



T. C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

RATLARDA POSTMORTEM mRNA DEGRADASYON DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİNDEKİ YERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Enes KERMAN

ADLİ TIP ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Adnan ÇELİKEL

HATAY-2019

T. C. HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

RATLARDA POSTMORTEM mRNA DEGRADASYON DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİNDEKİ YERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Enes KERMAN

ADLİ TIP ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Adnan ÇELİKEL

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
18U008 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI

T. C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

RATLARDA POSTMORTEM mRNA DEGRADASYON DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI VE POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİNDEKİ YERİ

Dr. Enes KERMAN

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

.....
Prof. Dr. Yusuf ÖNLEN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Adnan ÇELİKEL
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

.....
Doç. Dr. Adnan ÇELİKEL
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1. Doç. Dr. Adnan Çelikel

2. Doç. Dr. Kenan KARBEYAZ

3. Dr. Öğr. Üyesi Uğur KOÇAK

III. İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	
TEZ ONAY SAYFASI	
III. İÇİNDEKİLER	i
IV. TABLO LİSTESİ	iii
V. ŞEKİL LİSTESİ	iv
VI. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	v
VII. TEŞEKKÜR	vi
VIII. ÖZET	vii
IX. ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Postmortem interval tayini	4
2.1.1. Adli tahkikat	4
2.1.2. Vücut sıcaklığı	5
2.1.3. Ölü lekeleri	7
2.1.4. Ölü sertliği	9
2.1.5. Gözdeki değişiklikler	10
2.1.6. Böcek ve larva bulunması	11
2.1.7. Midenin boşalma hızı	13
2.1.8. Moleküler yaklaşımlar	14
2.1.8.1. DNA düzeyinde yapılan PMI tayini çalışmaları	14
2.1.8.2. RNA düzeyinde yapılan PMI tayini çalışmaları	15
2.2. Gen ekspresyonu	16
2.3. Çalışmada kullanılan genler	17
2.3.1. ACTB	17
2.3.2. GAPDH	18
2.3.3. PPIA	18
2.3.4. EMC7	19
2.3.5. SRP-72	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Deneme grupları	21

3.2. RNA izolasyonu	21
3.3. cDNA sentezi.....	22
3.4. RT-qPCR uygulaması.....	22
3.5. İstatiksel analiz	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Total RNA izolasyonu bulguları	24
4.2. RT-qPCR bulguları.....	27
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇ	34
7. KAYNAKÇA.....	35
8. EKLER.....	41
EK A : Hayvan Deneyleri yerel Etik Kurulu.....	41
EK B : Hayvan Deneyleri yerel Etik Kurulu.....	42
9. ÖZ GEÇMİŞ	43

IV. TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Göz içi [K+] değeri- PMI ilişkisi ile ilgili yapılan çalışmalar.....	11
Tablo 2: Gen primerlerinin Foward ve Revers dizileri.....	23
Tablo 3: Kalp ve kas dokularından izole edilen örneklerde RNA konsantrasyon ve saflık değerleri	24
Tablo 4: PPIA, ACTB, GAPDH, SRP-72 ve EMC-7 genlerinin 0., 6., 12., 24. ve 48. saatlerdeki Ct değerleri.....	28

V. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Henssge Nomogramı.....	7
Şekil 2: L,a,b sistemi.....	8
Şekil 3: Diptera’da yasam dđngüsü.....	13
Şekil 4: Kalp kası dokusundan 0. saatte elde edilen total RNA jel gđrüntüsü.....	25
Şekil 5: Kalp kası dokusundan 6. saatte elde edilen total RNA jel gđrüntüsü.....	25
Şekil 6: Kalp kası dokusundan 12. saatte elde edilen total RNA jel gđrüntüsü.....	25
Şekil 7: Kalp kası dokusundan 24. saatte elde edilen total RNA jel gđrüntüsü.....	25
Şekil 8: Kalp kası dokusundan 48. saatte elde edilen total RNA jel gđrüntüsü.....	25
Şekil 9: İskelet kası dokusundan 0. saatte elde edilen total RNA jel gđrüntüsü.....	26
Şekil 10: İskelet kası dokusundan 6. saatte elde edilen total RNA jel gđrüntüsü.....	26
Şekil 11: İskelet kası dokusundan 12. saatte elde edilen total RNA jel gđrüntüsü.....	26
Şekil 12: İskelet kası dokusundan 24. saatte elde edilen total RNA jel gđrüntüsü.....	26
Şekil 13: İskelet kası dokusundan 48. saatte elde edilen total RNA jel gđrüntüsü.....	26

VI. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ACTB	: Beta actin
ATP / GTP	: Adenintrifosfat/Guanintrifosfat
Ca	: Kalsiyum
CIE	:Uluslararası Aydınlatma Komisyonu (Commission Internationale de l'Eclairage)
Ct	: Threshold cycle
DEPC	: Diethyl Pyocarbonate
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EMC-7	: Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Complex Subunit 7
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
K	: Potasyum
Mg	: Magnezyum
miRNA	: Mikro RNA
mRNA	: Messenger RNA
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PMI	: Postmortem interval
PPIA	: Peptidylprolyl isomerase A
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	:Ribozomal RNA
RT-qPCR	: Quantitative Reverse Transcription PCR
S\bar{x}	: Standart sapma
SRP-72	: Signal recognition particle 72,
tRNA	: Taşıyıcı (transfer) RNA
\bar{X}	: Ortalama

VII. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimine başladığım günden itibaren bilgisi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Adnan ÇELİKEL'e,

Adli tıp eğitim sürecime önemli ve kıymetli katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Uğur KOÇAK hocama,

Genetik çalışmalarda ve akademik hayatımda, bilgilerini ve becerilerini paylaşmayı hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin ÖZKAN ve Doç. Dr. Akın YAKAN'a,

Adli Tıp Anabilim Dalı'nda geçirdiğim sürede dostluklarından ve beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Dr. İbrahim ORTANCA, Arş. Grv. Dr. Gizem MURATOĞLU, Arş. Grv. Dr. Eniscan KARAALP, Arş. Grv. Dr. Mustafa SALMAN GÖKOĞLU, Arş. Grv. Dr. Onur ÖZKAN ve Arş. Grv. Dr. İsmail Mehmet DEMİRCİ'ye özverili desteklerinden dolayı,

Sabrı ve desteği ile her zaman yanımda olan kıymetli aileme, eşim Dr. Beyza KERMAN'a ve oğlum Kerem Efe KERMAN'a sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunar, teşekkür ederim.

VIII. ÖZET

Amaç: Ölümden sonra geçen sürenin tahmini tüm olgularda önemlidir. Çeşitli yöntemlerin kullanıldığı postmortem interval tayini (PMI) tahmininde gelişen teknolojiyle birlikte moleküler yaklaşımlar öne çıkmaktadır. Bu çalışmada ölümden sonra 48. saate kadar RNA kalitesinde meydana gelen değişim ile PMI arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Wistar albino ratlarda ölümden sonra farklı sürelerde +4 °C’de bekletilen kalp ve iskelet kası dokularından RNA izolasyonu yapılmıştır. Elektroforetik olarak rRNA bant bütünlükleri değerlendirilmiş ve ACTB, PPIA, GAPDH, SRP-72 ve EMC-7 referans genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri RT-qPCR’da incelenmiştir.

Bulgular: Total RNA, 28S ve 18S rRNA subunitlerinin 12., 24. ve 48. saat örneklerinde yıkımlanmaya başladığı görülmüştür. Kalp kasında mRNA yıkımlanmasına bağlı; 24. saatteki PPIA geni threshold cycle (Ct) değerleri ile 0., 6., ve 12. saatlerdeki değerler arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur ($P<0,01$). 24. saatteki ACTB geni Ct değerleri ile 0., 6., 12. ve 48. saatler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0,001$). GAPDH Ct değerleri; 0. saat ile 24. saat arasındaki farkın yanı sıra 6. saat ile 12., 24., ve 48. saatler arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür ($P<0,001$). SRP-72 Ct değerleri, 6. saat ile 24. ve 48. saatlerde elde edilen değerler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). EMC-7 gen ekspresyon seviyeleri bakımından saatler arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. İskelet kasında ise mRNA yıkımlanmasına bağlı; PPIA, ACTB, GAPDH ve SRP-72 gen ekspresyonu seviyeleri incelendiğinde, saatler arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.

Sonuçlar: Yaş ve cinsiyet gibi birçok faktörün PMI tahmininde kullanılan yöntemlerin parametrelerini etkileyebileceği göz önünde bulundurulduğunda, bunlara ek olarak moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla, PMI tahmini güvenilirliğini arttırmanın mümkün olabileceği anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Postmortem interval tayini, mRNA yıkımlanması, Referans gen, Gen ekspresyonu

IX. ABSTRACT

INVESTIGATION OF POSTMORTEM mRNA DEGRADATION LEVELS AND THEIR IMPORTANCE IN POSTMORTEM INTERVAL ESTIMATION IN RATS

Aim: The estimation of the time since death is important in all cases. With developing technologies, molecular approaches come to the forefront in the estimation of PMI. The aim of this study was to investigate the relationship between change in RNA quality and PMI for up to 48 hours after death.

Methods: In Wistar albino rats, RNA was isolated from cardiac and skeletal muscle tissues kept at +4 °C for different periods after death. Electrophoretic rRNA band integrity was evaluated and expression levels of ACTB, PPIA, GAPDH, SRP-72 ve EMC-7 genes were investigated in RT-qPCR.

Results: Total RNA, 28S and 18S rRNA subunits began to degrade at 12th, 24th and 48th hour samples. In heart muscle, due to mRNA degradation, differences between threshold cycle (Ct) values of PPIA gene at 24th hour and 0th, 6th, 12th hours were statistically significant ($P < 0,01$). For ACTB, the difference between 24th hour and others were significant ($P < 0,001$). For GAPDH, the difference between 0th hour and 24th hour, as well as the difference between 6th and 12th, 24th, 48th hours was significant ($P < 0.001$). For SRP-72, the difference between 6th hour and 24th, 48th hours were significant ($P < 0.05$). For EMC-7, no significant difference was found between hours. When PPIA, ACTB, GAPDH and SRP-72 gene expression levels were examined, because of mRNA degradation no significant differences were found between hours in skeletal muscle.

Conclusion: Given the fact that many factors, such as age and gender may affect method parameters used in PMI estimation, it is possible to increase the reliability of PMI estimation by adding molecular methods to these.

Key words: Postmortem Interval, mRNA degradation, Reference gene, Gene expression.

1. GİRİŞ

Tıpta ölüm temel olarak “somatik ölüm” ve “hücreseöl ölüm” şeklinde ikiye ayrılır. Somatik ölüm; vücudun bir bütün olarak değerlendirilerek öldüğünün kabul edilmesidir. Hücreseöl ölüm ise; doku, organ ve hücrelerin fonksiyonlarının durması sonucu meydana gelir (1).

Ölümden sonra geçen sürenin (Postmortem interval = PMI) tahmini tüm ölüm olgularında önemlidir. Ölümden sonra defin ruhsatının düzenlenmesinde ve özellikle zorlamalı ölümlerin adli süreçlerinin aydınlatılmasında PMI tahmini büyük öneme sahiptir. Ölüm zamanının belirlenmesinde öncelikle adli tahkikat ve olay yeri inceleme sonuçlarının değerlendirilmesi ile birlikte adli tıbbi bilirkişilerin görüşlerine başvurulur(2).

PMI tahmininde birçok yöntem kullanılmaktadır (3,4). Bu yöntemler beraber kullanıldığında dahi PMI tahmininde nispeten yetersiz kalmakta ve erken postmortem dönemde değerlendirildiğinde bile elde edilen bilgiler sınırlı olabilmektedir (3,4). PMI tahmininde vücut sıcaklığı değişiminin ölçümü, ölü lekeleri ve ölü katılığının değerlendirilmesi, göz değişikliklerine dayalı metotlar, vücudun belirli bölgelerinde böcek ve larva bulunması, göz içi potasyum seviyeleri, mide boşalma hızı ve bazı dokularda nükleik asit bütünlük kaybı miktarının ölçümü gibi yöntemler kullanılmaktadır (5,6).

Gelişen teknoloji ve bilimsel ilerleme ile birlikte nükleik asitlerin adli tıpta kullanım alanı artmıştır. Özellikle postmortem dönemde DNA (Deoksiribonükleik asit) ve RNA (Ribonükleik asit) degradasyonlarına bağlı olarak PMI tahmini yapılabileceği bildirilmektedir (6–9). DNA, RNA'ya göre daha nispeten daha stabil bir molekül iken, RNA hücreseöl düzeydeki ölümden hemen sonra hızlı bir şekilde bütünlüğü yıkımlanabilmektedir. Gerek hücreseöl düzeydeki endonükleaz aktivitesi gerekse eksternal birçok faktör yüzünden zamana bağlı olarak yapısı yıkılan RNA molekülündeki yıkılma oranları incelenerek PMI tahmini yapılabileceği yapılan bazı

çalışmalarca bildirilmiştir (6,8). RNA degradasyonu araştırmalarında rRNA (ribozomal RNA)'larla birlikte mRNA (mesajcı RNA) degradasyon seviyelerinin belirlenmesi önemli hedeflerdendir. mRNA degradasyon kontrolü amacıyla seçilecek genler referans gen ve/veya hedef gen olabilmektedir (6,8–10). Referans gen; doku veya organizmadaki spesifik rolüne bakılmaksızın, bir hücrenin varlığını sürdürmesi ve bazal hücresel işlevlerin korunması için gerekli olan genlerdir. Referans olarak seçilen genlerin; doku tipinden, gelişim evrelerinden, hücre döngüsünden veya harici sinyallerden bağımsız olarak, normal koşullar altında bir organizmanın tüm hücrelerinde, ekspresyon düzeyi değişmeyen ya da çok az miktarda değişen genler olması beklenir (11–13).

