



T.C

ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ

BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Tuğba ÜNSAL

YIKANMIŞ KAN LEKELERİNDEN DNA ELDE EDİLMESİ

ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

ADLİ GENETİK BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG İŞİL TUNA ERDOĞAN

İSTANBUL - 2019



T.C.
ÜSKÜDAR
ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI
BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

GENEL BİLGİLER

Öğrenci No	: 174501027
Öğrenci Adı Soyadı	: Isıl Tuna Erdoğan
Anabilim Dalı	: Adli Bilimler
Tez Danışmanı	: Dr. Öğr. Üy. Tuğba Linal
Tezin Başlığı	: Yıkanmış Kan Lekelerinden DNA Elde Edilmesi

Toplantı Tarihi	: 25.10.2019	Saati	: 17:00
Öğrenci Savunmaya	: <input checked="" type="checkbox"/> Geldi		
Üniversitemiz Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca tez bilimsel olarak incelenmiş, adayın tez çalışmasını sunmasının ardından, adaya tez çalışması ile ilgili sorular yöneltilmiştir.			
<input checked="" type="checkbox"/> Yapılan savunma sınavında adayın tez çalışması başarılı bulunarak KABUL edilmesine,			
<input type="checkbox"/> Yapılan savunma sınavı sonunda tez çalışmasının DÜZELTİLMESİNE , düzeltme için adaya ay EK SÜRE verilmesine (en fazla 3 ay)			
<input type="checkbox"/> Yapılan savunma sınavının sonunda tezin REDEDİLMESİNE			
<input type="checkbox"/> OY BİRLİĞİ <input type="checkbox"/> OY ÇOKLUĞU			
İle karar verilmiştir.			
Savunmada Tezin Başlığı	: <input checked="" type="checkbox"/> Değişmedi <input type="checkbox"/> Değişti		
Tezin Yeni Başlığı	: <input checked="" type="checkbox"/> Değişmedi		
Öğrenci Savunmaya	: <input type="checkbox"/> Gelmedi		
Üniversitemiz Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca yukarıda belirtilen tarih ve saatte Tez Savunma Jürisi toplanmış ancak ilgili öğrenci savunma sınavına gelmemiştir. Adayın tez çalışmasını Jüri önünde sunmadığı için yapılan değerlendirmeler sonunda adayın tez çalışmasıyla ilgili aşağıdaki kararı,			
<input type="checkbox"/> OY BİRLİĞİ İLE REDEDİLMİŞTİR.			

Tez Sınavı Jürisi	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Seril Atasay	
Danışman Üye	Dr. Öğr. Üy. Tuğba Linal	
Üye	Dr. Öğr. Üy. Kaan Yılancıoğlu	
Üye	Dr. Öğr. Üy. Ötge Şahin Somuncu	
Üye	Dr. Öğr. Üy. Ahmet Can Timurçin	

(Tüm durumlarda jüri üyelerinin tez değerlendirme raporları gerekir.)

Sayı No :

Tarih : 25.10.2019.

Yukarıda kimlik bilgileri belirtilen ve Anabilim Dalımız Yüksek Lisans Programı öğrencisinin Tez Savunma Sınav Tutanağı ve eklerinin Enstitü Yönetim Kurulunda görüşülmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Not: Bu forma orijinal raporlar (bir nüsha) eklenecektir.

Anabilim Dalı Başkanı
(Unvanı, Adı Soyadı, İmza)

T.C
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Dr. Öğretim Üyesi Tuğba ÜNSAL

YIKANMIŞ KAN LEKELERİNDEN DNA ELDE EDİLMESİ

ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

ADLİ GENETİK BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOG IŞIL TUNA ERDOĞAN

İSTANBUL - 2019

YEMİN METNİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yıkanmış Kan Lekelerinden DNA Elde Edilmesi” adlı çalışmanın, tarafımdan bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın yazıldığını, intihal yapmadığımı ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve bunu onurumla doğrularım.

Tarih

.../.../.....

Adı SOYADI

Işıl Tuna ERDOĞAN

İmza

ÖNSÖZ

Lisans eğitimim boyunca hayalini kurduğum mesleğimi adalet için kullanabileceğimi fark etmeme sebep olan, yüksek lisans eğitimine başlamama ve tez çalışmasını gerçekleştirilmeme imkân sunan Üsküdar Üniversitesi Rektör Yardımcısı, Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü ve Birleşmiş Milletler Uluslararası Uyuşturucu Kontrol Kurulu (INCB) üyesi,

Prof. Dr. Sevil ATASOY'a

Lisansüstü eğitimim süresince özveriyle yanımda olan bilgisini ve sevgisini benden esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında tüm bilgisiyle destek olmasının yanı sıra benim için yol gösterici her zaman bir danışmandan çok daha fazlası değerli hocam,

Dr. Öğretim Üyesi Tuğba Ünsal'a

Öğretimim boyunca çalışmalarına katkıları bulunan değerli akademisyen, Üsküdar Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü Enstitü Müdür Yardımcımız **Dr.Öğr. Üyesi Kaan YILANCIOĞLU' na**

Çalışmalarım süresince desteklemlerini gördüğüm ve bilgi birikiminden yararlandığım, Türkiye'nin ilk Kadın Balistik uzmanı, Sayın **Dr.Öğr. Üyesi Aylin YALÇIN SARİBEY'e**

Büyük desteklerini hissettiğim ilgisi ve bilgilerini paylaşmaktan çekinmeyen her biri alanında uzman değerli **Üsküdar Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü bünyesinde yer alan akademisyenler ve başta Enstitü Sekreteri Seher Eren olmak üzere tüm idari personele,**

Çalışmam sırasında yalnız bırakmayan her yardıma ihtiyacım olduğunda moral ve destek veren **Aysun GÜNGÖR ve M. Eren DEMİR'e**

Bu tez çalışmamdaki süreçte bana destek olan bugüne gelmemde maddi manevi katkıları olan her zaman en iyi şekilde yetiştiren asil **AİLEM'e** - erdemli ve çağdaş duruşu ile Türk kadını sevgili biricğim **ANNEM'e**

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunarım...

