



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

ADLİ TIPTA VÜCUT SIVILARININ
TANIMLANMASINDA BİYOLOJİK MARKER OLARAK
MİKRORNA'NIN KULLANIMI

Dr. Betül ALBAYRAK ACAR
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan KAR

MERSİN-2019



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

ADLİ TIPTA VÜCUT SIVILARININ
TANIMLANMASINDA BİYOLOJİK MARKER OLARAK
MİKRORNA'NIN KULLANIMI

Dr. Betül ALBAYRAK ACAR
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan KAR

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
2018-1-TP3-2803 No'lu proje ile desteklenmiştir.

MERSİN-2019

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmalarımnda danışman öğretim üyesi olarak yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, değerli bilgi ve zamanlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Hakan KAR'a,

Asistanlığım süresince her alanda katkı ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Halis DOKGÖZ'e, bilgi ve deneyimlerini her daim bizlerle paylaşan değerli hocam Prof.Dr. Nursel GAMSIZ BİLGİN'e,

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Mehmet Emin ERDAL'a ve yine laboratuvar aşamasında bana eşlik eden Arş.Gör. Mehmet Tuğhan KIZILTUĞ'a,

Dört yıllık asistanlık sürecinde birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve Adli Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına,

2018-1-TP3-2803 No'lu proje olarak bu çalışmanın düzenlenmesine katkı sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Hiç karşılık beklemeden maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, evlatları olmaktan onur duyduğum en büyük teşekkürlerimin sahibi annem, babam ve sevgili kız kardeşime,

Hayatıma girdiği andan itibaren her anımı mutlu kılan sevgili eşime ve bu süreçte sürpriz bir şekilde hayatıma dahil olan, varlığı ile tarifi olmayan duygular yaşatan canım oğluma teşekkür ederim.

Dr. Betül ALBAYRAK ACAR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	7
GİRİŞ VE AMAÇ	9
GENEL BİLGİLER	
Tarihçe	11
Vücut Sıvılarının Tanımlanmasının Önemi	11
Temel vücut sıvıları ve tanımlanmasında kullanılan yöntemler	12
Kan	12
Semen	20
Tükürük	24
Menstruel kan	25
Vücut Sıvılarının Tanımlanmasında Güncel Yaklaşımlar	25
RNA'lar	27
mRNA	28
tRNA	28
rRNA	29
Küçük kodlamayan RNA'lar	29
Mikro RNA'ların Keşfi	30
Mikro RNA'ların Biyogenezi	30
Mikro RNA'ların Fonksiyonu	32
Adli Bilimler ve Mikro RNA	33
GEREÇ VE YÖNTEM	
Çalışma grubu	39
Gereçler	39
Cihazlar	39
Sarf ve kimyasal malzemeler	40
Periferik Kan ve Semen Örneklerinden RNA İzolasyonu	40
Menstruel Kan ve Tükürük Örneklerinden RNA İzolasyonu	41
Real-Time PCR ile Mikro RNA Ekspresyon Analizine Yönelik	
Primer-Prob Dizaynı	42
cDNA Eldesi	42

Ekspresyon Analizi	42
Veri Analizi	43
İstatiksel Analiz	43
BULGULAR	44
TARTIŞMA	53
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	63
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	76
ŞEKİLLER DİZİNİ	78
TABLolar DİZİNİ	79
EKLER	80



ÖZET

Adli uygulamalarda vücut sıvılarının tanımlanması olayın aydınlanmasına katkıda bulunması bakımından önemlidir. Son zamanlarda vücut sıvılarının tayininde RNA analizine dayalı metotlar üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmalarda mikroRNA ekspresyon analizinin vücut sıvılarının tanımlanmasında hassas ve spesifik bir yöntem olduğu öne sürülmektedir. Bu çalışmada belirlenen 11 hedef biyomarker adayı mikroRNA'nın periferik kan-semen-tükürük-menstruel kanda ekspresyon analizi yapılarak miRNA'ların vücut sıvılarının tayininde kullanılabilirliği ve biyolojik sıvılar için bir marker değerlerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda yazılı ve sözlü onamı alınan 10 kadın ve 10 erkek birey olmak üzere toplam sağlıklı 20 bireyden alınan periferik kan, tükürük, semen ve menstruel kan örnekleri dahil edildi. Alınan örneklerde hsa-miR-451, hsa-miR-144, hsa-miR-106a, hsa-miR-10b, hsa-miR-891a, hsa-miR135a, hsa-miR-96, hsa-miR-203, hsa-miR-205, hsa-miR-412 ve hsa-miR-214 ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Analiz edilen 11 miRNA'nın ekspresyon seviyeleri farklı vücut sıvıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi($p < 0,05$). Periferik kanın tanımlanması için hsa-miR-451a'nın artmış ekspresyon düzeylerinin, tükürük sıvısının tanımlanması için hsa-miR-203a-3p ve hsa-miR-205-5p'nin artmış ekspresyon düzeylerinin, semen sıvısının tanımlanması için hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-891a-5p ve hsa-miR-135a-5p'nin artmış ekspresyon düzeylerinin, menstruel kan tanımlanması için hsa-miR-412-3p ve hsa-miR-214-3p'nin azalmış ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü($p < 0,001$). Ayrıca vücut sıvılarının tanımlanması için aday olarak seçilen miRNA'lardan hsa-miR-451a'nın periferik kan için, hsa-miR-203a-3p'nin tükürük için, hsa-miR-891a'nın semen için diğer aday miRNA'lara kıyasla oldukça yüksek ayırt edici özelliğe sahip olduğu ve bu üç miRNA'nın adli uygulamalarda kullanılabilecek en güçlü biyomarkerlar olduğu belirlendi.

Çalışmamızın sonuçları; olay yerlerinde sıklıkla karşılaşılabilecek periferik kan, semen, tükürük ve menstruel kan gibi vücut sıvılarında seçilen aday miRNA biyobelirteçlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı ekspresyon seviyesi gösterdiğini, bu nedenle de vücut sıvılarının

tanımlanmasında miRNA'ların, adli laboratuvarların rutin uygulamalarında yeni bir yöntem olarak kullanımını desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Adli Tıp, mikroRNA, vücut sıvılarının tanımlanması



ABSTRACT

The Usage of MicroRNA as a Biomarker For Identification of Body Fluids in Forensic Sciences

Identifying body fluids in forensic applications is important for contributing revelation of cases. In recent years, there have been studies on method based on RNA analysis for identification of body fluids. It has been proposed that microRNA expression analysis is a sensitive and specific method for identification of body fluids in these conducted studies. In this study, evaluating whether chosen 11 target biomarker candidate microRNAs have availability and marker value for identification of body fluids and for biologic fluids by performing expression analysis on peripheral blood-semen-saliva-menstrual blood; was aimed.

Peripheral blood, saliva, semen and menstrual blood samples of a total of 20 healthy subjects (consisted of 10 male and 10 female individuals) who had given written and verbal consent in Mersin University Faculty of Medicine, Department of Forensic Science were included in this study. Expression levels of hsa-miR-451, hsa-miR-144, hsa-miR-106a, hsa-miR-10b, hsa-miR-891a, hsa-miR135a, hsa-miR-96, hsa-miR-203, hsa-miR-205, hsa-miR-412 and hsa-miR-214 in collected samples were analysed. There was statistically significant difference between measured 11 miRNA expression levels in different body fluids ($p < 0,05$). Increased levels of hsa-miR-451a, hsa-miR-203a-3p and hsa-miR-205-5p, hsa-miR-10b-5p and hsa-miR-891a-5p and hsa-miR-135a-5p were found to be statistically significant for identification of peripheral blood, saliva, semen; respectively; whereas decreased expression levels of hsa-miR-412-3p and hsa-miR-214-3p were found to be statistically significant for identification of menstrual blood ($p < 0,001$). In addition, hsa-miR-451a, hsa-miR-203a-3p and hsa-miR-891a among all other chosen miRNAs for identification of body fluids were found to have quite higher differentiating quality than other candidate miRNAs for identification of peripheral blood, saliva and semen; respectively; and these three miRNAs were identified as most potent biomarkers which can be used in forensic applications.

Results of our study supports the utility of miRNAs as a new method in routine applications of forensic laboratories in identification of body fluids due to

statistically significantly different expression levels of chosen miRNA biomarkers in peripheral blood, semen, saliva and menstrual blood which can be frequently seen during crime scene investigations.

Keywords: Body fluids identification, forensic science, microRNA,



GİRİŞ VE AMAÇ

Adli olgu analizlerinde vücut sıvılarının tanımlanması, olay yerinin yeniden canlandırılması ve olayın aydınlanmasına katkıda bulunması bakımından önemlidir^{1,2}. Belli vücut sıvılarının varlığının tespiti fail-suç- mağdur arasındaki bağlantıyı ortaya koyarak meydana gelen olayların diziliminin gösterilmesinde önemli veriler sunar. Örneğin kan lekeleri; fiziksel mücadele, saldırı veya cinayetin bazı biçimlerini gösterebilir ya da sperm veya vajinal sıvının tespiti, cinsel saldırının varlığını ortaya koyabilir³⁻⁵. Adli vakalarda biyolojik sıvı ve lekelerin orijin tayini mikroskopik, enzimatik ve immunolojik testlerle yapılmaktadır⁶. Ancak bu testlerle ilgili bazı problemlerle karşılaşmaktadır. Testlerin çoğu spesifik olmadığından diğer türler ve dokularla çapraz reaksiyonlar oluşturmaktadır. Testlerde her biyolojik vücut sıvısı için ayrı teknik kullanılmakta, bu durum adli delil tahribatı, yoğun emek ve zaman tüketimi, değişen hassasiyet ve düşük özgüllük dereceleri gibi çeşitli kısıtlamaları beraberinde getirmektedir. Ayrıca periferik kan-menstruel kan ve vajinal sekresyonun identifikasyonu için geliştirilmiş enzimatik veya immunolojik doku identifikasyon testi bulunmamaktadır⁷⁻⁹. Bu sebeplerden dolayı, son zamanlarda RNA'ya dayalı adli moleküler çalışmalarda hızlı bir şekilde artış yaşanmaya başlamıştır. Bu çalışmalar da mikroRNA gen ekspresyon analizinin adli tıp uygulamalarında kullanılabilecek hassas ve spesifik bir yöntem olduğu öne sürülerek vücut sıvılarının tanımlanmasında farklı şekilde eksprese edilen miRNA'lar araştırılmış "*MiRNA'lar biyolojik sıvılar için iyi bir biyolojik belirteç olarak kabul edilebilir mi?*" sorusunun cevabı aranmıştır. Araştırmalar neticesinde kan, tükürük, semen, vajinal sekresyon ve menstruel kan için anlamlı sonuçlar veren miRNA'lar tespit edilmiştir. Ayrıca miRNA'ların doku spesifik ekspresyon göstermeleri, az miktardaki örneklerden analizinin yapılabilmesi, birden fazla miRNA belirteçlerinin aynı anda çalışılabilmesi, çok küçük boyutları nedeniyle fiziksel-kimyasal etkenlerden kaynaklanan bozunmaya daha az duyarlı olmaları, aynı örnekten miRNA/DNA ekspresyon analizi birlikte yapılabilirdiğinden adli delil materyallerindeki ziyanı en aza indirmeleri nedeniyle vücut sıvılarının tanımlanmasında rutinde kullanılan geleneksel testlere alternatif olabileceği ileri sürülmektedir. Bununla birlikte miRNA'ların vücut sıvılarının ayırımında biyobelirteç olarak çalışılması halen araştırma

aşamasındadır ve genel kabul gören detaylı araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır¹⁰⁻¹⁴.

Bu tezin kapsamında belirlenen 11 hedef biyomarker adayı miRNA'nın vücut sıvılarının ayırt edilmesinde kullanılıp kullanılmayacağına araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma neticesinde seçili mikroRNA'ların vücut sıvılarına özgüllüğü belirlenerek adli laboratuvarların rutin uygulamalarında vücut sıvılarının tanımlanmasında biyolojik belirteç olarak yeni bir yöntemin kullanımına katkı sağlanması ve dolayısıyla adli olaylarda, olay yerinde elde edilecek adli delillendirmenin daha etkin yapılabilmesi düşünülmektedir.



GENEL BİLGİLER

Tarihçe

1984 yılında İngiliz genetikçi Alec Jeffreys'in DNA'nın bireyselliğini belirlemek için DNA parmak izini keşfetmesiyle birlikte adli bilimlerde DNA'nın kullanımına hızlı bir geçiş olmuştur. Bu keşifle birlikte özellikle kimliklendirme alanında kullanılan rutin serolojik testler neredeyse tamamen popülaritesini kaybetmiştir. Bu dönemlerde RNA'nın hızlı degradasyona uğraması nedeniyle adli analizlerde kullanılamayacağı düşüncesi adli bilim adamlarının RNA ile ilgili çalışmalara zaman ayırmalarını oldukça engellemiştir¹⁵.

Adli bilimlerde RNA ile ilgili ilk çalışma 1984'de post-mortem RNA sentezi ile ilgili gerçekleştirilmiştir¹⁶. RNA ile ilgili ikinci bir çalışma yaklaşık on yıl sonra 1994'te Phang ve ark.'ları tarafından postmortem dokularda gen ekspresyon analizi konusunda olmuştur¹⁷. Daha sonraki yıllarda Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) tekniğinin keşfedilmesiyle birlikte vücut sıvılarının tanımlanması ve yara yerinin iyileşmesinde moleküler değişiklikler olarak iki ayrı çalışma yapılmış ve yapılan bu iki ayrı çalışmada, RNA'nın potansiyel olarak adli bilimler alanında da kullanılabileceğini gösteren sonuçlar alınmıştır¹⁸. Bu sonuçlar adli topluluğun ilgisini bu alana çekmiş, adli bilimlerin çeşitli alanlarında RNA belirteçlerinden faydalanılabileceği düşüncesiyle o günden bu yana giderek artan oranda RNA ile ilgili adli moleküler çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar yalnızca vücut sıvılarının tanımlanması ve yara yerinin iyileşmesinde moleküler değişiklikler ile sınırlı kalmayıp, postmortem interval tayini, biyolojik lekelerde yaş tayini, normal ve patolojik gen ekspresyonları arasındaki farkın belirlenmesi, yara yaşının tespiti gibi çok çeşitli adli alanları da kapsamaktadır¹⁹.

Vücut sıvılarının tanımlanmasının önemi

DNA 1980'li yıllarda adli bilimler laboratuvarlarına giriş yaptıktan sonra olay yeri incelemelerinden elde edilen biyolojik örneklerde DNA analizi yapılarak şüphelinin veya mağdurun kimliği ortaya konulmaktadır. DNA analizi adli bilimlerde özellikle kimliklendirmenin yapılabilmesinde çok büyük bir öneme sahiptir. Ancak olay mahallinde bir kişinin DNA'sının bulunması, DNA'nın kaynağı hakkında bilgi vermemektedir. DNA'nın kaynağı cilt, kan, tükürük veya

meni vb. sıvılar olabilir. Kaynağı bilinmeyen bir delilin varlığı olayın aydınlatılmasına büyük katkı sunmakla birlikte, bazı soruları yanıtsız bırakmaktadır. Bir yerde bir kişinin sadece DNA'sının bulunması cinsel temas olup olmadığı sorusuna cevap vermemektedir²⁰.

Olay yerlerinde bulunan biyolojik örneklerin türünün ve kaynağının belirlenmesi, şüpheli ile işlenen suç arasındaki bağlantıyı destekleyerek olay yerinin yeniden canlandırılmasında önemli ipuçları sağlayabilir¹⁻³. Örneğin; menstruel döneminde seksüel saldırıya uğrayan bir kadına ait menstruel kanın, saldırıyı gerçekleştiren kişinin üzerinde saptanması sonrasında şüphelinin kanın burun kanaması olduğunu iddia etmesi üzerine bu kanın menstruel kan mı, yoksa burun kanaması mı olduğu konusunda ayırımın yapılabilmesi adli olayın sağlıklı bir şekilde çözümlenmesine aracı olacaktır⁴. Aynı şekilde, semen lekesinin mağdur üzerinde bulunması ya da vajinal sıvının penil bir sürüntü de varlığı cinsel aktivite iddiasını ortaya koyacaktır^{5,9}.

Olay yerlerinde bulunan yaygın vücut sıvıları kan, semen ve tükürüktür. Ancak vajinal sekresyon, göz yaşı, idrar ve ter gibi vücut sıvıları ve bunlara ek olarak deri hücreleri de olay yerlerinde tespit edilebilmektedir².

Temel vücut sıvıları ve tanımlanmasında kullanılan yöntemler

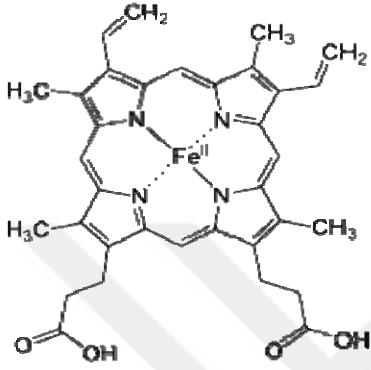
Kan

Kan, plazma adı verilen sıvı ortam içinde kan hücrelerinin (eritrosit, lökosit, trombosit) süspansiyon halinde dağıldığı, damar sisteminin içini dolduran ve kalbin pompa gücü sayesinde bu sistem içinde tüm vücudu dolaşan bir dokudur. Vücut ağırlığının yaklaşık % 8'ini oluşturur. Erkeklerde miktarı yaklaşık 5-6 litre, kadınlarda ise 4-5 litre arasındadır.

Kan, % 55'ini plazma ve % 45'ini hücrelerin meydana getirdiği iki bölümden oluşur. Plazmanın % 90'ı su, % 10'unu ise çözünmüş halde bulunan organik ve inorganik (%7 protein, %3 üre, aminoasitler, karbonhidratlar, organik asitler, yağlar, steroid hormonlar ve diğer organik iyonlar) maddeler oluşturur. Kan hücreleri ise eritrositler (% 99), lökositler (% 1), trombositlerden (% 1) oluşur^{21,22}.

Eritrositler; kanda sayıları en yüksek olan hücre grubudur. Bir mililitre kanda yaklaşık 5 milyon eritrosit bulunur. Çapları 6-8 mikronmetredir. Eritrositlerin başlıca fonksiyonu kanda oksijen dolaşımını sağlayan hemoglobini

taşıdır. Hemoglobin, yapısında Fe^{+2} atomu bulunduran 4 adet hem grubu taşıyan konjuge bir proteindir. Oksijen, hemoglobin molekülünde hem grubunda bulunan Fe^{+2} atomuna bağlanarak taşınır. Eritrositler kemik iliğinde üretilirler ve dolaşıma retikülosit olarak geçerler. Dolaşımda 1-2 gün içerisinde çekirdekleri yok olarak eritrosit haline gelir. Bu nedenle eritrositler DNA içermezler. Dolaşımdaki ömürleri ortalama 120 gün kadardır²².



Şekil 1: Hemoglobin yapısı.

Lökositler; vücudun savunma sisteminin hareketli elemanları olup 1 mililitre kandaki sayıları 4.000-10.000 arasında değişebilir. Lökositler çekirdekli hücreler olup çekirdek ve sitoplazma yapılarına bağlı olarak granülositler, monositler ve lenfositler olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Dolaşımdaki lökositlerin % 50-75'i granülosit, % 2-8'i monosit, % 20-40'ı lenfositlerdir. Granülositler ve monositler yalnızca kemik iliğinde yapılır. Lenfositler ise az miktarda kemik iliğinde, büyük oranda lenfoid organ ve dokularda yapılmaktadır. Granülositler; sitoplazmalarında belirgin granüller içerirler ve çekirdekleri çok parçalıdır. Granüllerinin ve çekirdeklerinin boyanma özelliklerine bağlı olarak kendi içlerinde nötrofiller, bazofiller ve eozinofiller olarak üç gruba ayrılırlar. Eozinofil ve bazofillerin sayısı allerjik reaksiyonlarda artış gösterir. Granülositlerin % 50-70'ini nötrofiller, % 1-4'ünü eozinofiller, % 0.4'ünü bazofiller oluşturur. Monositler; belirgin granüller göstermeyen, çekirdekleri böbrek şeklinde ve tek parçalı olan lökositlerdir. Dokular arasına geçip, burada gelişip büyüyerek doku makrofajları adı verilen hücreleri oluştururlar. Lenfositler yabancı moleküllerle bağlanma özelliği gösteren antikor oluştururlar. Antikor oluşumunu uyaran yabancı moleküllere antijen adı verilir. Lenfositler kendi

içlerinde T ve B olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. B lenfositler antijenlere karşı antikor veya immünoglobulinler adı verilen özel protein moleküllerini sentezlerler. T lenfositler ise hem B lenfositlerin antikor üretimini düzenleyen hem de antijenlerle doğrudan savaş verebilen hücrelerdir. Lökositlerin yaşam süreleri fonksiyonlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Granülositlerin yaşam süreleri ortalama 12 saattir, ancak bir enfeksiyon oluşmasında bu süre 2-3 saate düşebilir. Monositlerin ömürleri biraz daha uzundur, lenfositlerin ise 100-200 gün kadar olduğu kabul edilmektedir²³.

Trombositler; pıhtılaşmadan sorumlu hücrelerdir. Kemik iliğindeki dev megakaryosit hücrelerinden oluşurlar. Megakaryositlerin parçalanıp sistemik dolaşıma girmesi ile trombosit adını alırlar. Yaklaşık 5 günde oluşmakla birlikte yaşam süreleri 10 gün kadardır. Çekirdeksiz hücrelerdir (2-4 mikron çaplı). Sayıları bir mikrolitre kanda 150000-300000 civarındadır. Damar yaralanmalarında, kanamanın durmasında (hemostaz) ve pıhtı oluşmasında görev alırlar^{22,23}.

Kan lekesi tayini

Olay yerlerinde bulunan lekelerin kan lekesi olduğundan şüphelenilmesi durumunda cevaplandırılması gereken pek çok soru vardır^{21,24}. Bu soruların en önemlileri;

- ✚ Leke kan lekesi mi?
- ✚ Kan lekesi ise insan kanı mı hayvan kanı mı?
- ✚ İnsan kanı ise orijini neresi? (Burun kanı, menstruel kan, mide kanı v.s.)
- ✚ Kan lekesinin kadına mı, erkeğe mi ait olduğu?
- ✚ Kan lekesinin yaşı?
- ✚ Kan lekesinin grubu?

Kan lekesi tayininde kullanılan yöntemler

Olay yerlerinde en sık rastlanan vücut sıvısı kandır. Ancak pas lekesi, meyve suları, kırmızı mürekkep vb. gibi birçok madde kana benzeyen kırmızı-kahverengi lekeler oluşturabilmektedir. Bu nedenle olay yerinde kan lekesine benzer bir leke görüldüğünde ilk yapılacak işlem lekenin kan lekesi olup olmadığının tespitidir^{21,25}.

Adli analizlerde kan lekesinin tanımlanması için görüntüleme yöntemleri, kimyasal yöntemler ve immunolojik yöntemler kullanılmaktadır^{2,26}. Işık ile görüntüleme yöntemleri; 1991’de Stoilovic’in kanın yaklaşık 415 nm’de güçlü bir spektrumunun olduğunu göstermesinden sonra adli bilimler rutininde vücut sıvılarının ayırt edilmesinde kullanılmaya başlanmıştır²⁷. Alternatif ışık kaynağının kan inceleme açısından iki negatif yönü vardır. İlki pas vb. maddelerle kanın ayırt edilememesi, ikincisi 1/1000 dilüsyonun altındaki kan lekelerini gösterememesidir. Avantajlı yönü ise üzeri boya ile kapatılmış lekeleri de gösterebilmektedir. Alternatif ışık kaynaklarının kullanımında amaç lekeyi tespit etmek olmalı, lekenin tanımlanmasında diğer yöntemler kullanılmalıdır²⁸.