Bu çalışmada, ratlarda ölüm sonrası kontrollü çevre şartlarında (+4°C'de) 48 saate kadar muhafaza edilen kalp ve iskelet kası dokularında RNA kalitesinin, rRNA subunitlerinin bütünlüğü ile referans gen olarak kullanılan ACTB (Beta Actin), GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase), PPIA (Peptidylprolyl Isomerase A), SRP-72 (Signal Recognition Particle), EMC-7 (Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Complex Subunit 7) genlerinin ekspresyon ve degradasyon düzeylerinin tespiti ile postmortem interval tayinindeki öneminin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Tıpta ölüm, temel olarak “somatik ölüm” ve “hücresele ölüm” şeklinde ikiye ayrılır. Somatik ölüm; vücudun bir bütün olarak değerlendirilerek öldüğünün kabul edilmesidir. Gelişen teknoloji ile birlikte canlandırma cihazlarının kullanılmaya başlanmasıyla, yapay desteğe rağmen temel vücut fonksiyonlarının durması olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte son yıllarda somatik ölüm yerine “beyin ölümü” terimi kullanılmaya başlanmıştır. Hücresele ölüm ise; doku ve organ düzeyinde çeşitli sebeplere bağlı olarak hücrenin fizyolojik aktivitelerinin sonlanması olarak tanımlanabilir. Hücrelerin canlılık durumu, oksijensizliğe duyarlılığa göre değişmektedir. Zira nöronlar gibi oksijen ihtiyacı fazla olan dokular dakikalar içerisinde canlılığını yitirirken, beyaz kan hücreleri 12 saate kadar hareket kabiliyetine sahiptir (1,14).

Adli bilimler bakımından ölüm olgularını doğal ve doğal olmayan ölümler şeklinde incelemek mümkündür. Organizmada gelişen kardiyovasküler sistem bozuklukları, neoplaziler ya da alt solunum yolu enfeksiyonları gibi mevcut hastalıklara bağlı olarak gelişen doğal ölümler olarak sınıflandırılırken, travmatik ve zorlamalı ölümler olarak gelişen ölümler doğal olmayan ölümler olarak sınıflandırılır (2,15). Zorlamalı ölümlerin neredeyse tamamı adli tıp bilimlerini ilgilendiren ve organizmada bulunan bir faktöre bağlı olmaksızın cinayet, intihar ve kaza gibi travmatik etkenlerle ilişkili ölümlerdir. (1,2). Ateşli silah ve kesici-delici aletlerle yaralanmalar, trafik kazası, yüksekte düşme, bir cisim ile künt yaralanmalar, boğma, suda boğulma nedenli asfiksiye bağlı olaylar, uyuşturucu maddelere ve/veya ilaçlara bağlı zehirlenmeler şeklinde birçok durum doğal olmayan ölümle sonuçlanabilir (2).

Doğal ve doğal olmayan sebeplere bağlı olarak gelişen ölüm olgularının nedeninin tam olarak tespit edilebilmesi önemlidir. Ölüm sebebinin doğal veya doğal olmayan nedenlerden kaynaklandığının belirlenememesi durumunda, ölüm “şüpheli

ölüm” olarak kabul edilmekte ve “adli vaka” olarak değerlendirilmektedir (2,14,15). Tüm ölüm türlerinde PMI'nin belirlenmesi önemli olmakla birlikte şüpheli ve zorlamalı ölüm olgularının değerlendirilmesinde anahtar öneme sahiptir.

2.1. Postmortem interval tayini

PMI tayini, ölümün şekillendiği andan itibaren ölü muayene ve/veya otopsi işlemine kadar geçen sürenin tahmin edilmesidir (5). Daha çok defin ruhsatı düzenlenmesi, adli vakaların aydınlatılması, ticaret hukuku ve medeni hukuk alanlarında ön plana çıkan PMI tayininde tıbbi ve tıbbi olmayan yöntemler kullanılmaktadır. Tıbbi olmayan yöntemler adli makamların araştırmalarını içerirken tıbbi yöntemlerde ölüm sonrası değişikliklere bağlı vücut sıcaklığının tespiti, ölü katılığı ve ölü lekeleri, göz ve göz içi sıvısının durumu, böcek ve larva bulunması, mide boşalma hızı ve moleküler uygulamalar gibi yöntemler kullanılmaktadır (4,5,9,10). Bununla birlikte yüzyılı aşkın süredir yapılan çalışmalarla oluşturulan kapsamlı literatüre rağmen, deneyimli uzmanlar için bile PMI tahmini hala zor olabilmektedir (16).

Ölüm zamanının tahmininde tıbbi ve tıbbi olmayan yöntemler kullanılmaktadır. Tıbbi olarak; ölüm sonrası organizmada meydana gelen bazı değişiklikleri çeşitli tıbbi metotlarla inceleyerek ve ölüm zamanı hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Bu değişikliklerden incelenen faktörlerin başında vücut sıcaklığı, ölü lekeleri, ölü sertliği, gözdeki değişiklikler, böcek ve larva bulunması, mide boşalma hızı gelmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu parametrelerin yanı sıra moleküler yöntemlerden de yararlanılmaktadır(5,17–22). Tıbbi olmayan yöntemlerde ise; tanık ifadeleri, mobese ve şahıslara ait güvenlik kameraları görüntüleri, telefon kayıtları, internet erişim kayıtları, olay yeri inceleme bulguları gibi deliller kullanılmaktadır(5).

2.1.1. Adli tahkikat

Tanık ifadeleri değerlendirilerek ölenin en son nerelerde bulunduğu ve kimlerle görüştüğü belirlenebilir. Gittikleri yerlerde bulunan kamera görüntüleri incelenebilir.

Telefon kayıtları ve sinyal alınan bölgeler ile saat belirlenmesi yapılabilir. Olay yerinde bulunan mektup, not, üzerinde tarih bulunan basılı yayın materyalleri aracılığı ile ölümün gerçekleşme zamanı hakkında fikir elde edilebilir(5).

2.1.2. Vücut sıcaklığı

Sağlıklı bireylerde normal vücut sıcaklığının rektal ölçümlerde ortalama değeri 36,9 °C'dir. Çeşitli hastalıklar ve çevresel faktörlere bağlı olarak vücut sıcaklığında değişimler meydana gelebilmektedir. Ölümle birlikte vücut sıcaklığı çevre sıcaklığı ile eşitlenecek şekilde değişmektedir. Konjestif kalp yetmezliği, kanama ve sekonder şoklar durumlarında sıcaklık subnormal seyredilmektedir. Enfeksiyonlar, pons kanamaları ve kalp krizine bağlı ölümlerde ise normalin üzerinde olabileceği gibi septisemi durumunda postmortem birkaç saat boyunca vücut sıcaklığı artmaya devam edebilmektedir (23). Vücut sıcaklığındaki değişim çevre şartlarından önemli oranda etkilendiği için yalnızca bu parametrenin kullanımıyla ölüm zamanının belirlenmesi hakkında yeterli ve güvenli bilgiler elde edilememektedir (23).

Postmortem interval tahmini amacıyla kullanılan bir formüle göre ortalama koşullarda kıyafetli bir vücudun ilk altı saatte saat başına 2,5 °C ve ilk 12 saatte ortalama 1,5–2 °C sıcaklık kaybettiği bildirilmektedir (24). Başka bir formüle göre ise sıcaklığın saat başına 2,2–2,4 °C olacak şekilde düştüğü belirtilmektedir (24).

Ölüde meydana gelen vücut sıcaklığı azalmasına bağlı kullanılan pek çok şema mevcut olmakla birlikte, hiç biri tam anlamıyla güvenilir bulunmamaktadır (1,24). Bu şemalardan en kullanışlı olanının Henssge Normogramları olduğu bildirilmekle birlikte tahmin edilen ölüm zamanının, gerçek ölüm zamanından 2.8 saatlik bir fark göstermektedir (Şekil 1) (24,25).

Nelson'a göre PMI tahmini (26);

$$T_{Z_{r+i}} = T_{Ze^{(k_{n+i}+d_{n+i})}}$$

T_Z : ölçülen sıcaklık

n: Zaman

n+i: zamandaki artışlar

i: bir tam sayıdır.

d: Dakika olarak artışlar

k_E : $n+i$ zamanı için belirlenmiş üstel bir katsayıdır.

Toplanan sıcaklık verilerinin her biri ile bir “ k_A ” üstel sabiti belirlenir (26).

k_A 'nın belirlenmesi ise;

$$k_{A_{n+i}} = \ln(T_{Z_{r+i}}/T_Z)/d_{n+i}$$

Gerçek üstel büyüme sabitleri n aralık başına k_A aşağıdakilere göre belirlenir ve ortalaması alınır:

$$b = (k_{A_{0+i}} - k_{A_0}/d_{n+i} - d_0)$$

b 'yi kullanarak ve k_{A_0} 'dan başlayarak, aşağıdakilere göre belirsiz bir dizi tahmini üssel sabite k_E hesaplanabilir:

$$k_{E_{n+1}} = k_{E_n} + b$$

Matematiksel olarak ortalamaların kullanılması kesin veriler gerektirir; bu nedenle, veri toplama ve sıcaklık ölçümü en azından ikinci ondalık basamağa kadar kesin aralıklarla gösterilmelidir. Her ikisi de otomatik cihazların kullanımı da dahil olmak üzere, modern cihazlarla ölçülebilir. Antemortem sıcaklık verileri ölümden hemen önce toplanmadıkça, ölümdeki gerçek sıcaklık kesin olarak bilinemez. Bilinen, normal insan sıcaklığının ortalama $37,0^\circ\text{C}$ olduğu ve çoğu durumda ölümden kısa bir süre sonra yaklaşık $0,5^\circ\text{C}$ yükseldiğidir. Bu nedenle, $37,5^\circ\text{C}$ 'lik bir y eksenini seçildi ve PMI içeren T_Z ve T_0 arasındaki süre ile T_0 'ya eşit olarak ayarlandı. Toplanan veriler işlendikten sonra, PMI tahminini oluşturmak için aşağıdaki denklem kullanılır:

$$[((37,5-A)/(B-A)) \times 60] + C$$

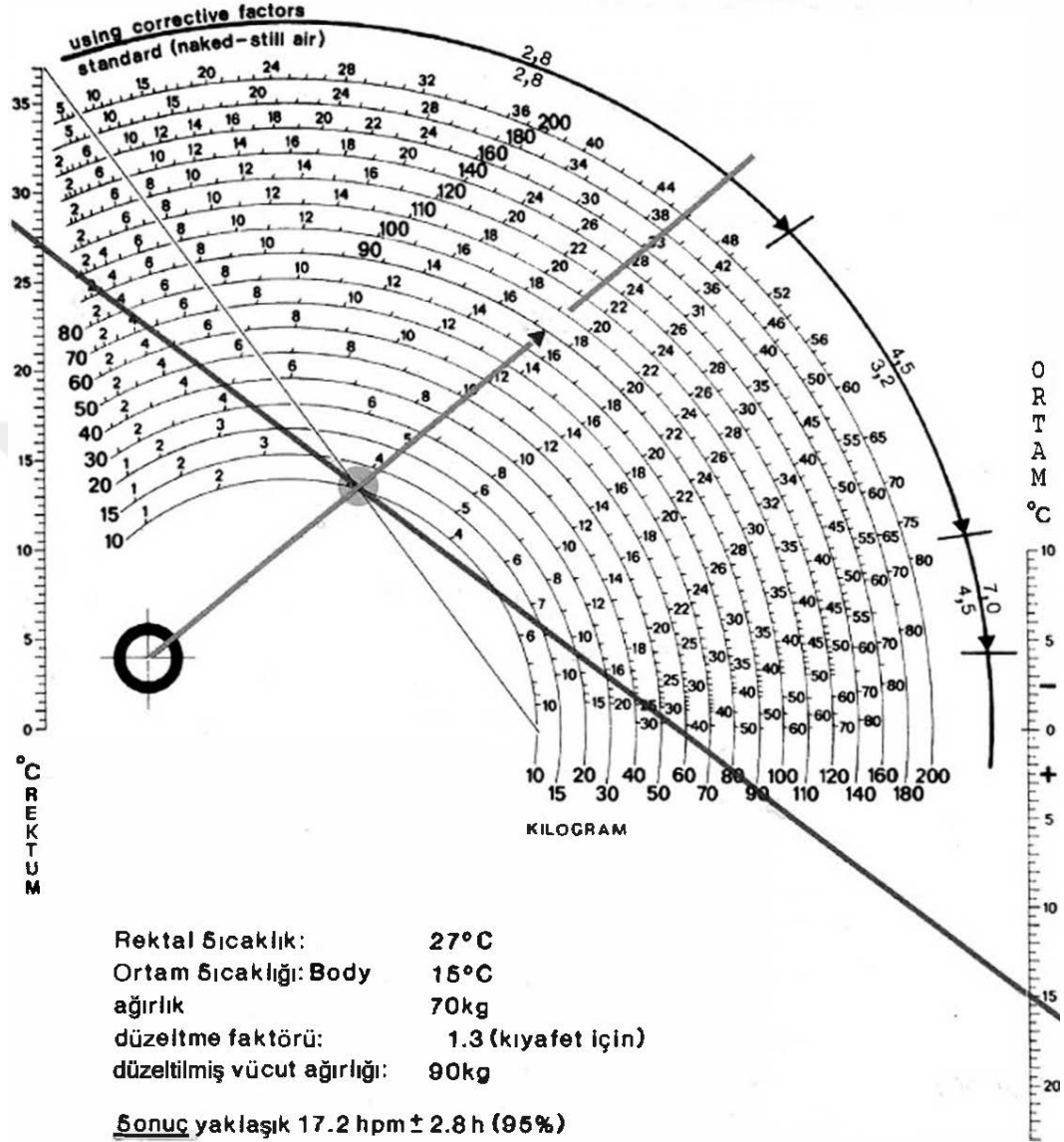
A , $37,5^\circ\text{C}$ 'den daha düşük bir değer en yakın sıcaklığıdır, B , $37,5^\circ\text{C}$ 'den daha büyük bir değer en yakın sıcaklığıdır ve C , dakika olarak verilen A 'nın kaydedildiği zamandır (26).

Henssge ve Madea' ya göre “Şekil 1” de gösterilen normogram aracılığı ile ölüm zamanı tayini yapılabilmektedir (25).