Moleküler Biyolog Işıl Tuna ERDOĞAN

İÇİNDEKİLER

YEMİN METNİ	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Adli Genetik Çalışmalarının Tarihsel Gelişimi	3
2.2. STR (Kısa Art Arda Tekrar Eden Diziler)	8
2.2.1. STR Lokusu Alellerinin Adlandırılması	9
2.2.2. Mini STR	10
2.2.3. Y STR	10
2.2.4. X STR	11
2.2.5. STR'lerin Adli Genetik Kimliklendirmede Kullanımı	11
2.3. CODIS (Birleşik DNA İndeks Sistemi - Combined DNA Index System)	12
2.4. Tek Nokta Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphisms- SNP)	14
2.4.1. SNP'lerin Adli DNA Kimliklendirmesinde Kullanımı	15
2.5. Biyolojik Deliller ve DNA Kaynakları	17
2.5.1. Biyolojik Delillerden Kan ve Kanın Yapısı	19
2.6. Biyolojik Delillerin Belgelenmesi, Toplanması, Korunması Ve Paketlenmesinde Genel Kurallar	20
2.6.1. Delillerin Belgelendirilmesi	21
2.6.2. Delillerin Toplanması	21
2.6.2.1. Kan Lekelerinin Toplanması Sırasında Yapılması Gerekenler	22
2.6.3. Delilin Korunması ve Paketlenmesi	23
2.6.4. Delilin Laboratuara Teslimi Ve Laboratuvar Süreci	23
2.6.5. Kan Lekeli Kıyafet ve Kumaşların İncelenmesi	24
2.7. Biyolojik Delillerin Laboratuvarda Analizi	29
2.7.1. DNA İzolasyonu	30
2.7.2. DNA Amplifikasyonu	30
2.7.3. Elektforez	31
2.7.3.1. Kapiller Elektforez	33
2.7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi Ve Genotiplendirme	34

2.8. Biyolojik Materyalden DNA Eldesini Engelleyen Faktörler	35
2.8.1.Kontaminasyon	35
2.8.2. Degredasyon (Bozunma).....	38
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	41
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar :	42
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler	43
3.2. Kumaşların Temini ve Hazırlanması	44
3.3. Kan Örneklerin Toplanması.....	44
3.4. Kumaşlara Kan Lekelerinin Oluşturulması.....	44
3.5. Kan Lekelerinin Yıkanması	46
3.6. Luminol Hazırlama ve Kan Lekelerinin Görünürleştirilmesi	46
3.7. DNA İzolasyonu.....	46
3.8. DNA Miktarının Belirlenmesi.....	49
3.9. PCR Aşamaları.....	50
3.9.1. PCR Bileşenleri ve Miktarları.....	50
3.9.2. PCR Programı.....	51
3.9.3. PCR Ürünlerinin 3500 Genetik Analizör Cihazında Analizi.....	52
3.10. Örneklerin Elektroforezi.....	52
3.11. Elektrofogramların Değerlendirilmesi	53
BULGULAR.....	55
4.1. Yıkanmış Kan Lekelerin İncelenmesi	55
4.2. DNA İzolasyonu	58
4.3. Genotiplerin Belirlenmesi.....	61
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ	79
7. KAYNAKLAR	81
8. EKLER	94
8.1. EK -1	94
8.2. EK- 2	96
8.3. EK-3	97
9. ÖZGEÇMİŞ.....	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A: Adenine- Adenin

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

Bç: Baz Çifti

C: Cytosine -Sitozin

CODIS: Combined DNA Index Systems – Birleşik DNA İndeks Sistemi

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA: Etilen Daimin Tetra Asetik Asit

FBI: Federal Bureau of Investigation – Fedaral Araştırma Bürosu

g: Gram

G: Guanin

Hap-Map : The haplotype map – Haplotip haritası

HLA: Human Leukocyte Antigens (İnsan Lökosit Antijeni)

LDIS: Local DNA Index Systems – Yerel DNA İndeks Sistemi

mL: Mili litre

mM: Mili molar

NDIS: National DNA Index System – Ulusal DNA İndeks Sistemi

ng: Nanogram

NGS: Next- Generation Sequencing -Yeni Nesil Dizileme

PCR: Polymerase Chain Reaction – Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA: Ribo Nükleik Asit

Rpm: Revolutions Per Minute – Dakikadaki Devir Sayısı

SDIS: State DNA Index Systems - Eyalet DNA İndeks Sistemi

SNP: Single Nucleotide Polymorphism- Tek Nokta Polimorfizmi

STR: Short Tandem Repeat- Kısa Ardışık Tekrar Dizileri

T: Timin

U/ μ L: Mikrolitre başına düşen ünite

VNTR: Variable Number of Tandem Repeats – Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Dizileri

μ m: Mikro molar

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

Tablo 2. Elektroforez için kullanılan bileşenler ve miktarları

Tablo 3. Applied Biosystems'in 3500 Genetik Analizör için standart boya setleri

Tablo 4. Qiagen QIAamp® DNA Mini Kit ile izolasyonu yapılan Allsheng-Nano 400A spektrofotometre cihazı ile ölçülen numunelerin DNA miktarları

Tablo 5. Fenol Kloroform İzamil Organik ile izolasyonu yapılan Allsheng-Nano 400A spektrofotometre cihazı ile ölçülen numunelerin DNA miktarları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kumaşların lekeleme için hazırlanması

Şekil 2. Kan lekelerinin oluşturulması ve fotoğraflandırılması

Şekil 3. GeneMapper™ ID-X Software görüntülenen GlobalFiler™ Allelik ladder'a ait elektroforegram

Şekil 4: Kan lekesi oluşturulan pamuk kumaşların 40 °C yıkama sonrası kan lekesinin orijinal kontörü

Şekil 5: Oluşturulan kan lekesi 60 °C yıkama sonrası kan lekesinin pamuk kumaşa ait orijinal kontörü

Şekil 6: Oluşturulan kan lekesinin 90°C yıkama sonrası pamuk kumaşa ait görüntüsü

Şekil 7: 40°C derecede yıkanmış pamuklu (sol), naylon (sağ) kumaşlara luminol kullanılarak görünürleştirme

Şekil 8: 60°C derecede yıkanmış pamuklu (sol), naylon (sağ) kumaşlara luminol kullanılarak görünürleştirme

Şekil 9: 90°C derecede yıkanmış pamuklu (sol), naylon (sağ) kumaşlara luminol kullanılarak görünürleştirme

Şekil 10: 1ng DNA örneğinden elde edilen elektroforegram

Şekil 11. 40°C’de yıkanmış naylon kumaştan organik izolasyon sonucu elde edilmiş DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsü

Şekil 12. 40°C’de yıkanmış pamuk kumaştan QIAamp DNA Mini Kit ile izolasyon sonucu elde edilmiş DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsü

Şekil 13. 60°C’de yıkanmış pamuk kumaştan organik izolasyon sonucu elde edilmiş DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsü

Şekil 14. 60°C’de yıkanmış pamuk kumaştan QIAamp DNA Mini Kit ile izolasyon sonucu DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsü

Şekil 15. 90°C’de yıkanmış pamuk kumaştan QIAamp DNA Mini Kit ile izolasyon sonucu DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsü

Şekil 16. 90°C’de yıkanmış naylon kumaştan QIAamp DNA Mini Kit ile izolasyon sonucu DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsü

Şekil 17. 90°C’de yıkanmış pamuk kumaştan organik izolasyon sonucu elde edilen DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsü

ÖZET

Adli bilimlerde şiddet suçlarında kan ve kan lekeleri gibi vücut sıvıları ile sık karşılaşılır. Bu tür suçlarda biyolojik kaynaklı DNA ihtiva eden bu tarz deliller, adli kimliklendirmenin tespiti ile şüpheli veya mağdurun suç ile ilişkili olup olmadığını belirlemede güçlü bir rol oynar. Bu sebeple olay yeri, şüpheli ve mağdur üçgeninde bağlantı kurmak amacıyla olay yerinden elde edilen kan, tükürük, semen, kıl gibi biyolojik materyallerden rutin adli laboratuvarlarda DNA analizi yapılmaktadır. Genel olarak kan lekeleri olay yerinde en sık karşılaşılan delildir ve genellikle çıplak gözle tespit edilebilir. Bu sebeple kan ve kan lekeleri potansiyel olarak suçla ilişkilendirebileceği için failer olay ile ilgili delillerden kurtulma amacıyla genellikle temizlenir veya yıkanır. Bu sebeple suç sonrası karakteristik temizlenme davranışı sonucu su veya temizleme reaktiflerine maruz kalan kan lekesi gibi vücut sıvıları çıplak gözle algılanamayacak kadar ortadan kaybolabilir. Çoğunlukla, araştırmacılar yıkanmış kan lekelerinin DNA analizi için yeterli kalitede olmayacağını düşünmektedir. Bununla birlikte, bazı araştırmalar ise kan lekelerinin yıkandıktan sonra bile DNA analizi için kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışmanın amacı; farklı kumaş türlerinde oluşturulan kan lekelerinin farklı sıcaklıklarda yıkanmasıyla DNA elde etme oranının belirlenmesidir. Konu ile ilgili literatüre paralel olarak DNA elde edilmesinin kumaş türü ile ilgili olduğu saptanmıştır. Kumaşların yüzeyde DNA'yı tutup tutmaları ile ilişkili olarak; emici olmayan naylon kumaş türünde dış etkenlerle kolay maruziyet sonucu DNA'nın daha fazla kaybedildiği ancak emici olan pamuklu kumaş türünde daha çok DNA elde edilebildiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca farklı kumaş türündeki, farklı sıcaklıklarda yıkanmış kan lekelerinde DNA elde edebilme oranları da bu çalışmada gösterilmektedir. Bu tez çalışmasında, temsili olay yeri oluşturulmuş olup pamuklu ve naylon türündeki kumaşlara kan lekeleri yapılmış; 40°C, 60°C ve 90°C'de çamaşır deterjanı ile yıkanmasının ardından görünürleştirme ve DNA düzeyinde kan lekelerinin

kimliklendirilmesi çalışmaları yapılmıştır. 40 ve 60 °C 'de yıkanmış pamuk ve naylon kumaşlardan adli genetik kimliklendirme için yeterli miktarda DNA elde edildiği saptanmıştır. 90°C'de yıkanan naylon ve pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinden DNA profillemesi için yeterli miktarda DNA elde edilemediği belirlenmiştir.

Bu çalışma, olay sonrası delil karartmak amaçlı veya başka bir sebeple yıkanmış çamaşırlarda delil niteliği taşıyabilecek DNA'nın elde edilebilmesi ve olay yeri, fail, mağdur üçgeni ile ilişkilendirilip adaletin tecellisi konusunda önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler : Adli Bilimler, Olay Yeri İnceleme, Adli Seroloji, Adli Genetik, Kan Lekeleri, Yıkanmış Kan Lekelerinden DNA Eldesi.

ABSTRACT

In forensic sciences, body fluids such as blood and blood stains are frequently encountered in manslaughter crimes. Such evidences, which requires biologically sourced DNA in such crimes, plays a strong role with forensic identification in determining whether a suspect or victim has an association with the crime. For this reason, DNA analysis is performed in routine forensic laboratories from biological materials such as blood, saliva, semen and hair obtained from the crime scene in order to connect with the crime scene in the triangle of suspects and victims. In general blood stains are the most common evidence at the scene and generally can be detected with the naked eye. For this reason, blood and blood stains can potentially relate to the crime, the perpetrators are usually cleared or washed for the purpose of liberation from evidence related to the incident. For that reason as a result of characteristic cleaning behavior after the crime, bodily fluids such as blood stains exposed to water or cleaning operations cannot be seen through naked eye. Mostly, the researchers think that the washed blood stains don't have sufficient quality for DNA analysing. However, some studies have shown that bloodstains can be used for DNA analysing even after washing.

The aim of this study is to determine the rate of DNA acquisition by washing blood stains in different types of fabric in different grades. In this study, representative crime scene was created and blood stains were made on cotton and nylon fabrics; after washing with laundry detergent at 40°C, 60°C and 90°C, studies were done to identify blood stains in the order of vision and DNA. It has been attempted to determine whether enough DNA will be obtained from washed laundry for forensic genetic identification. In parallel with the literature on the subject, it has been determined that obtaining DNA is related to the fabric type. In relation to the fact that fabrics hold and unhold DNA on their surfaces, the result is that DNA loses more due to easy exposure to external factors in the non-absorbent nylon fabric type, but more DNA

can be obtained in the type of cotton fabric that is absorbent. The rates of obtaining DNA in bloodstains of different types of fabric, washed at different temperatures, are also shown in this study. It was determined that sufficient amount of DNA was obtained for forensic genetic profiling from cotton and nylon fabrics washed at 40 and 60 °C. However, it was determined that sufficient amount of DNA could not be obtained for DNA profiling from blood stains on nylon and cotton fabric washed at 90 °C.

This study is important in obtaining DNA that may be evidence in washed clothes for the purpose spoliation of evidence after the event or for any other reason, and in relation to the crime scene, the perpetrator, the victim triangle and the manifestation of justice is desirable.