Kan lekesi tayininde kullanılan diğer yöntemler iki basamakta sınıflandırılabilir. İlk basamak çok hassas ancak belirli bir madde için spesifik olmayan ön tanı testleridir. Ön tanı testleri; pahalı olmayan, kullanımı kolay, hızlı çözümler olarak sahada kullanılmaktadır. Ön tanı testlerinin, genellikle sensitivitesi yani pozitif sonuç verme eğilimi yüksektir. Böylece negatif sonuç verenler daha kesin bir şekilde negatif olarak ayrılır. Pozitif sonuç verenlerin ise bazıları şüpheli iken (yalancı pozitif), bazıları da doğru pozitifdir. Bu testlerin DNA incelemesine olumsuz etkilerinin olmaması da önemlidir. İkinci basamakta ise doğrulama testleri kullanılır. Ön tanı testlerinde pozitif sonuç veren madde daha spesifik ikinci bir testle ile teyit edilir^{2,28}. Doğrulama testleri, sonuç alınabilmesi için bol miktarda örnek gerektirir ve genellikle sahada değil laboratuvarında kullanılır. Çünkü, daha kontrollü koşullar ve ön tanı testlerine göre daha fazla ekipman gerektirir. Doğrulama testlerinin spesifikliği yüksek olup, yalancı pozitiflik eğilimi düşüktür. Bu testlerin negatif sonuç verme eğilimi daha yüksektir. Bu şekilde pozitif sonuç verenler daha kesin bir şekilde pozitif olarak ayrılırlar²⁹.

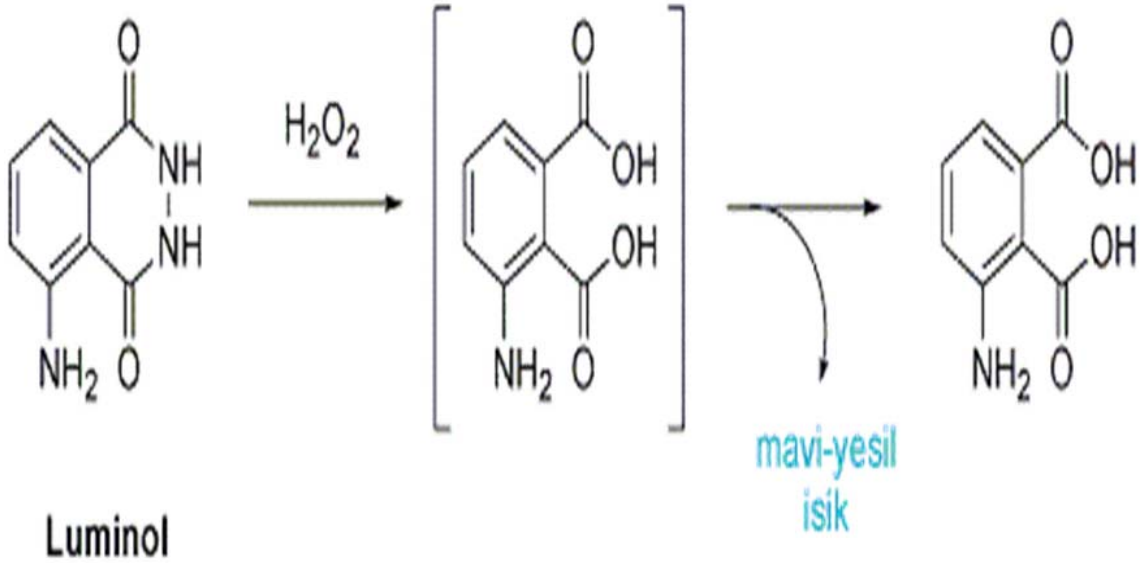
Ön tarama/Doğrulama testleri, maliyete uygun bir yaklaşımla leke kan değilse gereksiz DNA testlerine gidilmesinin önlenmesinde önemlidir. Bu testler olay yeri personelinin delili “DNA testi yapılacak/yapılmayacak” şeklinde ayırım yapabilmesini sağlar. Bu şekilde adli laboratuvarların daha efektif çalışması ve delillerin daha etkin incelenmesi sağlanmış olur. Açıkçası adli bilimler alanındaki uygulamalarda çoğu laboratuvar doğrulama testlerini kullanmamaktadır. Örnek ön tanı testinde pozitif sonuç verdiyse DNA incelemesine gönderilmektedir³⁰.

Ön tarama testleri

Ön tanı testlerinde kandaki hemoglobine reaksiyon gösteren kimyasallar kullanılır. Bu kimyasallar hemoglobin varlığında ya renk değiştirir ya da belirli bir dalga boyunda ortama ışık yayar(kemiluminesans). En yaygın olarak kullanılan ön tarama testleri luminol, fenolfitalein ve fluoresindir³¹.

➤ Luminol

Luminol (3-aminophthalhydrazide) bir amin türevidir ve kemiluminesans dediğimiz kimyasal reaksiyon sonucu ortama belirli dalga boyunda ışık yayılma mekanizmasıyla çalışır. Luminol okside edici ajan (hidrojen peroksit) varlığında kan olduğundan şüphelenilen lekeye sıkıldığında eğer lekede kan varsa kandaki hemoglobinin yapısında bulunan Fe^{+2} iyonları luminolun hidrojen peroksit ile tepkimesini katalizleyerek luminolun aminofitalata yükseltgenmesini sağlar. Oluşan yüksek enerjili aminofitalat enerji fazlalığını dışarıya ışık yayarak atar. Bu reaksiyon mavi beyazdan sarı yeşile bir lüminens ile sonuçlanır.



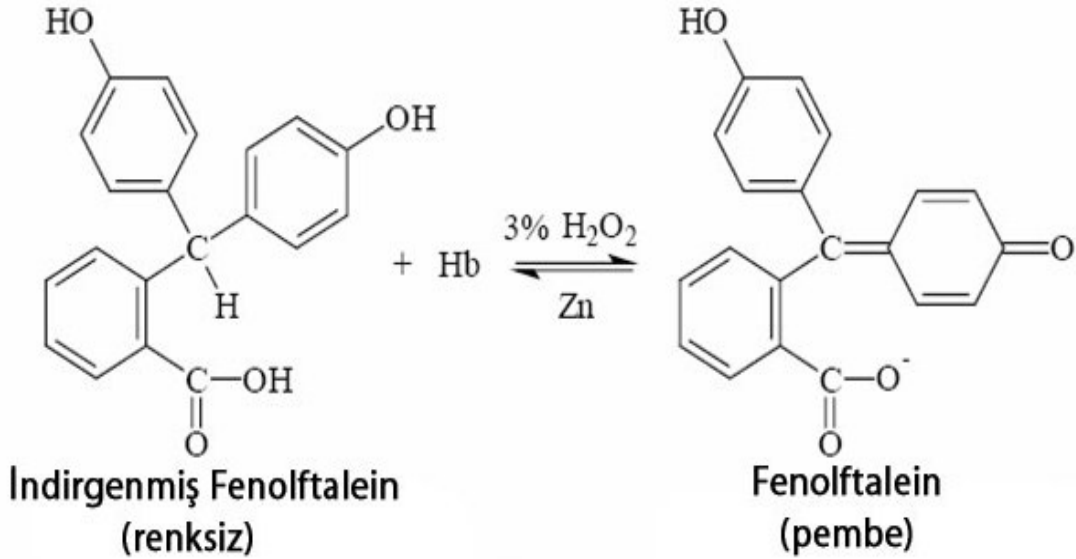
Şekil 2: Luminol reaksiyonu.

Luminol hemoglobine çok yüksek hassasiyet gösterir, 1/5.000.000 dilüsyonda kanı tespit edebilir. Bu nedenle yıkanmış, silinmiş, görünmeyen kan lekelerini de belirleyebilmektedir. Meydana gelen tepkime sonrasında ortama yayılan ışık yaklaşık 30 saniye kadar sürmektedir. Test uygulanacak alan

taşınamayacak zemin, duvar vb. gibi yerler olduğunda tepkime sonrası ışık yayılımı alternatif ışık kaynağı altında incelenmelidir. Işık yayılımının geçici olması nedeniyle görüntü yakalamada özel fotoğrafçılık teknikleri kullanılmalıdır. Mümkün olduğunca leke bulunduğu yerden alınabiliyorsa laboratuvar ortamında analiz edilmelidir³²⁻³⁵.

➤ Fenolftalein (Kastle-Mayer Testi)

1903 yılında Kastle tarafından geliştirilen Kastle-Meyer testi, indirgenmiş fenolftaleinin, hemoglobin ve peroksit tarafından yükseltgenmesini ve renksiz formdan parlak pembe renge dönüşmesini içerir. Test uygulanırken bir pamuk çubuk distile su ile ıslatılarak lekeye sürülür. Pamuğun ucuna bir damla fenolftalein damlatılır. Bu aşamada pamuk renksiz kalmalıdır. Son olarak pamuğa bir damla hidrojen peroksit damlatılır. Pamuk pembeye dönüşürse kan için ön tarama testi pozitifdir. Hidrojen peroksit damlatılmadan önce pamukta kırmızı-pembe renk değişiminin olması ortamda oksitleyici başka maddelerin bulunduğunu gösterir. Bu durumda leke, kan lekisi değildir.



Şekil 3: Kastle-Meyer Testi.

Kastle-Meyer testinin hassasiyeti 1/10.000.000 dilüsyonlu kan örneğini tespit edebilecek kadar yüksektir. Onlarca yıllık kan lekelerinde bile pozitif sonuç almak mümkündür. Renk değişimi birkaç saniye içerisinde gerçekleşir^{32,36-38}.

➤ Floresin

Floresin kanın varlığını kontrol için kullanılan bir diğer kimyasaldır. Luminol ile aynı şekilde hazırlanır ancak floresinde görülen luminoldeki gibi bir kimyasal ışımaya değil, floresan ışımadır. Kimyasal ışımada kimyasal reaksiyonun kendi içinde gerçekleşen enerji değişiminden dolayı açığa çıkan fotonun salınımı görülürken, floresan ışımada bir ışık enerjisi ile atomun uyarılması sonucu daha yüksek dalga boyunda ışımaya şeklinde foton açığa çıkması görülür. Floresinin avantajı, ışıklı ortamda ve daha uzun süre gözlemlenebilmesidir. Ancak gözlemleyebilmek için alternatif ışık kaynağı kullanımı zorunludur. Floresinin gözlemlendiği dalga boyu aralığı 415-480 nm olarak belirtilmektedir.

Hem luminol hem de floresin irritant özelliktedir ancak karsinojen olduklarına dair bir bilgi yoktur. Yine de kullanımları esnasında güvenlik önlemleri ve koruyucu ekipman kullanılmalıdır^{28,39,40}.

➤ Benzidin

Adler reaktifi de denilmektedir. Adler reaktifinin uygulanabilmesi için, öncelikle lekenin maserasyona tabi tutulması gerekir. Maserasyon için lekeli materyalden bir miktar alınıp, ufak parçalara kesilerek bir tüpe konulur, üzerine lekenin miktarı göz önüne alınarak bir miktar serum fizyolojik damlatılır. Lekenin, üzerinde bulunduğu materyalden serum fizyolojiğe geçmesi için bir süre beklenerek maserasyon sağlanır. Benzidin reaktifi dehidrojen peroksit ile beraber kullanılır. Reaktif damlatıldıktan hemen sonra yeşil, 10 dakika sonra mavi bir rengin meydana gelmesi lekenin kan lekesi olduğunu düşündürür. Günümüzde bu reaktif kanserojenik özellikte olması nedeniyle kullanılmamaktadır^{2,41-43}.

➤ Ortho-toludin

Benzidinin türevidir. Reaksiyonu benzidine benzemektedir. Yeşil veya mavi rengin meydana gelmesi pozitif sonuç olarak yorumlanır. Ana bileşiği olan benzidine dönüşebileceği ve dolayısıyla karsinojenik etkileri olabileceğinden adli bilimler alanında kullanılmamaktadır^{32,36,41}.

➤ **Tetrametilbenzidin**

Benzidinin türevidir. Benzidin ve ortho-toludine göre karsinojen etkisinin daha az olduğu gösterilmiştir^{2,44}.

➤ **Lökomaşit Yeşili**

Reaktif benzidin gibi uygulanır ancak solüsyon şeklinde hazırlanıp sprey olarak püskürtülür. Lekeye uygulandığında leke kan lekesi ise, bir dakika içinde mavi–yeşil renk meydana gelir ve bu renk 10 dakika sonra yeşil renge dönüşür^{21,45}.

Doğrulama Testleri

Doğrulama testleri; ön tarama testinde pozitif sonuç alınan lekeye ısı ve test kimyasallarının uygulanması sonucu kristal oluşumu yoluyla çalışır. Doğrulama testlerinin en bilinenleri Takayama testi (hemokromojen testi) ve Teichman testidir².

➤ **Takayama Testi (Hemokromojen Testi)**

Takayama (hemokromojen) testi, hemoglobine özgüdür ve takayama reaktifinin bileşenlerini içeren bir dizi reaksiyondan sonra çözünmez, pembe, iğne şeklindeki hemokromojen kristallerinin oluşumuna dayanır. Takayama reaktifinin bileşenlerinde; sodyum hidroksit, glikoz, pyridin ve distile su bulunur. Ön tanısı konmuş lekeden parça alınarak lam lamel arasına koyulur ve bir süre ısı uygulanır. Lamelin kenarından reaktif sızdırılır ve örnek mikroskop altında incelenir, leke kan lekeliyse pembe renk hemokromojen kristallerinin oluştuğu görülür. Şekilleri dikdörtgen, iğne veya iğ biçimindedir. Hemokromojen kristalleri Oustinov, Sarda–Derrien reaktifleri ile de oluşturulabilmektedir^{23,31,43,46}.

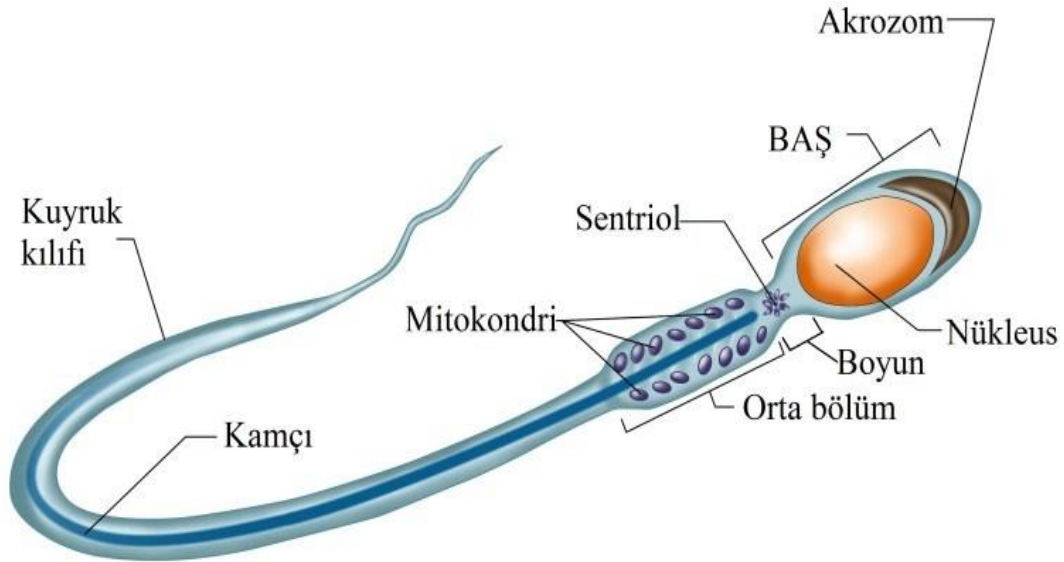
➤ **Teichman Testi**

Teichman testinde de takayama testinde olduğu gibi aynı prosedürler ile farklı kimyasallar uygulanır. Ön tanısı konmuş lekeden parça alınarak lam lamel arasına koyulur. Lamelin kenarından bir damla glasiyal asetik asit ile bir damla %1'lik sodyum klorür çözeltisi damlatılıp, kaynatmadan çok hafif bir alev üzerinde tutularak, glasiyel asetik asitle sodyum klorür çözeltisi uçurular ve soğumaya bırakılır. İyice soğuduktan sonra bu işlem bir kaç defa daha tekrar

edilir. Mikroskopta incelendiğinde leke kan lekesi ise kahverengi saman çöpü şeklinde billur oluşumu görülür. Bu billurlara hemin billurları adı verilmektedir. Hemin billurları; Wagennar, Gabriel Bertrand ve Stryzowski reaktifleri ile de oluşturulmaktadır^{23,31,43,46}.

Semen

Semen erkeklerde cinsel uyarılmanın ardından penisten boşalan içeriğinde fruktoz, asit fosfataz, spermin, PSA, çinko vb. gibi çok sayıda hücre, aminoasit, şeker, tuz ve iyon bulunduran kompleks bir karışımdır. Semen içeriğinin % 60'ı seminal keseden, % 20'si prostat bezinden, % 15-20'si bulboüretal, üretal, duktus epididimis ve duktus deferensten üretilir. Boşalan sıvının hacmi 2 ile 6 mililitre arasında değişir ve normalde mililitresinde 60-120 milyon spermatozoaya yada sperm hücresi taşımaktadır. Spermiumlar hacim olarak semenin %1'lik kısmını oluştururlar. Spermium hücresi yaklaşık 0.05 mm uzunluğunda baş, gövde ve kuyruk bölümünden oluşan bir yapıdır. Baş bölgesi yumurta (ovum) hücresinin içine girme görevini yürütür ve çekirdek içinde yer alan genetik materyali saklar. Kuyruk bölgesi spermatozoanın hareketli olmasını sağlar⁴⁷⁻⁵².



Şekil 4:Spermium anatomisi.

Semen cinsel saldırı olaylarında özellikle önemlidir. Semen varlığı (ya da bozulmamış sperm) cinsel temasın ön delili olarak kabul edilmektedir⁵³.

Semen Analizinde Kullanılan Yöntemler

Semen lekesi özellikle cinsel saldırı suçlarında belirlenmesi büyük önem taşıyan vücut boşluklarından, giysilerden ya da olay yerlerinden elde edilebilen delildir. Miktarının fazla olması ve içeriğinde spermium bulunması durumunda tespit edilebilmesi daha kolaydır. Ancak az miktarda olduğu durumlarda teşhisi zorlaşır.

Semen lekeleri tayininde birkaç farklı metot kullanılmaktadır. Bunlar sitolojik, biyokimyasal ve immünolojik inceleme tetkikleridir. İlk olarak kullanılan tetkik numudedeki spermium hücrelerini mikroskopik olarak gözlemlemektir. Eğer sperm hücreleri mikroskopik olarak belirlenemezse semeni diğer maddelerden ayırabilmek için diğer analiz yöntemleri kullanılır. Bu yöntemlerin tümü seminal sıvıda bulunan ve konsantrasyonları organizmanın diğer vücut sıvı ve dokularındakine oranla çok yüksek olan bir kimyasal bileşiğin, enzimin veya hücrenin; biyokimyasal, immünolojik veya sitolojik incelenmesine dayanmaktadır. Bu yöntemler Asit Fosfataz, Glisin Prolin Dipeptidil Aminopeptitaz, Lösin Aminopeptidaz, Gama-Glutamil Transferaz, Kreatin Fosfokinaz, Laktat Dehidrogenaz İzozim X (LDH-X) gibi enzim aktivitesinin, spermin, kolin gibi proteinlerin, çinko gibi elementlerin tespitine yönelik çalışır. Ayrıca UV ışık taraması da semen tayininde kullanılmaktadır⁵³⁻⁵⁵.

➤ UV ışık taraması

Çıplak gözle görülecek vücut sıvısı lekelerini saptamanın en basit yolu, ultraviyole ışığı gibi alternatif bir ışık kaynağı kullanmaktır. Seminal sıvı, içerdiği flavine bağlı olarak ekseri sarı renktedir. Flavin maddesi semenin ultraviyole ışığında mavi beyaz floresan bir ışımaya vermesini sağlar. Alternatif ışık kaynakları ile 450 nm'de semen görünür hale gelir. Bu yöntem hem açık hem koyu renk yüzeylerde geniş alanlarda uygulanabildiğinden ve hızlı olduğundan kullanışlıdır. Ancak idrar ya da tükürük gibi diğer vücut sıvılarında da ışımının gözleniyor olması özgüllüğünü düşürmektedir⁵⁶.

➤ **Biyokimyasal belirteçler**

Sperm hücrelerinin gösterilmesi semen lekesini tanımlamada en etkili yöntem olsa da pek çok örnekte spermatozoaya ulaşmak mümkün olmamaktadır. Bu yüzden mikroskopi dışında semenin gösterilmesinde başka metotlar da gereklidir. Bunun için kullanılan pek çok biyokimyasal belirteç bulunmaktadır⁵⁴⁻⁵⁷.

Asit Fosfataz:Asit fosfataz enziminin semendeki miktarı diğer vücut sıvılarına oranla çok daha yüksektir. Enzimin temel işlevinin semen plazmasındaki fosforu kolini hidrolizlemek olduğu bilinmektedir.Asit fosfataz semenin varlığını göstermek için iyi bir tespit yöntemidir. Enzimin varlığı, substrat olarak alphanaphtyl fosfat kullanılarak fenol ve naftollere hidrolize olması ve bu ürünlerin diazonyum tuzu ile birleşerek menekşe rengini vermesiyle gösterilir. Bu test eğer örnek eskiyse negatif sonuç verebilmektedir. Çünkü asit fosfataz zamanla daha az aktif hale gelmektedir. Ayrıca vajinal sekresyon gibi pek çok vücut sıvısında asit fosfataz içerdiği için testin özgüllüğünün düşük olması dezavantajdır⁵⁸⁻⁶².

Lösin Aminopeptidaz:Semende yüksek miktarda bulunan enzimin gösterilmesi esasına dayanır. Semen içerisindeki enzim L-lösin-beta-naftilamidinden beta naftilamini serbestleştirilmesini sağladıktan sonra meydana gelen ürünün diazonyum tuzu ile birleşip kırmızı renkte bir bileşik oluşturması ile gösterilir^{63,64}.

Gama Glutamil Transferaz:Substrat olarak kullanılan gama glutamil alfa naftilamidin enzim etkisiyle serbestleşmesi sonucu meydana gelen alfa naftilamin, bir diazonyum tuzu olan Fast Garnet GBC ile kırmızı kahverengi bir bileşik oluşturur^{62,65}.

Spermin Testi: Asit fosfataz gibi sperminin semendeki miktarı diğer doku ve vücut sıvılarına oranla daha fazladır. 11-20 yıl bekletilmiş lekelerde büyük ölçüde pozitif sonuç alınabildiği bildirilmiştir^{58,62}.

Çinko Testi:Seminal lekelerdeki çinko düzeyi prostat sekresyonundan kaynaklanmaktadır. 20 yıllık eski lekelerde bile etkinliği gösterilmiştir⁶⁶.

Kolin Testi:Temel kaynağı seminal veziküllerdeki fosforil kolindir. Vajinal ilişki sonrasındaki bir gün içerisinde saptanabilir^{62,66}.

Semenogelin: Seminal veziküllerin salgıladığı bir proteindir. Ejakülatın hızlı pıhtılaşmasını sağlar. Seminal vezikül spesifik antijen özelliği ve ayrıca prostat spesifik antijen için substrat rolü gösterir.

➤ **İmmunolojik belirteçler**

1978'de George Sensabough'un prostat spesifik antijeni p30'u keşfetmesiyle immünolojik çalışmalar yeni bir boyut kazandı. Sensabough; p30'u, radial immünodifüzyon, roket elektroforez gibi yöntemlerle izole edebilmişti. Kısa bir süre sonra p30, antijen-antikor reaksiyonu temelinde çalışan enzim bağlı immunoabsorbant deneyi (ELİSA) ile gösterildi^{57,62,67-69}.