Olası değişim 95 % (%h ±)

ÖLÜMLE İLGİLİ SICAKLIK ZAMAN NORMOGRAMI

23°C'ye kadar olan ortam sıcaklıkları için



Şekil 1: Henssge Nomogramı (25)

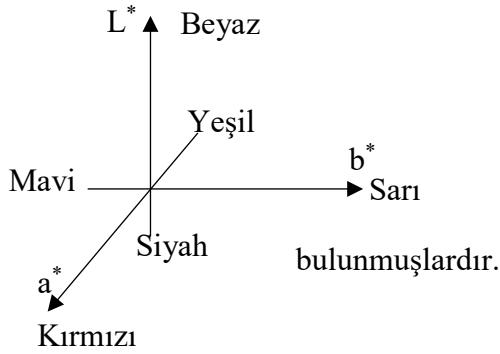
2.1.3. Ölü lekeleri

Ölüm sonrası vücutta kan akışı durmasına bağlı olarak damarlarda staz oluşmakta ve yerçekiminin etkisiyle kan vücudun yere yakın bölgelerinde toplanmaktadır. Kanda bulunan eritrositlerin parçalanmasıyla birlikte kan önce

kırmızı, oksijenin tükenmesinden sonra ise mor bir renk almaktadır. Staza uğrayan kan pasif olarak doku içerisine yayılır ve dokuları mor renge boyar (23). Renk değişikliği ile birlikte kandaki pıhtılaşma faktörlerinin inaktif olmaları sonucunda vücutta çeşitli lekelenmeler meydana gelebilmektedir. Ayrıca kandaki oksihemoglobin ve karbondioksit konsantrasyonunu değiştiren faktörler de ölü lekelerinin rengini etkilemektedir. Kandaki karbondioksit konsantrasyonu arttığında ölü lekeleri koyu mor renkte olurken, karbonmonoksit zehirlenmesi gibi durumlarda ölü lekeleri açık pembe-kırmızı renkte oluşabilmektedir. Soğuk ortamda ve/veya suda bekleyen cesetlerde, siyanür zehirlenmesinde açık pembe renkte oluşabilmektedir. Anilin ve potasyum klorat zehirlenmesi durumunda methemoglobinemi meydana geldiğinde ölü lekeleri kahvengi-siyah renk alabilmektedir (5,23,27).

Ölümden 3-5 saat sonra başlayan ve 12 saatte maksimuma çıkan ölü lekeleri, küçük çizgiler şeklinde başlayarak birleşmekte ve geniş alanlara yayılmaktadır. Bununla birlikte ölümden yaklaşık 12 saat sonra fikse olan lekeler cesedin pozisyon değişimiyle yer değiştirmeyerek sabitlenmektedir. Ölüm öncesi kan kaybı meydana gelen vakalarda, kanama miktarı arttıkça oluşan leke miktarı azalmaktadır. Kanın akışkanlığı arttıkça ölü lekesi oluşumu da artmaktadır (5,27).

Usumoto ve arkadaşları (28) yaptığı bir çalışmada ölü lekelerinin spektrofotometrik olarak incelenmesi amacıyla 1976 yılında Uluslararası Aydınlatma Komisyonu (CIE - Commission Internationale de l'Eclairage) tarafından belirlenen renk sistemi (29) kullanılarak postmortem interval tahmini için bir formül önerisinde



Şekil 2: L*a*b* sistemi: L*, açık koyu eksen; a*, kırmızı-yeşil renk eksen*, mavi-sarı renk eksenidir (28).

Şekil 2’de gösterilen L^* açık koyu eksenini ifade etmekte ve “beyaz=100”, “siyah=0” olarak değerlendirilmekle birlikte “sarı=+b”, “mavi=-b”, “kırmızı=+a”, “yeşil=-a” olarak formüle uygulanmaktadır (28). Bu çalışmada kontrol deri rengi ile ölü lekeleri arasındaki farklılıklar “ Δ ” simgesiyle ifade edilmiştir. Kontrol deri rengi ve ölü lekeleri arasındaki farklılıklar (ΔE^*ab) ile chroma (renksel parlaklık, C^*) formülleri belirlenmiştir:

$$\Delta E^*ab = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

Metrik Ton farkı (ΔH^*) hesaplaması;

$$\Delta H^* = \sqrt{(\Delta E^*ab)^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C^*)^2} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2 - (\Delta C^*)^2}$$

Usumoto ve ark.(28) 31 faktörün değerlerini incelenmiştir. Bu parametreler; kontrol cilt L_c^* , a_c^* , b_c^* ve C_c^* , ölüm sonrası canlılık L_1^* , a_1^* , b_1^* ve C_1^* , ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔH^* , ΔE^*ab , ΔC^* , a_c^*/L_c^* , b_c^*/L_c^* , $\Delta L^*/L_c^*$, b_c^*/a_c^* , $\Delta a^*/a_c^*$, $\Delta b^*/b_c^*$, a_1^*/L_1^* , b_1^*/L_1^* , $\Delta L^*/L_1^*$, b_1^*/a_1^* , $\Delta a^*/a_1^*$, $\Delta b^*/b_1^*$, $\Delta a^*/\Delta L^*$, $\Delta b^*/\Delta L^*$, $\Delta b^*/\Delta a^*$, $\Delta C^*/C_c^*$, $\Delta C^*/C_1^*$.

İncelenen faktörlerden ΔC^* ve $\Delta C^*/C_c^*$ parametrelerinin postmortem interval ile zayıf bir korelasyon gösterdiği, diğer parametrelerin ise korelasyon göstermediğini belirtmektedirler. Her ne kadar korelasyon zayıf olsa da postmortem intervalin hesaplanmasında önerdikleri bir formülle postmortem intervali $\pm 4,76$ saatlik bir hata payı ile hesaplamanın mümkün olduğunu bildirmektedirler (28).

$$PMI \text{ (saat)} = -20.47 - 3.79 \times \Delta L^* - 0.52 \times a_1^* + 10.70 \times \Delta b^* - 7.89 \times b_1^*/a_1^* - 57.42 \times \Delta a^*/\Delta L^* - 38.78 \times \Delta b^*/\Delta a^* \quad (28)$$

2.1.4. Ölü sertliği

Canlıda kas dokusunun ihtiyacı olan enerji, ATP’nin (adenin trifosfat) ADP’ye (adenin difosfat) dönüşümü sırasında ortaya çıkan fosfordan elde edilmektedir. Canlıda kas dokusunun fonksiyonunu başlatabilmesi için aksiyon potansiyeline ihtiyacı vardır. Aktin ve miyosin filamentinin kayma veya dişli çark hareketi sırasında yan çıkıntılarının ilişkileri için gerekli enerji kaynakları olan ATP ve kreatin fosfatın

tekrardan sentezleri için gerekli enerji besinlerden sağlanmaktadır. Miyosin filamentinin yan çıkıntılarının aktin filamentinden ayrılması ve lifin gevşeyebilmesi için ortamda ATP'ye ihtiyaç vardır. Ölüde yeni ATP üretilmeyeceğinden dolayı miktarı azalmakta ve buna bağlı olarak kasın işlevsel özelliği ortadan kalkmaktadır. Bundan dolayı kas dokusu sertleşir ve çürüme evresine kadar enerji yokluğundan dolayı gevşeyemez. Bu sertlik, donma ve yanmaya bağlı sertlik ile karıştırılabilmek ihtimali bulursa da ayırımı çok kolaydır (24).

Çevre sıcaklığı arttıkça ölü katılığı daha erken oluşmakta ve daha erken sona ermektedir. Donmuş cesetlerde ise normal ortam ısısına alındığında ölü katılığı beklenildiği şekilde gelişmektedir. Ölümden önce fiziksel aktivite fazla olursa kaslarda bulunan depo enerji erken tükeneceği için ölü katılığı erken oluşabilmektedir (5,23,25,27).

Ölümü takiben ortadan kalkan nöronal uyarımın ortadan kalkmasına bağlı olarak iskelet kaslarında gevşeme meydana gelmektedir. Çevre sıcaklığı ve ölüm öncesi fiziksel aktivite gibi faktörlere bağlı olmakla birlikte ölü katılığı ölümden yaklaşık 3-6 saat sonra başlamakta, 10-12 saatte maksimuma ulaşmakta ve 36-48 saate kadar sürmektedir. Çürümenin başlaması ile birlikte kaslar tekrar gevşemektedir (23,25,27).

2.1.5. Gözdeki değişiklikler

Anatomik olarak korunaklı bir bölgede bulunan göz içi sıvısı, postmortem dönemde kontaminasyondan az derecede etkilenmektedir ve diğer vücut sıvıları ile karşılaştırıldığında daha düşük diffüzyon hızlarına sahiptir ve uzun süre stabil olarak kalabilmektedir (30).

PMI tahmini için göz içi sıvısı incelemelerinde; potasyum, hipoksantin, magnezyum, sodyum, kalsiyum, klor, laktat, glikoz, serbest aminoasit, metal ve metalloproteinler gibi parametreler araştırılmaktadır (30). Tablo 1'de potasyum seviyelerine göre PMI tahmini için önerilen formüllere örnek verilmektedir.

Tablo 1: Göz içi [K⁺] değeri- PMI ilişkisi ile ilgili yapılan çalışmalar (30)

PMI = 7,14 [K ⁺] – 39,1	(Sturner 1963)
PMI = 5,26 [K ⁺] – 30,9	(Madea, Henssge ve ark 1989)
PMI = 4,32 [K ⁺] – 18,35	(James, Hoadley ve ark 1997)
PMI = 3,92 [K ⁺] – 19,04	(Munoz, Suarez-Penaranda ve ark 2001)
PMI = 6,41 [K ⁺] – 46,25	(Mulla, Massey ve ark 2005)
PMI = 5,8753[K ⁺] – 32,7132	(Zhou, Zhang ve ark 2007)
PMI = 1,076 [K ⁺] – 2,815	(Jashnani, Kale ve ark 2010)
PMI = 2,7157 [K ⁺] – 19,9538	(Tumram, Bardale ve ark 2011)
PMI = 5,7699 [K ⁺] – 13,2763	(Bortolotti, Pascali ve ark 2011)

Ölümden sonra sıvı kaybına bağlı olarak kornea opasitesi birkaç saat ile 24 saat arasında oluşabilmektedir (25,31). Korneada meydana gelen değişiklikler çok değişken bir saat aralığına sahip olduğu için geniş aralıkta ölüm zamanı tahmininde bulunulabilmektedir (31).

Postmortem dönemde göz içi incelemelerinde göz içinden enjektör ile, sıvının tamamı tek aspirasyonla alınmaktadır (30,32). Hücre ölümüne bağlı göz içi sıvısının dinamisi bozulmakta ve ölen hücrelere bağlı olarak elektrolit (Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, K⁺ vb.) miktarı değişimleri, üre retansiyonu, hipoksantin düzeyi, organik madde incelemeleri, metal ve metalloprotein seviyelerinin belirlenmesi gibi çalışmalar yapılarak PMI tahmininin yapılabileceği bildirilmektedir (30).

2.1.6. Böcek ve larva bulunması

Entomoloji bilgilerinin adli tıp alanında kullanımıyla ölüm zamanı hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Özellikle ölümden sonraki ilk ay içerisinde ergin sineklerin bıraktığı yumurtaların değerlendirilmesi gibi metotlarla önemli bulgular elde edilebilmektedir. Ergin sineklerin bıraktığı yumurtalar hava ısısına göre birkaç saatten iki güne uzayan süre içerisinde yumurtadan çıkmaktadırlar. Yumurtadan çıkan larvalar 3 kez kabuk değiştirdiklerinden dolayı bu 3 dönem birbirinden ayırt edilebilmektedir. Erişkin larva toprak altına girdikten sonra pupa formuna

dönüşmektedir (33). Pupal dinlenme ve metamorfoz süreçlerinden sonra erginleşmiş sinek kabuğu kırarak pupadan dışarı çıkmaktadır. Bu bilgilerin ışığında ölüm zamanı hakkında fikir sahibi olunabilse de yapılan çalışmalarda; çevre ısı ve vücut bütünlüğü gibi faktörlerin PMİ tahmininde doğruluğun 3 güne kadar etkilenebildiğini göstermektedir (33–35). Cesetten elde edilen böceğin evresi (larva dönemleri veya pupa) belirlenerek boyu ölçülür ve türe özgü sıcaklık-zaman grafipleri kullanılarak ölümden sonra geçen sürenin tahmini yapılabilir (36).

Cesetlere gelen böcekler yedi grupta incelenmektedir:

Birinci grup: Diptera ordosuna dâhil Calliphoridae, Muscidae ve Sarcophagidae familyalarına ait türler girmektedir. Larva boyu ve ağırlığı postmortem interval hesaplanmasında kullanılmaktadır (36).

İkinci grup: Bu evrede albüminoid maddelerin tüketilmesinden sonra yağ doku ortaya çıkmakta ve bu maddelerden hoşlanan böcekler, özellikle Coleoptera ordosuna ait bazı türlerin sayısı ceset üzerinde artmaktadır (36).

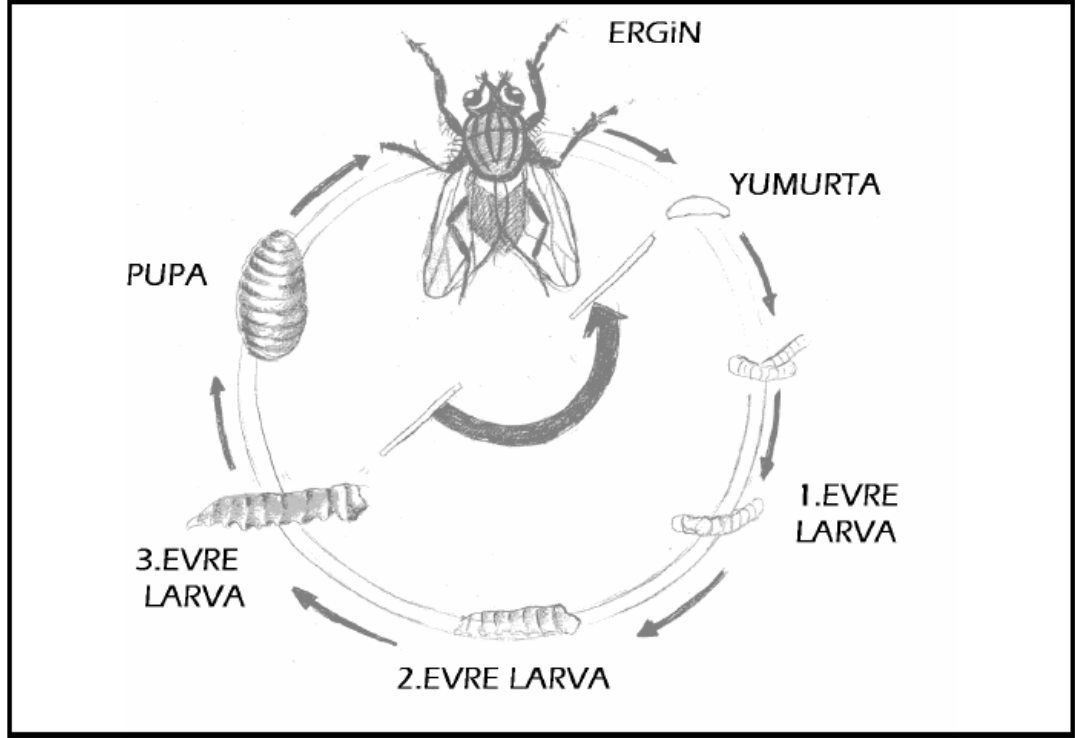
Üçüncü grup: Bazı albüminoid maddelerin (kazein) fermentasyonu sonucunda *Anthomya vicina* (Diptera:Anthomyiidae) ve *Pyophila petasionis* (Diptera) türleri böcek popülasyonu baskın hale gelmektedir (36).

