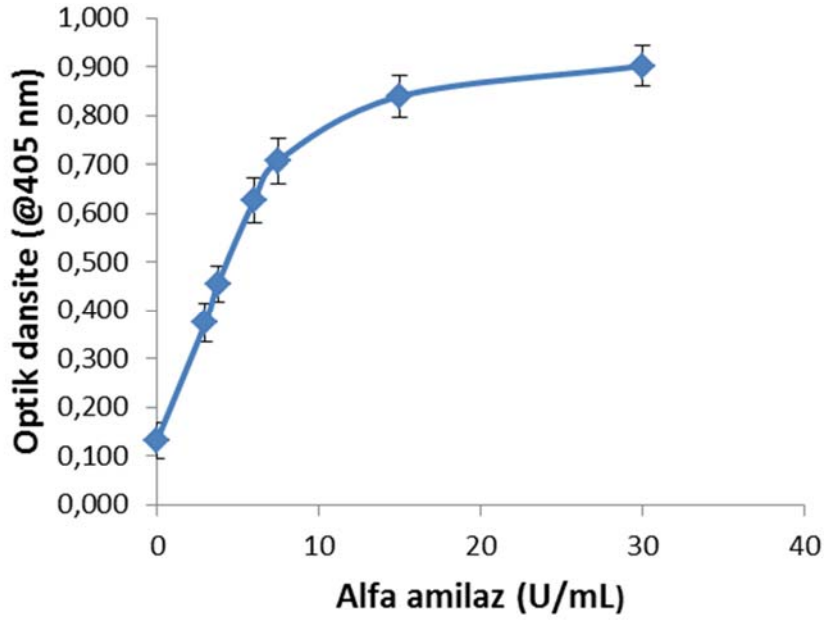
Nişasta-iyodin testiyle elde edilen α -amilaz standart eğrileri 5 testte çalışılmış ve ortalama standart eğri değerleri Şekil 4.1’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Nişasta-iyodin yöntemine göre artan α -amilaz konsantrasyonlarında optik dansitede meydana gelen değişiklikleri gösteren standart eğri. α -amilaz konsantrasyonlarındaki (ünite/ml) değişikliklerin oluşturduğu renk değişimleri spektrofotometrik olarak 580 nm dalga boyunda ölçülmüş ve yukarıdaki standart eğri grafiği elde edilmiştir. Değerler, 5 testte elde edilen değerlerin ortalaması ve standart hatası olarak sunulmuştur. Standart eğrinin 0,06 U/ml ile 1,5 U/ml arasında lineer olduğu belirlenmiştir.

4.2. CNPG3 Testi Standart Eğrisi

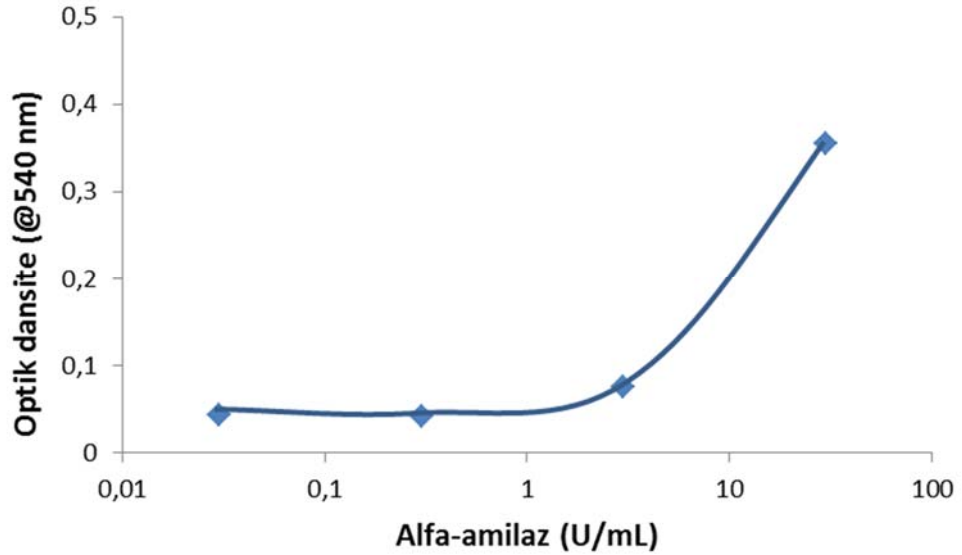
CNPG3 testiyle elde edilen α -amilaz standart eğrileri 13 testte çalışılmış ve ortalama standart eğri değerleri Şekil 4.2’de sunulmuştur.



Şekil 4.2. CNPG3 kromojen substrat yöntemine göre artan α -amilaz konsantrasyonlarında optik dansitede meydana gelen değişiklikleri gösteren standart eğri. Ölçümler 405 nm’de yapılmış olup, 13 standart eğrinin ortalaması olarak sunulmuştur (\pm SEM). Eğrinin 0-7,5 U/mL aralığında lineer olduğu tespit edilmiştir.

4.3. Dinitrosalisilik Asit Testi Standart Eğrisi

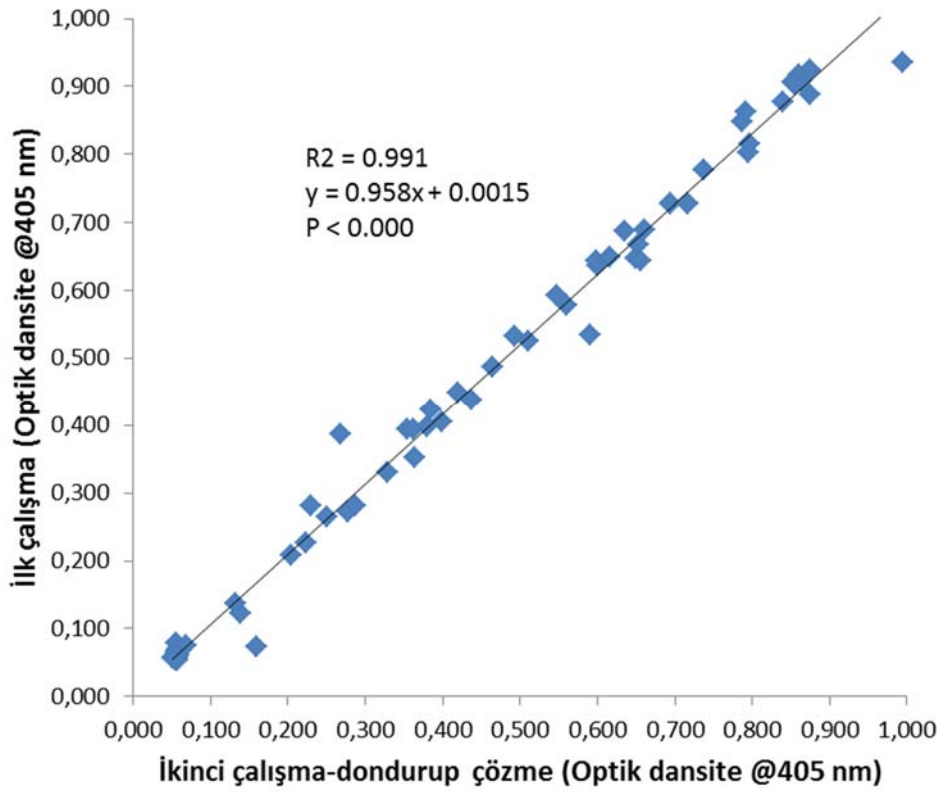
Dinitrosalisilik asit (DNS) testiyle elde edilen α -amilaz standart eğrisi Şekil 4.3’de sunulmuştur.



Şekil 4.3. Dinitrosalisilik asit testinde, α -amilaz konsantrasyonlarındaki artışla birlikte optik dansitede meydana gelen değişiklikleri gösteren standart eğri. Standart egride, 3-30 U/ml arasındaki konsantrasyon farkına karşılık optik dansite de yaklaşık olarak 0,300 birimlik bir değişiklik meydana gelmiştir.