Prostat Spesifik Antijen:Prostat-Spesifik Antijen (PSA, p30), prostat bezi tarafından üretilen proteolitik bir glikoproteindir. Semen tayininde spermiumun ışık mikroskobu ile gösterilmesi en güvenilir yol olarak bilinmekte ise de şüpheli leke ya da sıvının spermatozoa içermediği azospermik, aspermik, vasktomili olgularda da lekenin semen olup olmadığını belirlemek adli bilimler açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle seminal sıvıda çok yüksek konsantrasyonda bulunan PSA adli alanda semen tayininde oldukça etkilidir. Kadın vücut sıvısında, vajinada olmaması sebebiyle spesifitesi yüksektir. Sperm mikroskopisi zayıf pozitif ya da şüpheli olgularda PSA araştırılması önerilmektedir. Ayrıca asit fosfataz ve p30 değerlerinin pozitif, sperm mikroskopisinin negatif olduğu olgularda mutlaka moleküler genetik inceleme ve DNA çalışılmalıdır⁶⁹⁻⁷¹.

➤ **Mikroskopik inceleme**

Olay yerinde elde edilen biyolojik bir lekede spermiumun morfolojik olarak gösterilmesi eskiden beri semenin varlığına kesin delil olarak kabul edilmektedir. Ancak lekede sperm bulunmaması lekenin semen olmadığını değil sadece sperm bulunmadığının göstergesidir.

Spermatozoaların mikroskopik olarak görüntülenmesi için birçok farklı morfoloji boyası kullanılmaktadır. Bunların başlıcaları; Papanicolaou, Hematoksilen-Eosin, Giemsa, May-Grünwald Giemsa, Eosin-Nigrosin, Diff-Quick, Shorr, Christmas tree Fuksin, Corin-Stockis, Gentian Moru ve Metilen Mavidir. Bunlardan en sık kullanılanları ise Christmas tree (Yılbaşı ağacı boyası) ve Hematoksilen-Eosin boyalarıdır⁷²⁻⁷³.

Christmas tree (Yılbaşı ağacı boyası)

Sperm tayini histopatolojik bir boya olan Christmas tree boyası ile oldukça kolaylaşmıştır. Bu yöntemle sperm başı pembe, başın alt kısmı koyu kırmızı, orta kısım mavi ve kuyruk sarımsı yeşil boyanmaktadır. Parlak renkleri nedeni ile en popüler boya olarak bilinir. Leke suda çözünerek bir kısmı mikroskop lamına koyulur. Isıyla sabitlenip yılbaşı ağacı boyası ile boyanır. Preparat 400-1000 büyütme ile incelenir. Sadece sperm başları olsa bile yılbaşı ağacı boyası bunların ayırt edilmesini sağlar. Bu da semen varlığının tespiti için yeterlidir. Faz kontrast ya da karanlık alan mikroskobu kullanılabilir^{73,74}.

Hematoksilen-Eosin

Patoloji laboratuvarlarında doku kesitlerini boyamak için sıkça kullanılan Hematoksilen-Eosin boyası sperm boyamada da kullanılmaktadır. Hematoksilen, hücrenin “bazofilik” olan her komponentini boyar. Nükleik asit (DNA, RNA) içeriğinin fazla olmasından dolayı, hücrelerin nükleusları genellikle bazofiliktir. Bazofilik olan komponentler, Hematoksilen ile mavi-mor renklerini alır. Eosin ise, hücrenin asidofilik olan kısımlarını pembe-kırmızı renge boyar. Yapılan boya karşılaştırmaları çalışmasında, Christmas tree boyasının Hematoksilen-Eosin’den daha iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır⁷⁴.

Tükürük

Tükürük birçok suçta delil olabilir. Isırıklarda, sigarada, çiğnenmiş ya da yenmiş bir madde ya da artıka, kısaca tükürükle temas eden yerlerde olabilir ve DNA delili barındırır. Tükürük lekelerinin görülmesi güç ve tespiti de zordur. Günümüzde tükürük için kullanılan genel kabul görmüş birkaç test vardır ancak bu testler tükürüğe spesifik doğrulama testleri değildir.

Kan ve sperm gibi tükürükte alternatif ışık kaynağı kullanılarak belirlenebilir. Tükürük lekeleri, ultraviyole ışık altında bakıldığında mavi-beyaz görünür ancak bu tükürük lekesini diğer vücut sıvılarından ayırt etmez.

Tükürük için en yaygın olarak kullanılan yöntem tükürük içindeki amilazın bir polisakkarit olan nişastayı monosakkarit olan dekstroza çevirmesine dayanan leke içerisinde amilaz bulunup bulunmadığının tespitidir. Her ne kadar tükürükte amilaz enzimi bulunsada ve amilaz için testler varsada amilaz diğer birçok vücut sıvısında bulunmaktadır. Tükürükte miktarı daha fazladır bu

nedenle test sonuçlarının yoğunluğu tükürük için pozitif ön tanı anlamına gelir. Tükürükte yanak iç duvarına ait çok sayıda epitelyum hücre bulunur ve bu nedenle kolaylıkla DNA tiplendirmesi yapılabilir⁷⁵⁻⁸⁰.

Menstruel kan

Menstruel kanda endometrium artıkları, katabolitler (yıkım ürünleri), prostoglandinler, enzimler, servikal mukus, vaginadan dökülen hücreler ve bakteriler bulunur. Kanama bol olmadıkça, endometrium tarafından salgılanan fazla miktardaki fibrinolizin adlı enzim tarafından adet kanının pıhtılaşması önlenir.

Menstruel kanın tespiti için günümüzde kullanımı kolay doğrulayıcı bir test mevcut değildir. Oysaki periferik kan ile menstruel kan arasındaki ayrım cinsel saldırı vakalarında oldukça değerli bilgiler sağlayabilir. 2015 yılında yapılan bir çalışma fibrin bozunma ürünlerinin saptanmasına dayalı D-Dimer testi ile menstruel kanın tespit edilebileceğini belirtmektedir. Bir başka çalışmada menstruel kanda spesifik gen ifadeleri farklılıkları mRNA'nın RT-PCR analizi kullanılarak saptanabileceği ve periferik kan ile menstruel kanın birbirinden kesin olarak ayırt edilebileceğini ifade etmektedir⁸¹⁻⁸⁵.

Vücut sıvılarının tanımlanmasında güncel yaklaşımlar

➤ mRNA profil metodu

mRNA'ların adli laboratuvarlar rutininde biyolojik sıvı ve lekelerin tanımlanmasında kullanılabilmesi için seçilen mRNA belirtecinin doku spesifik olması, olay yerinde veya postmortem örneklerde stabilitesinin bozulmaması, ve ekspresyon seviyelerinin çevresel koşullara bağlı olarak değişiklik göstermemesi gerekmektedir. Bu nedenle mRNA ekspresyon analizinin vücut sıvılarının tayininde etkinliğini ortaya koymak için yapılan ön çalışmalar bazı mRNA tiplerinin bu alanda kullanıma uygun olduğu, bazılarının ise doku spesifik olmadığı ve/veya stabilitesinin düşük olması nedeniyle kullanılmasının uygun olmayacağını göstermektedir⁸⁶. Juusola ve Ballantyne kan için beta-spektrin (SPTB) ve porfobilinojen deaminaz (PBGD), tükürük için statherin (STATH) ve histatin 3 (HTN3), semen için protamin 1 (PRM1) ve protamin 2 (PRM2), vaginal sekresyon için human beta defensin-1 (HBD-1) ve müsin 4 (MUC4) mRNA belirteçleri üzerinde çalışmışlar ve dört vücut sıvısında tanımlamayı

başarmışlardır⁸⁷. Nussbaumer ve ark. hemoglobin A (HBA), kallikrein (KLK) ve musin 4 (MUC4) potansiyel markerlarını analiz etmiş ve biyolojik lekenin orjininin belirlenmesinde faydalı markerlar olduğunu göstermişlerdir⁸⁸. Haas ve ark. daha önce bildirilen mRNA belirteçlerini kullanarak kan, tükürük, semen, menstrual kan ve vajinal sıvının tanımlanmasında mRNA kullanımının geleneksel testlere etkili bir alternatif olduğunu belirtmişlerdir⁸⁹. Bu çalışmalar ile birlikte vajinal sekresyonların tanımlanması için önerilen birkaç mRNA belirteci tükürük örneklerinde yanlış pozitifliğe yol açan tartışmalı sonuçlar ortaya koymuştur. Bu nedenle Fleming ve Harbison, vajinal florada baskın olduğu bildirilen bakterilerden Lactobacillus'ların iki türü olan L. gasseri ve L. crispatus'un kullanılabilmesini, bu bakterilerin 16S-23S rRNA intergenic spacer bölgesinin PCR'a dayalı olarak gösterilmesi neticesinde vajinal sıvının tanımlanabileceğini belirtmişlerdir⁹⁰.

DNA metilasyon profil metodu

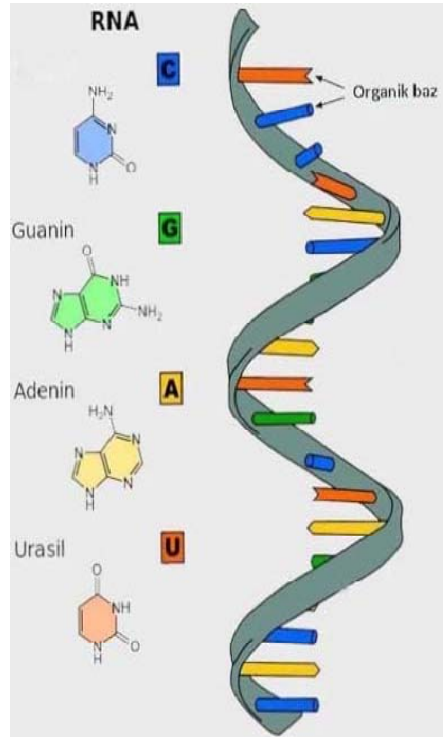
DNA metilasyonu; bir CpG dinükleotidindeki sitozinin 5'-karbonundan yapıya eklenmesini ifade eden epigenetik bir olaydır. Yalnızca Guanozin(G) tarafından takip edilen Sitozin(C) bazını etkiler. Böylelikle, DNA metilasyonu sadece CpG alanlarında gözlenir. DNA metilasyonu kromatin yapısını etkileyerek gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Epigenetik analizindeki son gelişmeler, tDMR'ler (dokuya özgü diferansiyel olarak metillenmiş bölgeler) adı verilen kromozom parçalarının, hücre veya doku tipine göre farklı DNA metilasyon profilleri olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, tDMR'lerin belirli bir CpG bölgesinde DNA metilasyon durumunun tespiti, DNA numunelerinin doku veya hücre tipinin tanımlanmasına izin verecektir. Frumkin ve ark. dokuya özgü metilasyon paternlerinin tespitine yönelik yaptığı çalışmada venöz ve menstrual kan, tükürük, semen ve cilt epidermisini tanımlamayı başarmışlardır⁹¹. Wasserstrom ve ark. beş genomik lokusta semen-spesifik DNA metilasyon paternlerinin tespitine dayanarak bir DNA kiti geliştirmiş, bu kit ile çeşitli vücut sıvılarından oluşan 135 örnek ve adli tıp laboratuvarından elde edilen 33 gerçek vaka örneğinde semeni doğru tanımlayarak semen tayininde DNA metilasyon analizinin mikroskopik inceleme kadar hassas ve güvenilir bir yöntem olabileceğini belirtmişlerdir⁹². Lee ve ark. ise çalışmalarında, bisülfid sekanslama metodunu kullanarak vücut sıvılarının tayini için tDMR'lerin potansiyelini

araştırdılar. Kan, tükürük, semen, menstrual kan ve vajinal sıvıdan toplanan DNA örneklerinde beş tDMR metilasyon profili üreterek sonuçta sperm için DACT1 ve USP49, vajinal sıvı için PFN3 tDMR'leri kullanılması önermişlerdir⁹³.

Bu sonuçlar DNA metilasyonu bazlı geliştirilen çalışmaların, biyolojik sıvıların tanımlanması için umut veren yeni bir yöntem olabileceğini göstermektedir, ancak adli laboratuvarların rutin uygulamalarında kullanılabilmesi için daha fazla marker içeren daha fazla doğrulama çalışmaları gerekmektedir²⁰.

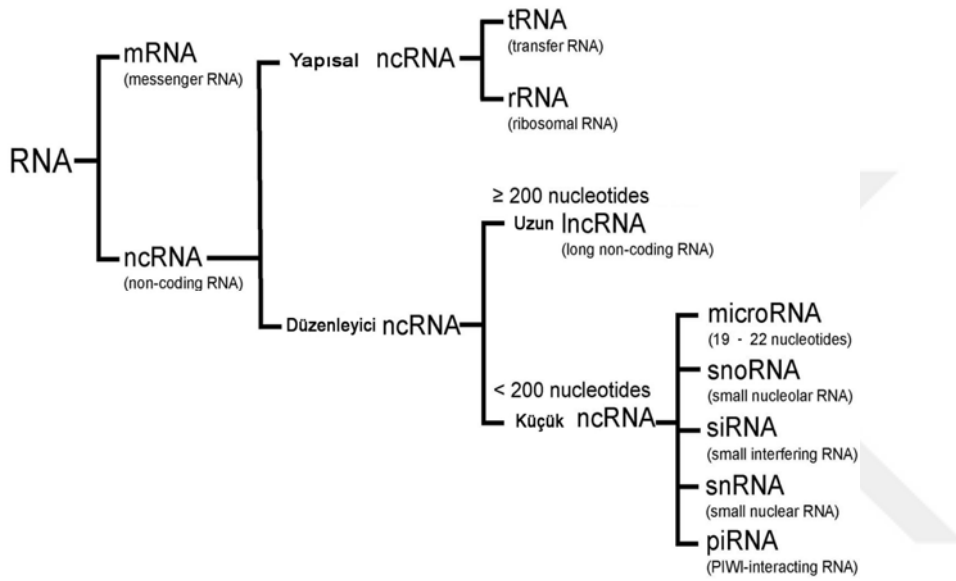
RNA'lar

RNA'lar; nükleotidlerin fosfodiester bağı ile bağlanmasından oluşan polinükleotid bir zincirdir. Genetik bilginin proteinlere dönüştürülmesi ve bu sürecin düzenlenmesini sağlarlar. Yapısında bir trifosfat grubu, beş karbonlu riboz şeker ve adenin, guanin, sitozin veya urasil bazlarından biri bulunur. Riboz şekerler birbirlerine fosfodiester bağı ile bağlanırlar. Bazlara ise glikozit bağı ile bağlanırlar. Her RNA molekülü DNA üzerinde gen adı verilen belirli bir bölge ile eşleniklik gösterir. RNA'lar DNA'dan farklı olarak tek zincirli ve Timin bazı yerine Urasil bazına sahiptir. Bazı RNA çeşitlerinde inosin, pseudouridin gibi farklı bazlara da rastlanmaktadır⁹⁴.



Şekil 5: RNA molekülünün temel yapısı.

RNA'lar protein kodlayan (coding) ve kodlamayan (noncoding, nc) olarak iki gruba ayrılır. Kodlamayan RNA'ların işlevleri göz önüne alınarak yapısal ve düzenleyici olarak sınıflandırılır. Yapısal olarak tanımlanan kodlamayan RNA'lar hücrenin temel işlevleri için gerekli olup rRNA ve tRNA'larını içermektedir. Düzenleyici RNA'lar ise hücre içindeki genetik bilgi akışını düzenleyen RNA'lar olup miRNA bu grupta yer almaktadır⁹⁵.



Şekil 6: RNA'ların sınıflandırılması.

mRNA

mRNA'lar DNA'daki genetik bilginin proteine çevrilmesine aracılık eden RNA'lardır. mRNA sentezinde DNA çift sarmalı çözülür ve kalıp görevi gören DNA zincirinin karşısına RNA polimeraz enzimi yardımıyla mRNA molekülü yazılır. Bu şekilde DNA'daki genetik bilgiyi alan mRNA bunu ribozomlara taşır. Ribozomlar mRNA'daki bilgiye göre sentezlenecek proteinin amino asit sırasını belirler. Ökaryotik bir hücrede 10000 farklı mRNA molekülü bulunur ve mRNA'lar toplam RNA'nın %5'ini oluşturmaktadır⁹⁶⁻⁹⁸.

tRNA

tRNA molekülleri RNA'ların en küçüğüdür. Hücredeki RNA'ların %15'ini oluşturur. Tek zincir hâlinde sentezlenen bazı bölgelerinde kendi içinde baz

eşleşmeleri yaparak yonca yaprağını andırır.tRNA'nın bir ucunda üçlü nükleotit dizisinden oluşan antikodon, diğer ucunda ise amino asidin bağlandığı bölüm bulunur. Her bir antikodon, tRNA çeşidine özgüdür ve mRNA üzerindeki kodonları karşılayacak şekildedir.tRNA'lar adaptör görevi yaparak bir uçlarınabağladıkları amino asiti, ribozoma tutunmuş mRNA'nın taşıdığı kodona göre polipeptidzincirine dizerler. Bu şekilde 20 çeşit aminoasitin çeşitli sıra ve sayıda dizilimini oluşturarak farklıproteinlerin sentezini gerçekleştirir^{97,98}.

rRNA

rRNA'lar proteinlerle birlikte ribozom organelinin yapısını oluşturur. Bir ribozomun yaklaşık %65'ini meydana getirirler. Hücredeki toplam RNA'nında %80-85 kadarı rRNA'dır. rRNA ribozomu oluşturan proteinlere bağlı olarak bulunur. rRNA'lar ribozomun yapısını oluşturmanın yanında mRNA'ların ribozoma bağlanmasında ve translasyonda önemli rol oynarlar⁹⁹.

Küçük kodlamayan RNA'lar

Hücrelerde mRNA, tRNA ve rRNA'dan başka farklı fonksiyonlara sahip RNA türleri de bulunmaktadır. Küçük kodlamayan RNA'lar olarak adlandırılan bu RNA türleri özellik ve fonksiyonlarına göre Küçük nüklear (small nuclear) RNA (snRNA), Küçük interferans RNA (siRNA), Small nucleolar RNAs(snoRNAs) ve mikro RNA (miRNA) olarak sınıflandırılmaktadır¹⁰⁰⁻¹⁰².

➤ Küçük nüklear (small nuclear) RNA (snRNA)

snRNA'lar nükleusta bulunan, mRNA işlenmesi ve gen regülasyonunda önemli görevleri olan küçük RNA sınıfıdır.mRNA işlenmesinde genlerin kodlanmayan (intron) bölgesinin çıkarılmasını sağlarlar. Böylece olgun mRNA oluşumuna yardımcı olurlar^{95,103}.

➤ Küçük interferans RNA(siRNA)

20-25 nükleotid uzunluğunda çift iplikli RNA'lardır. siRNA'lar spesifik mRNA'lara bağlanıponları işaretleyerek endonükleaz enzimleri tarafından yıkılmasını sağlarlar ve gen ekspresyonunun durdurulmasında görev alırlar¹⁰⁴.

➤ Küçük nükleolar RNAs (snoRNAs)

Ribozom biyogenezi için gerekli olan rRNA modifikasyonlarını gerçekleştirirler. Uzun pre-rRNA'ları küçük parçalaraayırarak fonksiyonel altünitelere (18S, 5.8S ve 28S moleküller) dönüştürürler¹⁰⁵.

➤ **PIWI interacting RNA (piRNA)**

25-30 nükleotid uzunluğunda küçük RNA'ların oldukça spesifik bir grubu olan piRNA'lar germ-line hücrelerinde, özellikle spermatogenezde retrotranspozonların ve diğer genetik elementlerin susturulmasını sağlamaktadır^{106,107}.

➤ **Mikro RNA (miRNA)**

MikroRNA'lar yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda, endojen, küçük, tek iplikli, DNA transkripsiyonu olan protein çevirisi olmayan RNA'lardır. mRNA'ya tutunarak posttranskripsiyonel gen ekspresyonunu inhibe ederler ve böylece proteinlere translasyonunun engellenmesine ya da mRNA degradasyonuna yol açarlar¹⁰⁸⁻¹¹⁰. miRNA'ların memelilerde tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'sinin aktivitesini kontrol ettiği tahmin edilmektedir. Şu anda, 1.881 prekürsör ve 2.588 olgun insan miRNA'sı, Haziran 2014 miRBase sürüm 21'de kaydedilmiştir^{111,112}.

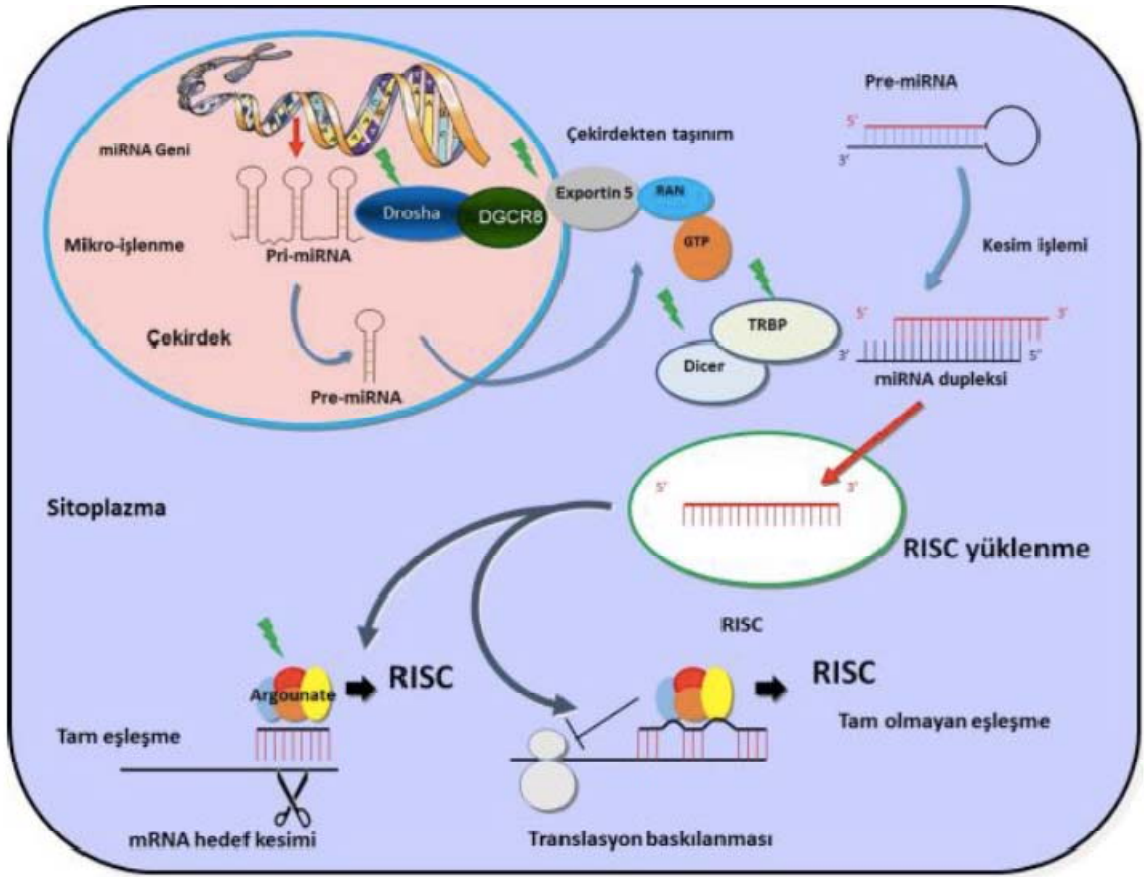
Mikro RNA'ların Keşfi

İlk kez 1993 yılında Victor Ambros'un laboratuvarında *Caenorhabditis Elegans*'da (*C. Elegans*) *lin-4* adı verilen miRNA keşfedilmiştir¹¹³. Aynı tarihte Gary Ruvkun ve arkadaşları tarafından *C. Elegans* üzerinde yapılan çalışmada *lin-4* adı verilen miRNA'ların *lin-14* geninin negatif düzenleyicisi olarak işlev yaptığı gösterilmiştir. Ruvkun grubu 2000 yılında *C. Elegans*'ta *let-7* adı verilen ikinci miRNA tipini keşfetmiştir. 21 nükleotitten oluşan *let-7*'nin larva döneminden erişkin döneme geçişi kontrol ettiği gözlenmiştir. *Let-7*'nin keşfi devrim niteliğinde olup bu kısa kodlanmayan RNA sınıfında yer alan ve gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu RNA'lara mikro RNA (miRNA) adı verilmiştir^{114,115}. Daha sonra arthropodlardan insana kadar birçok canlı türünde miRNA'lar bulunmuştur. Bugünlerde ise, binlerce miRNA insanlarda ve diğer canlılarda tanımlanmış olmakla birlikte, miRbase, miRDataBase gibi miRNA online dizi havuzları da oluşturulmuştur¹¹⁶.