Dördüncü grup: Bu evreye kadar böcekler tarafından tüketilmeyen dokular, amonyak kokuları yaymaya başlar ve bu grubun böcekleri cesette etkin popülasyon konumunda olmaktadır. Bu evrede Diptera'dan *Phora atterima* ile birlikte Coleoptera'dan Silphidae (leş kınkanathıları), Histeridae (kesik kınkanathılar) familyalarına ait türler gözlemlenmektedir (36).

Beşinci grup: Bu gruptaki böcekler Acari ordosuna aittir. Cesedin zemine bakan kısmında bulunurlar. Daha önce gelen böcekler kadavrada kalış sürelerini tamamlamadan kadavraya gelirler. Cesette kalan sıvı haldeki bütün organik maddeleri tüketerek cesedin mumyalaşmasına sebep olurlar. Cesede geliş zamanı ise 2-3 yıldır (36).

Altıncı grup: *Tineola biselliella* (Lepidoptera:Tineidae), *Attegenus pellio* (Coleoptera: Dermestidae) türleri böcekler kuruyup mumyalaşan cesedin tendonlarını, saçlarını ve kıllarını tüketirler (36).

Yedinci grup: *Tenebrio obscurus* (Coleoptera:Tenebrionidae), kendilerinden öncekilerin böcek kalıntılarını (nimf ve pupa) tüketirler.



Şekil 3: Diptera'da yaşam döngüsü (36)

2.1.7. Midenin boşalma hızı

Sağlıklı bir bireyde mideye gelen gıda içeriği normal şartlar altında 3-4 saat içerisinde bağırsaklara geçebilmektedir. Midenin motilitesi, alınan gıdanın içeriği ve miktarı gibi birçok faktör mide boşalma hızını etkilemektedir (5). Örneğin, midenin motilitesini etkileyen antikolinergik ilaçlar, ölüm anına yakın dönemde meydana gelen heyecan motiliteyi etkileyebilmektedir. Protein ve yağ oranı fazla gıdaların sindirim süresi karbonhidrat bazlı gıdalardan daha uzun sürmektedir. Alınan gıda miktarı arttıkça kimüs oluşum süresi artacağı için midenin boşalma süresi de uzayacaktır. Her ne kadar PMI tahmininde diğer faktörlerle birlikte fikir veren bir parametre olsa da tek başına yeterli olmamaktadır (5).

2.1.8. Moleküler yaklaşımlar

PMİ tayininde konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra akım sitometrisi, kapiller elektroforezi, manyetik rezonans spektroskopisi ve immünohistokimya gibi yöntemler önerilmiştir (37).

Moleküler biyolojide son yıllardaki gelişmeler ile birlikte nükleik asitler üzerinden (DNA ve RNA) ölümden sonra meydana gelen değişimlerin PMI ile ilişkilendirilmesi adli bilimlerde ilgi odağı olmuştur (38–43).

2.1.8.1. DNA düzeyinde yapılan PMI tayini çalışmaları

Kalıtım materyali olarak kabul edilen DNA, PMI tayini çalışmalarında kullanılabilme potansiyeline sahip bir moleküldür. Hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun tespitiyle PMI tahmininin yapılabileceği bildirilmiştir (44). Bununla birlikte PMI tayini çalışmalarında DNA kullanımında daha çok DNA degradasyonu üzerinde durulmaktadır (7). İnsan ve bazı laboratuvar hayvanları üzerinde PMI ve DNA degradasyonu arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda beyin, diş ve dalak gibi organlardan izole edilen DNA'nın degradasyon düzeyleri incelenerek PMI ile ilişkilendirilebileceği gösterilmiştir (7,40,45).

Postmortem dönemde katabolik enzimlerin etkisiyle hidroliz ve oksidasyon reaksiyonları meydana gelir ve DNA'yı bir arada tutan yapılar yıkılmaya başlar. Canlı hücrede normal şartlar altında DNA tamir mekanizmalarında ve gen regülasyonunda görevli nükleik asitleri kesen nükleazlar aracılığı ile DNA zincirinde kırılmalar meydana gelir ve DNA degradasyonuna neden olur (7,46).

Williams ve ark 21 °C ve 4 °C' de ölümden sonraki 96 saate kadar beyin ve dalak dokusunda yaptıkları çalışmada; PMI tahmini için beyin dokusunun dalak dokusundan daha güvenli sonuçlar verdiğini bildirmiştir (47). Luo ve ark. kemik iliği DNA içeriğinin, ölüm sonrası aralığın uzamasıyla kademeli olarak azaldığını ve ölümden 14 gün sonrasına kadar DNA tespit edilebildiğini, nükleer DNA'nın yıkılma hızı ile ölüm sonrası aralık arasında doğrusal bir ilişki bulunduğunu bildirmiştir (48).

PMI tayini çalışmalarında ölüm üzerinden geçen sürenin uzun olması durumunda DNA degradasyonunun incelenmesiyle önemli çıktıkların üretilebilmesi mümkün olabilirken, PMI'nin kısa olması durumunda stabil olan DNA molekülündeki degradasyon oranı yeterli çıktıkların üretilmemesiyle sonuçlanabilmektedir (7,45).

2.1.8.2. RNA düzeyinde yapılan PMI tayini çalışmaları

Mesajcı RNA'lar canlılardaki kalıtsal bilginin proteine dönüşümünde aracı molekül olarak görev almaktadır. DNA'ya göre endonükleazlar gibi faktörlere karşı daha hassas bir molekül olan RNA'nın kullanımının PMI tahmininde erken dönemde iyi bir yöntem olabileceği bildirilmektedir (6,8,9,41).

PMI tahminine yönelik RNA düzeyinde yapılan çalışmalarda daha çok RNA bütünlüğü ön plana çıkmakta, bu parametrenin kontrolü ise 28S ve 18S rRNA'lar üzerinden yapılmaktadır. Herhangi bir dokudan izole edilen total RNA'nın büyük kısmını rRNA'lar oluşturmaktadır. rRNA'lardaki kalite kontrolü ile genel total RNA kalitesi hakkında fikir sahibi olunabileceği bilinmektedir (49).

Gen ekspresyonu çalışmalarında total RNA izolasyonunda kalite kontrol noktası haline gelen rRNA bant bütünlüklerinin kontrolü, RNA kalitesi hakkında büyük oranda fikir verse de son zamanlarda yapılan çalışmalar rRNA bant bütünlüklerinin RNA kalitesini tek başına yansıtamayacağı yönündedir (34,50–52). Bu yüzden hücrel aktivitenin RNA'lar üzerinden inceleneceği çalışmalarda rRNA'ların yanı sıra mRNA'lar ve/veya miRNA (mikro RNA)'lar gibi diğer RNA çeşitleri üzerinden kalite kontrollerinin yapılması önerilmektedir (50,53,54).

PMI ile RNA kalitesi arasındaki ilişkinin çeşitli dokularda ve değişen sürelerde incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte birden fazla dokudaki RNA kalitesinin geçen süre ile birlikte değerlendirilerek PMI ile ilişkilendirildiği çalışmalar sınırlıdır. Ayrıca RNA kalitesinin yalnızca rRNA bant bütünlükleri üzerinden değil aynı zamanda mRNA'lar üzerinden gen ekspresyonu düzeyinde incelendiği çalışmaların sınırlı olduğu görülmüştür (6).

2.2. Gen ekspresyonu

DNA'da bulunan genetik bilginin ifadesi RNA'nın sentezi ile gerçekleştirilir. Transkripsiyon olarak adlandırılan bu işlemle günümüze kadar tanımlanmış yaklaşık 22 farklı RNA molekülünün üretimi sağlanır (55). Özellikle çevresel faktörlere bağlı olarak üretilen RNA'lardan proteine dönüşecek olan mRNA'ların üretimi gen ekspresyonu olarak tanımlanmaktadır.

Gen ekspresyonu çalışmalarında RT-qPCR (Reverse Transkriptase-Quantitative Polymerase Chain Reaction) teknolojisinden yararlanılmaktadır. Gerçek zamanlı kantitatif PCR olarak adlandırılan bu teknoloji ile hedef dokulardaki nükleik asitlerin miktarlarının tespiti mümkün olmaktadır. RT-qPCR'da oluşan nükleik asit miktarı reaksiyon sırasında meydana gelen ürün miktarıyla orantılı olarak artmaktadır. Oluşan ürünlerin tespiti için kullanılan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle ürün miktarı sayısı gerçek zamanlı olarak belirlenebilmektedir. Amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından önemlidir. Çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR-Green I gibi floresan boya içeren kitler aracılığıyla ya da TaqMan® probe gibi probe kullanılarak hücredeki hedef RNA miktarları hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Bu yöntemler içerisinde en çok tercih edilen yöntem SYBR-Green I ile yapılan yöntemdir (56).

Gen ekspresyonu çalışmaları için hücrelerden RNA molekülü izole edilmektedir. İzolasyon işlemi sırasında guanidyum tiyosiyanat, fenol ve kloroform kimyasallarının kullanılmasıyla RNA haricindeki molekülleri uzaklaştırarak saf RNA molekülü elde edilmektedir. İzolasyon aşamasında amaç mevcut RNA bütünlüğünü koruyarak saf RNA elde etmektir. İzole edilen RNA moleküllerinin saflıkları A_{260}/A_{280} oranının hesaplanması ile spektrofotometrik olarak tespit edilmektedir. Nükleik asitler maksimum absorbanı 260 nm'de, protein moleküllerin ise 280 nm'de göstermektedir. A_{260}/A_{280} oranının 1.70 ve üzerinde olması RNA'nın ekspresyon çalışmalarında kullanmak için yeterli saflıkta olduğu anlamına gelmektedir. Spektrofotometrik analizin yanı sıra kalite kontrol parametresi olarak elektroforetik yöntemlerden de yararlanılmaktadır. RNA bütünlüğü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmekte ve 28S ve 18S rRNA alt ünitelerinin bütünlükleri ve oranları değerlendirilerek RNA kalitesi hakkında fikir sahibi olunabilmektedir (50).

Gen ekspresyon çalışmalarında tam ve göreceli ölçüm olmak üzere iki yöntem tercih edilmektedir. Tam ölçüm yönteminde tespit edilen ürün miktarı ile kullanılan genin ekspresyon miktarı standart bir eğriye dayandırılarak belirlenmektedir. Göreceli ölçümde floresan özellik gösteren boyalar kullanılarak reaksiyon sonrası oluşan ürün incelenir. PCR'da her siklus sonrasında oluşan ürün miktarını gösteren floresan miktarının, belirlenen eşik düzeyini geçtiği nokta döngüsü Threshold Cycle (Ct) olarak isimlendirilir. Ct değeri RT-qPCR cihazındaki çoğaltım esnasında ilk anlamlı artışın olduğu zamanı belirtmektedir(13).

Göreceli ölçüm yöntemi ile yapılan gen ekspresyonu çalışmalarında hesaplamalardaki hedef gendeki değişimin kontrolü referans gen olarak adlandırılan ve ilgili doku ve hücrelerdeki ifade miktarı stabil olan genlerle yapılmaktadır. Ekspresyon miktarı belirlenmek istenen genin kopya sayısı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak referans gene/genlere göre normalize edilmekte, kontrol ve deneme örnekleri arasındaki ilişki kat değişimi olarak hesaplanmaktadır (13,23).

2.3. Çalışmada kullanılan genler

Çalışmada PMI döneminde geçen süreye bağlı olarak değişmesi beklenen RNA kalite kontrolü, spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemlerin yanı sıra mRNA düzeyinde kontrol edilmiştir. Bu amaçla referans olarak kullanılma potansiyeli olan ACTB, GAPDH, PPIA, EMC-7 ve SRP-72 genleri incelenmiştir.

2.3.1. ACTB

Beta-actin (ACTB), tüm ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunan aktinin üç ana izoformundan birisi olup hücre iskeleti yapısal proteinidir. Hücre göçü ve bölünmesinde, embriyonik gelişimde, yara iyileşmesinde, immun yanıtta ve hücre iskeletinin oluşturulmasında kritik rol oynamaktadır (57).

Beta-actin proteinini kodlayan ACTB geni hücrede GAPDH, tubulin, siklofilin, efl α (uzama faktörü), ubiquitin ve 18S rRNA ile birlikte, yapısal olarak ifade

edilir. Aktivitesi deneysel ve fizyolojik koşullardan büyük oranda etkilenmeyen bu gen ekspresyon çalışmalarında yaygın bir şekilde referans gen olarak kullanım alanı bulmuştur (57). Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda referans gen olarak seçilirken planlanan deneme modelinin göz önünde bulundurulması gerektiği tartışılmaktadır (58).

Postmortem dönemde +4°C ortam sıcaklığında bu genin değişen sürelerdeki aktivitesi araştırılarak PMI tayininde kullanılabilme potansiyelinin incelenmesi hedeflenmiştir.

2.3.2. GAPDH

GAPDH, glikolitik yolun, NAD⁺ ve inorganik fosfatın varlığında G3P (Glyceraldehyde 3-phosphate) 'nin 1,3-bifosfogliserat'a dönüşümünü katalizleyen anahtar enzimdir. Gen ekspresyon çalışmalarında çeşitli dokularda sıklıkla kullanılan bir referans gendir. Bununla birlikte son zamanlarda referans gen olarak GAPDH seçiminin özellikle PMI ile ilişkili çalışmalarda güvenilirliği ile ilgili olumlu ve olumsuz bildiriler bulunmaktadır (6,53,59–61).

Çalışmada ratlarda iskelet kası ve kalp kası dokularında bu genin ekspresyon düzeylerinin zamana bağlı değişiminin incelenmesiyle RNA kalitesi hakkında fikir sahibi olunarak PMI tahmininde kullanılabilirliğinin incelenmesi hedeflenmiştir.