Keywords: Forensic Sciences, Crime Scene Investigations, Forensic Serology, Forensic Genetics, Blood Stains, DNA from Washed Blood Stains.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli bilimler olay yerinde başlar ve bizi faile götürecek en önemli maddi deliller olay yerindedir. Olay yerinden elde edilen biyolojik materyallerin analizi son derecede önemlidir ve güncel yaklaşımlarla bu analizlerin daha iyi noktalara taşınması mümkündür. Olay yerinden elde edilen her türlü bulgudan şüpheliye ulaşılabilir veya bir kişi şüpheli olmaktan çıkarılabilir (1). Adli bilimlerde son yıllarda teknolojinin gelişmesi ile DNA profilleri, adli makamlar ve bilim insanlarının işi birliği içerisinde ceza ve hukuk davalarının çözümünde bilimsel delil sağlamak amacı ile çıkılan yolda çözümsüz olduğu düşünülen bir çok olayın aydınlatılmasında doğru güvenilir bir kaynak olmuştur (2). DNA profillerinin tespiti ile şüphelileri veya mağdurları belirli bir suç ile ilişkilendirip olay yerine bağlayabilmesi sebebiyle ceza soruşturmaları için önemli bir değer sağlamaktadır (3). Vakaların çözümündeki en önemli adım olay yerinden toplanan (kan, tükürük, semen, kıl gibi biyolojik materyaller) biyolojik örneklerin DNA profillemelerinin yapılmasıdır. Maddi deliller arasında kan lekesi olay yerinde özellikle de şiddet suçlarına maruz kalanlarda en sık karşılaşılan biyolojik bulgulardan biridir. Kan lekeleri, uzun zamandan beri adli bilimcilerin suç araştırmasında en önemli araçlarından biri olmuştur. Kan lekelerinin şekli, boyutu ve etrafındaki eşyalarla olan ilişkisi, olayın nasıl meydana geldiği hakkında önemli fikirler verebilir, bu sebeple kan lekelerinin dikkatli bir şekilde incelenmesi ile olay hakkında bilgi sahibi olunabileceği gibi olayın yeniden canlandırılmasını mümkün kılmaktadır. Son yıllarda teknolojinin de gelişmesi ile şüphelinin olmadığı durumlarda olay yerinden gelen ileri derecede bozunmuş, degrade biyolojik materyalden bir takım veriler elde etmek mümkün olabilmektedir. Kan lekeleri suç mahallerinde sıkça görülmekte olduğundan ve prensip olarak yapısından kaynaklı çıplak gözle tespit edilebilir. Bu sebeple kan ve kan lekeleri potansiyel olarak suçla ilişkilendirebileceği için

kişi olay ile ilgili delillerden kurtulma amacıyla genellikle temizlenir veya yıkanmaktadır. Suç sonrası karakteristik temizlenme davranışı ile kan lekeleri su veya temizleme reaktiflerine maruz kalabilir. Bu davranışın eylemleri ile kan lekesi gibi vücut sıvıları çıplak gözle algılanamayacak şekilde seyreltilebilir hale getirebilir (6). Çoğunlukla, araştırmacılar yıkanmış kan lekelerinin DNA profillemesi için yeterli kalitede DNA elde edemeyeceğini düşünmektedir. Bununla birlikte, bazı araştırmalar ise kan lekelerinin yıkandıktan sonra bile DNA profillemeye için kullanılabilirliğini göstermiştir (7,8).

Bu tez çalışması, 40 ° C, 60 ° C ve 90° C gibi farklı sıcaklıklarda yıkanmış kan lekeli naylon ve pamuk türündeki kumaşlardan adli amaçlarla kullanılan DNA profillemesi için yeterli miktarda DNA elde edilip edilemeyeceğinin saptanmasını amaç edinmiştir.

Ayrıca bu tez çalışması, olay sonrası delil karartmak amaçlı veya başka bir sebeple yıkanmış çamaşırlarda delil niteliği taşıyabilecek DNA'nın elde edilebilmesi ve olay yeri, fail, mağdur üçgeni ile ilişkilendirilip adaletin tecellisi konusunda önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adli Genetik Çalışmalarının Tarihsel Gelişimi

Adli bilimler, adli ve idari soruşturmalar sırasında elde edilen maddi delillerin incelenmesi ve değerlendirilmesi ile suç ve suçlunun saptanması, kanıtlanmasında yararlanılan mahkemelerce kabul edilmiş teknik ve analizlerin oluşturduğu geniş bir yelpazedeki bilim dallarını kapsayan adaletin doğru işlemesi için yapılan hizmet ve çalışmalardır. Adli bilimlerin amacı, olay yerinden elde edilen delillerin analizini yapmak, suçun kendisine ait durumları belirlemek polise ve adli kolluk kuvvetlerine multi disiplinler yaklaşım ile yardımcı olmaktır (9). Adli bilimler, suçun başladığı ilk yerden, olay yerinden başlamaktadır. Olay yerinden elde edilen bulgularda biyolojik materyal bulunulması durumunda DNA profillemesi ile suçlu, mağdur ve olay yerinden oluşan suç üçgeninin tespitine ait uygulamaları içermektedir. Adli genetikçilerin kullandığı teknikler uzmanlık gerektiren çalışmalar olmakla birlikte suç mahalinden elde edilen bulguların analizini, babalık testi ayrıca kan, semen, tükürük, kıl, kemik, vücut sıvılarının tanımlanmasını ve kişilerin adli kimliklendirme işlemlerini içermektedir. Bazı durumlarda, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar da DNA analizi için kullanılabilen olup bu konularda adli biyoloji-genetik biliminin ilgi alanları arasındadır. Tarihte adli genetik çalışmaları DNA'nın keşfi ile hızlanmıştır (10). 1880'de İngiliz antropolog Sir Francis Galton'un, parmak izi üzerine yaptığı ilk çalışma; belli bir kişinin parmak izi ile tanımlanması yöntemidir. Avusturyalı doktor Karl Landsteiner 1900'de tanımladığı ABO kan grubu sistemi ile birlikte bir soruşturmada babalık davasını çözmüştür. Ayrıca genetik farklılıklar sonucu oluşmuş olan antijenlerin ayırma gücü (Human Leukocyte Antigen - HLA) ile yapılan çalışmalar ve ABO kan grup sistemi bu tarihten sonra kimliklendirme için mahkemelerce kabul görmüş bir bilimsel delil haline gelmiştir. Bahsedilen incelemelerin yöntemleri, temelde