Mikro RNA Biyogenezi

MiRNA'ların biyogenezi ilk olarak çekirdekte DNA'dan RNA polimeraz II enzimi aracılığında transkripsiyon ile pri-miRNA oluşmasıyla başlar. Daha sonra

çekirdekdeki pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü olan DiGeorge Kritik Sendrom Bölgesi 8 (DGCR8) ikilisinin oluşturduğu mikroşlemci kompleks tarafından pre-miRNA (pre-miRNA) adı verilen saç tokası yapısında yaklaşık 85 nükleotid uzunluğunda RNA moleküllerine bölünür. Mikroşlemci kompleksindeki DGCR8 tek zincirli RNA yapısını tanıırken, katalitik birim olarak işlev gören Drosha ise pri-miRNA'yı yaklaşık 11 bp'lik kısımlık bazal birleşme yerinden, yaklaşık 22 bp'lik kısımlık apikal birleşme yerinden kesmektedir. Çekirdekte oluşan bu pre-miRNA, exportin 5/RanGTP kompleksi tarafından sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada RNAaz III grubu endonükleaz olan Dicer ve TRBP (trans-activator RNA binding protein) tarafından 21 nükleotidli yolcu ve matür miRNA iplikçikleri içeren miRNA dublekslerine yarıılır. Bir yandan Dicer ana bileşenleri Argonaute proteinleri (Ago) olan RNA-indüklenmiş susturma kompleksine (RISC) oluşumunu başlatır. Matür miRNA RISC kompleksine entegre (miRISC) olurken, yolcu miRNA parçalanır. RISC kompleksi içerdiği miRNA'yı hedef mRNA'ya yöneltir ve hedef mRNA'nın sekansına bağlanarak translasyonun baskılanmasını indükler¹¹⁷⁻¹¹⁸.



Şekil 7: MikroRNA'ların biyogenezi.

Olgun miRNA'nın mRNA üzerindeki hedef bölgesine bağlanması tam ve kısmi (parsiyel) olmak üzere iki şekilde olur. miRNA, hedef mRNA'ya kısmi bütünlüçlülük ile bağlanırsa, mRNA'yı baskılayarak translasyonunu inhibe eder. Bu yolu kullanan olgun miRNA'lar, hedef mRNA'ya genellikle 3'UTR bölgesinden bağlanırlar. miRNA, hedef mRNA'ya tam bütünlüçlülük ile bağlanırsa, mRNA'nın yıkımını gerçekleştirir. Bu yolu kullanan miRNA'lar ise, hedef mRNA'ya daha çok kodlama sekansı veya ORF (Open Reading Frame =Açık Okuma Çerçevesi) deki bölgelerden bağlanırlar. Genel olarak miRNA'lar post transkripsiyonel düzenlenmeyi; translasyonu baskılayarak veya mRNA hedeflerinin yıkımını sağlayarak yapar¹²⁰⁻¹²².

Son yapılan çalışmalarda miRNA'ların biyogenezinde farklı yollar olduğu keşfedilmiştir. Mirtron yolağı bunlardan biridir. Bu yolda mRNA kodlayan genlerin çok kısa saç tokası yapısındaki intronlarının splayzingi ve uçlarının kesilmesi ile Dicer tarafından direkt taşınan ve işlenen, Drosha/DGCR8 prosesinden bağımsız, pre-miRNA'lar üretilir. Mirtron'lara ek

olarak, pre-miRNA'ların bir başka kaynağı bazı taşıyıcı RNA (tRNA) ve küçük nükleolar RNA (snoRNA)'lardır. miRNA'lara işlenmesi süreçleri Dicer'a bağımlı, Drosha/DGCR8'ye bağımsız şekilde gerçekleşip, RISC kompleksine geçerler. Bir diğeri ise Drosha bağımlı Dicer bağımsız yolaktır. Drosha tarafından pre-miRNA üretilir ve Dicer basamağı atlanarak Ago2'ye yüklenir^{123,124}.

Mikro RNA'ların Fonksiyonu

MikroRNA'lar fonksiyonlarını kendi nükleotid dizilerine komplimenter hedef genleri tanıma özelliğine sayesinde gerçekleştirir. MikroRNA'nın yapıya eklenmesi ile oluşan RISC kompleksi baz eşleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanarak ilgili genin protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkılmasına sebep olur. MikroRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların herbirinin de birden fazla mikroRNA tarafından hedeflenebildiği bilinmektedir. Bu şekilde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan mikroRNA'ların protein kodlayan genlerin %30'unu bu yolla yönettiği düşünülmektedir^{125,126}.

Embriyonik gelişme, hücre çoğalması ve farklılaşması gibi çoğu hücrel süreçler gen ekspresyon paternleri ile düzenlenir. Herhangi bir patolojik durumda da mikroRNA'ların gen ekspresyon seviyelerinin artabileceği veya azalabileceği öngörüldüğünden günümüzde birçok hastalığın tanısında, prognozunda ve tedavisinde miRNA'ların kullanımıyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda kanser, nörodejeneratif ve metabolik bozukluklar gibi birçok hastalığın patojeniziyle mikroRNA'ların ilişkili olduğu belirtilmektedir¹²⁷⁻¹³⁰.

Adli Bilimler ve MikroRNA

Adli genetikte RNA'dan çok çeşitli alanlarda yararlanılabileceği düşünülerek bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. RNA türlerinin gen ekspresyon seviyelerinin analizi ve RNA degradasyonunun kantitatif ölçümleri yapılarak RNA'ların vücut sıvılarının ayırt edilmesi, postmortem interval tayini, leke yaşı tayini gibi adli arenada potansiyel kullanım alanları olup olmadığı araştırılmaktadır. Günümüzde RNA türlerinden mRNA ile vücut sıvı ve dokularının ayırt edilmesi, ölüme neden olabilecek patolojilerin açıklanması,

postmortem interval tayini üzerine, rRNA'lar ile tür identifikasyonunda konusunda araştırmalar yapılmaktadır.

MikroRNA'ların da gen ekspresyonunun regülasyonunda rol oynaması nedeniyle benzer amaçlarla adli bilimler alanında kullanılabileceği düşünölmektedir. Bu nedenle vücut sıvılarının tanımlanması, postmortem interval tayini, biyolojik lekelerde yaş tayini, normal ve patolojik gen ekspresyonları arasındaki farkın belirlenmesi gibi çok çeşitli adli alanlar da çalışmalar yapılmaktadır¹³²⁻¹³⁶.

➤ **Vücut sıvılarının tanımlanmasında miRNA**

Adli vücut sıvılarının tayini için hassas ve spesifik yeni bir metot olarak bazı mRNA belirteçleri önerilmekle birlikte nem, sıcaklık gibi çevre koşullarının mRNA stabilitesini etkilemesi nedeniyle adli kullanıma daha uygun olabileceği düşünölen mikroRNA belirteçleri araştırılmaya başlanmıştır. MiRNA'lar; 18-22 nükleotid uzunluğunda kodlamayan RNA molekülleridir ve transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenler. Birkaç yeni çalışma, bazı miRNA'ların doku spesifik ekspresyon paterni gösterdiğini belirtmektedir. MiRNA'ların çok küçük boyutları onları çevresel faktörler tarafından bozulmaya daha dayanıklı hale getirir. Bu durum vücut sıvılarının tayininde biyobelirteç olarak miRNA'ların mRNA'lara karşı belirgin avantajlı olmasını sağlar. Adli bilimlerde biyolojik sıvılarda miRNA ifadesini ilk kez değerlendiren Hanson ve ark. miRNA'nın adli örneklerde tespit edilebileceğini göstermişlerdir.Çalışmalarında qRT-PCR analizini kullanarak periferik kan, tükürük, semen, vajinal sıvı ve menstruel kanda 425 insan miRNA'sını incelemiş farklı vücut sıvılarında farklı ekspresyon seviyesi gösteren dokuz miRNA'nın biyolojik sıvılarının tayininde kullanılabilecek marker olduğunu belirtmişlerdir¹⁰. Zubakov ve ark. mikroarray analizi ile 718 miRNA'nın ekspresyon seviyelerini tanımlamış ve biyolojik sıvıların tayini için potansiyel marker olabilecek 14 aday miRNA'yı belirlemiştir. Belirlenen 14 aday miRNA'nın qRT-PCR ile kantitatif ölçümünü yaparak verileri mikroarray verileri ile karşılatırdığında sadece kan ve semenin uyumlu olduğunu, tükürük, menstruel kan ve vajinal sıvıda aynı sonucu elde edemediklerini belirtmişlerdir. Bu ilk iki çalışma, adli tıp uygulamalarında miRNA ekspresyon analizinin kullanılma potansiyelini göstermekle birlikte, farklı teknoloji platformları ve istatistiksel yöntemler kullanıldığından sonuçlar birbirleri ile

uyumsuz bulunmuştur¹¹. Sonrasında yapılan çalışmalarda pekçok miRNA'nın vücut sıvılarının tanımlanmasında kullanılabilirliği test edilmiş ve bu miRNA'lar Tablo 1'de aktarılmıştır.

Tablo 1: Vücut sıvılarının tanımlanmasında test edilen miRNA'lar

Vücut sıvısı	miRNA		
Periferik kan	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-16 ▪ miR-20a ▪ miR-106a ▪ miR-126 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-486 ▪ miR-22-5p ▪ miR-144 ▪ miR-185 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-451 ▪ miR-451a ▪ miR-150
Semen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-10a ▪ miR-10b ▪ miR-17 ▪ miR-29b-2 ▪ miR-135a 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-135b ▪ miR-507 ▪ miR-508-5p ▪ miR-644 ▪ miR-340 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-891a ▪ miR-943 ▪ miR-888 ▪ miR-380
Tükürük	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-26a ▪ miR-96 ▪ miR-135b ▪ miR-141 ▪ miR-145 ▪ miR-182 ▪ miR-200c 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-208b ▪ miR-381 ▪ miR-431 ▪ miR-450b-5p ▪ miR-205 ▪ miR-124 ▪ miR-203 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-518c ▪ miR-583 ▪ miR-622 ▪ miR-658 ▪ miR-1228
Menstruel kan	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-144 ▪ miR-185 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-451 ▪ miR-214 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-412
Vajinal sıvı	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-124a ▪ miR-372 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-1260b ▪ miR-4286 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-617
Gözyaşı	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-637 		
Cilt	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-139 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-3169 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ miR-494

m

iRNA profillemesiyle vücut sıvısının tanımlanmasının çeşitli avantajları vardır. Bunlardan ilki, aynı lekeden miRNA ve DNA'nın eş zamanlı tespitinin mümkün olmasıdır. Bu durum olay yerlerinden elde edilen delil materyalinin genellikle sınırlı olması nedeniyle adli araştırmalarda önemli bir avantaj sağlar. miRNA profillemesinin bir diğer önemli avantajı ise, birden fazla miRNA ekspresyon profilinin aynı anda değerlendirilmesi mümkün olduğundan aynı tüpte birkaç vücut sıvısı analiz edebilmektedir. Bu şekilde çok az miktardaki delil materyallerinde örnek kaybı önlenirken, bir çalışma ile birden fazla belirtecin aynı anda değerlendirilebilmesi yanlış pozitiflik riskini de azaltacaktır.

➤ Postmortem interval tayininde miRNA

Postmortem interval tayini(PMI) adli ölümlerde olayın aydınlatılması ve olası potansiyel şüpheli/şüphelilerin ekarte edilebilmesi açısından oldukça

önemlidir. PMI belirlenmesi için kullanılan yöntemler ölümden sonra meydana gelen değişikliklerin zamanlarını hesaplamak prensibine dayanmaktadır. RNA ile ilgili çalışmalarda postmortem dönemdeki RNA degradasyonunun tespitine yöneliktir.

Postmortem interval tayinine yönelik farelerde postmortem kalp dokusunda 18S-rRNA ve mikroRNA üzerinde yapılan bir çalışmada yedi güne kadar 18S-rRNA ve mikroRNA bozunma paterninin yararlı olduğu gösterilmiştir¹³⁷. Postmortem fare dalağında yapılan bir çalışmada ise mikroRNA'ların postmortem interval ve sıcaklık değişimlerinden çok az oranda etkilendikleri ancak mRNA'ların ölümden sonra hızla degradasyona uğradıkları, bu nedenle erken postmortem interval tahmini için daha uygun belirteçler olduğu ifade edilmiştir¹³⁸.

Bir diğer çalışmada vitroz sıvıda bulunan miRNA'ların ölümden önceki fizyolojik ve çevresel koşullar hakkında bilgi depolayan bir tür biyolojik kara kutu olabileceği düşünülerek gündüz veya gece ölen bireylerin vitroz sıvısında miRNA'lar qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Sonuçta miR-142-5p ve miR-541 ekspresyon seviyeleri için gündüz ve gece arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu teyit edilmiştir. Bunun yanında miRNA ekspresyon seviyelerinin ölümden sonra en az 24 saat boyunca stabil kaldığı belirtilmiştir. Bu sonuç; miRNA seviyeleri ile postmortem dönemde geçen süre arasında bir ilişki bulunmadığını, miRNA seviyelerinin ölüm anında ortamdaki ışık ya da sirkadiyen saat ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür¹³⁹. Benzer bir başka çalışmada gündüz veya gece saatlerinde ölen bireylerden vitroz sıvı ile birlikte kan örneğinde alınarak miRNA'lar analiz edilmiş ve ölümün gece veya gündüz olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuçta miRNA seviyeleri ile ölümden sonra geçen 24 saatlik süre arasında anlamlı korelasyon olmadığı, miRNA'ların ölümden sonra en az 24 saat stabil kaldıkları, ancak miR-106b ve miR-96'nın vitroz sıvıda, miR-142-5p ve miR-219'un ise kanda gece ile gündüz arasında anlamlı derecede farklı ekspresyon paterni gösterdikleri, bu nedenle miRNA'ların ölüm zamanı tayininde sirkadiyen saat ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.¹⁴⁰

Bütün bu çalışmalarının yanında cinsiyet, ölüm yaşı, ilaç tedavileri, koma, hipoksi, yüksek ateş ve dehidrasyon gibi birçok faktörün RNA'nın bütünlüğünü etkilediği bilinmektedir. Dolayısıyla yapılan çalışmalarda bu farklılıkların

hesaplanan ölüm zamanlarında sapma yaratabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Günümüzde postmortem interval tayininde mikroRNA profili üzerine yapılan araştırmalar emekleme aşamasında olup ölüm zamanının belirlenmesinde kronolojik biyobelirteçler olarak ne kadar yararlı olabileceklerini açıklamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır¹⁴⁰.

➤ **Leke yaşının tayininde miRNA**

Olay yerlerinde bulunan biyolojik örneklerin yaşını belirleyebilmek adli bilimler alanına büyük bir yarar sağlar. Biyolojik materyalin olaydan bağımsız farklı bir zamanda olay yerine bırakıldığını veya hangi lekenin olay ile bağlantılı olduğunu tespit edebilmek suçun zamanı ve şüphelileri tahmin etmede yardımcı olur¹⁴¹.

Biyolojik lekelerde leke yaşı tayininin RNA degradasyon derecesi ölçülerek yapılıp yapılamayacağına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır. 150 güne kadar saklanan kan lekelerinde zamana bağlı olarak 18S rRNA ve beta-actin mRNA'ların degradasyon seviyeleri araştırılan çalışmada, kan lekelerinde her iki RNA belirtecinin 150 günün üzerinde analiz edilebildiği, ancak beta aktin mRNA'sının zamana bağlı olarak degradasyon derecesinin kademeli olarak arttığı izlenmiştir. Her iki RNA belirtecinin tüm hücrelerde bulunması ve ekspresyonunun kısmen yüksek olması nedeni ile kan lekesinden başka diğer vücut sıvılarına ait lekelerin degradasyon derecelerinin araştırılması için de kullanılabilceği ileri sürülmüştür¹⁴².

Bir başka çalışmada etanol veya amfetamin sülfat ve metamfetamin hidroklorür içeren kan lekeleri hazırlanıp mikroRNA-16 (miR-16) ve miR- 451 seviyelerindeki zamansal değişikliklere dayanarak leke yaşı tayini araştırılmıştır. Hazırlanan örneklerde miR-16 ve miR-451 seviyelerinin 5-28 gün sonra önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular ile kan lekesinden yaş tayinin miRNA'ların ekspresyon seviyeleri analiz edilerek hesaplanabileceği öne sürülmüştür¹⁴³.

Yapılan bu çalışmalar çeşitli mRNA ve miRNA belirteçlerinin RT-PCR tekniği ile analiz edilerek kuru kan lekelerinin yaşının belirlenmesinde bir parametre olarak kullanılabilceğini göstermiştir¹⁴¹⁻¹⁴³.

➤ **Ölüm nedeni patolojik mekanizmanın anlaşılmasında miRNA**

Real time PCR'ın keşfedilmesinden sonra RNA'nın adli bilimler alanında daha fazla uygulamada kullanılabileceği düşünülmüştür. Bunlar arasında ölümün meydana geldiği sürecin anlaşılması da bulunmaktadır. Ölümün meydana geldiği süreç doku hasarının bir türüdür ve ölüme neden olan birçok mekanizma morfolojik değişiklik meydana getirmez, çünkü bu değişiklikler çoğunlukla fonksiyoneldir veya görünür bulgular oluşturacak uzunlukta sürmemektedir. Hücre döngüsünün hemen her aşamasında rol alan miRNA'ların ekspresyon paterninin analiz edilmesi ile ölümün meydana geldiği süreçte hücrenin fonksiyonel durumunun gösterilmesi mümkün olabilir. Bu nedenle ölüm nedeninin saptanmasında miRNA ekspresyon paternlerinin tanıda kullanılabilirliğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan biri suda boğulma vakaları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Suda boğulmanın patogenezinde iyon kanallarında mikro değişiklikler olduğu ve iyon kanallarını kodlayıcı genlerin düzenlenmesinde rol alan bazı miRNA'ların gen ekspresyon analizi yapılarak bu değişikliklerin belirlenebileceği düşünülmüştür. Çalışmanın neticesinde tatlı suda boğulmalarda miR-706'nın tanı koydurucu olabileceği ileri sürülmüştür¹⁴⁴.

Travmatik beyin hasarı sonrası fare hipokampusunda mikroRNA gen ifadesi değişiklikleri araştırılan bir diğer çalışmanın neticesinde miR-142-3p ve miR-221'in adli uygulamalarda travmatik beyin hasarı değerlendirmesi için potansiyel biyolojik belirteçler olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir¹⁴⁵. Ölüm sebebinin araştırılmasına yönelik olarak yapılan bir başka çalışma ise ani bebek ölüm sendromunda kalp spesifik miR-1 ve beyin spesifik let-7 miRNA'ların disregülasyonuna ilişkindir. Çalışmanın bulgularına göre organ spesifik miRNA düzensizliğinin ani bebek ölüm sendromu patogenezi ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir¹⁴⁶.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Grubu

Bu araştırma, T.C. Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve 21/09/2017 tarihinde 2017/273 sayılı kararla uygun bulunmuştur. Çalışmaya katılmak isteyen 18-25 yaş grubunda 11'i kadın ve 12'si erkek olmak üzere toplam 23 gönüllü bireye, etik kurulda belirtilen yönergelerle uygun olarak hazırlanmış bilgilendirilmiş onam formu okutulup imzalatılmıştır.

Çalışma grubundaki bireylerden, 2 ml venöz kan örneği tek kullanımlık steril şırıngalar kullanılarak Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA)'li tüpe alındı. Tükürük örnekleri için gönüllü bireylerden örneklemeden önce en az bir saat yiyip içmemeleri istendi ve örnekler steril swap çubuklar kullanılarak her bir bireyin ağzının iç kısmına sürülerek alındı. Her bireyden 4-6 adet steril swap çubuklar ile alınan örnekler plastik tüplere konuldu. Semen örnekleri, 3-4 günlük cinsel perhizi bulunan gönüllü 12 kişiden masturbasyon yöntemi ile herhangi bir kayganlaştırıcı madde kullanmadan ejakulat vermeleri sağlanarak plastik kaplara toplandı. Menstruel kan örnekleri gönüllü 11 bireyden menstruel siklusun iki veya üçüncü gününde steril swap çubukları kullanılarak alındı. Her bireyden 4-6 adet steril swap çubuklar ile alınan örnekler plastik tüplere konuldu. Tüm numuneler ihtiyaç duyulana kadar -20°C'de saklandı. Moleküler analizler, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Gereçler

Cihazlar

- Buzdolabı (Hotpoint Ariston)
- Derin Dondurucu (Arçelik)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Hassas Terazı (ACJ 120-4M, Kern)
- Mikropipet Seti (Thermo Electron Corporation)
- Otoklav (OT 40 L, Nüve StreamArt)
- PCR (Veriti, Applied Biosystems)
- Real-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems)
- Santrifüj (NF-400, Nüve)

- Vorteks (VELP Scientifica)

Sarf ve Kimyasal Malzemeler

- 5 X Hot Firepol® Probe QPCR Mix Plus (ROX) (08-14-00020, Solis Biodyne)
- dNTP Mix (10 mM each) (R0193, Thermo Scientific™)
- Etanol (1009712500, Merck Millipore Corporation)
- GeneMATRIX FFPE RNA Purification Kit (E3593-02 100 preps, EURx)
- İzopropanol (I9516, Sigma)
- Kloroform:İzoamilalkol (24:1) (X205, Amresco)
- Microamp Real Time PCR Plate kaplama Filmi (100'lük) (Applied Biosystems)
- Microamp Real Time PCR Plate tutucu (Applied Biosystem)
- Mikrosantrifüj tüpü 1,5 ml'lik (Axygen)
- PCR tüpü 0,2 ml'lik (Axygen)
- Pipet ucu 0,5-10 µl'lik (T-300, Axygen)
- Pipet ucu 1-200 µl'lik (T-200-Y, Axygen)
- Pipet ucu 1-1000 µl'lik (T-1000-B, Axygen)
- Polipropilen Real Time PCR Plate (96'lık) (Applied Biosystems)
- RevertAid Reverse Transcriptase, 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR ile birlikte (200U/µl) (EP0442, Thermo Scientific)
- Ribolock RNase Inhibitor (40 U/µl) (EO0382, Thermo Scientific)
- Ribozol (N580, Amresco)
- Total RNA Control (Human) (4307281, Applied Biosystems™)

Periferik Kan ve Semen Örneklerinden RNA İzolasyonu

1. 500 µl EDTA'lı kan örneği 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Üzerlerine 500 µl ribozol eklendi. 750 µl semen örneği üzerine ise 750 µl ribozol eklendi. Örnekler hemen vortekslenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
2. +4°C'de soğutulmuş 200 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve hemen vorteklendi.
3. Mikrosantrifüj tüpleri +4°C'de 15 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.