2.3.3. PPIA

İlk kez 1984 yılında, immünsüpresif bir ilaç olarak kullanım alanı bulan PPIA proteini, siklosporin A'nın hücre içi hedefi olarak tanımlanmış bir proteindir (62,63). İmmünofilinler adı verilen bir protein ailesinin üyesi olan PPIA, prokaryot ve ökaryotların tüm dokularında yaygın olarak bulunmasından dolayı bu proteini kodlayan genin hem referans hem de hedef gen olarak kullanımı mevcuttur (6,51). PPIA'nın moleküler şaperonlar olarak bilinen ve protein katlanmasında görev alan protein grubunun bir üyesi olduğu, mevcut peptidil-prolil izomeraz aktivitesi sayesinde sitozolde bazı proteinlerin peptidil-prolil bağlarının cis-trans

izomerizasyonunu gerçekleştirerek protein katlanmasında görev aldığı bildirilmiştir (63).

Karaciğer dokusunun canlıdan alımını takiben muhafazası ile ilgili yapılan bir çalışmada PPIA geni ekspresyon seviyeleri incelenerek RNA kalitesi araştırılmış ve PPIA'nın referans gen olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (51). Yapılan bu çalışmada PPIA geninin farklı PMI dönemlerinde kalp ve iskelet kasındaki ekspresyon düzeyleri incelenerek PMI'de referans olarak kullanılabilme potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.3.4. EMC-7

Sitoplazmik bir protein olan EMC-7 (Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Complex Subunit 7), neredeyse tüm zar ve salgılayıcı proteinlerinin biyogenezi, lipit biyosentezi, kalsiyum depolanması ve bazı metabolik yolların regülasyonu gibi hücrede birçok fizyolojik olayda görev almaktadır (64). EMC-7 ökaryotik canlılarda bulunan, yoğun ve çok parçalı bir protein kompleksidir. Bazı çalışmalarda EMC-7 geninin, yeni ve güvenilir bir referans gen olabileceği bildirilmiştir (11,65,66). Bu yüzden, farklı zamanlarda dondurulan kalp ve iskelet kası dokularında bu genin ekspresyon düzeyinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2.3.5. SRP-72

Sinyal tanıma partikülü (SRP), sekresyon sinyalleri ile proteinlerin sentezinde ve translokasyonunda ribozomları birleştiren bir ribonükleoprotein kompleksinden oluşmaktadır. SRP sitoplazma içerisinde meydana gelen translasyonu durdurarak SRP reseptörüne bağlanır. Ürün olarak meydana gelen polipeptidleri zarlara bağlanmak üzere yönlendirir. Memelilerde yaklaşık 300 nükleotidden oluşan SRP molekülü, yaklaşık moleküler ağırlıklarına göre SRP-9, SRP-14, SRP-19, SRP-54, SRP-68 ve SRP-72 olarak adlandırılan altı proteinden oluşmaktadır (67).

Ratlarda postmortem dönemde quadriceps kası dokusunda 11 saate kadar SRP-72 gen ekspresyon seviyelerinin yüksek oranda stabil olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada PMI süresi ile en çok ilişkili gen olarak belirlenmiştir (6).

Bu çalışmada hem iskelet hem kalp kası dokularında SRP-72 geninin PMI döneminde incelenerek çalışılması hedeflenen diğer genlerle olan ilişkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneme grupları

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu (MKÜ-HADYEK)'ndan 03/10/2017 tarihli toplantıda 2017/9-4 (EK-1) ve 2018/1-7 karar numaraları (EK-2) ile etik olarak onaylanmıştır. Hayvanlar Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (HMKÜ DAM) bünyesinde barındırılmıştır. Çalışmada 6-8 haftalık yaş ve 150-200 g (183,01±3,77) ağırlıkta 8 Wistar Albino ırkı erkek kullanılmıştır. Ratlar, ünitenin standart koşullarında barındırılmıştır. Çalışma boyunca ortamdaki ışık 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık (07:00-19:00 aydınlık, 19:00-07:00 karanlık), nem oranı %55 ve ortam sıcaklık 21±2 °C olacak şekilde düzenlenmiştir. Ratlar, polikarbonat malzemedeki yapılan şeffaf kafeslerde her kafeste 4 rat olacak şekilde barındırılarak yem ve su *ad libitum* olacak şekilde tüketime sunulmuştur.

Ötenazi, anestezi altında (80mg/kg Ketamine ve 12 mg/kg Xylazine, Intra Peritoneal) kalpten kan alma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar çalışmaları için iskelet kası (sol bacak *Musculus Gluteus*) ve kalp kası dokuları alınarak 5'er parçaya bölünmüştür. Parçalardan biri 0. saatte hızlı bir şekilde sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra -86 °C'de muhafaza edilmiştir. Diğer 4 parça ise steril tüpler içerisinde 6, 12, 24 ve 48 saat süreyle +4 °C'de muhafaza edildikten sonra sıvı azotla dondurularak -86 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. RNA izolasyonu

Alınan doku örnekleri -86 °C'den çıkarılarak Trizol metoduna göre RNA izolasyonu yapılmıştır (68). Kit protokolü gereği her örnekten yaklaşık 50 mg doku 1 ml TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, USA) içerisine alınarak soğuk şartlar altında homojenize edilmiş ve kloroform, izopropil alkol ve etil alkol aşamalarından sonra

total RNA elde edilmiştir. Örnekler pellet büyüklüklerine göre 30-100 µL nükleaz içermeyen su ile sulandırılarak nükleik asit ölçer (Merinton SMA 1000, USA) aracılığıyla konsantrasyon ve saflık ölçümleri yapılmıştır. Daha sonra örneklerdeki RNA kalitesi %1'lik agaroz jel elektroforezinde 100 V'da yaklaşık 25 dakika yürütülerek UV-transilluminatör (Wisd, WUV-L50, Güney Kore) ile görüntülenmiştir. A260/A280 oranı >1.7 olan ve jel elektroforezinde kalite kontrolü yapılan örnekler cDNA dönüşümünde kullanılırken, yeterli konsantrasyon ve saflıkta olmayan örneklerden RNA izolasyon protokolü tekrar edilmiştir.

3.3. cDNA sentezi

Elde edilen total RNA örnekleri DNA kontaminasyonu ihtimaline karşı DNaz (DNase I, RNase free, Thermo Fisher Scientific, USA, Kat. No: EN0521) ile muamele edilerek cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA sentezi kit protokolü (Revertaid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) gereği thermal cyclers'da (Biorad T100, USA) 42 °C'de 60 dakika, 25 °C'de 5 dakika ve 70 °C'de 5 dakika olacak şekilde düzenlenmiştir. cDNA sentez reaksiyonu sonrası örneklerin son hacmi nükleaz içermeyen su ile 200 µl'e tamamlanmış ve örnekler RT-qPCR aşamaları yapıncaya kadar – 86 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. RT-qPCR uygulaması

Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak SYBR Green boya içeren ticari kit (Power SYBR Green PCR Master Mix, ABI by Thermo Scientific, USA) ile RT-qPCR'da (Rotor-Gene Q, QIAGEN) PPIA, ACTB, GAPDH, SRP-72 ve EMC7 genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. cDNA örnekleri duplike olarak çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan PPIA primer dizileri literatürden temin edilirken(69), ACTB, GAPDH, SRP-72 ve EMC-7 genlerinin primer dizileri PrimerBLAST (BLAST, NCBI) aracılığıyla tarafımızca dizayn edilmiştir. Ayrıca primerlerin çoğalttığı bölge/bölgeler yine PrimerBLAST'ta kontrol edilerek kullanılmıştır (Tablo 2). RT-qPCR'da reaksiyon protokolü, 95 °C'de 10 dakika denatürasyon aşamasından sonra 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 60 saniye, 72 °C'de 30

saniye ve 40 siklus olacak şekilde düzenlenmiştir. RT-qPCR ile elde edilen Ct sonuçlarında 35'in altındaki değerler değerlendirilmeye alınırken, 35 ve üzerindeki Ct değerleri hesaplamalarda kullanılmamıştır.

Tablo 2: Gen primerlerinin Foward ve Reverse dizileri

Genler	Erişim No*	Foward ve Reverse Primer Dizileri	Bç**	Kaynak
PPIA	NM_017101.1	F: 5'-CAGACAAAGTTCCAAAGACAGCA-3' R: 5'-CACCTGGCACATGAATCCT-3'	117	(69)
GAPDH	NM_017008.4	F: 5'-AGTGCCAGCCTCGTCTCATA-3' R: 5'-TCCC GTT GAT GACCAGCTTC-3'	234	***
ACTB	NM_031144.3	F: 5'-GCAGGAGTACGATGAGTCCG-3' R: 5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'	74	***
SRP-72	NM_001170601.1	F: 5'-ACCTGCCCTCATCGGATAGT-3' R: 5'-CCCTGTCCTTGTTCCCTTTGGT-3'	133	***
EMC-7	NM_001106496.1	F: 5'-TCTGTGGGGTTTCTTTTTTCATCC-3' R: 5'-ACAAAGCTCCCATCTGTCCTC-3'	79	***

*:NCBI Genbank Erişim Numarası, **:Baz Çifti, ***: NCBI Blast sistemi kullanılarak dizayn edilmiştir.

3.5. İstatiksel analiz

Elde edilen tüm değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilk testi, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler “Aritmetik Ortalama \pm Std.hata” şeklinde gösterildi.

Kalp kası ve iskelet kasında ayrı ayrı olmak üzere PPIA, GAPDH, ACTB, SRP-72 ve EMC-7 genlerinin zaman içindeki Ct değerleri arasındaki farklılık MIXED prosedürü kullanılarak analiz edildi. Farklılığın anlamlı bulunduğu durumlar için Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Tüm istatistiksel analizler $P < 0,05$ kriteri dikkate alınarak değerlendirildi. Tüm analizler SPSS (V22.0) paket programı aracılığı ile gerçekleştirildi.

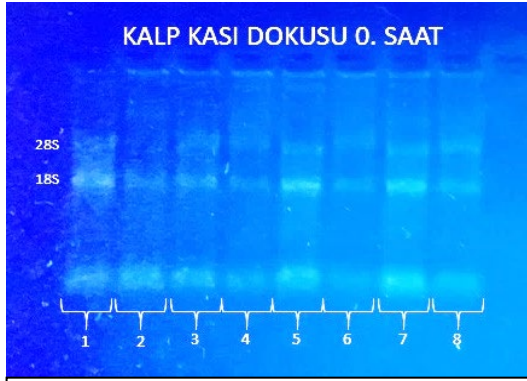
4. BULGULAR

4.1. Total RNA izolasyonu bulguları

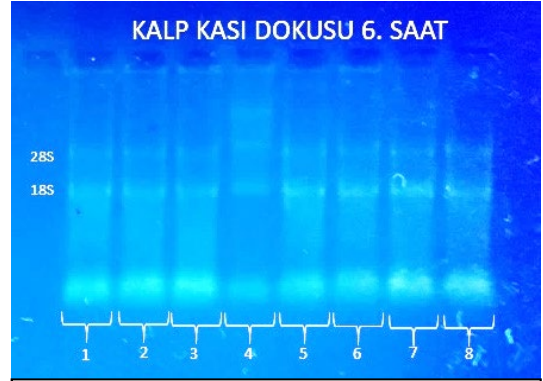
Kalp ve iskelet kası dokularından izole edilen total RNA'ların nükleik asit ölçer (Merinton SMA 1000) kullanılarak konsantrasyon ve saflıkları değerlendirilmiştir. Kalp kası dokularından izole edilen RNA konsantrasyonları 135,13-876,79 ng/μl olarak bulunurken iskelet kası dokularında 126,76-643,9 ng/μl olarak bulunmuştur. Dokulardaki A260/280 oranının ise 1.7-2.1 arasında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3). Dokulardan izole edilen RNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile UV-transilluminatör (Wisd, WUV-L50, Güney Kore)'de görüntülenmiştir. Örnekler 28S ve 18S rRNA (ribozomal RNA) birimleri incelenerek bütünlük ve kalite bakımından kontrol edilmiştir.

Tablo 3. Kalp ve Kas dokularından İzole Edilen Örneklerde RNA Konsantrasyon ve Saflık Değerleri ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

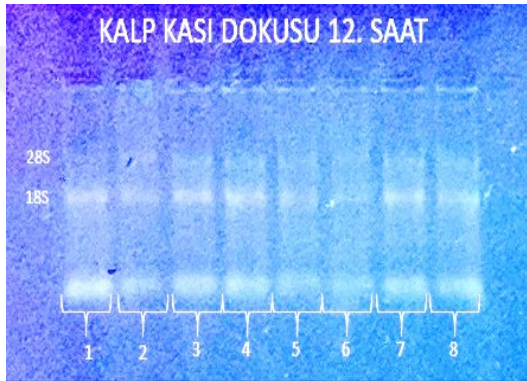
Saat	Kalp Kası		İskelet Kası	
	Konsantrasyon	A260/280	Konsantrasyon	A260/280
0	783,55±28,85	1,78±0,01	327,66±52,45	1,86±0,02
6	443,09±52,62	1,91±0,01	318,82±31,95	1,84±0,01
12	181,94±14,11	1,90±0,01	315,08±39,59	1,80±0,03
24	261,35±20,52	1,90±0,01	305,11±39,44	1,80±0,04
48	234,05±19,08	1,82±0,02	294,20±31,90	1,83±0,05



Şekil 4: Kalp kası dokusundan 0. saatte elde edilen total RNA jel görüntüsü



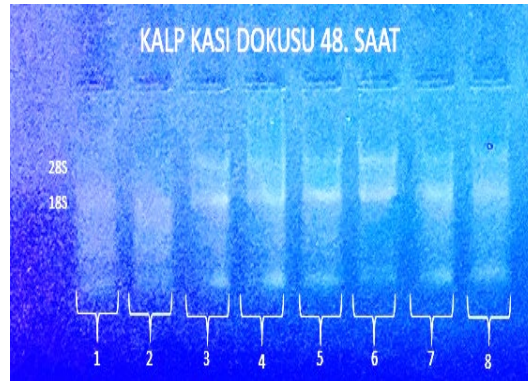
Şekil 5: Kalp kası dokusundan 6. saatte elde edilen total RNA jel görüntüsü



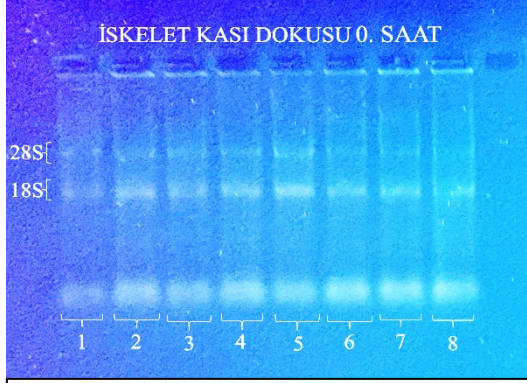
Şekil 6: Kalp kası dokusundan 12. saatte elde edilen total RNA jel görüntüsü