4.4. Örneklerin Dondurulup Çözdürülmesinin α -Amilaz Üzerine Etkisi

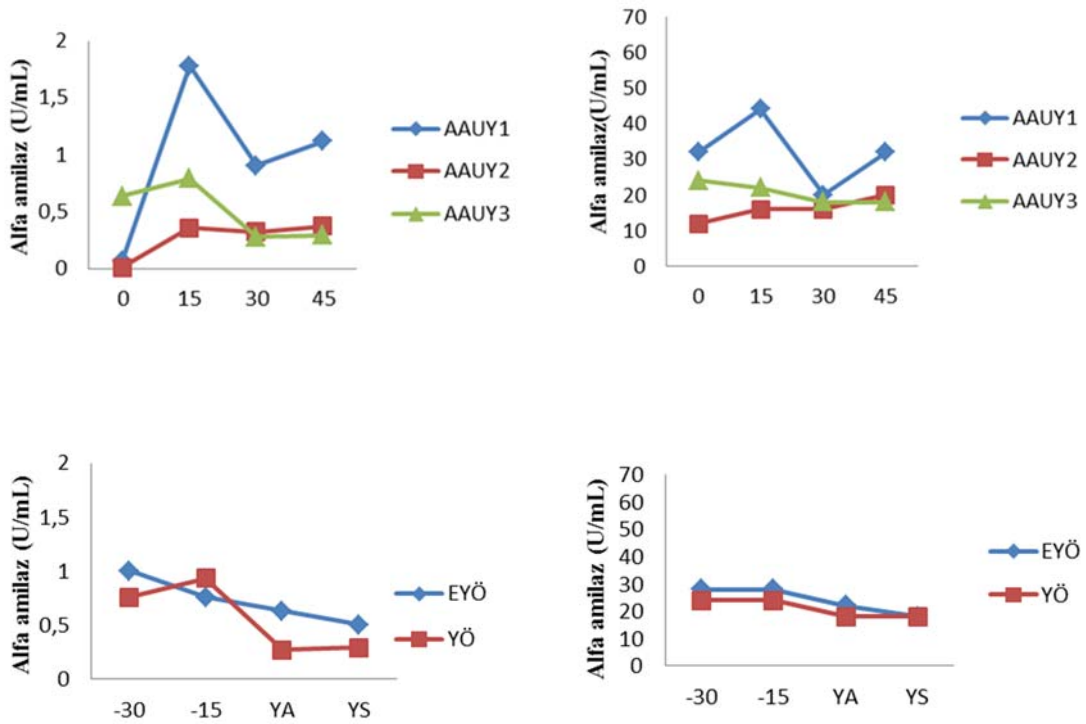
Örneklerin dondurulup çözdürülmesi gerekliliği, analizlerde sıklıkla karşılaşılan bir sorundur. Bu bağlamda tez çalışmasında, 11 örnek ve 1 standart sekiz defa seri olarak seyreltikten sonra dondurulmuş ve çözdürülerek CNPG3 testinde optik dansite değerleri incelenmiştir. Daha sonrasında da, bu örnek ve standart dilüsyonları (n=96) tekrar dondurulmuş ve aynı şekilde yeniden incelenmiştir. İki okuma için elde edilen optik dansite değerleri arasındaki korrelasyon incelenmiş ve bunun çok kuvvetli olduğu belirlenmiştir ($R^2=0.991$; $y=0.0015 + 0.958x$; $P<0.000$; Şekil 4.3).



Şekil 4.4. Örnekleri dondurup çözmenin CNPG3 testinde α -amilaz üzerine etkisi. Grafikte y eksenini, normal bir şekilde yapılan testten elde edilen optik dansite değerlerini gösterirken, x eksenini ise aynı örneklerin dondurulup çözdürülüp bir sonraki gün çalışılması sonucu elde edilen optik dansite değerlerini göstermektedir. Bu amaçla 11 farklı kişinin tükürük örneği ve 1 standart çözeltisi, 8 defa seri olarak seyreltilmiş ve elde edilen 96 örnek her iki testte de incelenmiştir. Elde edilen veriler, bir defa dondurup çözmenin α -amilaz üzerine olumsuz bir etki oluşturmadığını göstermektedir çünkü her iki test arasındaki uyum % 99,1 oranında bulunmuştur.

4.5. Profesyonel Okçularda Müsabaka Dönemi α -Amilaz Düzeyleri

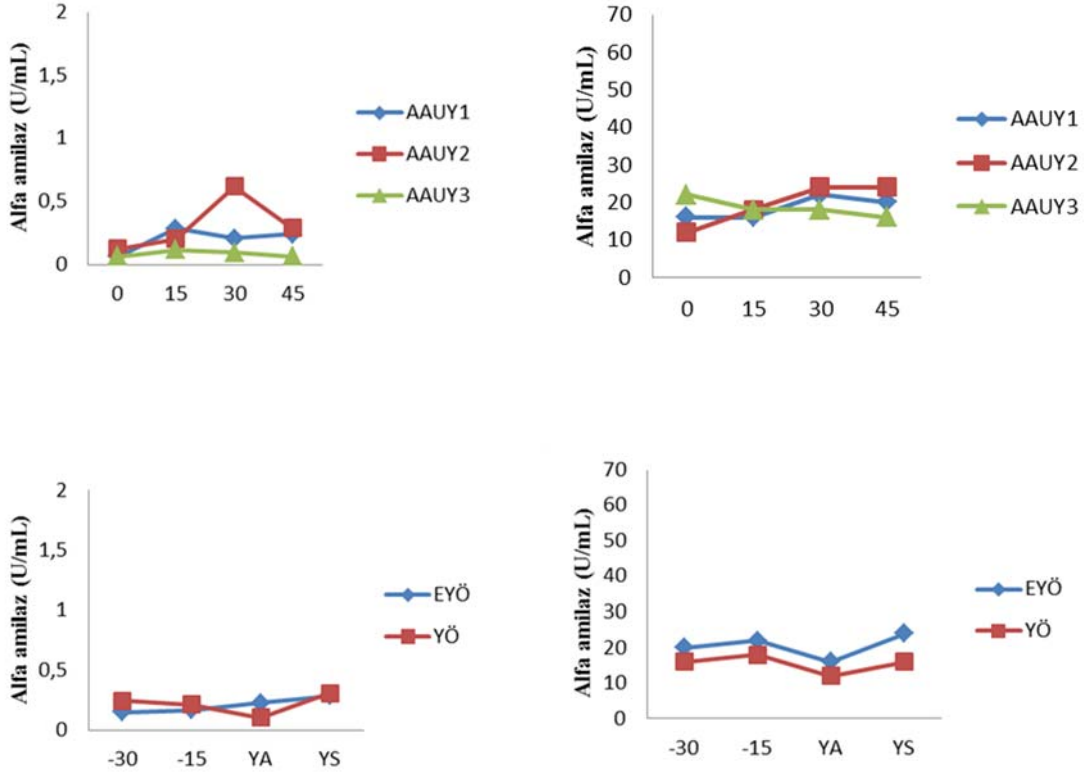
α -amilaz testlerinin performansı profesyonel okçularda (n=7) 3 günlük müsabaka boyunca sıralama (1. Gün), eleme (2. Gün) ve takım atışları (3. Gün) sabah uandıktan sonraki 0, 15, 30 ve 45. dakikalarda incelenmiştir. Ayrıca, ilk iki gün yarışmadan 30 ve 15 dakika önce, yarışma arasında ve yarışma sonunda da tükürük örnekleri α -amilaz düzeyi bakımından incelenmiştir. Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11'de, çalışmada incelenen her okçu katılımcı için CNPG3 kromojen testi ile nişasta-iyodin testlerinin bulguları sunulmuştur.



Şekil 4.5. Birey #KS için CNPG3 (sol taraftaki grafikler) ve nişasta-iyodin testleriyle (sağ taraftaki grafikler) elde edilen tükürük α -amilaz düzeyleri.

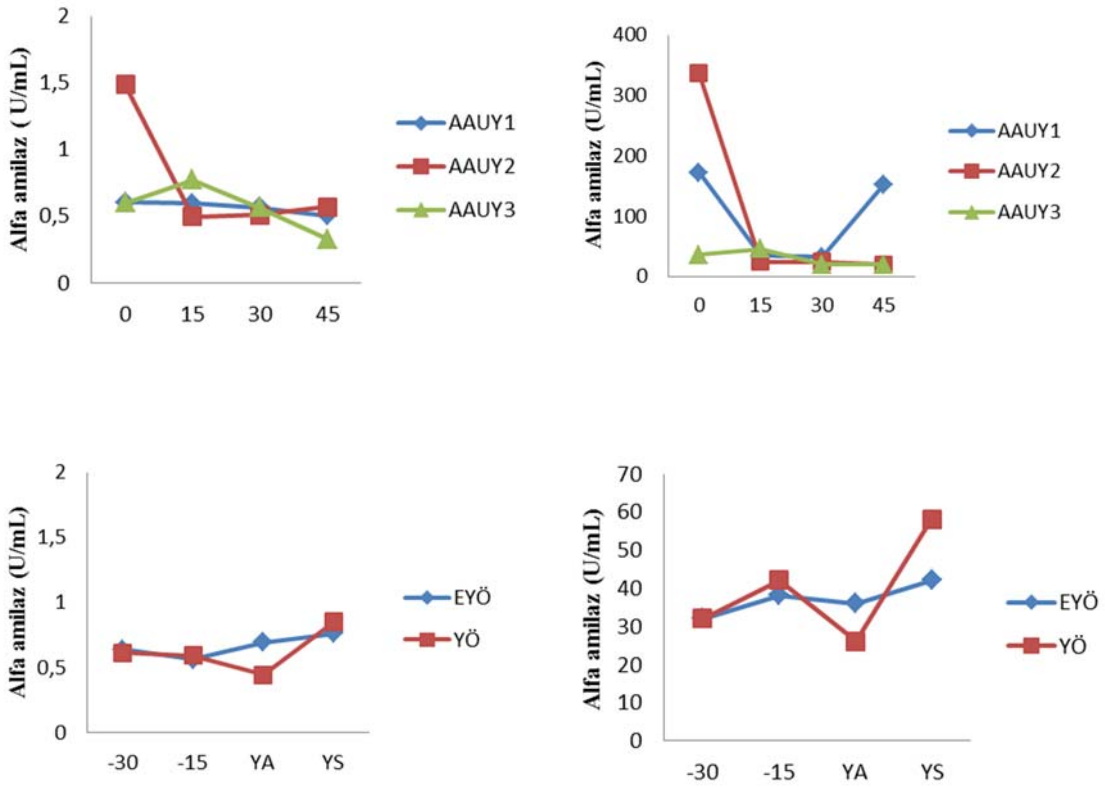
En üstteki grafikler birey uandıktan sonraki 0, 15, 30 ve 45. dakikalarda alınan tükürük örneklerindeki α -amilaz düzeyini (α -amilaz uyanma yanıtı, AAUY) verirken alttaki grafikler ise okçuluk yarışması sürecinde, yarışmadan 30 ve 15 dakika öncesiyile yarışma arası ve yarışma sonrası α -amilaz düzeylerini göstermektedir. AAUY1, AAUY2 ve AAUY3 sırasıyla okçuluk müsabakasındaki birinci (sıralama atışları günü), ikinci (eleme atışları günü) ve üçüncü (takım atışları günü) günleri temsil etmektedir.