4. Santrifüjden sonra örnek üç faza ayrıldı. Üstteki açık sıvı fazda RNA, orta beyaz bulutumsu fazda DNA, alttaki kırmızı fenol fazda protein ve lipid olmak üzere üç faz oluştu.
5. RNA içerikli üst açık sıvı faz, etiketli tüplere transfer edildi.
6. Sıvı fazın üzerine 500 µl hacimde izopropanol eklendi ve RNA'yı çöktürmek için 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
7. Tüpler +4°C'de 10 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
8. Süpernatant, pelletin altüst olmamasına dikkat edilerek pipetle atıldı.
9. Pellet üzerine 1 ml hacimde %75'lik soğuk etanol ilave edilerek RNA yıkanması sağlandı. Daha sonra, tüpler +4°C'de 10 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
10. Pipetle yine pellete dikkat edilerek süpernatant atıldı ve kuruma için 10-15 dk inkübe edildi. Etanolün kalmamasına dikkat edildi.
11. RNA pelletinin çözünmesi için üzerine 50 µl distile su ilave edildi. 15 sn kadar vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra tüpler -20°C'de saklandı.

Menstrual Kan ve Tükürük Örneklerinden RNA İzolasyonu

1. Miktarları 4-6 adet olan pamuklu çubuk yardımıyla alınan menstrual kan ve tükürük örnekleri, çubukları kesilerek 1,5 ml'lik eppendorflara alındı. Üzerlerine 1 ml Ribozol eklendi ve vortekslenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
2. +4°C'de soğutulmuş 200 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve hemen vorteklendi.
3. Mikrosantrifüj tüpleri +4°C'de 15 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
4. RNA içerikli üst açık sıvı faz, RNA binding spin-column'a transfer edildi ve GeneMATRIX FFPE RNA Purification Kit protokolü uygulandı.

Tüm örneklerden RNA izolasyonu yapıldıktan sonra RNA konsantrasyonu ve saflık tayini için NanoQ™ Spectrophotometer cihazı ile spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

Real-Time PCR ile MikroRNA Ekspresyon Analizine Yönelik Primer ve Prob Dizaynı

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Enstitüsü (NCBI; National Institute of Biotechnology Information) ve miRBase veri tabanından, ekspresyonları analiz edilmek istenen hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-412-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-891a-5p ve endojen kontrol olarak kullanılan hsa-miR-26b-5p'nin RNA dizileri belirlendi. İlgili miRNA'lara özgü primerler kök-halka yapısında olmak üzere, uygun prob dizileri ile beraber Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL tarafından dizayn edildi.

RNA izolasyonundan sonra elde edilen total RNA'lardan, ilgili cDNA'ların sentezlenmesi için gerekli revers transkriptaz (RT; reverse transcriptase) primer ile ekspresyon analizi için gerekli ileri (F; forward) primer ve prob dizileri "Metabion International AG, Martinsried/Deutschland" tarafından sentezlendi. İlgili primerlerin ve problemlerin dizileri Ek 1'de gösterilmiştir.

cDNA Eldesi

Ekspresyon analizi için, 12 miRNA'nın cDNA'ları oluşturuldu. Referans kontrol için Total RNA Control (Human) (Applied Biosystems™) kullanıldı. Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) için her bir miRNA'ya özgü 50 nM kök-halka RT primer, 5xRT tamponu, 10 mM dNTP, 200 U/μL RevertAid Revers Transkriptaz, 40 U/μL RiboLock RNase Inhibitor ve distile su karışımı toplam 10 μl olacak şekilde hazırlandı. RNA izolasyonu sonucu elde edilen total RNA örneğinden 5 μl karışıma eklendi. 16°C'de 30 dk, 42°C'de 30 dk, 85°C'de 5 dk PCR koşullarında miRNA'lar özgül olarak cDNA'ya dönüştürüldü ve örnekler -20°C'de saklandı.

Ekspresyon Analizi

Oluşturulan cDNA ürünlerinin gerçek zamanlı ölçülmesi gerçekleştirilir. miRNA saptamasında floresan saptama boyası olarak Taqman prob kullanıldı. 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna, master Mix, universal R, distile su, miRNA'lara özgül problemler ve forward primerleri karışımından 20 μl konuldu ve 5

ul özgül cDNA ilgili karışımlara uygulandı. Daha sonra plakanın üzeri film ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kaplanarak ısı bloğuna yerleştirildi. Başlama evresinde 50°C'de 2 dk, 95°C'de 15 dk ve döngü evresinde 50 döngü 95°C'de 15 sn, 58°C'de 90 sn olacak şekilde Real-time PCR analizi gerçekleştirildi.

Veri Analizi

İki farklı örnekte bulunan (endojen kontrol ve hedef miRNA) miRNA miktarlarının pozitif kontrol örnekleriyle beraber karşılaştırılarak miRNA miktarında meydana gelen değişiklikler tespit edildi. miRNA ekspresyon düzeyindeki bu değişimler, SDS 2.0.6 yazılımı ile $\Delta\Delta C_T$ değerleri kullanılarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Bu çalışma ile ilgili istatistiksel testler, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

Veriler STATISTICA 13.3 programı ile analiz edildi. MikroRNA değerlerinin değişim aralığı çok geniş olduğu için öncelikle verilere Box-Cox transformasyonu uygulanmıştır. MikroRNA ortalamaları bakımından gruplar arası farklılık miRNA'lar arası korelasyon dikkate alınarak çok değişkenli varyans analizi (MANOVA) ve post-hoc Tukey testi kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistik anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak alınmıştır. Gruplar arası farklılığın grafiksel gösterimi hata çubukları (error-bars) grafiği kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca olay yeri örneklerinin sınıflamasında etkili miRNA'ları ve cut-off değerlerini belirlemek amacıyla yine çok değişkenli bir yöntem olan Genel Sınıflama ve Regresyon Ağaçları (General Classification & Regression Trees) yöntemi kullanılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışmada 18-25 yaş aralığında 11 kadın 12 erkek toplam 23 birey bulunmaktadır. Çalışmada 23 bireyden periferik kan ve tükürük örnekleri, 11 kadın bireyden menstrual kan örneği, 12 erkek bireyden semen örnekleri alındı. Çalışmaya alınan bireylerin yaş ortalaması 19.57 ± 2.097 olarak hesaplandı.

Tablo 3: Cinsiyet ve Doku Türü Özellikleri (n=69)

	Kadın	Erkek	Periferik kan	Tükürük	Menstrual kan	Semen
Örnek sayısı	33 (%47.8)	36 (%52.2)	23 (%33.33)	23 (%33.33)	11 (%15.9)	12 (%17.4)

Vücut sıvılarının tanımlanmasında hedef biyomarkerlar olarak seçilen 11 hedef miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin cinsiyetler arasında farklı olup olmadığı açısından Independent t test ile istatistiksel analizi yapıldı. Periferik kan ve tükürükte cinsiyetlere göre p değerleri hesaplandı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$).

Tablo 4: Periferik Kanda Kadın ve Erkeğin miRNA ekspresyon düzeyleri bakımından karşılaştırılması

	Periferik Kan				
	Erkek	Kadın	Std.Dev. Erkek	Std.Dev. Kadın	p
miR-10b-3p	277,8	433,3	319,4	759,8	0,693041
miR-96-5p	6,7	5,4	8,0	6,9	0,418953
miR-106a	4,6	5,5	5,9	9,9	0,336587
miR-135a-5p	55,4	110,6	52,6	141,0	0,772848
miR-144-3p	552,2	523,5	1009,2	1132,0	0,147370
miR-203a-3p	38,5	14,3	106,8	20,1	0,634258
miR-205-5p	42,4	36,5	55,7	63,1	0,229901
miR-214-3p	43,1	29,1	85,9	46,0	0,255622
miR-412-3p	138,1	98,2	227,7	212,4	0,108790
miR-451a	494669,7	654449,8	511101,5	677558,9	0,954449
miR-891a	33,2	22,2	48,2	42,2	0,156700

Tablo 5: Tükürükte Kadın ve Erkeğin miRNA ekspresyon düzeyleri bakımından karşılaştırılması

	Tükürük				
	Erkek	Kadın	Std.Dev. Erkek	Std.Dev. Kadın	p
miR-10b-3p	640	104	1143	144	0,109798
miR-96-5p	3	3	5	4	0,520888
miR-106a	0	0	1	0	0,479109
miR-135a-5p	270	176	426	162	0,811403
miR-144-3p	980	4963	1630	8880	0,967843
miR-203a-3p	7090086	20412754	11147428	26727728	0,425200
miR-205-5p	1585283	363317	2431249	483521	0,298801
miR-214-3p	551	1018	820	2677	0,848518
miR-412-3p	1638	11044	2716	32134	0,181506
miR-451a	352	319	979	660	0,379984
miR-891a	914	4670	1195	14002	0,852329

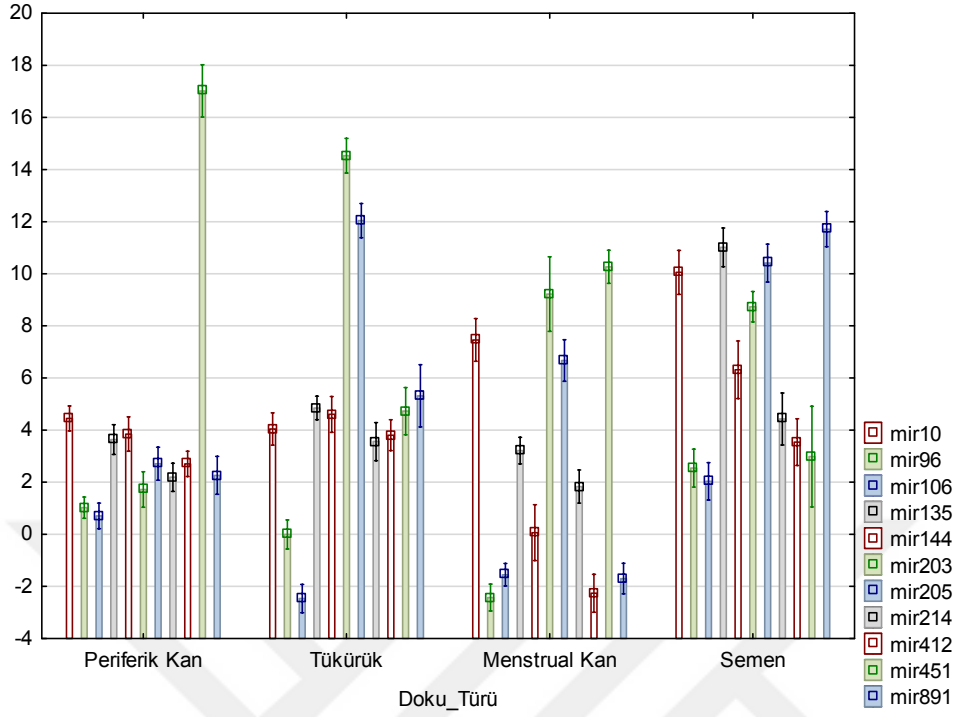
Ekspresyon ölçümlerinin veri analizi

Vücut sıvılarının tanımlanmasında hedef biyomarkerlar olarak seçilen 11 hedef miRNA'nın ekspresyon düzeyleri doku türlerine göre değerlendirilerek p değerleri hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alındı. Sonuç olarak; bakılan 11 miRNA'nın ekspresyon seviyeleri ve doku türleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi ($p < 0,05$).

Tablo 6: MiRNA'ların doku türlerine göre ortalama ekspresyon verileri

	Venöz kan(n=23) <i>ort±sd</i>	Tükürük(n=23) <i>ort±sd</i>	Mens Kanı(n=11) <i>ort±sd</i>	Semen(n=12) <i>ort±sd</i>
miR-10b-3p	352,2±565,4	384±859	19142,7±19347,7	2971802±4078917
miR-96-5p	6,1±7,4	3±4	0,15±0,08	133±288
miR-106a	5,0±7,9	0±0	0,28±0,21	24±31
miR-135a-5p	81,8±105,9	225±324	33,13±28,87	109802±91037
miR-144-3p	538,5±1045,0	2971±6555	8,09±22,55	98122±230278
miR-203a-3p	26,9±77,7	13461797±20812245	52520,9±69341,7	12356±12889
miR-205-5p	39,6±58,0	1000865±1857764	1564,11±1492,41	87707±95906
miR-214-3p	36,4±68,6	775±1911	14,65±19,87	3494±6327
miR-412-3p	119,0±216,5	6136±22274	0,24±0,38	2651±5876
miR-451a	571086,3±588173,2	337±823	5380,11±2991,09	303±878
miR-891a	27,9±44,8	2710±9670	0,24±0,15	117582±96975

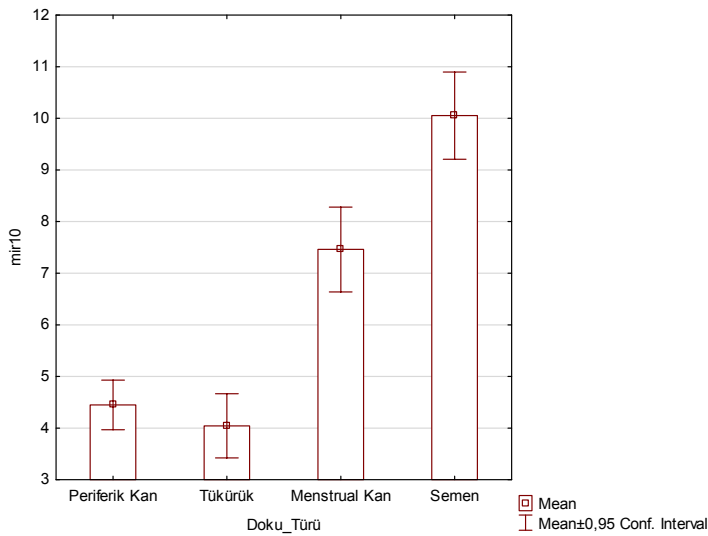
Tablo 7: miRNA'ların doku türlerine göre ortalama ekspresyon düzeyleri



➤ **Hsa-miR-10b-3p Ekspresyonunun değerlendirilmesi**

Hsa-miR-10b-3p ortalaması semende diğer gruplardan anlamlı derecede yüksektir ($p < 0,001$). Menstruel kanda ise periferik kandan ve tükürükden anlamlı derecede yüksektir ($p < 0,001$).

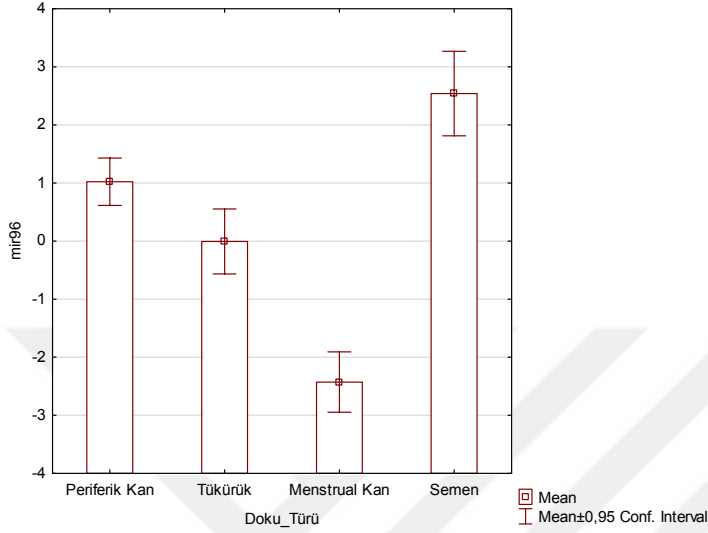
Tablo 8: miRNA-10b-3p'nin doku türlerine göre ekspresyon düzeyi



➤ **Hsa-miR-96-5p ekspresyonunun değerlendirilmesi**

Hsa-miR-96-5p ortalaması bakımından tüm gruplar arasındaki fark anlamlıdır($p<0,01$).

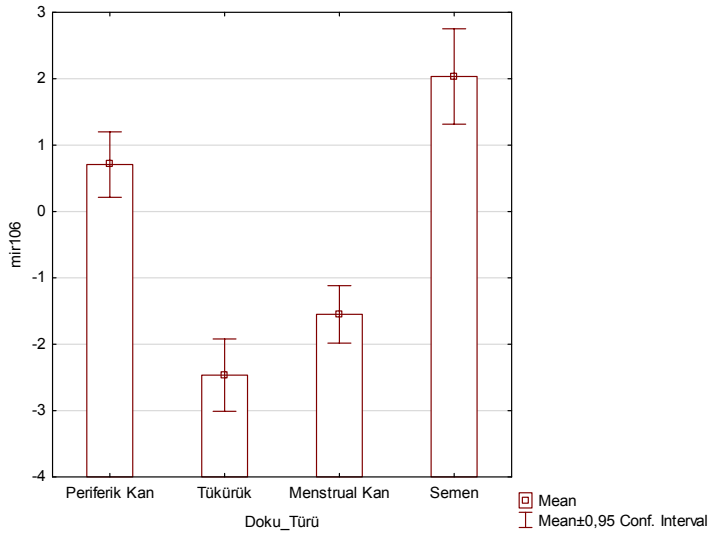
Tablo 9: miRNA-96-5p'nin doku türlerine göre ekspresyon düzeyi



➤ **Hsa-miR-106a ekspresyonunun değerlendirilmesi**

Hsa-miR-106a ortalaması semende diğer gruplardan anlamlı derecede yüksektir($p<0,05$). Periferik kanda da tükürük ve menstruel kandan anlamlı derecede yüksektir($p<0,05$).

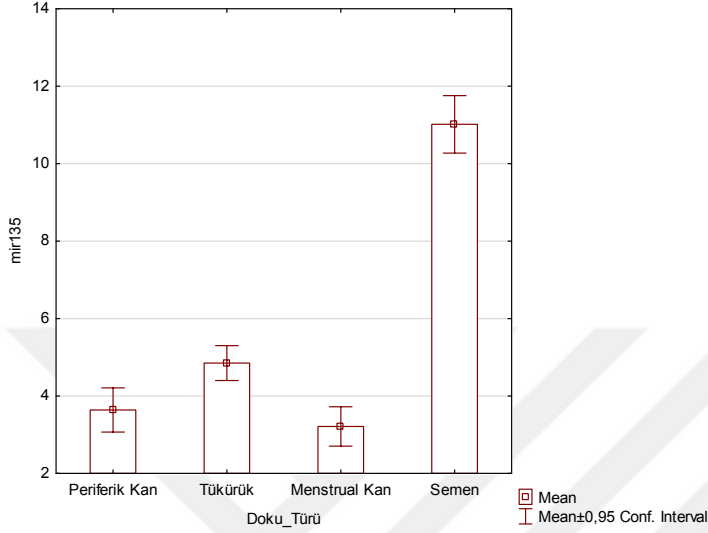
Tablo 10: miRNA-106a doku türlerine göre ekspresyon düzeyi



➤ **Hsa-miR-135a-5p ekspresyonunun değerlendirilmesi**

Hsa-miR-135a-5p ortalaması semende diğer gruplardan anlamlı derecede yüksektir ($p < 0,05$).

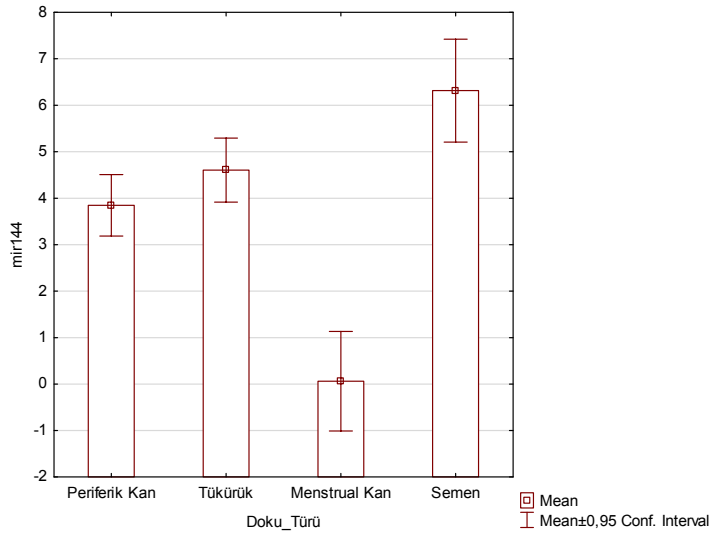
Tablo 11: miRNA-135a-5p doku türlerine göre ekspresyon düzeyi



➤ **Hsa-miR-144-3p ekspresyonunun değerlendirilmesi**

Hsa-miR-144-3p ortalaması semende diğer gruplardan anlamlı derecede yüksektir ($p < 0,05$). Periferik kanda ve tükürükte ise menstruel kandan anlamlı derecede yüksektir ($p < 0,001$).

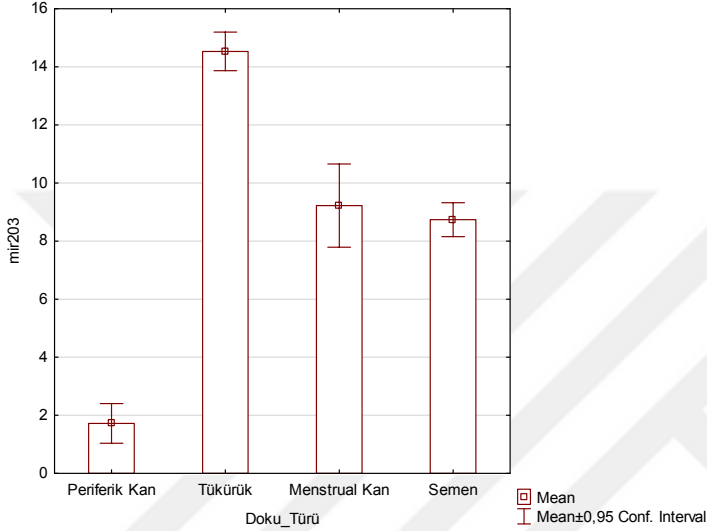
Tablo 12: miRNA-144-3p doku türlerine göre ekspresyon düzeyi



➤ **Hsa-miR-203a-3p ekspresyonunun değerlendirilmesi**

Hsa-miR-203a-3p ortalaması tükürükte diğer gruplardan anlamlı derecede yüksektir($p<0,001$). Periferik kanda diğer gruplardan anlamlı derecede düşüktür($p<0,001$).

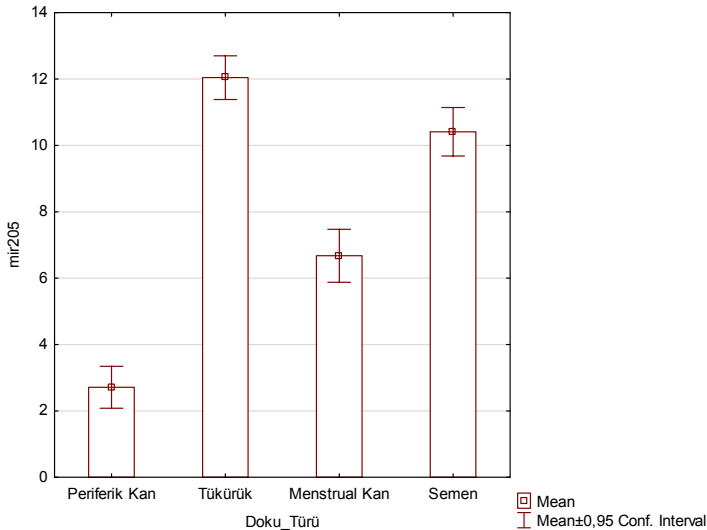
Tablo 13: miRNA-203a-3p doku türlerine ekspresyon düzeyi



➤ **Hsa-miR-205-5p ekspresyonunun değerlendirilmesi**

Hsa-miR-205-5p ortalaması tükürükte diğer gruplardan anlamlı derecede yüksektir($p<0,001$). Ayrıca tüm gruplar arasında fark anlamlıdır($p<0,05$).