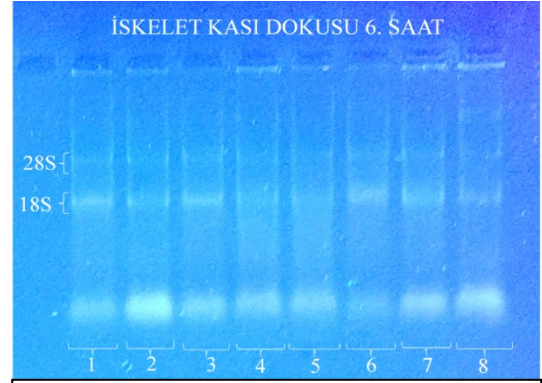
Şekil 7: Kalp kası dokusundan 24. saatte elde edilen total RNA jel görüntüsü



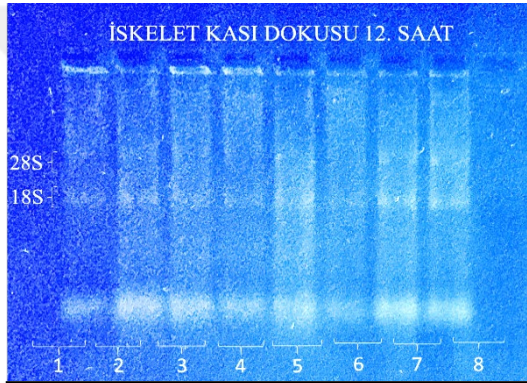
Şekil 8: Kalp kası dokusundan 48. saatte elde edilen total RNA jel görüntüsü



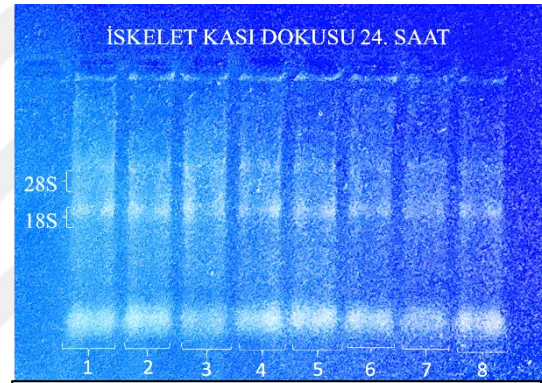
Şekil 9: İskelet kası dokusundan 0. saatte elde edilen total RNA jel görüntüsü



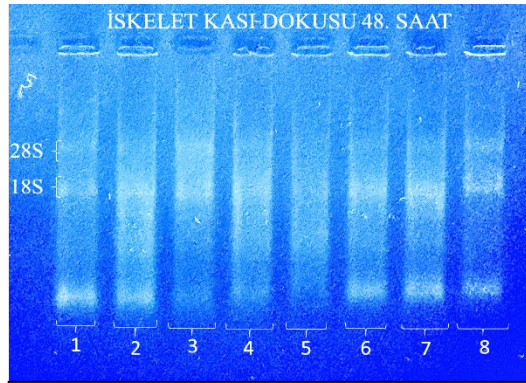
Şekil 10: İskelet kası dokusundan 6. saatte elde edilen total RNA jel görüntüsü



Şekil 11: İskelet kası dokusundan 12. saatte elde edilen total RNA jel görüntüsü



Şekil 12: İskelet kası dokusundan 24. saatte elde edilen total RNA jel görüntüsü



Şekil 13: İskelet kası dokusundan 48. saatte elde edilen total RNA jel görüntüsü

4.2. RT-qPCR bulguları

Thermal cycler’da cDNA’ya dönüştürülen örneklerden Realtime PCR reaksiyonu sonrası alındıktan PPIA, ACTB, GAPDH, SRP-72 ve EMC-7 genlerine ait Ct değerleri tablo 4’te verilmiştir.

PPIA geni Ct değerleri bakımından 0, 6, 12 ve 48. saatte dondurulan kalp kası dokusu örnekleri benzer bulunurken 24. saatte dondurulan örneklerin Ct değerleriyle arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur ($P<0,01$). Kalp kası 24. saat Ct değerleri diğer saatlerden yüksek bulunmuştur. Ayrıca 24 ve 48. saat örnekleri arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (Tablo 4). İskelet kasında ise gruplardaki bulguların benzer olduğu tespit edilmiştir.

Kalp kası dokusunda ACTB geni Ct değerlerinin en yüksek 24. saat örneklerinde olduğu ve diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu belirlenmiştir ($P<0,001$). 0., 6., 12. ve 48. saatlerdeki kalp kası dokusu örneklerinde Ct değerlerinin benzer oldukları görülmüştür. Bununla birlikte iskelet kası dokularında 6. saat örnekleri Ct değerlerinde anlamlı olmayan bir yükseklik tespit edilmiştir ($120,76\pm 1,42$).

Kalp kası dokusunda GAPDH gen ekspresyon seviyelerinin 12., 24. ve 48. saat doku örneklerinde istatistiksel olarak benzer bulunurken, 0. ve 6. saat örnekleri ile 12., 24. ve 48. saat Ct değerlerinden yüksek oldukları belirlenmiştir ($P<0,001$). 0. ve 6. saat örneklerinde istatistiksel olarak benzer olduğu bulundu. İskelet kası GAPDH gen ekspresyonu seviyeleri arasında ise farklılık bulunmamaktadır.

SRP-72 gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde kalp kası dokusunda 24 ve 48. saat örneklerinde 6. saat örneklerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$) ve Ct değerlerinde yükseklik tespit edilmiştir. İskelet kası dokularında ise grupların benzer oldukları görülmüştür.

EMC-7 gen ekspresyon seviyelerinin her iki dokuda (kalp ve iskelet kası) da gruplar arasında bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: PPIA, ACTB, GAPDH, SRP-72 ve EMC-7 genlerinin 0, 6, 12, 24 ve 48. saatlerdeki Ct değerleri ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

GEN	DOKU	0	6	12	24	48	P
PPIA	KALP	15,67±0,38 ^b	15,66±0,22 ^b	15,73±0,17 ^b	18,01±0,77 ^a	17,36±0,50 ^{ab}	<0,01
	İ. KASI	20,66±0,73	19,74±0,14	19,82±0,26	19,48±0,41	18,98±0,47	-
ACTB	KALP	16,53±0,14 ^b	15,78±0,24 ^b	16,12±0,18 ^b	18,13±0,61 ^a	16,39±0,18 ^b	<0,001
	İ. KASI	18,83±1,84	20,76±1,42	18,64±0,36	19,62±0,82	19,84±1,02	-
GAPDH	KALP	16,43±0,54 ^{bc}	14,32±0,26 ^c	17,73±0,27 ^{ab}	19,82±0,71 ^a	18,60±1,13 ^{ab}	<0,001
	İ. KASI	15,65±0,72	17,12±0,73	17,38±1,16	19,23±2,04	15,86±0,65	-
SRP-72	KALP	20,43±0,43 ^{ab}	19,69±0,23 ^b	22,48±0,83 ^{ab}	22,34±0,50 ^a	21,86±0,69 ^a	<0,05
	İ. KASI	22,70±1,08	22,47±0,51	22,77±0,54	22,39±0,40	21,92±0,19	-
EMC-7	KALP	32,11±0,57	30,44±0,33	31,67±0,08	34,21±0,75	33,40±0,77	-
	İ. KASI	33,69±0,52	35,41±0,58	33,96±0,53	34,68±0,81	33,85±0,40	-

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkı gösterir. İ. Kası: İskelet kası

5. TARTIŞMA

Ölümden sonra geçen süre içerisinde çeşitli yöntemlerle ölüm zamanının doğru tahmin edilmesi özellikle şüpheli ölümlerde önemlidir. Güncel teknolojinin kullanımıyla PMI tahmini daha çok hipostaz, rigor mortis, vücudun ölüm sonrası soğuması gibi parametrelerin yanı sıra zaman, sıcaklık, böcek larvaları gibi değişkenlere bağlı olan histokimyasal değişikliklerin incelenmesiyle yapılmaktadır (70–72). Son yıllarda yapılan çalışmalarla, DNA, RNA ve protein gibi biyolojik materyallerin PMI periyodunda kimyasal ve fiziksel olarak yıkımlandığı ve bu durumun PMI tahmininde kullanılabileceği anlaşılmıştır (8,39,42,70). Bununla birlikte çeşitli dokularda moleküler yöntemlerden yararlanarak DNA ve RNA düzeyinde PMI tahminine yönelik araştırmalar yapılmaktadır (70). 2003 yılında yapılan pilot çalışmada (10), mRNA degradasyonunun PMI tahmininde önemli bir belirteç olabileceği bildirilmiştir. Sonrasında yapılan çalışmalarla birlikte PMI ile mRNA degradasyonu arasında ilişki olabileceği doğrulanmıştır (40,53,73–76).

Yapılan bu çalışmada ratlarda ötenaziyi takiben değişen sürelerde +4°C’de bekletilen (0, 6, 12, 24 ve 48 saat) ve bu sürelerin sonunda sıvı azotla dondurularak -86°C’de muhafaza edilen kalp ve iskelet kası dokularında RNA aktivitesi incelenmiştir. Bu dokularda zamana bağlı olarak kalitesi değişen RNA, elektroforetik ve spektrofotometrik yöntemlerin yanı sıra RT-qPCR teknolojisi ile gen ekspresyonu düzeyinde değerlendirilmiştir. Çalışmada farklı sürelerde dondurulan kalp ve iskelet kası dokularından izole edilen RNA’ların cDNA sentezi için yeterli konsantrasyon (126,76-876,79 ng/µl) ve saflıkta (A260/280=1,7-2,1) oldukları belirlenmiştir (Tablo 3). Gerek yapılan bu çalışmada elde edilen bulgulardan gerekse bildirilen benzer çalışmalardan, dokudan RNA izolasyonunda 48 saate kadar geçen sürede değişen kalitede, yeterli konsantrasyon ve saflıkta RNA izole edilebileceği anlaşılmıştır (70,72,77).

Dokulardan elde edilen total RNA agaroz jel elektroforezinde 28S ve 18S rRNA subunitleri bakımından kontrol edildiğinde özellikle 12, 24 ve 48. saat

örneklerinin bant bütünlüklerinin dolayısıyla RNA kalitesinin bozulmaya başladığı görülmüştür (Şekil 4-13). PMI tahminine yönelik model geliştirmek için ratlarda yapılan bir çalışmada 0-312. saatler arasında +4°C’de bekletilen dalak dokusundan çalışılarak RNA kalitesi incelenmiş ve kalite kaybının ilk saatlerde başladığı bununla birlikte degradasyonun süreyle orantılı olmadığı bildirilmiştir (72). RNA degradasyonu ile zaman arasındaki ilişkinin incelendiği çalışmalarda benzer bulgulara ulaşıldığı görülmüştür (6,76,78). Kim ve ark. ise iskelet kasında RNA bütünlüğü ve PMI arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında 21°C-23°C ortam sıcaklığında kas dokuda 48. saatten sonra RNA kalitesinin yüksek oranda düştüğünü bildirmişlerdir (74).

Özellikle rRNA ve mRNA düzeyinde RNA kalite kontrolü ile yapılan PMI tahmini araştırmalarında hangi RNA ile çalışılması gerektiği tartışmaları halen devam etmektedir. Yapılan bir çalışmada total RNA içerisinde en çok bulunan RNA olan 28S rRNA degradasyon düzeyinde incelenmiş ve güvenilir olduğu bildirilmiştir (74). Bununla birlikte RNA degradasyonunun yalnızca 28S veya 18S rRNA’larının elektroforetik olarak değerlendirilmesinin doğru olmayacağı, bu parametrelerin yanı sıra mRNA düzeyinde bazı genlerdeki aktivite incelenerek RNA kalitesi ile PMI’nin ilişkilendirilebileceği bildirilmektedir (72).

RNA molekülünün bütünlüğüne zarar veren RNazların aktivitesi için dokunun ya da ölünün bulunduğu ortam oldukça önemlidir. Tao ve ark. 2018 yılında yaptıkları çalışmada ratlarda kalp kası dokusunu 24 saate kadar değişen sürelerde 10, 25 ve 35 °C gibi farklı ortam sıcaklıklarında bekletmişler ve sıcaklığın RNaz aktivitesine olan etkisini ortaya koymuşlardır (79). Yaptıkları çalışmayla sıcaklığın yanı sıra ortamdaki nem değerlerinin de RNA kalitesini etkileyebileceğini bildirmişlerdir (79). mRNA’ların yarılanma ömürlerinin değişken olduğu, bazı mRNA’ların yarılanma ömrünün 5-10 dakika gibi kısa bir süre bile olabileceği bilinmektedir (80). mRNA’lar total RNA içerisindeki RNA’ların %1-3’ünü oluşturmaktadır. mRNA boyutları değişebilmekte bu yüzden degradasyon oranları farklı olabilmektedir. mRNA aktivitesi dokudan dokuya değişiklik göstermektedir. Kanlanma oranı dolayısıyla RNaz aktivitesi de farklı olan dokuların PMI tahmininde seçiminin önemli olduğu anlaşılmaktadır. Bir çalışmada 0. gün ve 5. gün tam kandan izole edilen RNA

örneklerinde 5 günlük süre sonunda RNA kalite kaybının %62'lik bir orana ulaştığı bildirilmiştir (81).

Yapılan bir çalışmada 4, 15, 25 ve 35 °C'de bekletilen dokulardan RNA izolasyonu yapılarak hem elektroforetik olarak hem de gen ekspresyonu düzeyinde RNA kalitesi incelenmiş ve bulgular PMI ile ilişkilendirilmiştir. Düşük sıcaklıklarda daha yüksek olması beklenen RNA kalitesinin yapılan bu çalışmaya benzer şekilde agaroz jelde daha düşük kalitede olduğu, 4°C ve 15°C'deki örnekler karşılaştırıldığında 28S ve 18S rRNA bantlarının 15°C'deki örneklerde daha iyi oldukları bildirilmiştir (77).