EYÖ ve EY ise sırasıyla, birinci (eleme yarışması öncesi, EYÖ) ve ikinci (eleme yarışması, EY) gün yapılan atış müsabakaları sürecini temsil etmektedir.



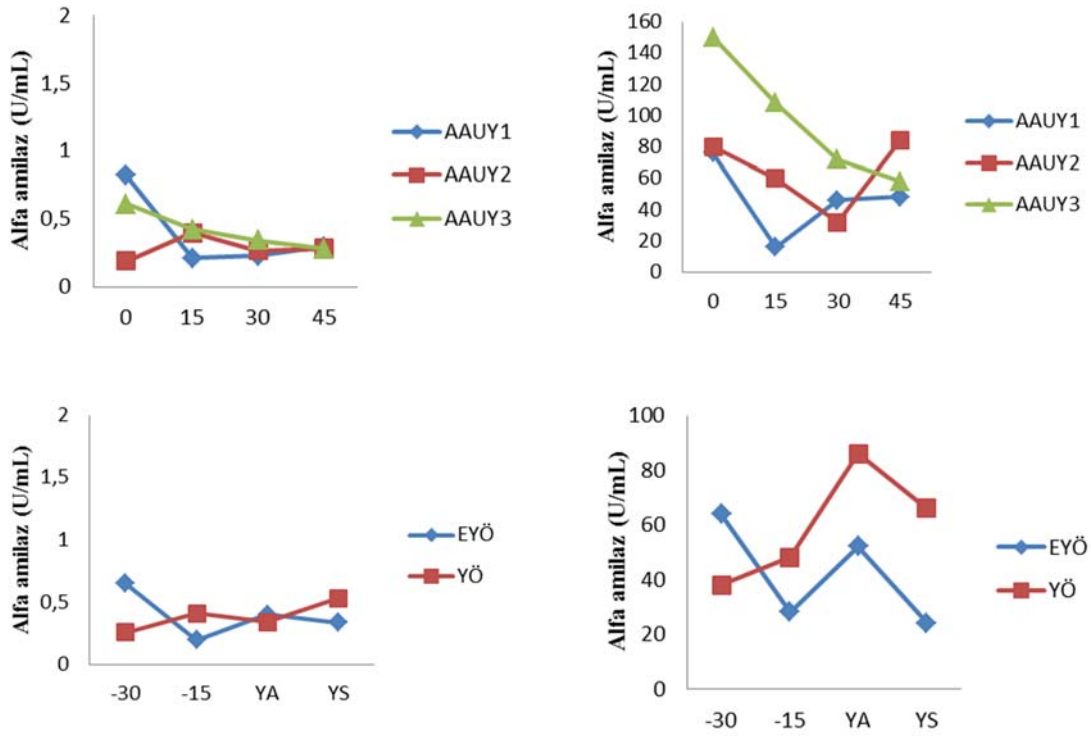
Şekil 4.6.Birey #MU için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri.

En üstteki grafikler birey uyandıktan sonraki 0, 15, 30 ve 45. dakikalarda alınan tükürük örneklerindeki α -amilaz düzeyini (α -amilaz uyanma yanıtı, AAUY) verirken alttaki grafikler ise okçuluk yarışması sürecinde, yarışmadan 30 ve 15 dakika öncesiyle yarışma arası ve yarışma sonrası α -amilaz düzeylerini göstermektedir. AAUY1, AAUY2 ve AAUY3 sırasıyla okçuluk müsabakasındaki birinci (sıralama atışları günü), ikinci (eleme atışları günü) ve üçüncü (takım atışları günü) günleri temsil etmektedir. EYÖ ve EY ise sırasıyla, birinci (eleme yarışması öncesi, EYÖ) ve ikinci (eleme yarışması, EY) gün yapılan atış müsabakaları sürecini temsil etmektedir.



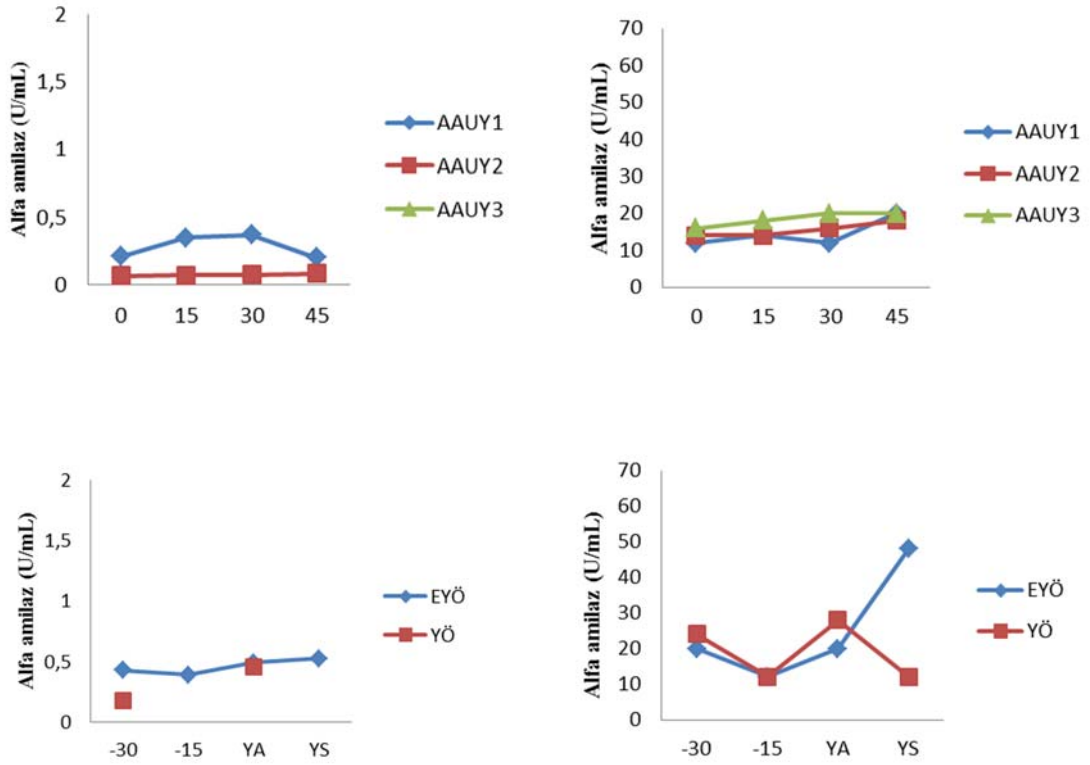
Şekil 4.7.Birey #FB için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri.

En üstteki grafikler birey uyardıktan sonraki 0, 15, 30 ve 45. dakikalarda alınan tükürük örneklerindeki α -amilaz düzeyini (α -amilaz uyanma yanıtı, AAUY) verirken alttaki grafikler ise okçuluk yarışması sürecinde, yarışmadan 30 ve 15 dakika öncesiyle yarışma arası ve yarışma sonrası α -amilaz düzeylerini göstermektedir. AAUY1, AAUY2 ve AAUY3 sırasıyla okçuluk müsabakasındaki birinci (sıralama atışları günü), ikinci (eleme atışları günü) ve üçüncü (takım atışları günü) günleri temsil etmektedir. EYÖ ve EY ise sırasıyla, birinci (eleme yarışması öncesi, EYÖ) ve ikinci (eleme yarışması, EY) gün yapılan atış müsabakaları sürecini temsil etmektedir.



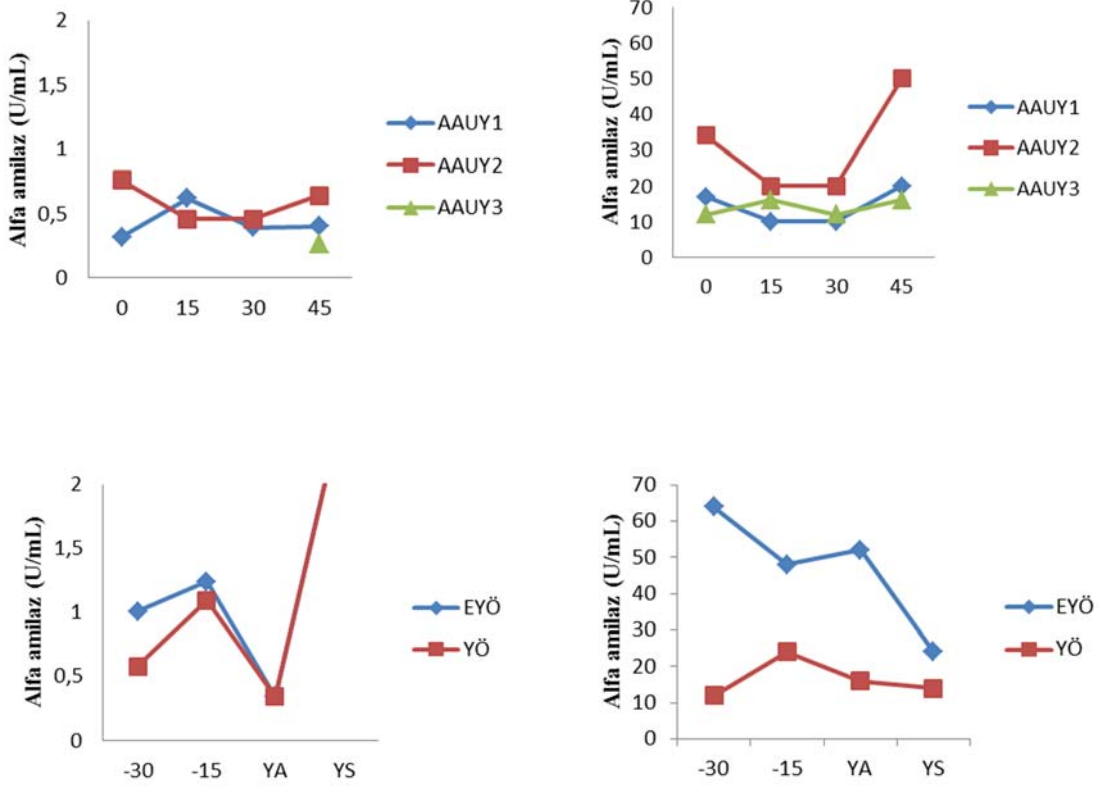
Şekil 4.8. Birey #OET için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri.