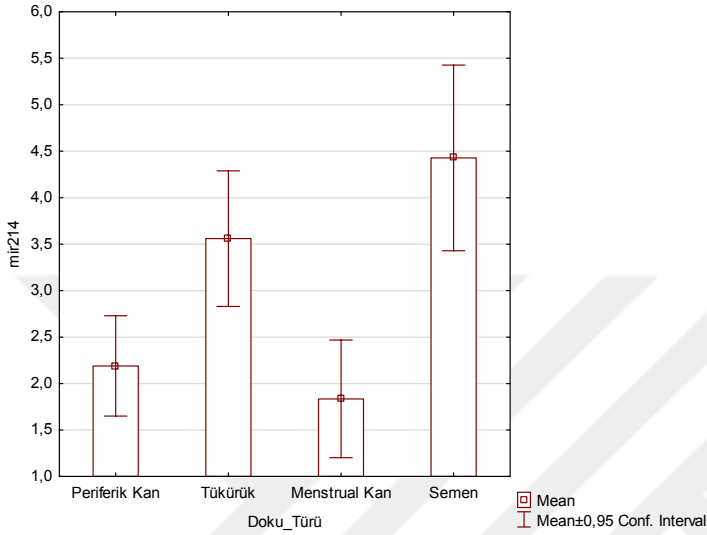
Tablo 14: miRNA-205-5p'nin doku türlerine göre ekspresyon düzeyi



➤ **Hsa-miR-214-3p ekspresyonunun değerlendirilmesi**

Hsa-miR-214-3p ortalaması menstruel kanda tükürük ve semenden anlamlı derecede düşüktür($p<0,05$). Menstruel kan ve periferik kan arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur($p=0,944$).

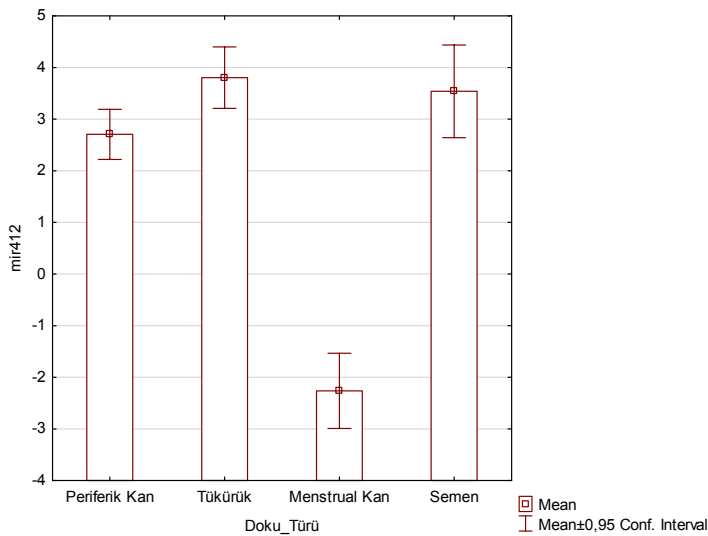
Tablo 15: miRNA-214-3p'nin doku türlerine göre ekspresyon düzeyi



➤ **Hsa-miR-412-3p ekspresyonunun değerlendirilmesi**

Hsa-miR-412-3p ortalaması menstruel kanda diğer gruplardan anlamlı derecede düşüktür($p<0,001$). Semen ile periferik kan ve semen ile tükürük arasında anlamlı bir fark yoktur($p<0,05$).

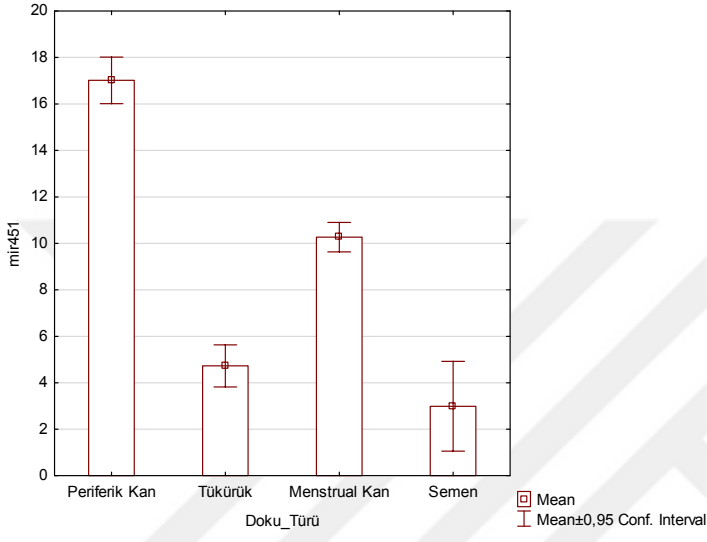
Tablo 16: miRNA-412-3p'nin doku türlerine göre ekspresyon düzeyi



➤ Hsa-miR-451a ekspresyonunun değerlendirilmesi

Hsa-miR-451a ortalaması periferik kanda diğer gruplardan anlamlı derecede yüksektir($p<0,001$). Menstruel kanda tükürük ve semenden yüksektir ($p<0,001$). Tükürük ve semen arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,180$).

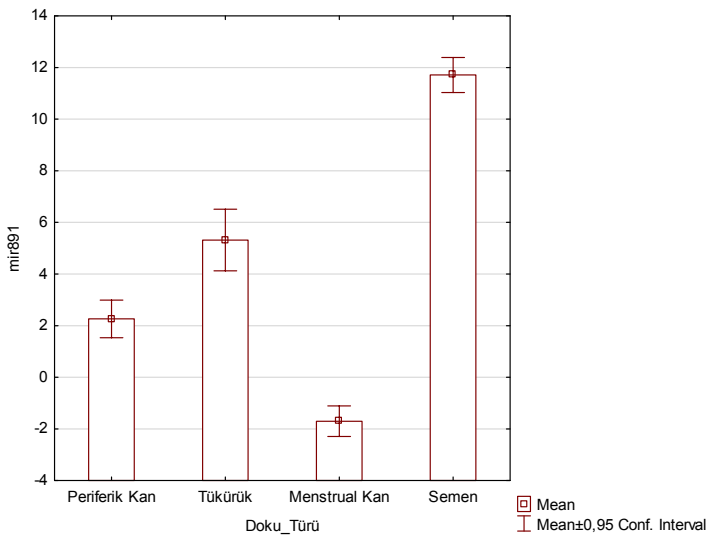
Tablo 17: miRNA-451a'nın doku türlerine göre ekspresyon düzeyi



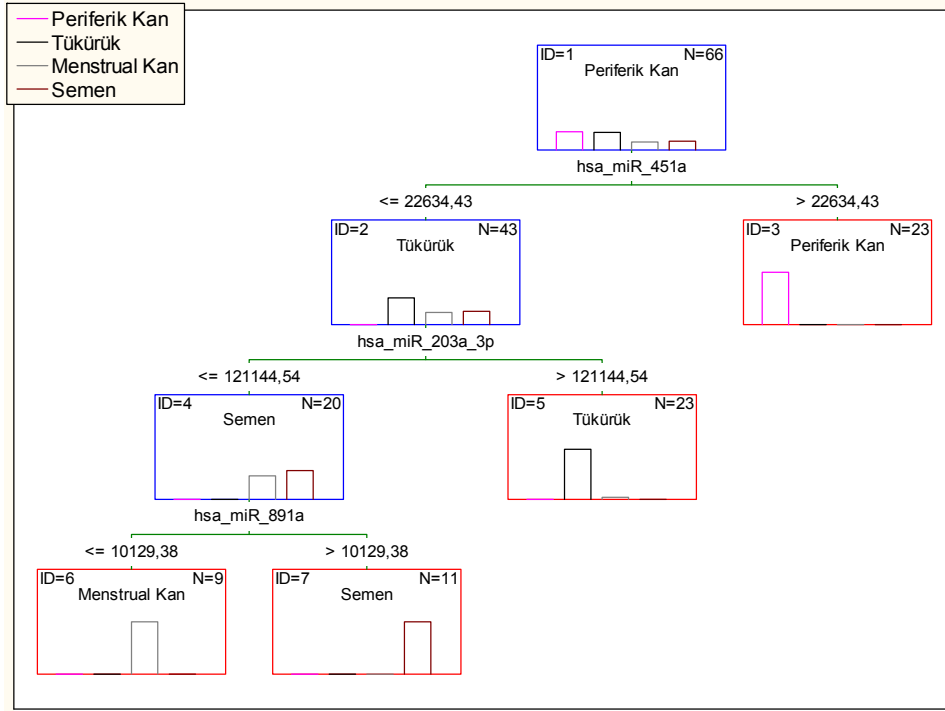
➤ Hsa-miR-891a ekspresyonunun değerlendirilmesi

Hsa-miR-891a ortalaması semende diğer gruplardan anlamlı derecede yüksektir($p<0,001$). Ayrıca tüm gruplar arasında fark anlamlıdır($p<0,05$).

Tablo 18: miRNA-891a'nın doku türlerine göre ekspresyon düzeyi



Bu sonuçlara göre, periferik kan için hsa-miR-451a, tükürük için hsa-miR-203a-3p, semen için hsa-miR-891a vücut sıvılarının tanımlanmasında ayırt edici özelliğe sahiptir. Olay yerinden elde edilen bir örnekte hsa-miR-451a>22634,43 ise periferik kan örneği olduğu, hsa-miR-203a-3p>121144,54 ise tükürük örneği olduğu, hsa-miR-891a>10129,38 ise semen örneği olduğu söylenebilmektedir. Bir olay yeri örneğinin bu miRNA'lar için sonuçları belirtilen eşik değerlerden düşükse menstrual kan olduğu söylenebilir.



Şekil 8: Genel Sınıflama ve Regresyon Ağacı

TARTIŞMA

Adli uygulamalarda olay yerlerinden elde edilen vücut sıvılarının orijinini doğru bir şekilde tespit etmek delil ile iddia edilen suç arasındaki bağlantının kurulması ve neticede olayın aydınlatılması açısından oldukça önemlidir. Örneğin; bir şüphelinin aracında cinsel saldırıya uğradığını iddia eden mağdurun DNA'sı araçta tespit edilebilir ve şüpheli bu durumu mağdurun pek çok kez aracına binmesi neticesinde olabileceğini iddia edebilir. Bu durumda araçta bulunan DNA kaynağının vajinal sekresyon olduğu tespit edildiğinde şüphelinin iddiası çürütülerek, cinsel istismarın kanıtı ortaya konmuş olacaktır¹⁻³.

Vücut sıvılarının tanımlanmasında günümüz uygulamalarında immunolojik ve enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Kanda hemoglobin, tükürükte amilaz, semende prostat spesifik antijen ve sperm varlığına dayalı testler geliştirilmiştir. Ancak menstruel kan ve vajinal sekresyonun tanımlanması için geliştirilmiş enzimatik veya immunolojik doku identifikasyon testi bulunmamaktadır. Ayrıca kullanılan bu testlerin çoğunun spesifik olmaması, değişen hassasiyet-düşük özgüllük dereceleri ve her biyolojik vücut sıvısı için ayrı teknik kullanılmasının beraberinde getirdiği adli delil tahribatı, yoğun emek ve zaman tüketimi gibi çeşitli kısıtlamaları bulunmaktadır⁶⁻⁹. Bu kısıtlamalar vücut sıvılarının tanımlanmasında daha spesifik ve daha özgül yeni yöntemlerin araştırılması ihtiyacını doğurmuştur. Bu nedenle RNA'ya dayalı moleküler çalışmalar üzerinde araştırmalara başlanmıştır. İlk çalışmalar mRNA üzerine yapılmış ve bazı mRNA'ların doku spesifik eksprese edildiği gösterilmiştir. Ancak mRNA'larında nem, UV ışık, sıcaklık gibi çevresel etkenlerden etkilenecek stabilitesinin kolay bozulduğu ortaya konulmuştur^{19,20}.

Son zamanlarda gerçekleştirilen araştırmalarda ise miRNA'larında doku spesifik eksprese edildikleri ve daha küçük boyutlu olmaları neticesinde çevresel şartlarda bozulmaya daha dirençli oldukları, bu nedenle de vücut sıvılarının tanımlanmasında rutinde kullanılan testlere ve mRNA'ya alternatif olabileceği ileri sürülmektedir. Bu araştırmalarda kan, tükürük, semen, vajinal sekresyon ve menstruel kan için anlamlı sonuçlar veren miRNA'lar tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmalar henüz başlangıç aşamasındadır ve miRNA'ların vücut sıvılarının tanımlanmasındaki potansiyeli tümüyle aydınlatılabilmemiş

değildir. Dolayısıyla miRNA'ları adli bilimler alanında kullanılabilen standart ve güvenilir bir yöntem haline getirmek için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır¹⁰⁻¹⁴.

Bu çalışmada vücut sıvılarının tanımlanması amacıyla periferik kan, semen, tükürük ve menstruel kanda, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-451a ve hsa-miR-891a-5p olmak üzere toplam 11 hedef marker olarak seçilen miRNA'ların (Periferik kan için hsa-miR-451a, hsa-miR-144-3p ve hsa-miR-106a-5p; semen için hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-891a-5p ve hsa-miR-135a-5p; tükürük için hsa-miR-96-5p, hsa-miR-203a-3p ve hsa-miR-205-5p; menstruel kan için hsa-miR-412-3p ve hsa-miR-214-3p) ekspresyon analizi yapılmıştır. Çalışmamızda seçilen 11 hedef miRNA'nın ekspresyon seviyeleri ve dört vücut sıvısı arasında anlamlı bir fark olduğu ve farklı vücut sıvılarının farklı miRNA ekspresyon paterni sergilediği gözlenmiştir. Seçilen miRNA belirteçlerinin bir kısmının hedef vücut sıvısı için artmış ekspresyon sergileyerek istatistiksel olarak anlamlı sonuç verirken, bir kısmının da hedef vücut sıvısında azalmış ekspresyonu ile istatistiksel anlamlılık kazandığı tespit edilmiştir. Bazı miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde ise hedef vücut sıvısı için anlamlı bir fark bulunmamıştır. Buna karşın, hsa-miR-451a periferik kan, hsa-miR-203a-3p tükürük ve hsa-miR-891a-5p semen vücut sıvılarının tanımlanmasında ayırt edici özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Kadın-erkek miRNA ekspresyon seviyeleri, periferik kan ve tükürük ile değerlendirildiğinde anlamlı bir fark olmadığı, böylelikle miRNA ekspresyon seviyelerinin cinsiyetler arasında değişiklik göstermediği ortaya çıkmıştır.

Periferik kanda yapılan analizler sonucu hem erkek hem kadın bireylerde hsa-miR-451a'nın maksimum düzeyde ekspresyon seviyesine ulaştığı görülmüş olup, diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında periferik kan için hsa-miR-451a'nın artmış ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir biyobelirteç olabileceği tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Literatürde çok sayıda olmasa da çeşitli vücut sıvılarının identifikasyonuna yönelik farklı miRNA ekspresyon analiz çalışmaları yapılmıştır. Bu konuda miRNA-tabanlı ilk çalışma Hanson ve ark. (2009) tarafından vücut sıvılarının tanımlanması için beş kişilik bir örnekleme gerçekleştirilmiştir¹⁰. Bu örneklemeden elde edilen periferik kan (miR451, miR16), semen (miR135b, miR10b), tükürük (miR205, miR658), vajinal sıvı

(miR124a, miR372) ve menstruel kanda (miR451, miR412) SYBR Green ile mikroarray yöntemi kullanılarak dokuz miRNA'nın 5 vücut sıvısı için tanımlayıcı olabileceği belirlenmiştir. Bu deney sonucunda çalışılan her bir miRNA'nın farklı vücut sıvısında farklı kümelenme gösterdiği, ilgili vücut sıvısı için bakılan hedef miRNA'ların ekspresyon düzey verisinin diğer vücut sıvılarından belirgin bir farkla ayrıldığı gözlenmiştir. Özellikle periferik kan için bu ayrımın daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada üç donörden elde edilen yirmi farklı doku çalışmaya dahil edilerek bu miRNA'ların vücut sıvılarına özgüllüğü test edilmiştir. Beklendiği gibi, tüm vücut sıvılarının ekspresyon profili doku örnekleriyle karşılaştırıldığında, doku örnekleri farklı miRNA ekspresyon paterni sergilemiş ve vücut sıvılarının tanımlanmasında miRNA'ların özgüllüğü teyit edilmiştir. Deneylerin sonucunda, periferik kan için miR451 ve miR16'yı hedef marker olarak belirlemiş, bu miRNA'ların bakılan diğer dört vücut sıvısına kıyasla periferik kanda oldukça yüksek oranda eksprese edildiği ve vücut sıvılarının tanımlanmasında periferik kan için uygun biomarkerlar olduğu kabul edilmiştir¹⁰. Courts ve ark. da (2011) beş kişilik bir örneklemede vücut sıvılarından periferik kan (miR-126, miR150 ve miR451) ve tükürük (miR200c, miR203 ve miR205) için seçilen üçer adet miRNA üzerinde çalışmış ve mikroarray analiz yöntemiyle kan için miR126, miR150 ve miR451'i aday marker olarak belirlemişlerdir. Bu miRNA'ları SYBR Green PCR kullanarak doğrulamış, periferik kan ve tükürük vücut sıvılarının kendi arasında ayırt edilmesinin yanı sıra karaciğer, kas ve beyin doku türlerinden de ayrılabildiklerini göstermişlerdir. Ayrıca bir kan örneği bir yıl yaşlandırılarak bu numunede miRNA'nın başarıyla eksprese edildiğini dolayısıyla yaşlandırılmış numunelerde miRNA'nın stabilitesini koruduğunu bildirmişlerdir¹⁴⁷. Sirker ve ark. (2017) on dokuz adet miRNA üzerinde çalışmış bunlardan miR16, miR451, miR10b, miR1280, miR4286 ve miR3169 hedef vücut sıvıları için beklenen sonucu vermiştir. Bunlar arasında ise sadece miR451 ve miR10b'nin net bir şekilde vücut sıvılarını ayırt etme kapasitesi olduğu gösterilmiştir. Periferik kan için miR16 ve miR451 hedef marker seçilmiş ancak her iki miRNA'da periferik kan ve menstruel kanda yüksek oranda eksprese edilmiştir. Dolayısıyla periferik kan ve menstrual kan arasında belirgin bir ayrım miR16 veya miR451 kullanılarak yapılamamıştır. Aslında, her iki genin ifadesi menstrüel kanda daha yüksek oranda bulunmuş, miR16'nın semen ve vajinal sekresyonda periferik kan ile örtüşen seviyelerde

olması nedeniyle miR451'in kanı tanımlamak için daha güçlü ve güvenilir bir belirteç olduğu belirtilmiştir¹⁴⁸. Yaptığımız araştırmada da Hanson, Courts ve Sirker'in araştırma bulgularına benzer şekilde periferik kanda artmış miR-451 ekspresyonunun diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında ayırt edici olduğu gözlenmiştir. Buna ek olarak, araştırmamızda miR451'in periferik kandan menstruel kan ayırımını da yapabildiği ortaya konulmuştur. Bu nedenle, miR451'in periferik kan için aday biomarker olabileceğini önermekteyiz.

Bir başka çalışmada ise, Zubakov ve ark. (2009) üç erkek ve üç kadın gönüllüden oluşan örnekleme, periferik kan, tükürük, semen, vajinal sıvı ve menstruel kanda mikroarray analiz yöntemi kullanılarak miRNA ekspresyon profillerini araştırmıştır. Mikroarray analizi sonucu anlamlı çıkan 14 hedef miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin geçerliliğini teyit etmek için TaqMan RT-PCR ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonucunda periferik kan için miR-20a, miR106a, miR-185, miR-144'te ve semen için miR943, miR135a, miR10a, miR507, miR-891a'da anlamlı sonuçlar elde edilmiş ancak vajinal sıvı, tükürük ve menstruel kan için seçilen hedef markerler teyit edilememiştir. Ayrıca, çevresel koşulların miRNA gen ekspresyon seviyesine etkisini araştırmak amacıyla periferik kan ve semen örneklerini bir yıl süreyle yaşlandırarak TaqMan RT-PCR sonuçlarını karşılaştırmış ve ilk deneyde kullanılan örneklerle yaşlandırılmış örneklerin ekspresyon düzeylerinde güçlü benzerlik olduğunu, dolayısıyla test edilen miRNA'ların zamanla bozunmaya maruz kalmadıklarını göstermişlerdir. Çalışmada menstruel kan için hedef marker seçilen miR-144; TaqMan RT-PCR analizinde semen-tükürük-vajinal sıvı da düşük ekspresyon seviyesi gösterirken, periferik kanda menstruel kandan daha yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir. Ancak bu sonuçlar mikroarray verileriyle uyumsuz bulunmuştur. Dolayısıyla miR-144'ün kan için yararlı bir marker olabileceği ancak menstruel kan markeri olarak doğrulanmadığı, bu nedenle de periferik kan-menstruel kan ayırımında faydalı olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca periferik kanda miR-144'ün sensitivitesini TaqMan assaylerle değerlendirdiğinde de, 2 pg toplam RNA kullanıldığında bile hedef vücut sıvısında saptanabildiği, bu miktarın tek hücre seviyesine tekabül ettiği ve mRNA'ların başarılı RT-PCR bulguları için gerekli olan orana kıyasla çok daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple gelecekteki adli tıp uygulamalarında vücut sıvılarının tanımlamasında miRNA'ların mRNA'lara göre

daha faydalı markerlar olabileceği düşünülmüştür¹¹. Çalışmamızda, diğer vücut sıvılarından periferik kan ayrımının yapılması için Zubakov ve ekibinin yapmış oldukları çalışmanın ışığı altında seçmiş olduğumuz miR-144'ün periferik kandaki ekspresyon seviyesi, menstruel kandan daha yüksek ancak, semen ve tükürük sıvılarından daha düşük olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla hem menstruel hem de periferik kan örnekleri için, miR-144'ün marker olarak kullanılmayacağını düşünmekteyiz. Zubakov ve ark. bulgularına zıt olarak semen ve tükürükteki miR-144'ün ekspresyon seviyesi, çalışmamızda periferik kandan daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, Zubakov ve ark. araştırmasında miR-106a'nın ekspresyon seviyesi, diğer tüm vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında periferik kanda daha yüksek iken çalışmamızda semende en yüksektir. Her iki araştırma arasında ki bu farklılığın nedeni Zubakov ve ark.'nın dar kapsamlı örneklem de (Zubakov ve ark. çalışmasında erkek n=3 ve kadın n=3, çalışmamızda erkek n=12 ve kadın n=11) çalışması ile açıklanabilir. Örneklem sayısının düşüklüğü istatistiksel anlamlılığı negatif etkileyen bir durumdur. Örneklem genişliği arttıkça bireyler arası genetik varyasyonlara bağlı olarak miR-144'ün ve miR-106a'nın ekspresyon seviyesi farklı vücut sıvılarında değişkenlik gösterebilir. Bu nedenle daha geniş kapsamlı insan çalışmaları ile bu durumun aydınlatılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Semende yapılan analizler sonucu, diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-891a-5p ve hsa-miR-135a-5p'nin artmış ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Yapılan araştırmalara göre, Hanson ve ark. çalışmasında semen için miR-10b ve miR-135b üzerinde çalışmış ve bu miRNA'ların gen ekspresyon verileri tüm semen örneklerinde diğer vücut sıvılarından ayrılarak ayrı bir kümede bulunmuştur. Bununla birlikte, semen örnekleri ile diğer vücut sıvıları arasındaki bu farklılık, periferik kan ve diğer vücut sıvıları arasında gözlemlenen kadar belirgin olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca semen analizinin sperm hücrelerine özgü olup olmadığını belirlemek için iki vazektomize erkekten alınan örnekler çalışmaya dahil edilmiş, numunelerin her ikisinde diğer semen numuneleri ile birlikte kümelenmiş, dolayısıyla bu miRNA'ların sadece sperm hücrelerine özgü olmadığı, erkek üreme sisteminde seminal sıvıda veya epitelyal hücrelerde de bulunduğu tespit edilmiştir¹⁰. Zubakov ve ark. çalışmasında ise miR-135b ve miR-10b ile yakından ilişkili ancak aynı olmayan miR-10a ve miR-135a semen

için araştırılmış ve semen için faydalı markerlar olabileceği sonucu bildirilmiştir. Aynı çalışmada mikroarray analiz sonuçlarına göre miR-891a vajinal sıvı için hedef marker olarak seçilmiş ancak TaqMan RT-PCR analizinde semende en yüksek seviyede eksprese edilmiştir. Mikroarray ve TaqMan RT-PCR verileri birbirini ile uyumsuz olan bu miRNA Northern blotlama yöntemi ile analiz edilerek vajinal sıvıda yanlış pozitiflik gösterdiği, sonuç olarak miR-891a'nın semende fazla eksprese edilen miRNA olduğu, bu nedenle de semen ayırımında marker olabileceği önerilmiştir¹¹. Bu çalışmaya paralel olarak, Wang ve ark. (2012) çalışmasında semen için iki aday miRNA (mir891-miR888), hedef vücut sıvısında aşırı şekilde eksprese edilmiştir. Bunlardan miR891a diğer vücut sıvılarında tespit edilememiş bu nedenle vücut sıvısına spesifik tek miRNA olarak değerlendirilmiştir¹². Sirker ve ark. (2017) da miR10b ve miR943'ü potansiyel semen belirteçleri olarak seçmiş, bunlardan miR10b; diğer tüm vücut sıvılarında düşük ekspresyon seviyeleri göstererek semen örneklerini net bir şekilde tanımlayan marker olarak belirlenmiştir¹⁴⁸. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında semen için hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-891a-5p ve hsa-miR-135a-5p'nin artmış ekspresyonunun istatistiksel analizlere göre anlamlı bulunduğu, özellikle miR891a'nın vücut sıvılarının tanımlanmasında semenin ayırt edilmesine yönelik daha güçlü marker olabileceği tespit edilmiştir.