Housekeeping genler olarak adlandırılan referans genler moleküler biyoloji çalışmalarında gen ekspresyonu değişimlerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (13,51,57,82,83). Bununla birlikte PMI tahmininde, ölüm sonrası RNA kalite kaybına bağlı olarak housekeeping genlerin ekspresyonlarında meydana gelecek değişimin hesaplanması sayesinde PMI tahmini yapılabileceği anlaşılmıştır (84). Yapılan bu çalışmada, birçok araştırmada housekeeping olarak kullanılabileceği bildirilen ACTB, PPIA, GAPDH, SRP-72 ve EMC-7 genlerinin ekspresyon seviyeleri kalp ve iskelet kası dokularında incelenmiş ve zamana bağlı olarak bu genlerin aktivitelerinde değişiklikler meydana geldiği tespit edilmiştir (Tablo 4). Sprague-Dawley ratlarında yapılan bir çalışmada (70), 25°C ve 4°C'de tutulan dokulardan ACTB, GAPDH, 18S rRNA, U6 gibi genlerin ekspresyon seviyelerine bakılarak PMI tahmini yapılmaya çalışılmış, soğuk şartlarda (+4°C) RNA degradasyonunun yavaş olduğu bildirilmiştir. Bu durumun, RNA degradasyonundan önemli derecede sorumlu olan RNazların düşük sıcaklıklarda daha az aktivasyon göstermelerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Farklı RNA türlerinin uzunluk, moleküler yapı ve aktivite gibi sebeplerle degradasyona yatkınlıkları da farklı olduğu bildirilmektedir (8,74,85). Bununla birlikte hangi dokuda çalışıldığı da önemlidir. ACTB ve GAPDH mRNA'larının ölümden sonra hızlı bir şekilde degrade oldukları bildirilmiştir (86). Başka bir çalışmada IL-3 geninin mRNA transkriptinin referans gen olarak yaygın kullanım alanı bulan GAPDH'e göre daha az stabil olduğu bildirilmiştir (87). Bu durum PMI'nin erken döneminde bu genlerin degradasyonlarının tespitiyle PMI hakkında fikir yürütülebileceğini göstermektedir.

Çalışmada kalp kası dokusunda 0, 6 ve 12. saatlerde PPIA, ACTB ve GAPDH genlerinin Ct değerleri birbiriyle benzer bulunurken, 24. ve 48. saatlerde farklı bulunması ($P < 0,05$) Lv ve ark. (86) ile Ma ve ark. (88)'nin yaptıkları çalışmaları doğrular niteliktedir. SRP-72'nin 24 ve 48. saatlerdeki Ct değerlerinin 0 ve 6. saatteki Ct değerleriyle benzer bulunması bu genin housekeeping gen olarak kullanılabilceği ancak kalp kası dokusunda PMI tayini için güvenilir bir gen olmadığını göstermiştir. EMC-7 geninin 24 ve 48. saatlerde Ct değerlerinin, 0, 6 ve 12. saatlerden anlamlı olarak farklı çıkması; ilk 24 saatlik PMI döneminde bu genin diğer parametrelerle birlikte PMI tahmininde kullanılabilceğini göstermiştir (Tablo 4).

İskelet kası dokularında genlerin Ct değerleri bakımından zamana bağlı olarak önemli bir değişimin tespit edilememesi, dokulardaki kanlanma oranının dolayısıyla RNaz aktivitesinin farklı olduğunu ve gen stabilitesinin dokudan dokuya değişebileceğini göstermektedir. Bu nedenle PMI tahmininde kalp kası dokusunun moleküler düzeyde incelemeler yapmak için daha uygun bir örnek olabileceği anlaşılmıştır. Koppelkamm ve ark. (89) insanlarda PMI ile ilgili yaptıkları çalışmada çalışılan dokunun postmortem RNA kalitesi üzerine oldukça önemli etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

EMC-7 geni her ne kadar referans gen olarak kullanılacağı bildirilen bir gen (11,90) olsa da yapılan bu çalışmada bu genin hem kalp hem de iskelet kası dokularında az miktarda ifade edildiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra her iki dokuda da farklı sürelerde benzer Ct sonuçlarına ulaşılması bu genin PMI tahmininde güvenilir bir belirteç olarak kullanılamayacağını göstermektedir.

Herhangi bir genin mRNA düzeyinde tespit edilmesi ile PMI tahmininde özellikle dar bir sürenin tespitinde direkt bir ilişki kurmanın mümkün olamayacağı düşünülmektedir. Zira, özellikle ölümlerle birlikte RNaz aktivitesi hızlı bir şekilde başlayarak RNA kalitesini değişen derecelerde etkilemekte bu durum da mRNA ürün miktarının tespitinde hatalı sonuçların üretilmesiyle sonuçlanabilmektedir. Degrade RNA ile çalışılırken qPCR'da kullanılacak primer, bütünlüğü bozulmuş diğer genlerin de çoğaltılmasıyla sonuçlanabilir. RT-qPCR'da üretilen ürün miktarındaki hata kantitatif verilerin yanlış yorumlanmasına neden olacaktır.

Erkek 10 haftalık C57BL/6J farelerinde yapılan bir çalışmada, beyin, akciğer, karaciğer ve iskelet kası dokularından RNA izolasyonu yapılarak PMI çalışılmış ve beyin dokusunda 48 saate kadar RNA stabilitesinin korunduğu, bununla birlikte diğer dokularda erken saatlerde bile değişen derecelerde degradasyon meydana geldiği bildirilmiştir (74). Yaptığımız çalışmada iskelet kası dokularından izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüleri incelendiğinde 6. saat ve sonrasındaki örneklerde değişen derecelerde degradasyonun başladığı ve 28S ve 18S rRNA subunitlerinin oranlarının değiştiği tespit edilmiştir Şekil (10-13).

Bauer ve ark. ölümden sonraki 5 güne kadar kandan RNA degradasyonu incelenerek PMI tahmini yapılabileceğini bildirmişlerdir (91). Ölümden sonra vücut sıcaklığının hızlı bir şekilde ortam sıcaklığına ulaşması RNA degradasyonunu hızlandırdığı için, RNA degradasyonu ve PMI arasındaki ilişki incelenirken kontrollü şartlar oluşturulmakta, bu durumda genellikle çalışmamızda olduğu gibi +4°C'de muhafaza sağlanmaktadır (91). Bu sıcaklıkta RNA degradasyon hızı yavaşlayarak sadece büyük PMI farklılıkları tespit edilebilmektedir. Çok daha erken zamanların tespitinde ise ortam sıcaklığındaki dokudan RNA izolasyonu denenebilir (91,92).

Yapılan bir çalışmada beyin dokusunda ACTB geninin optimal RNA markörü olarak PMI tahmininde kullanılabileceği bildirilmiştir (54,88). Bununla birlikte miR-9 ve miR-125b isimli mikro RNA'ların daha uzun sürelerde stabil olarak kalabildikleri bu yüzden PMI tahmininde markör olmaya aday olabilecekleri bildirilmiştir (54,88). Gerek yapılan literatür taramaları gerekse bu çalışmadan elde edilen bulgular, model hayvan üzerinden yapılacak PMI araştırmalarında mikro RNA'lar üzerine daha fazla çalışma yapılması gerektiğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Yaş ve cinsiyet gibi faktörlerin yanı sıra ırk faktörünün bile PMI tahmininde kullanılan parametreleri etkileyebileceği göz önünde bulundurulduğunda PMI tahmininde güncel olarak kullanılan yöntemlere ek olarak moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla, PMI güvenilirliğini artırabilmenin mümkün olabileceği görülmüştür.

Herhangi bir dokudaki kolorimetrik değişiklikler gibi bazı parametrelerin RNA bütünlüğü ile birlikte değerlendirilmesinin daha anlamlı ve güvenilir çıktılarn üretilebilmesine olanak sağlayacağı düşünülmüştür.

RNA molekülündeki bütünlük değerlendirilerek yapılan PMI tayininde rRNA bant bütünlüklerinin yanı sıra referans gen olarak kullanılabilen bazı genlerin ekspresyon değerleri üzerinden RNA kalitesi hakkında fikir sahibi olmanın daha güvenilir olabileceği anlaşılmıştır.

7. KAYNAKÇA

1. Koç S. Ölüm ile İlgili Bazı Temel Kavramlar. *Türkiye Klin Adli Tıp - Özel Konular*. 2016;2(1):1–7.
2. Can M, Koç S. Ölüm Nedeni Belirlenmesi ve Ölüm Belgesi Düzenlenmesi. *Türkiye Klin Adli Tıp - Özel Konular*. 2016;2(1):35–43.
3. Madea B. Importance of supravitality in forensic medicine. *Forensic Sci Int*. 1994 Dec 16;69(3):221–41.
4. Henssge C, Madea B. Estimation of the time since death. *Forensic Sci Int*. 2007 Jan 16;165(2–3):182–4.
5. Aksoy E, Turan Yrutsever N. Ölüm Zamanı Belirlenmesi. 2016;2(1):20–3.
6. Sampaio-Silva F, Magalhães T, Carvalho F, Dinis-Oliveira RJ, Silvestre R. Profiling of RNA degradation for estimation of post mortem [corrected] interval. *PLoS One*. 2013;8(2):e56507.
7. Williams T, Soni S, White J, Can G, Javan GT. Evaluation of DNA degradation using flow cytometry: promising tool for postmortem interval determination. *Am J Forensic Med Pathol*. 2015 Jun;36(2):104–10.
8. Lv Y-H, Ma J-L, Pan H, Zeng Y, Tao L, Zhang H, et al. Estimation of the human postmortem interval using an established rat mathematical model and multi-RNA markers. *Forensic Sci Med Pathol*. 2017 Mar 28;13(1):20–7.
9. González-Herrera L, Valenzuela A, Marchal JA, Lorente JA, Villanueva E. Studies on RNA integrity and gene expression in human myocardial tissue, pericardial fluid and blood, and its postmortem stability. *Forensic Sci Int*. 2013 Oct;232(1–3):218–28.
10. Bauer M, Gramlich I, Polzin S, Patzelt D. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Leg Med*. 2003 Dec;5(4):220–7.
11. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet*. 2013 Oct;29(10):569–74.
12. Janssens N, Janicot M, Perera T, Bakker A. Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Mol Diagn*. 2004;8(2):107–13.
13. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8.
14. Saukko P, Knight B. The pathophysiology of death [Internet]. 3rd ed. In: *Knight's Forensic Pathology*. 3rd ed. 2004. p. 52–98.
15. DiMaio VJ, DiMaio D. *Medicolegal Investigative Systems* [Internet]. In: *Forensic Pathology*. CRC press; 1993. p. 1–41.

16. Siege JA, Saukko P, Houck MM. Encyclopedia of Forensic Sciences. Academic Press;
17. Marhoff-Beard SJ, Forbes SL, Green H. The validation of ‘universal’ PMI methods for the estimation of time since death in temperate Australian climates. *Forensic Sci Int.* 2018;291:158–66.
18. Frere B, Suchaud F, Bernier G, Cottin F, Vincent B, Dourel L, et al. GC-MS analysis of cuticular lipids in recent and older scavenger insect puparia. An approach to estimate the postmortem interval (PMI). *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(4):1081–8.
19. Pittner S, Ehrenfellner B, Monticelli FC, Zissler A, Sanger AM, Stoiber W, et al. Postmortem muscle protein degradation in humans as a tool for PMI delimitation. *Int J Legal Med.* 2016;130(6):1547–55.
20. Myburgh J, L’Abbe EN, Steyn M, Becker PJ. Estimating the postmortem interval (PMI) using accumulated degree-days (ADD) in a temperate region of South Africa. *Forensic Sci Int.* 2013;229(1–3):1–6.
21. da Fonseca CAR, Paltian J, dos Reis AS, Bortolatto CF, Wilhelm EA, Luchese C. Na⁺/K⁺-ATPase, acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities as new markers of postmortem interval in Swiss mice. *Leg Med.* 2019;36(November 2018):67–72.
22. Romanelli MC, Gelardi M, Fiorella ML, Tattoli L, Di Vella G, Solarino B. Nasal ciliary motility: A new tool in estimating the time of death. *Int J Legal Med.* 2012;126(3):427–33.
23. Arslan MN, Koç S. lm Belirtileri. *Adli Tıp Ders Kitabı.* 2011;2(1):89–94.
24. Koç S, Kulusayın . *Adli Tıp [Internet]. In: Soysal Z, akalır C, editors. cilt 1. 1999. p. 93–151.*
25. Henssge C, Madea B. Estimation of the time since death in the early post-mortem period. *Forensic Sci Int.* 2004 Sep 10;144(2–3):167–75.
26. Nelson EL. Estimation of short-term postmortem interval utilizing core body temperature: a new algorithm. *Forensic Sci Int.* 2000 Mar;109(1):31–8.
27. Lew E, Matshes E. Postmortem changes [Internet]. In: *Forensic Pathology Principles and Practice.* Elsevier Academic Press; 2005. p. 528–54.
28. Usumoto Y, Hikiji W, Sameshima N, Kudo K, Tsuji A, Ikeda N. Estimation of postmortem interval based on the spectrophotometric analysis of postmortem lividity. *Leg Med.* 2010 Jan;12(1):19–22.
29. Weatherall IL, Coombs BD. Skin Color Measurements in Terms of CIELAB Color Space Values. *J Invest Dermatol.* 1992 Oct;99(4):468–73.
30. Lale A, Yıldıırım MŞ, Akçan R, Balseven Odabaşı A, Tmer AR. Postmortem interval estimation by vitreous fluid analysis from past to present. *Turkish J Forensic Med.* 2017;31(1):26–35.
31. Katsuhiko Hatake WK. Estimating the Time after Death on the Basis of Corneal Opacity. *J Forensic Res.* 2014;06(01).
32. Coe JI. Vitreous potassium as a measure of the postmortem interval: an