En üstteki grafikler birey uyandıktan sonraki 0, 15, 30 ve 45. dakikalarda alınan tükürük örneklerindeki α -amilaz düzeyini (α -amilaz uyanma yanıtı, AAUY) verirken alttaki grafikler ise okçuluk yarışması sürecinde, yarışmadan 30 ve 15 dakika öncesiyle yarışma arası ve yarışma sonrası α -amilaz düzeylerini göstermektedir. AAUY1, AAUY2 ve AAUY3 sırasıyla okçuluk müsabakasındaki birinci (sıralama atışları günü), ikinci (eleme atışları günü) ve üçüncü (takım atışları günü) günleri temsil etmektedir. EYÖ ve EY ise sırasıyla, birinci (eleme yarışması öncesi, EYÖ) ve ikinci (eleme yarışması, EY) gün yapılan atış müsabakaları sürecini temsil etmektedir.



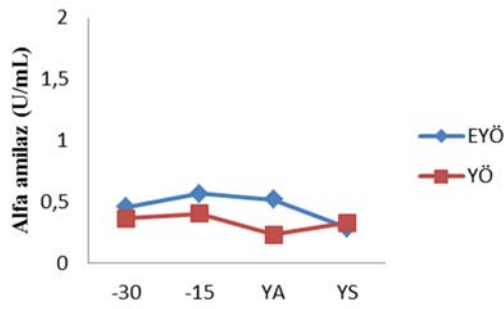
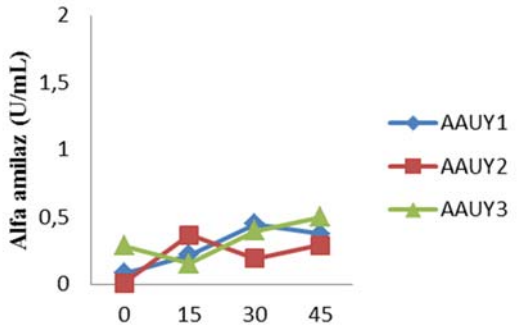
Şekil 4.9.Birey #BB için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri.

En üstteki grafikler birey uyandıktan sonraki 0, 15, 30 ve 45. dakikalarda alınan tükürük örneklerindeki α -amilaz düzeyini (α -amilaz uyanma yanıtı, AAUY) verirken alttaki grafikler ise okçuluk yarışması sürecinde, yarışmadan 30 ve 15 dakika öncesiyle yarışma arası ve yarışma sonrası α -amilaz düzeylerini göstermektedir. AAUY1, AAUY2 ve AAUY3 sırasıyla okçuluk müsabakasındaki birinci (sıralama atışları günü), ikinci (eleme atışları günü) ve üçüncü (takım atışları günü) günleri temsil etmektedir. EYÖ ve EY ise sırasıyla, birinci (eleme yarışması öncesi, EYÖ) ve ikinci (eleme yarışması, EY) gün yapılan atış müsabakaları sürecini temsil etmektedir.



Şekil 4.10.Birey #OE için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri.

En üstteki grafikler birey uandıktan sonraki 0, 15, 30 ve 45. dakikalarda alınan tükürük örneklerindeki α -amilaz düzeyini (α -amilaz uyanma yanıtı, AAUY) verirken alttaki grafikler ise okçuluk yarışması sürecinde, yarışmadan 30 ve 15 dakika öncesiyle yarışma arası ve yarışma sonrası α -amilaz düzeylerini göstermektedir. AAUY1, AAUY2 ve AAUY3 sırasıyla okçuluk müsabakasındaki birinci (sıralama atışları günü), ikinci (eleme atışları günü) ve üçüncü (takım atışları günü) günleri temsil etmektedir. EYÖ ve EY ise sırasıyla, birinci (eleme yarışması öncesi, EYÖ) ve ikinci (eleme yarışması, EY) gün yapılan atış müsabakaları sürecini temsil etmektedir.

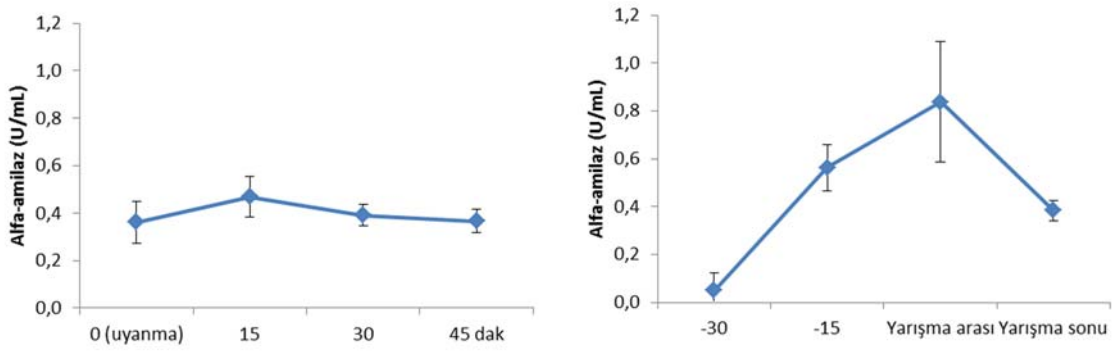


Şekil 4.11.Birey #BY için CNPG3 ve nişasta-iyodin testleriyle tükürük α -amilaz düzeyleri.

En üstteki grafikler birey uyandıktan sonraki 0, 15, 30 ve 45. dakikalarda alınan tükürük örneklerindeki α -amilaz düzeyini (α -amilaz uyanma yanıtı, AAUY) verirken alttaki grafikler ise okçuluk yarışması sürecinde, yarışmadan 30 ve 15 dakika öncesiyle yarışma arası ve yarışma sonrası α -amilaz düzeylerini göstermektedir. AAUY1, AAUY2 ve AAUY3 sırasıyla okçuluk müsabakasındaki birinci (sıralama atışları günü), ikinci (eleme atışları günü) ve üçüncü (takım atışları günü) günleri temsil etmektedir. EYÖ ve EY ise sırasıyla, birinci (eleme yarışması öncesi, EYÖ) ve ikinci (eleme yarışması, EY) gün yapılan atış müsabakaları sürecini temsil etmektedir.

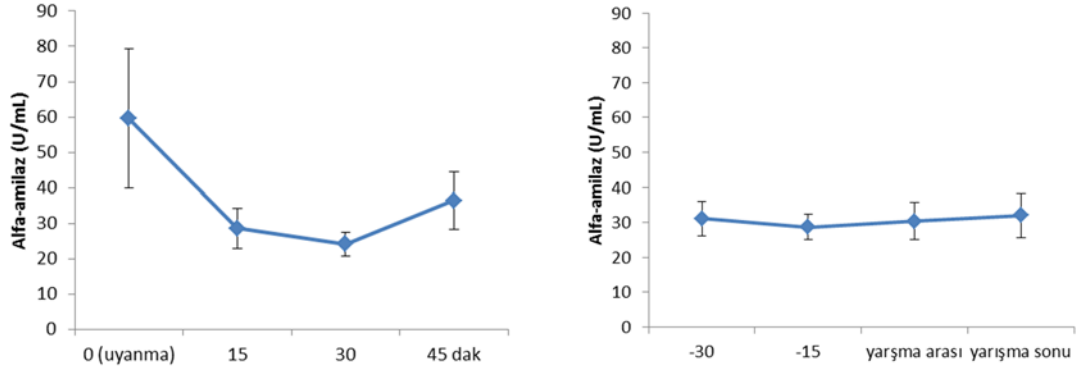
4.6. Okçuluk Müsabakası Yanıtlarının Genel Karşılaştırmaları

Üç günlük müsabaka sürecinde, α -amilaz düzeyi hem CNPG3 hem de nişasta-iyodin testine göre erkek okçularda (n=7) bireysel farklılıklar vardı ($P<0.001$). Fakat her iki testte ölçülen α -amilaz düzeyleri dakikalar arasında (0, 15, 30, 45, -30, -15, yarışmanın yarısı ile sonu), günler arasında (sıralama, eleme, takım) farklılık göstermedi ($P>0.05$). Bununla beraber CNPG3 ile ölçülen α -amilaz düzeyleri sabah uyanma döneminde düşük iken yarışma sürecinde yüksek bulundu ($P=0.010$; Şekil 4.12).



Şekil 4.12. CNPG3 analizlerine göre okçularda (n=7) müsabaka sürecinde uykudan uyanma sonrası α -amilaz düzeylerinde görülen ortalama değişim (sol) ile ok atışlarının yapılması sürecinde (-30, -15, yarışma arası, yarışma sonu) α -amilaz değerleri (sağ). Yarışma süreci ortalama α -amilaz düzeyi, uyanma süreci α -amilaz düzeyinden daha yüksek olarak belirlendi ($P=0.010$).