proteinlerin elektroforetik ayrımının sağlanması ve ayrıca analizler antijenlerin immünolojik tepkime reaksiyonlarına dayanmaktadır (14). 1923'te Edmond Locard yayınlamış olduğu çalışmada ise olay yerinde inceleme yapmanın bir uzmanlık gerektirdiğini savunmuş ve kan lekeleri, boya, parmak izi gibi materyallerin olay yerinden çalışma amacıyla için nasıl toplanıp ve transfer edilmesi gerektiği hakkında bilgiler vermiştir. Edmond Locard'ın çalışmaları halen günümüzde mahkemelece kabul edilen bilimsel delillerin kriterlerinin sınırlandırmada belirleyici olmuştur. Bu çalışmaları sayesinde Locard kriminolojinin önemli bir ismi olmuştur. David Botstein keşfi ile DNA düzeyinde bireyler arasında farklılıkların olduğu ve kişilerin DNA'larındaki farklılıkların yer aldığı bu bölgelerin ise küçük boyutta olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılık restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism) olarak tanımlanmıştır (2). RFLP, DNA'nın restriksiyon endonükleazlar tarafından spesifik bölgelerden kesilmesi ve fragment boyutunun analizi esas almaktadır (4). Sir Alec Jeffreys, ilk kez adli çalışmalar için RFLP yöntemini kullanarak DNA'daki bazı bölgelerin bireyler arasında değişken, tekrarlayan diziler içerdiğini kanıtlamıştır. (13). Adli genetik kimlik tespitinde bireyler arasındaki genetik farklılıkların/varyasyonları kullanmanın önemini ispatlayan ilk kişi olmuştur. Özellikle DNA çalışmalarıyla bilinen Jeffreys, günümüzde bu çalışmasıyla Adli bilimler tarihinin en önemli vakalarından birine imza atmıştır. Bu keşifi sayesinde adli genetiğin ilk örneği olmuştur. DNA analizi kullanılarak adli soruşturmanın çözülebilir olduğunu kanıtlamıştır. 1983' te Kary Mullis, açılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğini geliştirmiştir. 1993 yılında bu çalışma Kary Mullis' e Nobel ödülünü kazandırmıştır. Bu keşif iz miktardaki DNA ile çalışma imkanı sunmuştur . Bu teknik, DNA bölgelerinin invitro ortamda bir çok döngüde çoğatıldığı sıcaklık değişimlerine bağlı enzimatik bir işlemdir (17-18). Adli amaçlı DNA tipleme 1985 yılında İngiltere'de ve 1986'nın sonlarında da ABD'de delil olarak kullanılmıştır (11-12). 1983 ve 1986'da iki kızın ölümünün incelenmesi için polis cinayetin gerçekleştiği bölgede yaşayan 5000 kişiden kan ve

tükürük örneği toplamıştır ve çalışmaları sonunda katil bulunmuştur (11-16). DNA teknolojisi, 20. yüzyılın en önemli bilimsel gelişmelerinden biridir ve bir çok organizmanın genetik materyalinin Deoksiribo Nükleik Asit olması ile çalışmalar desteklenmiş ve bu materyalin yapısı ve işleyişi hakkında bir çok bilgiye sahip olunmuştur. Son zamanlarda DNA teknolojisinin moleküler biyoloji genetik ve temel bilimlerde kullanılmasıyla bu laboratuvarlarda gelişimsel ve destekleyici rol oynamıştır (21). DNA teknolojilerinin gelişmesi ile birlikte adli bilimlerdeki gelişmelerde paralellik göstermektedir. Çalışmaların paralellik kazanması ise adli bilimlerin olay yerinden başlaması ve olay yerinin kendine has koşulları yani kalitesiz ve iz miktardaki DNA ürünlerinin elde edilmesi sebebiyet vermektedir (102). Bu kısıtlayıcı durumlar olay yerinden elde edilen ürünlerin PCR gibi moleküler genetik tabanlı keşifler sayesinde az miktardaki örneklerle bile çalışmayı mümkün kılmıştır (18). DNA günümüzde mahkemelerce kabul gören, bilimsel olarak tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği güçlü bir delildir. DNA, genetik yapısı gereği bu yapının kalıttan, gen ifadesi, aktarımı ve farklılaşmasından sorumludur. DNA türler arası ve hatta aynı tür içerisinde varyasyonlar içermektedir. Bu farklılaşmaların tespiti ile adli genetik çalışmalarda bireyler arası kimlik tespiti sağlanmaktadır. Bu farklılaşmanın adli genetik kimliklendirme amaçlı kullanılabilmesi için o sistemin popülasyonda en az %1 sıklıkta görülmesi gerekmektedir. DNA'nın yüksek derecede ayırt edici profiller üretme yeteneği, genetik düzeyde farklı olan bireylere bağlıdır ve tek yumurta ikizler dışında, hiçbir iki birey aynı DNA'ya sahip değildir. Ancak, çok farklı görünen bireyler bile, genetik düzeyde aslında çok benzemektedir (19). Aslında, insan genomunu insane en yakın hayvan popülasyonu ile karşılaştırırsak, yaklaşık 6 milyon yıl önce ortak bir atayı paylaştığımız şempanzeden, genomlarımızın farklılaştığını tespit edilmektedir. Şempanzeler ve insanlar arasındaki yaklaşık % 5 oranındaki farklılaşma; DNA dizisinin değişimi ile meydana gelmiştir. Bu oran %5'lik dilimin içinde % 1.2 oranında tekabül etmektedir (20). Adli vakalar için ise genetik analizlerin kullanım amacı, oldukça ayırt edici

olan bir DNA profili üretmektir - ideal olan her bireye özgü bir DNA profili oluşturmaktır. Adli genetik çalışmalarında DNA 'nın kullanılmasının en büyük avantajlarında biri de bir insan DNA'sının her hücrede birebir eşsiz kopyasını içermesidir (23). Olay yerinden elde edilen biyolojik bulgulardan elde edilen materyallerin bir bireye eşleştirilebilmesini sağladığından çok güçlü adli kanıtlar olabilmesini sağlamaktadır..Bu özelliği ile DNA adli genetik kimliklendirmede temel faktör olmaktadır (97) . İnsan genomunda proteinleri kodlanan (Exon) ve kodlanmayan (İntron) bölgeler içermektedir. Toplam insan DNA'sının neredeyse 4'te 3'ü İntron bölgelerden oluşur. İntron bölgeler birden fazla sayıda tekrarlayan şekilde birimden meydana gelmiş olup, tekrarlanan diziler olarak bilinirler. Bilim insanları çalışmalarında insan genomunun 2500'den fazla bölgesinde polimorfik yani farklılık içeren bölgeler olduğunu tespit etmiştir ve DNA moleküllerindeki polimorfizmler, kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan bölgelerdeki polimorfizmler olarak iki ana sınıfta toplanırlar özellikle kodlayıcı olmayan bölgelerdeki polimorfizmler adli genetik çalışmalarda önem taşımaktadırlar (24). Adli bilimlerde yapılan DNA çalışmalarında kullanılan teknikler - genetik işaretler bireyler arasında güçlü, kanıtlanabilir, güvenilir, tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi ve evresel bir dil kouşulabilmesi amacıyla standardize edilmeye çalışılmaktadır. Bu standartizasyon çalışmaları ile DNA çalışmaları yıllar içinde büyük bir hızla gelişmiş ve neredeyse 6-8 haftada yapılan çalışmalar günümüzde saatler içerisinde tamamlanmaktadır. Olay yerinde elde edilen az miktardaki materyal ile çalışmalar mümkün kılınmış ve DNA çalışmalarında belli bir standart yakalanmıştır. DNA bireyler arasında farklılık gösterir ve bu nedenle biyolojik materyal bir suçla veya dava ile ilişkilendirilebilir durumdadır (4-17).