- historical review and critical evaluation. *Forensic Sci Int.* 1989 Aug;42(3):201–13.
33. Kulusayın Ö, Koç S. Adli Tıp - Cilt 1- Ölüm [Internet]. 1st ed. In: Soysal Z, Çakalır C, editors. *Adli Tıp Cilt 1.* 1st ed. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları; 1999. p. 93–151.
 34. Sabucedo AJ, Furton KG. Estimation of postmortem interval using the protein marker cardiac Troponin I. *Forensic Sci Int.* 2003;134(1):11–6.
 35. Bajerlein D, Taberski D, Matuszewski S. Estimation of postmortem interval (PMI) based on empty puparia of *Phormia regina* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) and third larval stage of *Necrodes littoralis* (L.) (Coleoptera: Silphidae) – Advantages of using different PMI indicators. *J Forensic Leg Med.* 2018 Apr;55:95–8.
 36. Tüzün A, Yüksel S. Postmortem İnterval'in Saptanmasında Adli Entomoloji. *Türkiye Klin J Forensic Med.* 2007;4:23–32.
 37. Madea B. Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry? *Forensic Sci Int.* 2005 Jul 16;151(2–3):139–49.
 38. Zhen J-L, Zhang X-D, Niu Q-S. [Relationship between the postmortem interval and nuclear DNA changes of heart muscular cells in mice]. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2006 Jun;22(3):173–6.
 39. van den Berge M, Wiskerke D, Gerretsen RRR, Tabak J, Sijen T. DNA and RNA profiling of excavated human remains with varying postmortem intervals. *Int J Legal Med.* 2016 Nov;130(6):1471–80.
 40. Hansen J, Lesnikova I, Funder AMD, Banner J. DNA and RNA analysis of blood and muscle from bodies with variable postmortem intervals. *Forensic Sci Med Pathol.* 2014 Sep;10(3):322–8.
 41. Fan J, Khanin R, Sakamoto H, Zhong Y, Michael C, Pena D, et al. Quantification of nucleic acid quality in postmortem tissues from a cancer research autopsy program. *Oncotarget.* 2016 Oct 11;7(41):66906–21.
 42. Pérez-Martínez C, Pérez-Cárceles MD, Legaz I, Prieto-Bonete G, Luna A. Quantification of nitrogenous bases, DNA and Collagen type I for the estimation of the postmortem interval in bone remains. *Forensic Sci Int.* 2017 Dec;281:106–12.
 43. Xiong P, Guo P, Zhang J. [Raman micro spectroscopic analysis of relationship between DNA degradation in tissue cells and postmortem interval]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi.* 2010 Jun;30(6):1511–5.
 44. Emiral E, Hancı İH, Tufan NL. Putative role of cell free DNA and HMGB-1 in postmortem interval. 2016.
 45. Zheng J, Li X, Shan D, Zhang H, Guan D. DNA degradation within mouse brain and dental pulp cells 72 hours postmortem. *Neural Regen Res.* 2012 Feb 5;7(4):290–4.
 46. Mao S, Fu G, Seese RR, Wang ZY. Estimation of PMI depends on the changes in ATP and its degradation products. *Leg Med.* 2013;15(5):235–8.
 47. Williams T, Soni S, White J, Can G, Javan GT. Evaluation of DNA Degradation

- Using Flow Cytometry. *Am J Forensic Med Pathol.* 2015 Jun;36(2):104–10.
48. Luo G, Chen Y, Cheng J, Wang J, Gao C. [Relationship between DNA degradation and postmortem interval of corrupt corpse]. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2006 Feb;22(1):7–9.
 49. KURAR E, ATLI MO, GÜZELOĞLU A, ÖZŞENSOY Y, SEMACAN A. At Endometriumunda Gen Transkripsiyon Analiz Çalışmalarında Beş Farklı RNA İzolasyon Yönteminin Karşılaştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2009;
 50. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr;27(2–3):126–39.
 51. Ozkan H, Yakan A. RNA Quality in Snap and Directly -80°C Frozen Liver Tissues. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg.* 2018;58(1):42–7.
 52. Pittner S, Monticelli FC, Pfisterer A, Zissler A, Sängler AM, Stoiber W, et al. Postmortem degradation of skeletal muscle proteins: a novel approach to determine the time since death. *Int J Legal Med.* 2016;130(2):421–31.
 53. Tu C, Du T, Shao C, Liu Z, Li L, Shen Y. Evaluating the potential of housekeeping genes, rRNAs, snRNAs, microRNAs and circRNAs as reference genes for the estimation of PMI. *Forensic Sci Med Pathol.* 2018;14(2):194–201.
 54. Courts C, Madea B. Micro-RNA - A potential for forensic science? *Forensic Sci Int.* 2010;203(1–3):106–11.
 55. Nelson DL, Cox MM, Kılıç N. RNA metabolizması [Internet]. 3. In: Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. 3. Palme Yayıncılık; 2005. p. 979–1019.
 56. GÜNEL T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi. *Türkiye Klin Tıp Bilim Derg.* 2007;27(5):763–7.
 57. Ruan W, Lai M. Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta.* 2007;385(1–2):1–5.
 58. Guo C, Liu S, Wang J, Sun M-Z, Greenaway FT. ACTB in cancer. *Clin Chim Acta.* 2013 Feb;417:39–44.
 59. Langnaese K, John R, Schweizer H, Ebmeyer U, Keilhoff G. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol Biol.* 2008;9:1–15.
 60. Lemma S, Avnet S, Meade M, Chano T, Baldini N. Validation of Suitable Housekeeping Genes for the Normalization of mRNA Expression for Studying Tumor Acidosis. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 26;19(10):2930.
 61. Nicholls C, Li H, Liu J-P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012 Aug;39(8):674–9.
 62. Satoh K, Shimokawa H, Berk BC. Cyclophilin A. *Circ J.* 2010;74(11):2249–56.
 63. Wang P, Heitman J. The cyclophilins. *Genome Biol.* 2005;6(7):226.
 64. O'Brien KP, Tapia-Páez I, Stähle-Bäckdahl M, Kedra D, Dumanski JP. Characterization of five novel human genes in the 11q13-q22 region. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jun 24;273(1):90–4.
 65. Bär M, Bär D, Lehmann B. Selection and Validation of Candidate Housekeeping Genes for Studies of Human Keratinocytes—Review and

- Recommendations. *J Invest Dermatol.* 2009 Mar;129(3):535–7.
66. Wideman JG. The ubiquitous and ancient ER membrane protein complex (EMC): tether or not? *F1000Research.* 2015 Oct 5;4:624.
 67. Yin J, Iakhiaeva E, Menichelli E, Zwieb C. Identification of the RNA Binding Regions of SRP68/72 and SRP72 by Systematic Mutagenesis of Human SRP RNA. *RNA Biol.* 2007 Jul 27;4(3):154–9.
 68. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* 2010;5(6):1–4.
 69. Santos BP dos, da Costa Diesel LF, da Silva Meirelles L, Nardi NB, Camassola M. Identification of suitable reference genes for quantitative gene expression analysis in rat adipose stromal cells induced to trilineage differentiation. *Gene.* 2016 Dec;594(2):211–9.
 70. Lv Y, Ma K, Zhang H, He M, Zhang P, Shen Y, et al. 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 Sep;59(5):1286–94.
 71. Iancu L, Carter DO, Junkins EN, Purcarea C. Using bacterial and necrophagous insect dynamics for post-mortem interval estimation during cold season: Novel case study in Romania. *Forensic Sci Int.* 2015 Sep;254:106–17.
 72. Young ST, Wells JD, Hobbs GR, Bishop CP. Estimating postmortem interval using RNA degradation and morphological changes in tooth pulp. *Forensic Sci Int.* 2013 Jun;229(1–3):163.e1-163.e6.
 73. White K, Yang P, Li L, Farshori A, Medina AE, Zielke HR. Effect of Postmortem Interval and Years in Storage on RNA Quality of Tissue at a Repository of the NIH NeuroBioBank. *Biopreserv Biobank.* 2018;16(2):148–57.
 74. Kim JY, Kim Y, Cha HK, Lim HY, Kim H, Chung S, et al. Cell Death-Associated Ribosomal RNA Cleavage in Postmortem Tissues and Its Forensic Applications. *Mol Cells.* 2017;40(6):410–7.
 75. Lv YH, Ma JL, Pan H, Zeng Y, Tao L, Zhang H, et al. Estimation of the human postmortem interval using an established rat mathematical model and multi-RNA markers. *Forensic Sci Med Pathol.* 2017;13(1):20–7.
 76. Li WC, Ma KJ, Lv YH, Zhang P, Pan H, Zhang H, et al. Postmortem interval determination using 18S-rRNA and microRNA. *Sci Justice.* 2014;54(4):307–10.
 77. Ma T, Huang J, Wang JF. Study on the pupal morphogenesis of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) for postmortem interval estimation. *Forensic Sci Int.* 2015;253:88–93.
 78. Valenzuela A, Marchal JA. Studies on RNA integrity and gene expression in human myocardial tissue, pericardial fluid and blood, and its postmortem stability. 2013;232:218–28.
 79. Tao L, Ma J, Han L, Xu H, Zeng Y, Yehui L, et al. Early postmortem interval estimation based on Cdc25b mRNA in rat cardiac tissue. *Leg Med.*

- 2018;35(August):18–24.
80. Guhaniyogi J, Brewer G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*. 2001 Mar;265(1–2):11–23.
 81. Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, et al. Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem*. 2002;48(11):1883–90.
 82. Iser IC, de Campos RP, Bertoni APS, Wink MR. Identification of valid endogenous control genes for determining gene expression in C6 glioma cell line treated with conditioned medium from adipose-derived stem cell. *Biomed Pharmacother*. 2015 Oct;75:75–82.
 83. Melgar-Rojas P, Alvarado JC, Fuentes-Santamaría V, Gabaldón-Ull MC, Juiz JM. Validation of Reference Genes for RT-qPCR Analysis in Noise-Induced Hearing Loss: A Study in Wistar Rat. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138027.
 84. Vennemann M, Koppelkamm A. mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Sci Int*. 2010;203(1–3):71–5.
 85. Chung U, Seo J-S, Kim Y-H, Son GH, Hwang J-J. Quantitative analyses of postmortem heat shock protein mRNA profiles in the occipital lobes of human cerebral cortices: implications in cause of death. *Mol Cells*. 2012 Nov;34(5):473–80.
 86. Lv YH, Ma KJ, Zhang H, He M, Zhang P, Shen YW, et al. 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(5):1286–94.
 87. James SH, Eckert WG. *Interpretation of Bloodstain Evidence at Crime Scenes*. CRC press; 2000.
 88. Ma J, Pan H, Zeng Y, Lv Y, Zhang H, Xue A, et al. Exploration of the R code-based mathematical model for PMI estimation using profiling of RNA degradation in rat brain tissue at different temperatures. *Forensic Sci Med Pathol*. 2015 Dec 12;11(4):530–7.
 89. Koppelkamm A, Vennemann B, Lutz-Bonengel S, Fracasso T, Vennemann M. RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int J Legal Med*. 2011 Jul 17;125(4):573–80.
 90. Artyukhov AS, Dashinimaev EB, Tsvetkov VO, Bolshakov AP, Konovalova EV, Kolbaev SN, et al. New genes for accurate normalization of qRT-PCR results in study of iPS and iPS-derived cells. *Gene*. 2017 Aug;626:234–40.
 91. Bauer M, Polzin S, Patzelt D. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: A possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Sci Int*. 2003;138(1–3):94–103.
 92. Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet*. 2007;1(1):69–74.

8. EKLER

EK A: Hayvan Deneyleri yerel Etik Kurulu

Evrak Tarih ve Sayısı: 05/10/2017-E.56708

GİZLİ



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı :40595970-050.99/
Konu :Yrd. Doç. Dr. Adnan ÇELİKEL

SAYIN YRD.DOÇ.DR. ADNAN ÇELİKEL
ADLİ TIP ANABİLİM DALI ÖĞRETİM ÜYESİ

İlgi :25/09/2017 tarihli 80199299--1317 sayılı yazı,

Kurulumuzun 03/10/2017 tarihli toplantısında almış olduğu 2017/9-4 numaralı karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. Muhammed Enes ALTUĞ
Başkan

KARAR 2017/9-4 Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Adnan ÇELİKEL'in (Adli Tıp AD) yürütücüsü olduğu Arş. Gör. Enes KERMAN (Adli Tıp AD) ve Arş Gör. Hüseyin ÖZKAN'ın (Genetik AD) ortak çalışmaları "*Kalp ve Kas Dokularında Postmortem İnterval Tayini İçin Kullanılmaya Aday Bazı Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi*" adlı proje önerisi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına oybirliğiyle karar verilmiştir.

Mevcut Elektronik İmzalar

MUHAMMED ENES ALTUĞ (Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu - Başkan) 05/10/2017 14:45

GİZLİ

T: F:
E-Posta: Web:
İletişim: Hükümet Ardılı (Dahili: 3262455845)



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK B : Hayvan Deneyleri yerel Etik Kurulu

Evrak Tarih ve Sayısı: 05/02/2018-E.8051

GİZLİ



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı :40595970-050.99-
Konu :Yrd. Doç. Dr. Adnan
ÇELİKEL

SAYIN YRD.DOÇ.DR. ADNAN ÇELİKEL
ADLI TIP ANABİLİM DALI ÖĞRETİM ÜYESİ

İlgi : 19/01/2018 tarihli 80199299-050.99-4490 sayılı yazı.

Kurulumuzun 25/01/2018 tarihli toplantısında almış olduğu 2018/1-7 numaralı karar aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. Muhammed Enes ALTUĞ
Başkan

KARAR 2018/1-7 Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Adnan ÇELİKEL'in (Adli Tıp AD) yürütücüsü olduğu Arş. Gör. Enes KERMAN (Adli Tıp AD) ve Arş Gör. Hüseyin ÖZKAN'ın (Genetik AD) ortak çalışmaları "*Kalp ve Kas Dokularında Postmortem İnterval Tayini İçin Kullanılmaya Aday Bazı Genlerin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi*" adlı proje 03/10/2017 tarih ve 2017/9-4 sayılı karar ile hadyek onayı almış olup projede hiçbir değişiklik yapılmaksızın sadece proje adının "*Ratlarda Postmortem mRNA Degradasyon Düzeylerinin Araştırılması ve Postmortem İnterval Tayinindeki Yeri*" olarak değiştirilmesi hakkındaki dilekçesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına oybirliğiyle karar verilmiştir.

Mevcut Elektronik İmzalar

MUHAMMED ENES ALTUĞ (Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu - Başkan) 05/02/2018 14:15

GİZLİ

T: F:
E-Posta: Web:
İletişim: Hükümet Ardılı (Dahili: 3262455845)



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

9. ÖZ GEÇMİŞ

Enes KERMAN, 1988 yılında Aydın'da doğdu. İlk ve ortaöğretimini Aydın'da, lise öğretimini Isparta'da tamamladı. Afyon Kocatepe üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 2013 yılında mezun oldu. Bitlis 112 komuta merkezi ve Afyon devlet hastanesinde pratisyen hekim olarak görev aldı. 2015 yılında araştırma görevlisi doktor olarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Adli Tıp Anabilim Dalı kadrosuna atandı. Evli ve bir çocuk babasıdır.

Halen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi doktor olarak görev yapmaktadır.