Tükürük örneğinde yapılan analizler sonucu, diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında hsa-miR-203a-3p ve hsa-miR-205-5p'nin artmış ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Ayrıca, miR203a'nın periferik kanda diğer vücut sıvılarına göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). miR96 ise; tüm vücut sıvıları arasında anlamlı derecede farklı gen ekspresyon seviyesi gösterirken tükürük için beklenen yüksek gen ekspresyon paternini sergilemedi. Dolayısıyla, herhangi bir vücut sıvısı için hedef belirteç olarak belirlenemedi. Önceki çalışmalara bakıldığında, Hanson ve ark. tükürük için miR-658 ve miR-205'i hedef marker olarak seçmiş ve çalışmalarında hem tükürük hem de bukkal swap örneklerini test etmişlerdir. Sonuçta her iki miRNA'da hem tükürük hem bukkal swap örneklerini tanımlama kabiliyeti göstermiştir¹⁰. Zubakov ve ark. tükürük için miR583, miR518, miR208b'nin ekspresyon analizini yapmış ancak beklenen neticeye ulaşamamışlardır. Ayrıca aynı çalışmaya ek olarak Hanson ve ark.'nın tükürük

için belirledikleri hedef markerları (miR-658 ve miR-205) TaqMan RT-PCR ile test etmişler ancak aynı sonuca ulaşamadıklarını bildirmişlerdir¹¹. Wang ve ark. yaptığı çalışmada on kişilik örneklemede miR16, miR205 ve miR658'in TaqMan RT-PCR analizi ile periferik kan, semen, vajinal sıvı, menstruel kan ve tükürük sıvılarında tanımlanmasındaki etkinliğini araştırmıştır. Ayrıca Hanson ve ark. aksine görüş bildirerek miR658 ve miR205'in tükürüğe özgü miRNA'lar olmadığını, miR658'in fizyolojik koşullardan etkilenen kararsız bir gen ekspresyon ifadesi sergilediğini, miR205'in ise bukkal swablarda, vajinal sekresyonlarda ve menstrüel kanda çok daha fazla eksprese edildiğini bu nedenle epitelyuma özgü marker olabileceği bu miRNA'nın vajinal ve oral epitelyal hücreleri ayırt etmek için kullanılabilirliğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada doğal ortamın miRNA'lar üzerindeki etkisini gözlemlemek için, numuneler laboratuvar koşullarında (günde yaklaşık 15°C ve 10 saatlik doğal güneş ışığına maruz kalma) 1 ay süreyle saklanmış TaqMan-qPCR ile miRNA'ların stabilitesi incelenmiştir. Neticede 1 aylık örneklerde miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin ve dolayısıyla da stabilitesinin çok fazla değişmediği ortaya konulmuştur¹². Courts ve ark. (2011) da miR200c, miR205 ve miR203 ile yaptıkları çalışmada SYBR Green PCR kullanarak bu miRNA'lar ile tükürüğü periferik kandan ve birkaç dokudan ayırt etmiş dolayısıyla miRNA'ların adli analizlerde vücut sıvıları ve/veya dokuların tanımlanmasında faydalı markerlar olabileceği görüşünü desteklemişlerdir¹⁴⁷. Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise, Sirker ve ark. (2017) miR124, miR203 ve miR205 tükürüğe özgü hedef markerlar olarak seçmiş, üç miRNA'da tükürükte hiçbir spesifiklik göstermemiştir. Bununla birlikte, miR203 vajinal sekresyonlarda belirgin bir şekilde artış sergilemiş ve bu vücut sıvısını periferik kan, tükürük ve semenden ayırmak için bir belirteç olarak kabul edilmiştir¹⁴⁸. Literatür bulgularına göre tükürüğün diğer vücut sıvılarından ayırımında hsa-miR-203a-3p ve hsa-miR-205-5p'nin marker olup olamayacağı tartışmalı olsa da, çalışmamızdaki bulgular tükürük için hsa-miR-203a-3p ve hsa-miR-205-5p'nin artmış ekspresyon verilerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu, özellikle hsa-miR-203a-3p'nin tükürüğü diğer vücut sıvılarından ayırt edebilme kabiliyetinin olduğunu göstermektedir.

Son vücut sıvısı menstruel kan örneğinde yapılan analizler sonucu, diğer vücut sıvılarıyla karşılaştırıldığında hsa-miR-412-3p ve hsa-miR-214-3p'nin

azalmış ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Ancak miR214'ün periferik kanda da düşük ekspresyon seviyesi gösterdiği ve her iki vücut sıvısı arasında anlamlı bir fark saptanmadığı bu nedenle periferik kan ve menstruel kan arasında hedef biobelirteç olarak ayırım yapamadığı görüldü. Hanson ve ark. çalışmasında miR412'nin artmış ekspresyonu menstruel kan için hedef marker olarak seçilmekle birlikte miR451 kan için hedef marker olarak belirlenmiş ve bu iki miRNA birlikte kullanılarak menstruel kanı diğer vücut sıvılarından net bir şekilde ayırmayı başarmıştır¹⁰. Zubakov ve ark. çalışmasında menstruel kan için miR144 ve miR185 hedef olarak belirlenmiş, miR-144'in yukarıda bahsedildiği üzere; kan için yararlı bir marker olabileceği ancak menstruel kan markerı olarak doğrulanmadığını ortaya koymuştur¹¹. Hanson ve ark. yapmış oldukları çalışmada miR412'nin artmış ekspresyonu anlamlı iken, çalışmamızda hsa-miR-412-3p ve hsa-miR-214-3p'nin azalmış ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu durum, kullanılan yöntemler açısından da değerlendirildiğinde, çalışmamızda altın standart olan seçili miRNA'lara spesifik Taqman probe kullanımı araştırmamızı güvenilirlik bakımından diğer çalışmalara kıyasla daha önemli kılmaktadır. Yine de, menstruel kan periferik kandan ayırt edilmesi bakımından hala ek çalışmalara ihtiyaç duyulduğu söylenebilir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmamızın sonuçları adli bilimler alanında vücut sıvılarının tanımlanmasında miRNA kullanımının uygulanabilirliğini desteklemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar adli vücut sıvılarının tanımlanmasında miRNA kullanımının uygulanabilirliğini göstermekle birlikte bu alanda miRNA'ların kullanımı ile ilgili aydınlatılması gereken pek çok çözümlenmemiş konu bulunmaktadır. Çalışmalarda kullanılan aday miRNA'ların bazıları vücut sıvılarını ayırt edebilme kabiliyetine sahip olsa da çok sayıda miRNA ekspresyon profillerinin belirlenmesi ile daha güçlü adayların tespiti mümkün olacaktır. Ayrıca yapılacak çalışmalarda sağlıklı veya sağlıklı doku ve vücut sıvılarının potansiyel etkilerinin de araştırılması gerekmektedir. Ek olarak adli vakalarda sıkça karşılaşılan bozulmuş örnek analizinde miRNA kullanımının yararını kanıtlayan, daha geniş örneklemeler üzerinde daha kapsamlı incelemelere ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda numunelerden farklı sonuçlar verebilecek çeşitli yöntemler ve farklı cihazlar

kullanılmaktadır. Bu nedenle adli bilimler alanında kullanıma optimize edilmiş standart bir prosedüre ihtiyaç vardır. Bütün bunlara rağmen hiç şüphesiz ki miRNA'lar adli bilimler alanında çok büyük bir potansiyele sahiptir ve vücut sıvılarının tanımlanmasında biyomarker olarak adli laboratuvarların rutin kullanımına uygun pratik ve ucuz yeni bir teknik olarak umut vermektedir.



SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1- Çalışmamızda, olay yerlerinde sıklıkla karşılaşılabilecek periferik kan, semen, tükürük ve menstruel kan gibi vücut sıvılarında, seçilen aday miRNA biyobelirteçlerinin, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı ekspresyon seviyesi gösterdiği saptandı.

2-Vücut sıvılarının tanımlanmasında;

A-Periferik kanın identifikasyonu için hsa-miR-451a'nın artmış ekspresyon düzeylerinin,

B-Tükürük identifikasyonu için hsa-miR-203a-3p ve hsa-miR-205-5p'nin artmış ekspresyon düzeylerinin,

C-Semen identifikasyonu için hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-891a-5p ve hsa-miR-135a-5p'nin artmış ekspresyon düzeylerinin,

D-Menstruel kan identifikasyonu için hsa-miR-412-3p ve hsa-miR-214-3p'nin azalmış ekspresyon düzeylerinin kullanılabilirliği görüldü.

3- Ayrıca vücut sıvılarının tanımlanması için aday olarak seçilen miRNA'lardan "*Hsa-miR-451a'nın periferik kan*" için, "*Hsa-miR-203a-3p'nin tükürük*" için, "*Hsa-miR-891a'nın semen*" için diğer aday miRNA'lara kıyasla oldukça yüksek ayırt edici özelliğe sahip olduğu ve bu üç miRNA'nın adli uygulamalarda kullanılabilir *en güçlü biyomarkerlar* olduğu belirlendi.

4-Farklı vücut sıvılarının tanımlanmasında biyobelirteç olarak belirlenen miRNA'ların, TaqMan RT-PCR yöntemi ile, çok az miktardaki vücut sıvı örneklerinde bile ekspresyon düzeylerinin belirlenebilmesi sayesinde olay yerlerinden elde edilen delil örneklerinde materyal kaybının önüne geçilebileceği saptandı.

5- Çalışmamızın sonucundan elde edilen veriler, vücut sıvılarının tanımlanmasında biyomarker olarak miRNA kullanımının adli bilimlerin rutininde uygulanabilirliğine ve olası biyobelirteçlerin belirlenmesine yönelik katkı sağlayacak çalışmaların geliştirilmesine olanak sunabileceği düşünüldü.

6- Yapılan çalışmalarda numunelerde farklı sonuçlar verebilecek çeşitli yöntemler ve farklı cihazların kullanımı miRNA'ların adli bilimlerin alanında rutin kullanımına olanak sağlayabilecek daha büyük örneklerde altın standart tekniklerle gerçekleştirilecek ek çalışmalar gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

1. E. Hanson, J. Ballantyne. RNA profiling for the identification of the tissue origin of dried stains in forensic biology. *Forensic Sci. Rev*, 2010; 22: 145–157.
2. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int*, 2009; 188:1–17.
3. Hanson EK, Ballantyne J. Highly specific mRNA biomarkers for the identification of vaginal secretions in sexual assault investigations. *Sci Justice*, 2013; 53:14-22.
4. Jakubowska J, Maciejewska A, Bielawski KP, Pawłowski R. mRNA heptaplex protocol for distinguishing between menstrual and peripheral blood. *Forensic Sci Int: Genet*. 2014; 13:53–60.
5. G. Hadzic, A. Lukan, K. Drobnic. Practical value of the marker MUC4 for identification of vaginal secretion in penile swabs. *FSI Genet. Suppl. Series*, 2011; 3:222–223.
6. Jong-Lyul Park, Oh-Hyung Kwon, Jong Hwan Kim, Hyang-Sook Yoo, Han- Chul Lee, Kwang-Man Woo, Seon-Young Kim, Seung-Hwan Lee. Identification of body fluid-specific DNA methylation markers for use in forensic science. *Forensic Sci Int: Genet*, 2014; 13: 147–153.
7. Tomoko Akutsu, Tetsushi Kitayama, Ken Watanabe, Koichi Sakurada. Comparison of automated and manual purification of total RNA for mRNA-based identification of body fluids. *Forensic Sci Int: Genet*, 2014; 14:11–17.
8. Haas C, Hanson E, Kratzer A, Bär W, Ballantyne J. Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood. *Forensic Sci Int Genet*, 2011; 5: 449-458.
9. C. Haas, C. Muheim, A. Kratzer, W. BaE, C. Maake. mRNA profiling for the identification of sperm and seminal plasma. *Forensic Sci Int: Genet Suppl*, 2009; 2:534–535.
10. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem* 2009 387:303–314.

11. Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med* 2010;124(3):217–26.
12. Wang Z, Luo H, Pan X, Liao M, Hou Y. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2012 May; 6 (3): 419-23.
13. J.L. Park, S.M. Park, O.H. Kwon, H.C. Lee, J.Y. Kim, H.H. Seok. Microarray screening and qRT-PCR evaluation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Electrophoresis* 35 2014; 3062–3068.
14. E. Sauer, A.K. Reinke, C. Courts. Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. *Forensic Sci. Int. Genet.* 22 2016; 89–99.
15. V.S. Catts, S.V. Catts, H.R. Fernandez, J.M. Taylor, E.J. Coulson, L.H. Lutze-Mann. A microarray study of post-mortem mRNA degradation in Mouse brain tissue, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2005: 138:164–177.
16. M. Oehmichen, K. Zilles. Postmortale DNS and RNS-synthese. Erste untersuchungen an menschlichen leichen, *Z. Rechtsmed,* 1984; 91:287–294.
17. T.W. Phang, C.Y. Shi, J.N. Chia, C.N. Ong, Amplification of cDNA via RTPCR using RNA extracted from postmortem tissues, *J. Forensic Sci.* 1994; 39:1275–1279.
18. C. Haas, B. Klessner, A. Kratzer, W. Baar. mRNA profiling for body fluid identification. *Forensic Sci Int: Genet Suppl.* 2008; 1: 37–38.
19. Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1:69–74.
20. J.H. An, K.J. Shin, W.I. Yang, H.Y. Lee. Body fluid identification in forensics. *BMB Rep,* 2012; 45: 545–553.
21. Bevel T, Gardner RM. Bloodstain pattern analysis. Newyork:CRC Press; 1997.
22. Ganong WF. Review of medical physiology. 19th ed. USA: Appleton&Lange; 1999. p.508-13.

23. Lee HC, Pagliaro EM. Serology/Blood Identification. In:Payne-James J, Byard RW, Corey TS, Henderson C. Encyclopedia of forensic and legal medicine.Volume-4. Spain: Elsevier Academic 2005; 64-70.
24. Eckert W.G, James S.H. Interpretation of bloodstains evidence at crime scenes. Elsevier, New York, 1989.
25. Ana Castello Ponce, Fernando A, Verdu Pascal. Critical revision of presumptive tests for bloodstains. Forensic Science Communications, July 1999; 1(2).
26. Thorogate R, Moreira JCS, Jickells S, Miele MMP, Daniel B. A novel fluorescence-based method in forensic science for the detection of blood in situ. Forensic Sci Int: Genetics 2008; 2:363-71.
27. Stoilovic M. Detection of semen and blood stains using polilight as a light source.Forensic Sci Int. 1991 Oct;51(2):289-96.
28. Vandenberg N, van Oorshcot RAH. The use of polilights in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests. J Forensic Sci. May 2006; 51(2):361-70.
29. Rudin N, Inman K. An Introduction to Forensic DNA Analysis. 2nd ed.USA:CRC Press;2002.
30. Budowle B et al. 2000. The presumptive reagent fluorescein for the detection of dilute bloodstains and subsequent STR typing of recovered DNA, Journal of Forensic Science 45:1090-1092.
31. Ballantyne J. Serology Overview. In:Payne-James J, Byard RW, Corey TS, Henderson C, editors. Encyclopedia of forensic and legal medicine. Volume-4.Spain:Elsevier Academic Press;2005. p.53-63.
32. James SH, Kish PE, Sutton TP. Principles of bloodstain pattern analysis theory and practice. Boca Raton:CRC Press Inc.; 2005; p. 73-90.
33. Quinones I, Sheppard D, Harbison SA, Eliot D. Comparative Analysis of Luminol Formulations. Canadian Society of Forensic Science Journal. 2007 June; 40(2):53-63.
34. Blum LJ, Esperança P, Rocquefelte S. A new high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence. Canadian Society of Forensic Science Journal. 2006; 39(3):81-100.

35. Creamer JI, Quickenden TI, Apanah MV, Kerr KA, Robertson P. A comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence*. 2003; 18 (4):193-8.
36. Cox M. A study of the sensitivity and specificity of four presumptive tests for blood. *J. Forensic Sci.* 1991 Sep;36(5):1503-11.
37. Higaki RS, Philip WMS. A study of sensitivity, stability and spesificity of phenolphthalein as an indicator test for blood. *Canadian Society of Forensic Science Journal*. 1976;9(3):97-102.
38. Büyük Y, Aşıcıoğlu F. Kan lekesi analizinde ihtimali reaktifler; Özgüllük, özgünlük ve kontaminasyonun etkisi. *Adli Bilimler Dergisi*. 2006;5(2):13-21.
39. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lagoa G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*. 2007;72: 896-913.
40. Abacus Diagnostics. Hemascein Technical Information Sheet. Catalog # 800121.
41. Açıkgöz HN, Hancı İH. *Adli Biyoloji. İçinde;Hancı İH, editör. Adli Tıp ve Adli Bilimler. Ankara:Seçkin Yayıncılık;2002. p. 578-613.*
42. Gaensslen RE. *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry. U.S. Department of Justice, National Institute of Justice. 1983. p. 73-5.*
43. De Forest PR, Gaensslen RE, Lee HC. *Forensic science an introduction to criminalistics. USA: McGraw-Hill, Inc;1983.*
44. Holland VR, Saunders BC, Rose FL, Walpole AL. A safer substitute for benzidine in the detection of blood (abstract). *Tetrahedron*. 1974;30(18):3299-302.
45. Webb JL, Creamer IJ, Quickenden TI. A comparison of the presumptive ve luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. *Luminescence*. 2006;2:214-20.
46. Hatch A. A modified reagent for the confirmation of blood. *J. Forensic Sci.* 1993 Nov;38(6):1502-6.

47. Kayıkçı M.A, Çam K.H, Akman Y, Erol A. Erkek infertilitesini değerlendirmede semen analizinin özellikleri ve rolü. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 4 (3):35-38.
48. Özden H. Semen analizi: Biyokimyasal yaklaşım. Türkiye Kinikleri Tıp Bilimleri 1994; 14:41-46.
49. Baker DJ. Performing a quality semen analysis in the clinical laboratory. MLO Med Lab Obs. 2000; 32(12): 20-29.
50. World Health Organization, WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed.2010.
51. Young B, Heath JW. Wheater's Functional Histology. 4th ed. Sydney 2000; 328-340.
52. Ross MH, Kaye GI, Romrell RJ, Pawlina W. Histology A Text and Atlas. 3rd ed. Lippincott: Williams & Wilkins 1995; 682-712.
53. Fikiet M.A, Lednev I.K. Raman spectroscopic method for semen identification: Azoospermia. Talanta. 2019 Mar 1;194:385-389.
54. Khaldi N, Miras A, Botti K, Benali L. Evaluation of three rapid detection methods for the forensic identification of seminal fluid in rape cases. J. Forensic Sci. 2004; 49:4.
55. Sato I, Sagi M, Ishiwari A. Use of "Smitest" PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine, Forensic Sci. Int. 2002;127(1-2) 71-74.
56. Taşçı A İ, Samastı M. İnfertilite Laboratuvar ve Uygulamaları, Hayat Sağlık ve Sosyal Hizmetler Vakfı, İstanbul.1997: 1- 30.
57. Sensabaugh GF. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: A potential new marker for semen identification, J. Forensic Sci. 1978; 23:105-115.
58. V. Peonim, W. Worasuwannarak, K. Sujirachato, S. Teerakamchai, S. Srisont, J. Udnoon, U. Chudoung. Comparison between prostate specific antigen and acid phosphatase for detection of semen and vaginal swabs from raped women. J. Forensic Leg. Med. 20 (2013) 578-581.
59. Dieudonne O, Godin PA, Van-Langendonck A. Biochemical analysis of the sperm and infertility. Clin Chem Lab Med. 2001;39(5):455-7.
60. A. Laffan, I. Sawyer, I. Quinones, B. Daniel. Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes. Med. Sci. Law 51(2011)11-17.

61. Suzuki O, Asano M, Kido, et al. Zinc test as a new tool for identification of human seminal stains, *Forensic Sci. Int.* 1983; 22,231-235.
62. Stubbings NA, Newall PJ. An evaluation of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and p30 determinations for the identification of semen on postcoital vaginal swabs. *J. Forensic Sci* 1985; 30 (3): 604-14.
63. Oya M, Kido A. Immunologic Characterization of human seminal leucine aminopeptidase (LAP) and its medicolegal use. *Z Rechtsmed* 1984; 91 (4): 26978.
64. Diamandis EP, Arnett WP, Foussias G. Seminal plasma biochemical markers and their association with semen analysis findings. *Urology.* 1999; 53(3):596-603.
65. Abe S, Kunii S, Fujita T, Hiraiwa K. Detection of seminal gamma-glutamyl transpeptidase in stains using sandwich ELISA, *Forensic Sci. Int.*, 1998; 91 : 19-28.
66. Indest G F. Medicolegal issues on detecting and proving the sexual abuse of children in Legal medicine. In: Wecht C H (eds) New Hampshire: Butterworth Publishers, 1990; 31- 56.
67. Graves HCB., Sensabaugh GF, Blake E. Postcoital detection of a malespecific semen protein, *New Engl.J.Med.* 1985; 312:338-343.
68. M. Hochmeister, B. Budowle, O. Rudin, C. Gehrig, U. Borer, M. Thali, R. Dirnhofer. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid., *J. Forensic Sci.* 44(5) (1999) 1057-1060.
69. E.S. Boward, S.L. Wilson, A comparison of ABACard(R) p30 and RSIDTM - Semen test kits for forensic semen identification *J. Forensic Leg. Med.* 20 (2013) 1126-1130.
70. Suttipasit P, Wongwittayapanich S. Detection of prostate specific antigen and semenogelin in specimens from female rape victims.*J Forensic Leg Med.* 2018 Feb;54:102-108.
71. Yokota M, Mitani T, Tsujita H, et al. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test for forensic examination of semen, *Legal Medicine* 2001; 3(3): 171-176.
72. J Herr. Sperm paint optimization and validation, in: U.S Department of Justice (Ed.) Washington. DC. 2007.