Nişasta-iyodin testiyle belirlenen α -amilaz düzeyleri, gerek uyanma sürecinde gerekse yarışma sürecinde zaman bakımından farklılıklar göstermedi ($P>0,05$; Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Nişasta-iyodin testiyle belirlenen α -amilaz düzeyleri, gerek uyanma sürecinde gerekse yarışma sürecinde zaman bakımından farklılıklar göstermedi ($P>0,05$; Şekil 4.13).

4.7. α -Amilaz Düzeyleri Arasındaki Korrelasyonlar:

Ölçümü yapılan tüm örneklerde nişasta-iyodin yöntemi ile CNPG3 kromojen substrat yöntemi bulguları arasındaki korrelasyonlar incelendiğinde, her iki yöntem arasında istatistiksel olarak belirgin fakat düşük düzeyli bir ilişki bulunduğu tespit edilmiştir (Lineer regresyon için: $R^2=0.048$; $p<0.05$, kuadratik regresyon için $R^2=0.106$; $P<0.01$).

5. TARTIŞMA

Mevcut çalışmada, tükürük α -amilaz aktivitesinin ölçüm yöntemleri ve bu yöntemlerin stres fizyolojisinde kullanılabilirliği incelenmiş ve tükürük α -amilaz aktivitesinin ölçüm yöntemleri ilk defa birbirleriyle karşılaştırılmıştır. α -amilaz enziminin tükürükteki aktivitesini ölçmek amacıyla karşılaştırılan nişasta-iyodin yöntemi, CNPG3 yöntemi ve DNS yönteminin birbirlerine üstünlükleri ve stres fizyolojisinde kullanılabilirlikleri aşağıda ayrı ayrı tartışılmıştır.

5.1. Nişasta-İyodin Yöntemi ile α -Amilaz Tayini

Nişasta-iyodin testi başarılı bir şekilde kurulmuş olup, standart eğrinin dinamik aralığının 0,05-3 U/ml arasında bulunduğu ve hassasiyetinin de 0,05 U/ml olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, testin optik dansite aralığı da yaklaşık olarak 0 ile 4,000 arasında dinamik bir değişiklik göstermektedir. Bir diğer ifadeyle, α -amilaz aktivitesine oldukça hassas olan bir testtir. Test bu haliyle, tükürük örnekleri yaklaşık 4000x sulandırıldığında örneklerdeki α -amilazı tespit edebilmektedir. Bununla beraber bu düzeydeki bir sulandırma iş yükünü nispeten artırmakta ve zaman kaybına yol açmaktadır. Öte yandan inkübasyon süresinin çok kısa olması ve malzemelerinin nispeten kolay ve ucuz elde edilmesi nedeniyle tercih edilebilecek bir yöntem olarak gözükmektedir. Fakat her tükürük örneği için ayrı sulandırmaların gerekliliği, testin pratik olarak uygulanabilirliği üzerine zayıf bir olumsuz etki oluşturmaktadır.

Nişasta-iyodin testi, ucuz, kolay kurulabilen ve uygulanabilen, malzemeleri nispeten rahatlıkla bulunabilen bir test olup, çok sayıda sulandırma gerektirmekte ve bu nedenle işyükünü nispeten artırmaktadır. Öte yandan en önemli özelliğinin de testin optik dansite değerlerinin 0 ile 4,000 arasında değişiyor olması ve bu nedenle oldukça dinamik bir test olması da önemli bir tercih nedeni olmaktadır.

5.2. Profesyonel Okçularda Nişasta-İyodin Testiyle Belirlenen α -Amilaz Düzeyleri

Okçularda, genel olarak uyanma döneminde α -amilaz düzeyi yüksek iken uyandıktan sonraki 15, 30 ve 45.dakikalarda bazal seviyeye düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.13). Bu yönüyle incelendiğinde, α -amilaz uyanma yanıtının bulunabileceğine ilişkin bir kanıt sunmuştur. Bununla beraber, uyanma yanıtı bireysel olarak incelendiğinde,

incelenen 6 katılımcıdan ikisinde α -amilaz'ın uyanma anında yüksek olduğu ve uyandıktan sonraki 15 dakika içinde düştüğü (#FB ve #OET) fakat üçünde (#KS, #MU ve #BD) görülmüştür. α -amilaz düzeyi uyanma anında yüksek olan bireylerde de bazı günler α -amilazın yüksek olduğu fakat bazı günlerde ise yüksek olmadığı görülmektedir (örneğin #KS, Şekil 4.5). Dolayısıyla tüm bu bulgular, α -amilaz uyanma yanıtı adı verilebilecek bir artışın bazı katılımcılarda bazı günlerde gözüktüğü belirlenmiştir. Bu bulgular Rohleder ve ark. tarafından bildirilen bulgularla uyumludur (Şekil 2.10). Dolayısıyla, HPA eksen aktivitesi uyanmayla birlikte artarken (kortizol uyanma yanıtı), SAM aktivitenin ise uyanmayla birlikte azaldığı düşünülebilir. Bu bağlamda da, uyanmanın uykunun hangi safhasında (REM veya non-REM) oluştuğu önemli olabilir. Çünkü REM uykusu SAM aktivitesiyle ilişkili bulunmuştur.

Öte yandan, nişasta-iyodin testinde, okçuluk atış sürecinde α -amilaz düzeyinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı ve α -amilaz düzeyinin bazal seviyede seyrettiği belirlenmiştir. α -amilaz aktivite artışının SAM'ın bir göstergesi olduğu düşünüldüğünde ve aynı çalışmada yarışmadan hemen önce kortizol düzeyi arttığı halde (89) α -amilaz aktivitesinin artmamış olmasının nedeni bilinmemektedir. Söz konusu çalışmada, tükürük örneği yarışmadan 30 dakika önce alınmaya başlanmış olduğundan, SAM aktivitesi daha öncesinde artmış olabilir.

5.3. CNPG3 Yöntemi ile α -Amilaz Tayini

CNPG3 testi başarılı bir şekilde kurulmuş olup, standart eğrinin dinamik aralığının 3-15,75 U/ml arasında bulunduğu ve hassasiyetinin de 0,100 U/ml olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, testin optik dansite aralığı da yaklaşık olarak 0,1 ile 0,8 arasında dinamik bir değişiklik göstermektedir. Test bu haliyle, tükürük örnekleri yaklaşık 5x sulandırıldığında örneklerdeki α -amilazı tespit edebilmektedir. Tek bir sulandırma yapıyor olması iş yükünü ve zaman kaybını en aza indirmekte fakat fazla miktarda tükürük kullanılması ve inkübasyon süresinin uzunluğu olumsuz bir etki oluşturmaktadır.

CNPG3 testi, kolay kurulabilen ve uygulanabilen, işyükünü azaltan fakat nispeten pahalı olan bir yöntemdir.

5.4. Profesyonel Okçularda CNPG3 Testiyle Belirlenen α -Amilaz Düzeyleri

Okçularda, uyanma yanıtı bireysel olarak incelendiğinde, incelenen 7 katılımcıdan üçünde (#KS, #FB ve #OET) α -amilaz'ın uyanma anında veya 15 dakika

sonrasında yüksek olduğu görülmektedir. Bununla beraber, uyanma döneminde CNPG3 yöntemiyle ölçülen ortalama α -amilaz düzeyi uyandıktan sonraki 0, 15, 30 ve 45.dakikalarda bazal seviyede seyretmiştir (Şekil 4.13). Bu yönüyle incelendiğinde, bu yönteme göre α -amilaz uyanma yanıtının bulunabileceğine ilişkin bir kanıt elde edilememiştir. Fakat okçuluk atış sürecinde ise yarışma öncesi 30. dakikadan sonra 15 dakika ve yarışma arasında CNPG3 yöntemiyle ölçülen α -amilaz en yüksek düzeye erişmiştir ve yarışmanın sonuna doğru tekrar düşüş eğilimine girmiştir. Dolayısıyla CNPG3 yöntemiyle ölçülen α -amilaz düzeyinin yarışma süreciyle yakından ilgili olduğu belirlenmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, CNPG3 yönteminin, yarışma esnasındaki α -amilaz yanıtını en iyi bir şekilde yansıttığı görülmektedir. Bunun pratikte ne anlama geleceğinin sonraki aşamalarda yapılacak çalışmalara bağlı olduğu aşikârdır.

5.5. DNS Yöntemi ile α -Amilaz Tayini

DNS yöntemi daha çok biyokimyasal alanda üre ve şeker tayini için kullanılan bir yöntem olarak bilinmektedir. DNS maddesi laboratuvar koşullarında hazırlanılmış olup, yöntem için standart bir eğri oluşturulmuştur. DNS standart eğrisinin dinamik aralığının 0,3-0,03 U/ml arasında bulunduğu ve hassasiyetinin de 0,4 U/ml olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, testin optik dansite aralığı da yaklaşık olarak 0,1 ile 0,4 arasında küçük bir değişiklik göstermektedir. Bu nedenle tercih edilme olasılığı çok düşük olup ayrıca testin birçok aşamadan oluşması da olumsuz bir faktör olarak düşünülmüştür. Kaynatma gibi zor bir aşamasının bulunması ve örneklerin standart eğrinin optik aralığında yer almaması da önemli eksiklikler olarak not edilmiştir. Tüm bu nedenlerden ötürü, DNS testi mevcut tez çalışmasında örneklerdeki α -amilaz aktivitesini ölçmek için kullanılamamıştır. Ayrıca, test gereği gibi çalışsa da çok sayıda örneği pratik bir şekilde incelemek için de uygun değildir.