1980'lerde, insan genomunun araştırılması ile yüksek düzeyde yeni araştırmalara yol açmıştır. İnsan DNA'sının çoğu bireyler arasında neredeyse aynıdır; bireyler arasındaki fark % 0.3-0.5 oranındaki değişiklikten kaynaklanmaktadır. Bu değişikliklere - varyasyonlara polimorfizm denir. Polimorfizmik DNA'nın bölümlerine ise lokus adı verilir. Bireyler arası oluşan

polimorfizmi Alec Jeffreys keşfi ile VNTR- değişken sayıda tekrarlardan oluşan lokuslar ile yaptığı çalışmalar ile bireyler arasında tekrar eden DNA dizilerinin bireyler arasında bu genetik çeşitliliğin adli çalışmalarda kullanılabileceğini göstermiştir (25-26). VNTR'ler genomda birçok bölgede dağınık şekilde bulunurlar. VNTR'ler 8 ila 100 baz çifti arasındadır. Bu teknik ile birey identifikasyonu için günümüzde kullanışlı ve yeteri kadar bilgilendirici olmayan tekniklerin yerini almıştır. Ancak VNTR analizi ihtiyaç duyulan yüksek ayırım gücüne sahip olmaması ve degradasyona uğramış DNA materyallerinde belirli kısıtlamalara sahip olduğundan olay yerinden elde edilen VNTR çalışmaları yerine PCR temelli teknik olan STR ile çalışmaya başlanmıştır. STR'ler VNTR'lere benzemekle beraber temelde daha kısa tekrar diziler içermektedir. Günümüzde STR'ler mevcut adli DNA profilleme tekniği olarak kullanılmaktadır. Bunun nedeni ise STR'lerin bozulma etkilerine karşı daha fazla direnç sağlaması ve daha yüksek derecede bireyler arası ayırım gücüne ve birkaç saat kadar kısa bir sürede test sonuçlarının sonucunu alındığından dolayı tercih edilmektedir. STR'ler, 2-7 bp arasında ikili tekrarlar içerir. STR analizlerinin çoğu, bireysel tanımlamada yüksek derecede kesinlik veren PCR multipleksleri ile çalışılmasına imkan sağlayarak elektroforez sonuçlarının değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bu imkanları sayesinde STR son on yıldır adli bilimlerin ve araştırmaların odağı olmuştur. Adli bilimlerde ise DNA'nın intron bölgelerinden minisatellit (VNTR) değişken sayıda art arda tekrarlar ve mikrosatellit (STR) kısa ardışık tekrarlar olmak üzere iki ana tipte farklılık içeren bölgeler kullanılır. Söz konusu bilgi adli genetik çalışmaların temelini oluşturan genetik işaretleri oluşturmaktadır ve kişiler arası %99, 9999 yakınlıkta ayırım yapılmaktadır (25). VNTR'lerin ve STR'lerin genel yapısı aynıdır ancak isimlendirme farklı aleller arasındaki varyasyonlar ve farklı uzunluklardaki aleller ile sonuçlanan tekrar birimlerinin sayısındaki farktan kaynaklanmaktadır. Son yıllarda insan genetik yapısının daha iyi bilinmesi ile genetik düzeyde bireyler hakkında daha fazla bilgi veren sistemler de geliştirilmektedir. Bunlardan bir tanesi ise (Single Nucleotide

Polymorphisms) SNP'lerdir. Adli çalışmalarda özel vakalarda tek nokta polimorfizmi (insersiyon ya da delesyon) kullanılmaktadır. SNP'ler ek nükleotid polimorfizmler genomik DNA'da tek bazda meydana gelen sekans farklılığı oluşturan, popülasyonda %1 daha fazla görülme sıklığı olan varyasyonlardır. SNP'ler kimliklendirmede, yakın soy ortaya çıkarılmasında, ata soy belirlemede, fenotipin ortaya çıkarılması çalışmaları yer almaktadır.

2.2. STR (Kısa Art Arda Tekrar Eden Diziler)

İnsan genomu tüm insanlarda %99.7 bireyler arasında aynıdır. Kişilerin genetik kimliklendirmesi ile bireyler arasında ayırımı ortaya koymak mümkündür. Ökaryöt canlıların genomu çok miktarda tekrar eden DNA dizilerinden meydana gelir (27). Bu tekrar eden diziler, tekrar bölgesinin sayısı ve uzunluğuna göre temsil edilip adlandırılmaktadır. Kısa DNA dizilerinin tekrarlanması sonucu adenin, sitozin, guanin ve timin içeren nükleotitlerin sıklığının değişmesi ve bu bölgelerin yoğunluğu ile farklılaşmaktadır. Çoğu satelit DNA kromozomun telomerik veya sentromerik bölgesinde lokalize durumdadır ve canlı türlerinde bu tekrarların nükleotit dizileri iyi korunmuş vaziyettedir. Mikrosatellit, söz konusu kısa art arda tekrar eden bölgelerin sentromer ile çevrili olmasından dolayı satellite DNA olarak adlandırılır. Mikrosatellit bölgeler insan genomunun %3 'ünü oluşturacak şekilde tüm kromozomlara dağılmıştır. Ancak kromozomlar arasındaki yoğunluğu değişkendir. Buna örnek olarak insanlarda 19. kromozomda en yüksek söz konusu bölgeler sıklıkta bulunmaktadır. İnsan genomunda heterozigotluk oranı neredeyse % 70'in üzerinde olan 1300'den fazla STR lokusu tanımlanmıştır. Adli çalışmalarda, DNA'nın intron bölgelerinde yer alan STR lokusları kullanılmaktadır (28).

Adli araştırmalarda rutinde kullanılacak STR lokuslarının genel itibari ile bireyler arası ayırım gücü yüksek, kromozomal lokalizasyonunun diğer STR lokusları ile birlikte tek bir PCR

çalışması ile çoğaltılabilmesi gibi güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi amacıyla belirli kriterler yer almaktadır.

2.2.1. STR Lokusu Alellerinin Adlandırılması

STR lokuslarının isimlendirilmesi açık ve anlaşılır olmalıdır. STR'lar A (adenin)'den zengin birimlerdir: AAC(T), AAC(T), AAAC(T,G). Örnek olarak D21S11 olarak adlandırılan STR lokusunda D harfi DNA'yı, 3 rakamı STR lokusunun yerleştiği 2. kromozom, S harfi STR'ı, 11 ise özgün lokalizasyonunu temsil etmektedir. Zaman içinde STR'ların biyolojik fonksiyonları çalışmalarla birlikte daha fazla keşfedilmesine rağmen çoğunun halen ne işe yaradığı bilinmemektedir. Bu açıdan STR'leri 3 grupta incelemek uygun olur.