73. Arkansas State Crime Laboratory, Christmas Tree Stain for Spermatozoa, Serology Quaility Manual 2010.
74. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rouge D. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci.* 2001 Mar; 46(2): 349-51.
75. Herman Y, Feine I, Gafny R. Acid phosphatase test on Phadebas[®] sheets An optimized method for presumptive saliva and semen detection. *Forensic Sci Int.* 2018 Jul;288:218-222.
76. Ricci U, Carboni I, Torricelli F. False-positive results with amylase testing of citrus fruits. *J Forensic Sci.* 2014 Sep;59(5):1410-2.
77. Carboni I, Rapi S, Ricci U. Stability of human α -salivary amylase in aged forensic samples. *Leg Med (Tokyo).* 2014 Jul;16(4):214-7.
78. Park HY, Son BN, Seo YI, Lim SK. Comparison of Four Saliva Detection Methods to Identify Expecterated Blood Spatter. *J Forensic Sci.* 2015 Nov;60(6):1571-6.
79. Kulstein G, Wiegand P. Comprehensive examination of conventional and innovative body fluid identification approaches and DNA profiling of laundered blood- and saliva-stained pieces of cloths. *Int J Legal Med.* 2018 Jan;132(1):67-81.
80. Vennemann M, Scott G, Curran L, Bittner F, Tobe SS. Sensitivity and specificity of presumptive tests for blood, saliva and semen. *Forensic Sci Med Pathol.* 2014 Mar;10(1):69-75.
81. Baker DJ, Grimes EA, Hopwood AJ (2011) D-dimer assays for the identification of menstrual blood. *Forensic Sci Int* 212:210–214.
82. Akutsu T, Watanabe K, Motani H, Iwase H, Sakurada K (2012) Evaluation of latex agglutination tests for fibrin-fibrinogen degradation products in the forensic identification of menstrual blood. *Leg Med (Tokyo)* 14:51–54.
83. Holtkötter H, Dierig L, Schürenkamp M, Sibbing U, Pfeiffer H, Vennemann M. Validation of an immunochromatographic D-dimer test to presumptively identify menstrual fluid in forensic exhibits. *Int J Legal Med* (2015) 129:37–41.
84. Bauer M, Patzelt D (2002) Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. *J Forensic Sci* 47:1278–1282.

85. Roeder AD, Haas C. mRNA profilin gusing a minimum offive mRNA markers per body fluid and a novel scoring method for body fluid identification. *Int J Legal Med* (2013) 127:707–721.
86. Gomes I, B. Strohucker, M.A. Rothschild, P.M. Schneider. Evaluation of mRNA specific markers using a pentaplex system for the identification of skin and saliva from contact trace evidence. *Forensic Sci Int: Genet Supplement Series*, 2013; 4:180–181.
87. Juusola J, Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci Int*, 2005; 152:1-12.
88. Nussbaumer C, Gharehbaghi-Schnell, E. and Korschineck, I. (2006) Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR. *Forensic Sci. Int.* 157, 181-186.
89. Haas C, Klessner, B., Maake, C., Bär, W. and Kratzer, A. (2009) mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci. Int. Genet.* 3, 80-88.
90. Fleming, R. I. and Harbison, S. (2010) The use of bacteria for the identification of vaginal secretions. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4, 311-315.
91. Frumkin, D., Wasserstrom, A., Budowle, B. and Davidson, A. (2011) DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5, 517-524.
92. Wasserstrom, A., Frumkin, D., Davidson, A., Shpitzen, M., Herman, Y. and Gafny, R. (2012) Demonstration of DSI-semen-A novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. *Forensic Sci. Int. Genet.* (in press) <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.08.009>.
93. Lee H. Y., Park, M. J., Choi, A., An, J. H., Yang, W. I. and Shin, K. J. (2012) Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. *Int. J. Legal Med.* 126, 55-62.
94. R.E. Gaensslen. Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry, US Government Printing Office, NIJ, 1983.
95. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry, DNA, RNA and the flow of genetic information, 5th edition, W H Freeman and Company, New York, 2002; 195–236.
96. Alberts B., Bray D., Lewis J. Molecular biology of the cell, Garland Publishing, New York, 1994.

97. J.S. Mattick, G.J. Michael. The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms, *Mol. Biol. Evol.*, 2001; 18:1611–1630.
98. B.P. Lewis, C.B. Burge, D.P. Bartel. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are micro RNA targets, *Cell*, 2005; 120:15–20.
99. R. Milo, P. Jorgensen, U. Moran, G. Weber, M. The database of key numbers in molecular and cell biology, *Nucleic Acids Res*, 2010; 38:750–753.
100. D. Voet, J. Voet, C. Pratt, U. Hahn. *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2002.
101. Wei JW, Huang K, Yang C, Kang CS. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol Rep.* 2017 Jan;37(1):3-9
102. S. Egloff, D. O'Reilly, S. Murphy. Expression of human snRNA genes from beginning to end. *Biochem Soc. Trans.*, 2008; 590–594.
103. Harvey RA, Champe PC. *Biyokimya*. (Çeviri Ed: Ulukaya E) RNA yapısı ve sentezi, 3. Baskı Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2007, 413-444.
104. J. Rossi. Mammalian Dicer finds a partner, *EMBO Rep.*, 2005; 6:927–929.
105. Marielle Vennemann, Antje Koppelkamm. *Forensic Sci Int*, 2010; 203:71–75.
106. A.G. Seto, R.E. Kingston, N.C. Lau. The coming of age for Piwi proteins, *Mol. Cell*, 2007; 26:603–609.
107. S. Chang, S. Wen, D. Chen, P. Jin. Small regulatory RNAs in neurodevelopmental disorders, *Hum. Mol. Genet.*, 2009; 18: 18–26.
108. Sarah S. Silva, Cátia Lopes, A.L. Teixeira, M.J Carneiro de Sousa, R. Medeiros. Forensic miRNA: Potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int: Genet*, 2014; 14:1–10.
109. Beuvink I, F.A. Kolb, W. Budach, A. Garnier, J. Lange, F. Natt, U. Dengler, J. Hall, W. Filipowicz, J. Weiler. A novel microarray approach reveals new tissue specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2007; 35:52.

110. Courts C, Madea B. Micro-RNA - A potential for forensic science? *Forensic Sci. Int.* 2010; 203; 106-111.
111. B.P. Lewis, C.B. Burge, D.P. Bartel. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are micro RNA targets, *Cell*, 2005; 20:15–20.
112. Haifeng Dong, Jianping Lei, Lin Ding, Yongqiang Wen, Huangxian Ju, Xueji Zhang . *MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis*. *Chem. Rev.*, 2013; 113 : 6207–6233.
113. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993; 75:843-54.
114. Pasquinelli EA, Reinhart JB. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408:86-89
115. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403:901– 906.
116. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2011; 717(12):1-8.
117. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2014; 15(8):509-524.
118. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 2010; 11:597-610.
119. Kim VN. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005; 6(5):376-385.
120. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Tromb Haemotology*. 2012; 107:605-10.
121. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004; 5:522-31.
122. Bartel DP, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004; 116: 281-297.
123. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 2007; 28:328–336. [PubMed: 17964270].

124. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNAclass regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 2007;130:89.
125. Marjorie PP, Provost P. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front. Biosc.* 2008;13:2537-47.
126. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nature reviews Genetics*, 2008; 9(2):102-114.
127. Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:116-25.
128. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci.* 2007;32:189-97.
129. Fiorucci G, Chiantore MV, Mangino G, Percario ZA, Affabris E, Romeo G. Cancer regulator microRNA: potential relevance in diagnosis, prognosis and treatment of cancer. *Curr Med Chem.* 2012;19:461-74.
130. Silva SS, Lopes C, Teixeira AL, Carneiro de Sousa MJ, Medeiros R. Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet.* 2015 Jan;14:1-10.
131. Juusola J, Ballantyne J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *J Forensic Sci* 2007;52(6):1252–62.
132. Madea B, Saukko P, Oliva A, Musshoff F. Molecular pathology in forensic medicine-Introduction. *Forensic Sci Int.* 2010 Dec 15; 203(1-3):3-14.
133. Jessica A. Weber, David H. Baxter, Shile Zhang, David Y. Huang, Kuo How Huang, Ming Jen Lee, David J. Galas, and Kai Wang. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem.* 2010 November; 56(11): 1733–1741
134. T. Ohshima, Y. Sato, Time-dependent expression of interleukin-10 (IL-10) mRNA during the early phase of skin wound healing as a possible indicator of wound vitality, *Int. J. Leg. Med.* 111 (5) (1998) 251–255.
135. M. Bauer, I. Gramlich, S. Polzin, D. Patzelt, Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval – a pilot study, *Leg. Med. (Tokyo)* 5 (4) (2003) 220–227.

136. D. Zubakov, M. Kokshoorn, A. Kloosterman, M. Kayser, New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16- year-old stains, *Int. J. Leg. Med.* 123 (1) (2009) 71–74.
137. Li W, Ma K, Lv Y, Zhang P, Pan H, Zhang H. Postmortem interval determination using 18S-rRNA and microRNA. *Sci Justice.* 2014;54:307–10.
138. Lv Y, Ma K, Zhang H, He M, Zhang P, Shen Y. A time course study demonstrating mRNA, microRNA, 18S rRNA, and U6 snRNA changes to estimate PMI in deceased rat's spleen. *J Forensic Sci.* 2014;59:1286–94.
139. Odriozola A, Riancho JA, de la Vega R, Agudo G, García-Blanco A, de Cos E, Fernandez F, Sanudo C, Zarrabeitia MT. miRNA analysis in vitreous humor to determine the time of death: a proof-of-concept pilot study. *Int J Legal Med.* 2013 May;127(3):573-8.
140. Corradini B, Alu M, Radheshi E, Gabbolini V, Ferrari F, Santunione A.L, Silingardi E. Estimation of the time of death through the analysis of clock miRNAs expression in blood and vitreous humor. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2015(5) e204-e206.
141. Bremmer R.H, de Bruin K.G, Van Gemert M.J, Van Leeuwen T.G, Aalders M.C. Forensic quest for age determination of bloodstains. *Forensic Sci. Int.* 2012. 216;1-11.
142. Anderson S, Howard B, Hobbs GR, Bishop CP. A method for determining the age of a bloodstain. *Forensic Sci Int.* 2005 Feb 10;148(1):37-45.
143. Ken-Ichiro Nakao, Ryo Shimada, Kenji Hara, Kazuhiko Kibayashi. Experimental Study on Age Estimation of Bloodstains Based on Biological and Toxicological Analysis. *Forensic Science Journal.* 2013; 6: 6-11.
144. Yu S, Na JY, Lee YJ, Kim KT, Park JT, Kim HS. Forensic application of microRNA-706 as a biomarker for drowning pattern identification. *Forensic Sci Int.* 2015 Oct; 255: 96-101.

145. Sun TY, Chen XR, Liu ZL, Zhao LL, Jiang YX, Qu GQ, Wang RS, Huang SZ, Liu L. Expression profiling of microRNAs in hippocampus of rats following traumatic brain injury. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2014 Aug;34(4):548-553.
146. Courts C, Grabmüller M, Madea B. Dysregulation of heart and brain specific micro-RNA in sudden infant death syndrome. *Forensic Sci Int*. 2013 May 10;228(1-3):70-4.
147. Courts C, Madea B. Specific micro-RNA signatures for the detection of saliva and blood in forensic body-fluid identification. *J Forensic Sci*. 2011 Nov; 56(6).
148. Sirker M, Fimmers R, Schneider PM, Gomes I. Evaluating the forensic application of 19 target microRNAs as biomarkers in body fluid and tissue identification. *Forensic Sci Int Genet*. 2017 Mar; 27 :41-49.



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ago	: Argonaute
ark	: arkadaşları
bp	: baz çifti
cDNA	: complementary DNA
dk	: dakika
DGCR8	: Di George syndome critical region gene 8
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNAaz	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: deoxyribonucleotide triphosphates
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	:Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fe+2	: Demir
LDH-X	: Laktat Dehidrogenaz İzozim X
ml	: mililitre
µl	: mikrolitre
mRNA	: messenger RNA
miRNA	: micro RNA
nm	:nanometre
ng	: nanogram
ncRNA	: protein kodlamayan RNA
ORF	: Open Reading Frame =Açık Okuma Çerçevesi
pg	: pikogram

pH	: Power of Hydrogen
PCR	: Polymerase Chain Reaction
piRNA	: piwi-interacting RNA
pre-miRNA	: prekürsör miRNA
pri-miRNA	: primer miRNA
PSA	:Prostat spesifik antijen
rpm	: dakikadaki devir sayısı
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: ribosomal RNA
RNAaz	: Ribonükleaz
RISC	: RNA-indüklenmiş susturma kompleksine
siRNA	: small interfering RNA
snRNA	: small nuclear RNA
snoRNA	: small nucleolar RNA
sn	: saniye
tRNA	: transfer RNA
TRBP	: trans-activator RNA binding protein
UV	: Ultraviyole
qRT-PCR	: quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
3'UTR	: 3' ucu çevrilmemiş bölge
°C	: Sıcaklık (Santigrat Derece)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa no
Şekil 1. (Hemoglobin yapısı)	13
Şekil 2. (Luminol reaksiyonu)	16
Şekil 3. (Kastle-Meyer testi)	17
Şekil 4. (Spermium anatomisi)	20
Şekil 5. (RNA molekülünün temel yapısı)	27
Şekil 6. (RNA'ların sınıflandırılması)	28
Şekil 7. (MikroRNA'ların biyogenezi)	31
Şekil 8. (Genel sınıflama ve regresyon ağacı)	54

TABLolar DİZİNİ

Tablolar	Sayfa no
Tablo 1. (Vücut sıvılarının tanımlanmasında test edilen miRNA'lar)	34
Tablo 2. (MiRNA RT-PCR ve Real-Time PCR primer-prob dizileri)	43
Tablo 3. (Cinsiyet ve Doku türü özellikleri)	46
Tablo 4. (Periferik Kanda Kadın-Erkeğin miRNA ekspresyon düzeyleri bakımından karşılaştırılması)	46
Tablo 5. (Tükürükte Kadın ve Erkeğin miRNA ekspresyon düzeyleri bakımından karşılaştırılması)	47
Tablo 6. (MiRNA'ların doku türlerine göre ortalama ekspresyon verileri)	47
Tablo 7. (MiRNA'ların doku türlerine göre ortalama ekspresyon düzeyleri)	48
Tablo 8. (MiRNA-10b-3p'nin doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	48
Tablo 9. (MiRNA-96-5p'nin doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	49
Tablo 10. (MiRNA-106a doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	49
Tablo 11. (MiRNA-135a-5p doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	50
Tablo 12. (MiRNA-144-3p doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	50
Tablo 13. (MiRNA-203a-3p doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	51
Tablo 14. (MiRNA-205-5p doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	51
Tablo 15. (MiRNA-214-3p doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	52
Tablo 16. (MiRNA-412-3p doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	52
Tablo 17. (MiRNA-451a doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	53
Tablo 18. (MiRNA-891a doku türlerine göre ekspresyon düzeyi)	53

EKLER

EK-1: miRNA RT-PCR ve Real-Time PCR primer-prob dizileri

miRNA İsmi	*miRNA Gen No	*miRNA NükleotitDizi No	Primer ve Prob Dizileri
hsa-miR-10b-5p	406903	NR_029609.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACCACAAA-3'
			5'-F-GCCGCTACCCGTAGAACCG-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC) CA(pdC)AAA-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-96-5p	407053	NR_029512.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACAGCAA-3'
			5'-F-GCCGCTTTGGCACTAGCA-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)AGCAA- ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-106a-5p	406899	NR_029523.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACATCTGC-3'
			5'-F-GCCGCTAAAGTGCTGACAGT-3'
			5'-PR-FAM- TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)CTACCTGC-ZNA4-BHQ1-3'
hsa-miR-135a-5p	406925	NR_029677.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACTCACAT-3'
			5'-F-GCCGCTATGGCTTTTATTCT-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC) T(pdC)A(pdC)AT-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-144-3p	406936	NR_029685.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACAGTACA-3'
			5'-F-GCCGCTACAGTATAGATGAGTGTCTC-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)AGTA(pdC)ATC-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-203a-3p	406986	NR_029620.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACCTAGTG-3'
			5'-F-GCCGCGTAAAATGTTTAGG-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)(pdC)TAGTGGT-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-205-5p	406988	NR_029622.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACCAGACT-3'
			5'-F-GCCGCTCCTTCATTCCAC-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)(pdC)AGA(pdC)T-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-214-3p	406996	NR_029627.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACTGCC-3'
			5'-F-GCCGCACAGCAGGCAC-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)ACTGCC-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-451a	574411	NR_029970.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACAACCTCA-3'
			5'-F-GCCGCAAACCGTTACCAT-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC) AA(pdC) T(pdC) A-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-891a-5p	100126341	NR_030581.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACTCAGTG-3'
			5'-F-GCCGCTGCAACGAACCT-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)T(pdC)AGTGG-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-26b-5p	407017	NR_029500.1	5'-RT-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGCATACGACCTAT-3'
			5'-F-GCCGCTCAAGTAATTCAGG-3'
			5'-PR-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)A(pdC)CTATCC-ZNA4-BHQ-1-3'
miR-Universal			5'-R-GTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'

*www.ncbi.nlm.nih.gov/gene. **Kısaltmalar:**F: Forward, R: Reverse, PR: Prob, RT: Revers transkriptaz

Ek-2: Erişkin Hastalar için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (ERİŞKİN HASTALAR İÇİN)

Araştırmanın Açık Adı: Adli Tıpta vücut sıvılarının ayırımında biyolojik marker olarak mikroRNA kullanımı

Sorumlu Araştırmacı : Arş. Gör. Dr. Betül ALBAYRAK ACAR

Merkezin Adı : Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu çalışmada, vücut sıvılarının teşhisi için spesifik miRNA'larının tanımlanması amacıyla bir araştırma yapacağız. Bu araştırma toplam 8 ay sürecektir. Ayrıca, bu çalışmaya sizden başka 19 erişkin hasta daha katılacaktır.

Bu çalışmaya sizin de katılmanı istiyoruz, ancak katılmaya karar vermeden önce bazı şeyleri bilmeniz ve anlamanız gerekiyor. Size öncelikle çalışma sırasında neler olacağı açıklanacaktır. Size söylenen herşeyi anladıktan sonra bu çalışmaya katılıp katılmayacağınıza karar vermelisiniz.

Doktorunuz Arş. Gör. Dr. Betül ALBAYRAK ACAR size bilgileri dikkatli bir şekilde okuyacaktır. Çalışmada neler olacağını anlatabilmek için anlayamayacağınız sözler kullanmamız gerekebilir. Eğer anlamadığınız bir şey olursa doktorunuza istediğiniz kadar soru sorabilirsiniz.

Çalışmaya katılmaya "evet" dersanız ve isterseniz bu formu imzalayabilirsiniz. Çalışmaya katılmayı ya da katılmamayı seçebilirsiniz. İstemediğiniz zaman çalışmadan ayrılabilirsiniz.

Eğer çalışma sırasında size anlatıldığından farklı bir durum gelişirse size hemen haber verilecektir. O zaman da istediğinizde doktorunuza çalışmadan ayrılmak istediğinizi söyleyebilirsiniz. Kimse sizi zorlayamaz.

Bu çalışmaya katılmamanın yararları nelerdir?

Bu çalışmaya katılmanız durumunda adli olaylarda biyolojik materyallerin ayırımına yardımcı olacak bilgiler edinmeyi umuyoruz.

Bu çalışmada bana ne olacak?

Eğer bu çalışmaya katılmayı kabul ederseniz, sizden en fazla 5 ml kan, menstrual kan/semen ve tükürük örneği vermeniz istenecektir. Sizden alınan biyolojik materyal/veri 1 yıl süre saklandıktan sonra kurallara uygun olarak imha edilecektir. Anlamadığınız bir şey olursa tekrar tekrar doktorunuza sorabilirsiniz.

Bu çalışmaya katılmak zorunda mıyım?

Bu çalışmaya katılıp katılmamak istediğinize bağlıdır. Kararınızı vermeden önce, bu araştırmaya katıldığınızı için size para veya hediye verilmeyeceğini bilmeniz gerekir. Şimdi "evet" desanız de, istediğiniz zaman "istemiyorum" diyerek bu araştırmadan çıkabilirsiniz. Bunu yalnızca doktorunuza söylemeniz yeterlidir.

Bu çalışmaya katıldığımı başkaları da bilecek mi?

Sizin dışınızda yalnızca tıbbi kayıtlarınıza doğrudan erişebilecek olan kişiler (araştırma ekibindeki kişiler dışında araştırmanın yapılmasına onay ve izin verecek olan Etik Kurul ve Sağlık Bakanlığı gibi) bu çalışmaya katıldığınızı bilecektir. Ancak, çalışmanın her aşamasında olduğu gibi çalışmanın sonuçları yayınlanırken bile bütün bilgileriniz gizli tutulacaktır. Bu form sizin tarafınızdan imzaladığında sizinle ilgili bütün bilgilere ulaşabileceksiniz. Bu çalışmadan sorumlu doktorunuza sorduktan sonra, eğer o izin verirse, bu araştırmaya katıldığınızı kendi özel doktorunuza söyleyebilirsiniz.

Ne yapmak zorundayım?

Size yapılacak herşeyi anladıysanız, şimdi sizden bu araştırmaya katılmak istediğinize ilişkin imza atmanız istenecektir. Bu size açıklandığı haliyle çalışmaya özgürce katıldığınızı gösterecektir. Bu imzaladığınız kağıdın birisi de sizde kalacaktır.

Canınızı sıkan veya merak ettiğiniz bir şey olursa mesai saatleri içinde 03243410000-21930 numaralı telefonda Arş. Gör. Dr. Betül ALBAYRAK ACAR'ı arayabilir ve istediklerinizi sorabilirsiniz.

Olur verme beyanı

Toplam 2 sayfa olan bu formdaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırmayla ilgili yazılı ve sözlü açıklama Arş. Gör. Dr. Betül ALBAYRAK ACAR'dan doktor tarafından yapıldı. Bu araştırmanın amacını ve ne yapılacağını anladım. Bu çalışmada bana ne olacağını, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi, kimlik bilgilerimin gizli tutulacağını ve imzaladığım bu formun bir kopyasının bana verileceğini biliyorum. Bu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katıldığımı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı Soyadı :
Tarih (Gün/Ay/Yıl) :
İmzası :
Adresi :
Telefon numarası:

Bağımsız tanığın [gönüllü okur-yazar olmadığı için imzalı onay veremiyorsa vb. durumlarda]

Adı Soyadı :
Tarih (Gün/Ay/Yıl) :
İmzası :
Adresi :
Telefon numarası:

Bu çalışmadabenden alınan biyolojik materyalin/verinin:

- Yalnızca yukarıda adı geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
 İleride yapılması planlanan araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
 İleride yapılması planlanan araştırmalarda hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Formdaki bilgileri vererek gerekli açıklamaları yapan ve olur alan araştırmacının

Adı Soyadı : Arş. Gör. Dr. Betül ALBAYRAK ACAR
Tarih (Gün/Ay/Yıl) :
İmzası :
Adresi : Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı
Telefon numarası : 03243410000-21930

Acil tıbbi durumlarda iletişime geçilecek kişinin

Adı Soyadı : Arş. Gör. Dr. Betül ALBAYRAK ACAR
Tarih (Gün/Ay/Yıl) :
İmzası :
Adresi : Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı
Telefon numarası : 03243410000-21930

Araştırmaya onay veren Etik Kurulun

Adı :
Adresi :
Telefon numarası :