5.6. İncelenen Testlerin Birbirleriyle Karşılaştırılması

Mevcut tez çalışması kapsamında kurulan α -amilaz testleri birbirleriyle genel özellikleri bakımından karşılaştırılmış ve bu veriler Tablo 5.1’de sunulmuştur. Tablo incelendiğinde, inkübasyon sürelerinin 30-60 dakika arasında ve nispeten kısa olduğu görülmektedir. Bununla beraber, her test için ayrı sayıda aşama ve seyreltme bulunması veya kaynatma işleminin gerekliliği gibi faktörler testlerin toplam süresini etkilemişlerdir. Yine toplam test sürelerinin yaklaşık 3-3,5 saat olması uygulanabilir yöntemler olarak kabul edilmelerine olanak sağlamaktadır.

Testlerin optik ve dinamik aralıkları dikkate alındığında nişasta-iyodin testinin en iyi sonucu verdiği anlaşılmaktadır. Benzer şekilde nişasta-iyodin testi en ucuz test olduğu için tercih nedeni olacağı düşünülmektedir.

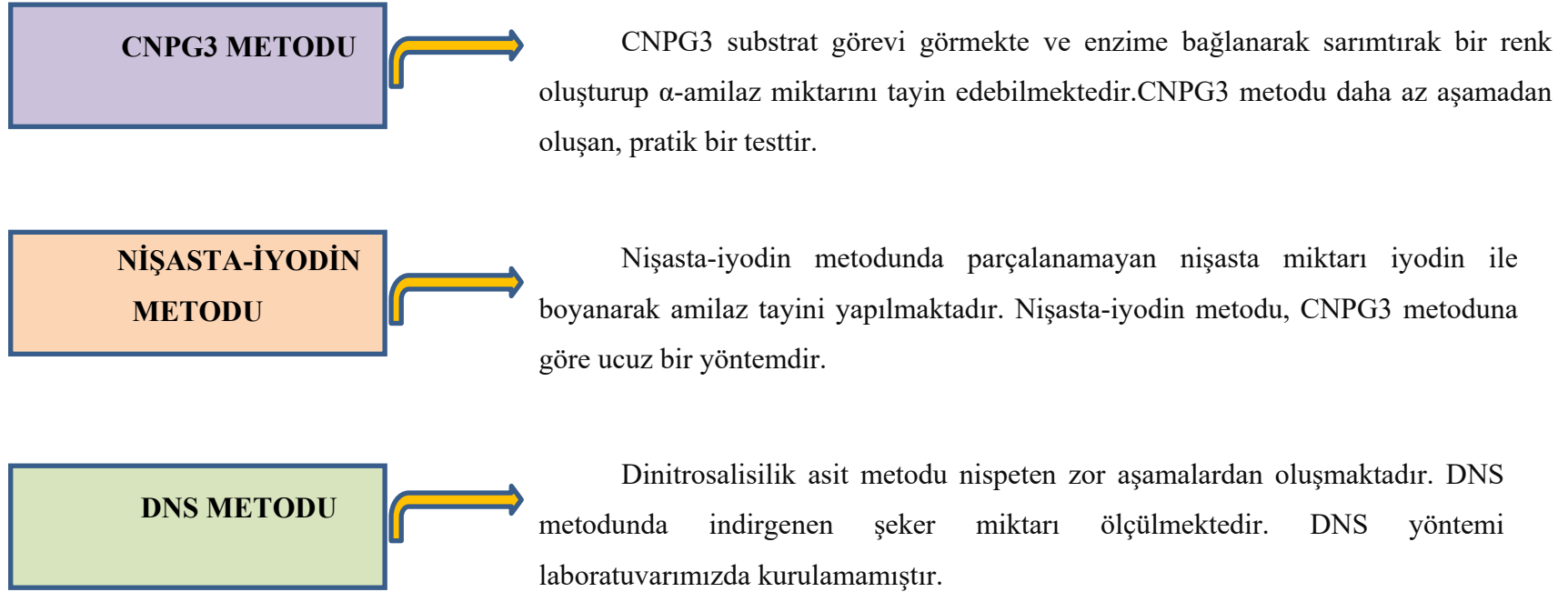
Tablo 5.1. Tez kapsamında incelenen testlerin genel özelliklerinin karşılaştırılması.

METODLAR	Nişasta-iyodin metodu	CNPG3 metodu	DNS metodu
Total inkübasyon süresi(dak)	30	60	40
Optik aralık ve renk oluşum süresi	0-4000 Hemen	0,1-0,8 Yavaş yavaş	Yavaş yavaş
Dinamik aralık (U/ml)	0,05-3	3-15,75	0,3-0,03
Aşama sayısı	6	5	5
Dilüsyon düzeyi ve sayısı	4000x 8	5x 7	- 15
Kullanılan madde veya solüsyon sayısı	6	4	6
Testin toplam süresi (dk)	2 saat	3 saat	3,5 saat
Optik dansite (nm)	580	405	540
Maliyet	Nispeten ucuz (1,81)	Pahalı (5,09)	Ucuz (2,39)

5.7. Stres Fizyolojisinde Nişasta-İyodin Testi ile CNPG3 Testinin Pratik Olarak Karşılaştırılması

Her iki testin sonucunda elde edilen bulgular birbirleriyle karşılaştırıldığında, iki tekniğin bulguları arasında zayıf fakat belirgin bir fark bulunduğu gözlenmiştir. Öte yandan, nişasta-iyodin testinde bulgular yaklaşık 0-70 U/ml arasında değişirken,

CNPG3 testinde 0-2 U/ml arasında değişmektedir. Bu farklılığın nedeni bilinmemektedir. Fakat her iki testin prensibinin farklı olması, iki test arasında belirgin bir fark oluşmasına yol açmış olabilir. Ayrıca, nişasta-iyodin testi α -amilaz tarafından parçalanan nişasta ile ilişkili olduğu halde, CNPG3 testi özel olarak tasarlanmış bir substratı parçalamaktadır. Dolayısıyla, α -amilaz muhtemelen nişastayı kolaylıkla parçalarken, CNPG3 substratını daha zor parçalamaktadır. Yine, çok sayıda gen tarafından α -amilazın üretilmesi ile birlikte (93) α -amilaz polimorfizmi bilinmemektedir. Fakat mevcut tez çalışması, böyle bir olasılığı düşündürmektedir.



Şekil 5.1. Tükürük α -amilaz aktivitesini ölçen üç farklı yöntemin karşılaştırılması.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut tez çalışmasıyla elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- ❖ Nişasta-iyodin testi başarılı bir şekilde kurulmuştur.
- ❖ CNPG3 kromojen testi başarılı bir şekilde kurulmuştur.
- ❖ DNS testinin standart eğrisi başarılı bir şekilde oluşturulmuş fakat örnekler optik dansiteyle uyumlu olmadığından mevcut tez çalışmasında kullanılamamıştır.
- ❖ Kurulan testlerin hassasiyetleri ve çalışma aralıkları uygun bulunmuş; nişasta-iyodin testinde 4000 kat, CNPG3 testinde ise 5 kat sulandırma gerekmiştir.
- ❖ Kurulan iki test arasında zayıf fakat istatistiksel olarak belirgin pozitif bir ilişki gözlenmiştir.
- ❖ Stres fiziolojisinde her iki testin de kullanılabileceği; bireyler ve uygulamalar arasında α -amilaz yanıtı bakımından farklılık bulunduğu belirlenmiştir.
- ❖ Her iki test de ucuz ve kolay uygulanabilir ve kısa süren testler olarak gözükmektedir. Nişasta-iyodin testi CNPG3 testine göre 4-5 kat daha ucuz olmakla birlikte, CNPG3 testi daha az aşamadan oluşan daha pratik bir testtir.

KAYNAKLAR

1. Hofman LF. Human saliva as a diagnostic specimen. *J Nutr* 2001, 131(5):1621S-5S.
2. Obayashi K. Salivary mental stress proteins. *Clin Chim Acta* 2013, 425:196-201.
3. Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, Ehlert U. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int J Psychophysiol* 2005, 55(3): 333-42.
4. Skosnik PD, Chatterton RT, Swisher T, Park S. Modulation of attentional inhibition by norepinephrine and cortisol after psychological stress. *Int J Psychophysiol* 2000, 36(1):59-68.
5. Booij SH, Bos EH, Bouwmans ME, van Faassen M, Kema IP, Oldehinkel AJ, de Jonge P. Cortisol and α -amylase secretion patterns between and within depressed and non-depressed individuals. *PLoS One* 2015, 10(7): e0131002.
6. Petrakova L, Doering BK, Vits S, Engler H, Rief W, Schedlowski M, Grigoleit JS. Psychosocial stress increases salivary alpha-amylase activity independently from plasma noradrenaline levels. *PLoS One* 2015, 10(8): e0134561.
7. Allwood MA, Handwerker K, Kivlighan KT, Granger D A, Stroud LR. Direct and moderating links of salivary alpha-amylase and cortisol stress-reactivity to youth behavioral and emotional adjustment. *Biol Psychol* 2011, 88(1): 57-64.
8. Kang Y. Psychological stress-induced changes in salivary alpha-amylase and adrenergic activity. *Nurs Health Sci* 2010, 12(4): 477-84.
9. Strine TW, Chapman DP, Ahluwalia IB. Menstrual-related problems and psychological distress among women in the United States. *J Womens Health* 2005, 14(4): 316-23.
10. Rohleder N, Wolf JM, Maldonado EF, Kirschbaum C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. *Psychophysiol* 2006, 43(6): 645-52.
11. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva—a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002, 13(2): 197-212.
12. Baum BJ. Neurotransmitter control of secretion. *J Dent Res* 1987, 66(2_suppl): 628-32.
13. Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology* 2007, 32(4): 392-401.