Basit STR'ler: Tekrar eden bölgedeki baz dizisinin sayısı ve sırası aynı bulunan olan STR lokuslarıdır. TH01 lokusunda, TH ifadesi 11. kromozomda yerleşmiş olan insan tirozin hidroksilaz enzimini, 01 ise tirozin hidroksilaz geninin 1. intron bölgesini ifade etmektedir.

Örneğin, HumFES/FPS (human c-fes/fps proto oncogene), AATG tekrar motifi içeren TH01

Bileşik STR'ler: İki ya da daha fazla sayıda tekrar eden baz dizilerine sahip ve bu tekrar eden ünitelerden baz dizisinin sırası birbirlerinden farklı olması itibari ile bileşik STR lokusu olarak adlandırılmaktadır. Bazen ön ek olarak 'HUM' eki insanı ifade etmek için lokusun başında kullanılmaktadır. Bu durumda lokus HUMTH01 olarak adlandırılır. Örneğin, TCTA ve TCTG komşu tetranükleotidlerin tekrarından oluşan HumvWFA31 (Human von Willebrand factor gene).

Karmaşık STR'ler: Tekrar eden baz dizi sayısı farklı olan birkaç tipte yer alan tekrar ünitesine sahip lokuslardır. STR lokusları gen bölgelerinin dışında yer alıyor ise isimlendirme şu şekilde yapılır: Örneğin, D21S11 lokusunda; D harfi DNA, 21 rakamı hangi kromozomda yer aldığı,

S harfi lokusun tek kopya dizisine sahip olduğu (single), 11 ise bu lokusun kromozom üzerinde nerede yer aldığını göstermektedir.

2.2.2. Mini STR

Çevresel faktörler, nem ve sıcaklık gibi etkenlerden dolayı DNA ileri derecede degradasyona uğrayabilmektedir. Degradasyona uğrayan DNA küçük parçalara ayrılmaktadır. Biyolojik materyalin bozulması DNA profillemesinde başarısızlıklara sebebiyet verebileceğinden soruşturmalara yetersiz veriler sunmaktadır. Olay yerinde elde edilen materyalde genetik bilginin yüksek oranda bozulmuş veya çok az miktarda olması sebebiyle adli genetik çalışmalarının altın standardı olan STR analizleri yetersiz kalabilmektedir. Bu bağlamda, “mini-STR” teknolojisinin, adli analizlerde küçük boyutta omaları sebebiyle başarısızlık oranlarını azalttıklarından büyük öneme sahiptir. Geliştirilen mini-STR teknolojisi ile adli bilim alanında marjinal ve son derece düşük kalitedeki özellikle az miktardaki DNA örneklerinden genetik verileri elde edilebilmektedir. Degrade DNA'nın genotiplemesi yapılırken STR'lerin tekrar bölgelerine yakın yani DNA üzerinde daha az yer kaplayan PCR ürünleri 150 bp'ye kadar olan bölgeler dizayn edilmesi sonucu mini STR'ler oluşturulmuştur ve daha küçük boyutta PCR ürünlerinde başarılı DNA profillemesini mümkün kılmıştır (29, 30). Bu sayede rutin protokolde geleneksel STR kitlerinin başarısız olduğu zor örnekler için daha iyi ve tam DNA profilleri sağlamasından dolayı daha önce çözilemeyen birçok vaka mini-STR teknolojisi ile çözülebilmektedir.

2.2.3. Y STR

STR analizlerinde otozomal STR bölgeleri içerisinde erkek bireylerde farklı olarak Y kromozomu üzerindeki kısa tekrar bölgeleri de adli bilimlerde DNA analizlerinde kullanım alanı bulmuştur (31). Y kromozomunun, özellikle standart otozomal STR çalışılarak DNA

profili elde edilemediği durumlarda Y STR'ler DNA üzerindeki kapladıkları alanların küçük olması sebebi ile DNA analizlerinde kimliklendirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Y kromozomunun otozomal genler taşıyan küçük bir parçası dışında kalan bölgeleri mayozda rekombinasyona girmez ve bu sebeple Y STR'ler birbirleri ile bağlı haplotipler olarak kalıtılır. Kuşaklar boyunca baba tarafından olan tüm erkek akrabalarda Y STR profilinin aynı olması ile sonuçlanır. Özgün yapısı sebebi ile Y STR sistemleri, antik DNA çalışmalarında, birey sayısı fazla geniş ailelerde soy ağacı çıkartılmasında ve babaya ulaşamadığı durumlarda baba soyundan biri ile babalık tayininde avantajlar sağlar . Y kromozomuna özgü STR polimorfizmi kimliklendirmede olduğu kadar özellikle erkek ve kadının DNA'sının karışık olduğu cinsel saldırı örneklerinde de erkek DNA profilini ayırt etmek için kullanılmaktadır (32,33).

2.2.4. X STR

X STR analizleri, otozomal STR ve Y STR analizlerine göre daha sınırlı bir kullanım alanına sahiptir. Ancak ebeveynlerin bulunmadığı durumlarda babaanneden-kız torunun nesep tayini amacıyla kullanılır. Fetüsün kız olması şartı ile, özellikle bir kaç aylık küretaj materyalinde anne ve bebeğin biyolojik örnekleri karışık olacağından, soy bağı tayini yapılırken annenin X STR profilini elimine edip, babadan gelen X STR profile ile babalık tayini yapmak için kullanılmaktadır. Yine benzer şekillerde iki kız kardeşin babalarının aynı olup olmadığının belirlenmesinde, ensest vakalarında, kullanılabilir (34).

2.2.5. STR'lerin Adli Genetik Kimliklendirmede Kullanımı

İnsan genomu farklı uzunluklarda ardışık tekrar eden DNA sekansları içerir ve bu bölgelerdeki tekrar sayıları bireyler arasında farklılıklar gösterir. Günümüzde kişiler arası ayırım kısa ardışık tekrar dizileri (STR)'ndeki tekrar sayılarındaki farklılıkların tespiti ile belirlenir. Bu bölgelerden insan genomunda heterozigotlukları % 70'in üzerinde tanımlanmış olan 1300'den