14. Herr AE, Hatch AV, Throckmorton DJ, Tran HM, Brennan JS, Giannobile WV, Singh AK. Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics. *Proc Natl Acad Sci* 2007, 104(13): 5268-73.
15. Fábíán TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábíán G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci* 2012, 13(4): 4295-320.
16. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003, 14(3): 199-212.
17. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001, 85(2):162-9.
18. Bosch JA, Veerman EC, de Geus EJ, Proctor GB. α -Amylase as a reliable and convenient measure of sympathetic activity: don't start salivating just yet! *Psychoneuroendocrinology* 2011, 36(4): 449-53.
19. Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J* 2000, 50(3): 140-61.
20. Boehlke C, Zierau O, Hannig C. Salivary amylase—The enzyme of unspecialized euryphagous animals. *Arch Oral Biol* 2015, 60(8): 1162-76.
21. Ambudkar IS. Regulation of calcium in salivary gland secretion. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000, 11(1):4-25.
22. Gunput ST, Wouters D, Nazmi K, Cukkemane N, Brouwer M, Veerman EC, Ligtenberg AJ. Salivary agglutinin is the major component in human saliva that modulates the lectin pathway of the complement system. *Innate Immun* 2016, 22(4): 257-65.
23. Chou YS, Young TH, Lou PJ. Effects of biomaterial-derived fibroblast conditioned medium on the α -amylase expression of parotid gland acinar cells. *Acta Biomater* 2015, 27: 214-23.
24. <https://saglikdiyetspor.blogspot.com.tr/2015/08/tukuruk-bezi-kanseri-nedenleri-ve-tedavisi.html> 31 Mart 2017
25. <http://pocketdentistry.com/11-head-and-neck-structures/> 31 Mart 2017
26. http://dent.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/313_agizfizyo/10.pdf 31 Mart 2017
27. Fábíán TK, Beck A, Fejérdy P, Hermann P, Fábíán G. Molecular mechanisms of taste recognition: considerations about the role of saliva. *Int J Mol Sci* 2015, 16(3): 5945-74.
28. Guyton AC, J.E. Hall. *Textbook of Medical Physiology*. 11. Basım ed2007.

29. Marvin RK, Saepoo MB, Ye S, White DB, Liu R, Hensley K, Rega P, Kazan V, Giovannucci DR, Isailovic, D. Salivary protein changes in response to acute stress in medical residents performing advanced clinical simulations: a pilot proteomics study. *Biomark*, (just-accepted) 2017, 1-35.
30. MacGregor EA, Janeček Š, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1546(1): 1-20.
31. Schumacher S, Kirschbaum C, Fydrich T, Ströhle A. Is salivary alpha-amylase an indicator of autonomic nervous system dysregulations in mental disorders?—A review of preliminary findings and the interactions with cortisol. *Psychoneuroendocrinology* 2013, 38(6): 729-43.
32. Makinen KK. Salivary enzymes. *Human Saliva* 1989, 1: 1193.
33. Zakowski JJ, Bruns DE. Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1985, 21(4): 283-322.
34. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ. Salivary α -amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993, 4(3): 301-7.
35. Czerbska MT. Psychoneuroendocrinology research trends. *Nova Publishers* 2007.
36. Cozma S, Dima-Cozma LC, Ghiciuc CM, Pasquali V, Saponaro A, Patacchioli FR. Salivary cortisol and α -amylase: subclinical indicators of stress as cardiometabolic risk. *Braz J Med Biol Res* 2017, 50(2).
37. Helpman L, Penso J, Zagoory-Sharon O, Feldman R, Gilboa-Schechtman E. Endocrine and Emotional Response to Exclusion among Women and Men; Cortisol, Salivary Alpha Amylase, and Mood. *Anxiety, Stress, & Coping*, (just-accepted) 2016, 1-23.
38. Tanaka Y, Ishitobi Y, Inoue A, Oshita H, Okamoto K, Kawashima C, Nakanishi M, Aizawa S, Masuda K, Maruyama Y, Higuma, H, Kanehisa M, Ninomiya T, Akiyoshi J. Sex determines cortisol and alpha-amylase responses to acute physical and psychosocial stress in patients with avoidant personality disorder. *Brain Behav* 2016, 6(8).
39. Laine M, Pienihäkkinen K, Ojanotko-Harri A, Tenovuo J. Effects of low-dose oral contraceptives on female whole saliva. *Arch Oral Biol* 1991, 36(7): 549-52.
40. Kasperczyk S, Brzoza Z, Kasperczyk A, Beck B, Duliban H, Mertas A. The changes of alpha-amylase activity in serum and different tissues of female rat during sex cycle- isoelectrofocusing studies of alpha-amylase. *Med Sci Monit* 2001, 7(1): 49-53.
41. Salvolini E, Giorgio R, Curatola A, Mazzanti L, Fratto G. Biochemical modifications of human whole saliva induced by pregnancy. *BJOG* 1998, 105(6): 656-60.

42. Aguirre A, Levine MJ, Cohen RE, Tabak LA. Immunochemical quantitation of α -amylase and secretory IgA in parotid saliva from people of various ages. *Arch Oral Biol* 1987,32(4): 297-301.
43. Salvolini E, Mazzanti L, Martarelli D, Di Giorgio R, Fratto G, Curatola G. Changes in the composition of human unstimulated whole saliva with age. *Aging (Milano)* 1999, 11(2): 119-22.
44. Ahmadi-Motamayel F, Falsafi P, Goodarzi MT, Poorolajal J. Evaluation of salivary catalase, vitamin C, and alpha-amylase in smokers and non-smokers: a retrospective cohort study. *J Oral Pathol Med* 2016.
45. Zuabi O, Machtei EE, Ben-Aryeh H, Ardekian L, Peled M, Laufer D. The effect of smoking and periodontal treatment on salivary composition in patients with established periodontitis. *J Periodontol* 1999, 70(10): 1240-6.
46. Froehlich DA, Pangborn RM, Whitaker JR. The effect of oral stimulation on human parotid salivary flow rate and alpha-amylase secretion. *Physiol Behav* 1987, 41(3): 209-17.
47. Muehlhan M, Höcker A, Höfler M, Wiedemann K, Barnow S, Schäfer I, CANSAS study group. Stress-related salivary alpha-amylase (sAA) activity in alcohol dependent patients with and without a history of childhood maltreatment. *Psychopharmacol* , 1-9.
48. Backes TP, Horvath PJ, Kazial KA. Salivary alpha amylase and salivary cortisol response to fluid consumption in exercising athletes. *Biol Sport* 2015, 32(4): 275-80.
49. Schönfeld P, Preusser F, Margraf J. Costs and benefits of self-efficacy: Differences of the stress response and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev* 2017.
50. Busch L, Sterin-Borda L, Borda E. Differences in the regulatory mechanism of amylase release by rat parotid and submandibular glands. *Arch Oral Biol* 2002, 47(10): 717-22.
51. Garrett JR, Kidd A. The innervation of salivary glands as revealed by morphological methods. *Microsc Res Tech* 1993, 26(1): 75-91.
52. Ishikawa Y, Cho G, Yuan Z, Skowronski MT, Pan Y, Ishida H. Water channels and zymogen granules in salivary glands. *J Pharmacol Sci* 2006, 100(5): 495-512.
53. van Stegeren A, Rohleder N, Everaerd W, Wolf O T. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology* 2006, 31(1), 137-41.
54. Chatterton RT, Vogelsong KM, Lu YC, Ellman AB, Hudgens GA. Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol* 1996, 16(4): 433-48.

55. Beck A, Fábíán G, Fejérdy P, Krause WR, Hermann P, Módos K, Fábíán TK. Alteration of consciousness via diverse photo-acoustic stimulatory patterns. Phenomenology and effect on salivary flow rate, alpha-amylase and total protein levels. *J Physiol Paris* 2015, 109(4): 201-13.
56. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions 1. *Endocr Rev* 2000, 21(1): 55-89.
57. Gaab J, Rohleder N, Nater UM, Ehlert U. Psychological determinants of the cortisol stress response: the role of anticipatory cognitive appraisal. *Psychoneuroendocrinology* 2005, 30(6): 599-610.
58. Davis EP, Granger DA. Developmental differences in infant salivary alpha-amylase and cortisol responses to stress. *Psychoneuroendocrinology* 2009, 34(6): 795-804.
59. Yorbik O, Mutlu C, Ozturk O, Altinay DK, Tanju IA, Kurt I. Salivary alpha amylase levels in youths with anxiety disorders. *Psychiatry Res* 2016, 235: 148-53.
60. Nosratzahi T, Salimi S, Parvae A. Comparison of Salivary Cortisol and α -amylase Levels and Psychological Profiles in Patients with Burning Mouth Syndrome. *Spec Care Dentist* 2017.
61. Warren CM, van den Brink RL, Nieuwenhuis S, Bosch JA. Norepinephrine transporter blocker atomoxetine increases salivary alpha amylase. *Psychoneuroendocrinology* 2017, 78: 233-6.
62. Ortu E, Pietropaoli D, Mazzei G, Cattaneo R, Giannoni M, Monaco A. TENS effects on salivary stress markers: A pilot study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2015, 28(1): 114-8.
63. Behringer V, Deschner T, Möstl E, Selzer D, Hohmann G. Stress affects salivary alpha-amylase activity in bonobos. *Physiol Behav* 2012, 105(2): 476-82.
64. Batzri S, Selinger Z. Enzyme secretion mediated by the epinephrine β -receptor in rat parotid slices factors governing efficiency of the process. *J Biol Chem* 1973, 248(1): 356-60.
65. Batzri S, Selinger Z, Schramm M, Robinovitch MR. Potassium release mediated by the epinephrine α -receptor in rat parotid slices properties and relation to enzyme secretion. *J Biol Chem* 1973, 248(1): 361-8.
66. Pajcin M, Banks S, White JM, Dorrian J, Paech GM, Grant C, Johnson K, Tooley K, Fidock J, Kamimori GH, Della Vedova CB. Decreased salivary alpha-amylase levels

- are associated with performance deficits during sleep loss. *Psychoneuroendocrinology* 2017, 78: 131-41.
67. Zeng F, Cohen AC. Partial characterization of α -amylase in the salivary glands of *Lygus hesperus* and *L. lineolaris*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2000, 126(1): 9-16.
 68. Anderson LC, Garrett JR, Johnson DA, Kauffman DL, Keller PJ, Thulin A. Influence of circulating catecholamines on protein secretion into rat parotid saliva during parasympathetic stimulation. *J Physiol* 1984, 352(1): 163-71.
 69. Speirs RL, Herring J, Cooper WD, Hardy CC, Hind CRK. The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of amylase from the human parotid gland. *Arch Oral Biol* 1974, 19(9): 747-52.
 70. Bosch JA, Brand HS, Ligtenberg TJ, Bermond B, Hoogstraten J, Amerongen AVN. Psychological stress as a determinant of protein levels and salivary-induced aggregation of *Streptococcus gordonii* in human whole saliva. *Psychosom Med* 1996, 58(4): 374-82.
 71. Laurikainen K, Laurikainen E, Tenovuo J, Kaila T, Vilja P. Effects of a β -blocking agent, timolol maleate, on saliva in healthy volunteers. *Eur J Oral Sci* 1988, 96(2): 121-7.
 72. Gilman S, Thornton R, Miller D, Biersner R. Effects of exercise stress on parotid gland secretion. *Horm Metab Res* 1979, 11(07): 454.
 73. Skosnik PD, Chatterton RT, Swisher T, Park S. Modulation of attentional inhibition by norepinephrine and cortisol after psychological stress. *Int J Psychophysiol* 2000, 36(1): 59-68.
 74. Noto Y, Sato T, Kudo M, Kurata K, Hirota K. The relationship between salivary biomarkers and state-trait anxiety inventory score under mental arithmetic stress: a pilot study. *Anesth Analg* 2005, 101(6): 1873-6.
 75. Rohleder N, Nater UM, Wolf JM, Ehlert U, Kirschbaum C. Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase: an indicator of sympathetic activity? *Ann N Y Acad Sci* 2004, 1032(1): 258-63.
 76. Nater UM, La Marca R, Florin L, Moses A, Langhans W, Koller MM, Ehlert U. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity—associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrinology* 2006, 31(1): 49-58.
 77. Rohleder N, Nater UM. Determinants of salivary α -amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology* 2009, 34(4): 469-85.

78. Tester RF, Qi X, Karkalas J. Hydrolysis of native starches with amylases. *Anim FeedSci Technol* 2006, 130(1): 39-54.
79. Braithwaite EC, Ramchandani PG, Lane TA, Murphy SE. Symptoms of prenatal depression are associated with raised salivary alpha-amylase levels. *Psychoneuroendocrinology* 2015,60: 163-72.
80. Lehoczki G, Szabó K, Takács I, Kandra L, Gyémánt G. Simple ITC method for activity and inhibition studies on human salivary α -amylase. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016, 31(6): 1648-53.
81. Visvanathan R, Jayathilake C, Liyanage R. A simple microplate-based method for the determination of α -amylase activity using the glucose assay kit (GOD method). *Food Chem* 2016, 211: 853-9.
82. Xiao Z, Storms R, Tsang A. A quantitative starch–iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Anal Biochem* 2006, 351(1): 146-8.
83. Manonmani HK, Kunhi AAM. Interference of thiol-compounds with dextrinizing activity assay of α -amylase by starch-iodine colour reaction: Modification of the method to eliminate this interference. *World J Microbiol Biotechnol* 1999, 15(4): 485-7.
84. Gordis EB, Granger DA, Susman EJ, Trickett PK. Salivary alpha amylase–cortisol asymmetry in maltreated youth. *Horm Behav* 2008, 53(1): 96-103.
85. Engert V, Vogel S, Efanov SI, Duchesne A, Corbo V, Ali N, Pruessner JC. Investigation into the cross-correlation of salivary cortisol and alpha-amylase responses to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology* 2011, 36(9): 1294-302.
86. Zagami F. 2-Chloro-4-nitrophenyl- β -D-maltotrioxide new substrate for α -amylase determination in biological fluids.
87. Bernfeld P. Amylases, alpha and beta. *Methods Enzymol* 1955, 149-58.
88. Stamford TLM, Stamford NP, Coelho LCB, Araujo JM. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresour Technol* 2002, 83(2): 105-09.
89. Kayacan Y, Derebaşı DG, Tapan T, Uçar C, Yıldız S. Non –invasive determination of stress hormone cortisol in saliva elit archers. *Acta Physiologica. Special issue: Turkish society of physiological sciences 41st national physiology Congress*, Volume 215, Issue supplement S704, pages 79-80. September 2015. DOI: 10.1111/apha.12591, PC141.
90. Özgöçer T. Menstrual Döngü, Kortizol Uyanma Yanıtı ve Otonom Sinir Sistemi Aktivitesi. *Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı*. Doktora Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2016.

91. Nater UM, Bohus M, Abbruzzese E, Ditzen B, Gaab J, Kleindienst N, Ehlert U. Increased psychological and attenuated cortisol and alpha-amylase responses to acute psychosocial stress in female patients with borderline personality disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2010, 35(10): 1565-72.
92. Petrullo LA, Mandalaywala TM, Parker KJ, Maestripieri D, Higham JP. Effects of early life adversity on cortisol/salivary alpha-amylase symmetry in free-ranging juvenile rhesus macaques. *Horm Behav* 2016, 86: 78-84.
93. Mandel AL, des Gachons CP, Plank KL, Alarcon S, Breslin PA. Individual differences in AMY1 gene copy number, salivary α -amylase levels, and the perception of oral starch. *PLoS One* 2010, 5(10): e13352.

EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU


Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/793-939

11.05.2017

Sayın Yrd. Doç. Dr. Yıldırım KAYACAN

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Kortizol ve Egzersiz Arasındaki İlişkinin İnsan Tükürüğünde Non-Invaziv Yöntemlerle İncelenmesi** başlıklı OMÜ KAİK 2017/98 Karar nolu Anket çalışması+ Biyokimya çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları açısından Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş ve etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına, çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 09.03.2017 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.


Prof. Dr. Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

EK 2: Özgeçmiş

GENEL

Adı Soyadı:	Özlem Barutçu
Doğum yılı/yeri:	1988/Akçadağ
E-posta:	ozlembarutcu@gmail.com

EĞİTİM

Eğitim Düzeyi	Mezun olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	2014-2017
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İngilizce Biyoloji	2008-2013
Pedagojik Formasyon	Fırat Üniversitesi, Eğitim Fakültesi	2015
Ön Lisans	Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Laborant ve Veteriner Sağlık	2010-2012
Ön Lisans	Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Sağlık Kurumları İşletmeciliği	2016-

PROJE DENEYİMİ

Projenin Adı	Menstrual Döngü, Kortizol Uyanma Yanıtı ve Otonom Sinir Sistemi Aktivitesi
Kurum	1002-TUBİTAK
Bütçe	19.800 TL
Tarih	2015-2016
Görev	Bursiyer
Ardeb No	115 S 949

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
İngilizce Öğretmeni	Fırat Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi	4 ay

ÇALIŞMALAR

1. Ozgocer T, Ucar C, Yıldız S, **Barutçu Ö.** Cortisol awakening response, ovarian steroids and premenstrual symptoms in healthy premenopausal women. TSPS 42. National Physiology Congress (5-8 Sep 2016- Düzce, Turkey), Acta Physiologica 2016, 218 (Suppl. 709), PC.072, S 53.
2. Tuba Özgöçer, Cihat Uçar, Hilal Yıldırım, Pınar Çakan, **Özlem Barutçu**, Sedat Yıldız. Salivary Cortisol Levels in Hungry Fasting Individuals at the First Week of Ramadan. TSPS 42. National Physiology Congress (5-8 Sep 2016-Düzce, Turkey), Acta Physiologica 2016, 218 (Suppl. 709), PC091, S 59.
3. Burcu Köksal, Ergül Alçın, Tuba Özgöçer, Azibe Yıldız, Nigar Vardı, **Özlem Barutçu**, Sedat Yıldız. Investigation of possible Effects of Exendine During Exposure to Moderate Chronic Stress in Dehydroepiandrosterone-induced Polycystic Ovary Syndrome in Rats. TSPS 42. National Physiology Congress (5-8 Sep 2016-Düzce, Turkey), Acta Physiologica 2016, 218 (Suppl. 709), OC08, S 10.
4. Kevser Tanbek, Ergül Alçın, Azibe Yıldız, Nigar Vardı, Burcu Köksal, **Özlem Barutçu**. Effects of Metformin on Diabetic Neuropathy in Diabetic Rat Model. Acta Physiologica. Special Issue: Turkish Society of Physiological Sciences 41st National Physiology Congress, Volume 215, Issue Supplement S704, page 21, September 2015.