fazla STR lokusları adli çalışmalarda tercih edilmektedir (35). STR lokuslarının seçiminde yer alan ; bireyleri ayırım gücünü oluşturabilme, lokus lokalizasyonu, yapısı, diğer STR lokusları ile tek bir PCR reaksiyonu içinde gerçekleştirilebilmesi ile çoğaltılması ve bu etmenlerin oluşturduğu ayırım gücünün güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi gibi kriterler göz önüne alınmaktadır. Çoklu STR'ler, yüksek ayırım gücü sağlaması, karışım analizlerindeki ve bozulmuş DNA içeren biyolojik materyallerdeki başarısı nedeniyle adli moleküler genetik çalışmalarında çok önemli bir yer edinmeye başlamıştır. STR lokuslarının ilk kullanılmaya başlandığı yıllarda her lokus tek tek çalışılmaktaydı, bu yöntem analiz maliyetini artırdığı ve uzun zaman aldığı için birden fazla lokusun aynı anda analizini sağlayacak kitler oluşturulmaya başlandı (36). Adli bilimlerde STR'ler aynı türün bireyleri arasında bir fark olup olmadığını araştırmakta, olay yerindeki biyolojik örneklerden kişilerin ve felaket kurbanlarının kimliklendirilmesi, akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi, evrim ve göç yollarının açıklığa kavuşturulması amacıyla etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Adli genetik çalışmalarda çoğunlukla materyaller ileri düzeyde degradasyona uğramış ve DNA içeriği 50-100 ng'dan az olan biyolojik materyallerin kimliklendirilmesi gerekebilmektedir. Adli amaçlı kullanılabilirlikleri ve popülasyonlara göre gen sıklıkları belirlenmiş STR lokusları ile çalışılarak güvenilir sonuçlar elde edilmektedir (37). Günümüzde STR lokuslarının popülasyondaki çalışmaları tamamlanmış olup alt popülasyonlarda çalışmalar hala devam etmektedir (38,39).

2.3. CODIS (Birleşik DNA İndeks Sistemi - Combined DNA Index System)

FBI (Federal Bureau of Investigation - Federal Soruşturma Bürosu) laboratuvarı özellikle şiddet içeren suçların çözümüne yardımcı olmak ve fail üzerine hızlı bir şekilde soruşturma önerileri sunarak daha fazla suçu önleme amacıyla aynı sayıda ve aynı gen bölgelerinin (lokus)

çalışılmasının hedefinde laboratuvar çalışmalarında altın standardın sağlanabilmesi ortak bir dil konuşulabilmesi amacıyla DNA veri bankaları (Combined DNA Index System) CODIS geliştirmiştir (30). 1997'de ABD'de DNA veri bankası oluşturulmuştur. Kayıp kişileri ve / veya şüphelinin tespit edilmediği davalardan delillerden elde edilen suçluların profillerini içeren veri tabanları, belirli suçları çözmek için soruşturma önerilerini sağlamak amacıyla yararlıdır (40). CODIS hiyerarşik bir veri tabanıdır. CODIS, yerel, eyalet ve federal olmak üzere üç hiyerarşik seviyede hizmet sunan veritabanıdır. Tüm DNA profilleri LDIS'te (Local DNA Index Systems - Yerel İndeks DNA Sistemi) toplanır. Ardından veriler Eyalet İndeks Sistemi'ne (State DNA Index Systems - SDIS) iletilir. SDIS, eyalet içerisindeki laboratuvarların DNA profili bilgilerini paylaşmasına izin verir. Her eyalet ve ilgili yerel kurumlar veritabanını belirli yasal veya yasal gerekliliklere göre işletmektedir. Ulusal DNA İndeks Sistemi (National DNA Index System - NDIS), CODIS hiyerarşisinde en üst seviyedir ve CODIS'e katılan laboratuvarların ulusal bir düzeyde yani ülkeler arasında DNA profillerinin karşılaştırmasını sağlar. LDIS, SDIS ve NDIS'de yerel, eyalet ve ulusal düzeyde DNA bilgilerini bağlamak için kullanılan yazılımlardır. Yazılım, farklı erişim düzeylerine (LDIS, SDIS veya NDIS) izin veren çeşitli yapılandırmalara sahip tüm sitelerde aynıdır. Yazılım sürümleri periyodik olarak güncellenir ve tüm CODIS laboratuvarlarına FBI tarafından sağlanır (41). Söz konusu veriler FBI tarafından belirlenen evrensel olarak kullanılan 13 temel STR lokusundan oluşacak şekilde CODIS sistemi oluşturulmuştur. Bugün yaygın olarak kullanılmakta olan 13 STR bölgesini içeren CODIS veri tabanı biyolojik örneklerde kimliklendirme yapmaya hızlı ve çoklu analizlere imkân sağlaması sebebiyle adli bilimler için ideal genetik işaretler olarak kullanılmaktadır. Bu lokuslar halihazırda kullanılmakta olup aşırı derecede bozunmuş biyolojik örneklerde DNA profillemeye sorunları yaşanmakta ve soruşturmalara veriler sunulamamaktadır. Bilim insanları DNA üzerinde bozunmuş örneklerde bireyleri ayırma gücü yüksek DNA profillendirmesine imkânı sağlayan yeni STR lokuslarını

bulma çalışmalarını yürütmektedirler (42,30). 1 Ocak 2017’de CODIS, hali hazırda bulunan “CODIS ideali” olarak adlandırılan 13 temel STR lokusuna ilaveten ayrıca 7 tane daha STR lokusu ilave ettiğini bildirmiştir. İlave edilen STR lokusları D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 ve D22S1045'tir. Bu ekleme ile olay yerinden gelen degrade biyolojik örneklerde kimliklendirme sorunları yaşanmasından kaynaklı eklenen bu yeni STR belirteçleri kimliklendirme çalışmaları rutin laboratuvarlarda için kullanılması için hala geliştirilmektedir (15,30).

2.4 Tek Nokta Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphisms- SNP)

SNP'ler insan DNA'sında görülmekte ve ortalama olarak her 1000 nükleotidden yaklaşık bir kez meydana gelmektedirler. Bu bir kişinin genomunda yaklaşık 4 - 5 milyon SNP olduğu anlamına gelmektedir. Bu varyasyonlar bireyler arasında benzersiz olabilmektedir. Bilim insanları dünyadaki nüfusta 100 milyondan fazla SNP bulmuşlardır (43). En yaygın olarak, bu varyasyonlar DNA'da genler arasında bulunmaktadır. İnsan genomundaki SNP'lerin sayısını tahmin etmek zor olmasına karşın farklı çalışmalarla birlikte veritabanlarında 5 milyondan fazla SNP toplanmıştır ve yaklaşık 4 milyon SNP çeşitli ana popülasyon gruplarında polimorfik olduğu onaylanmıştır (44). Genetik belirteçler gibi davranarak, hastalıklarla ilişkili genleri bulmalarına yardımcı olabilirler. SNP'ler bir gen içinde veya bir genin yanındaki düzenleyici bir bölgede meydana geldiğinde, genin fonksiyonunu etkileyerek hastalıklarda doğrudan bir rol oynayabilir (2). Adli genetik çalışmaları son yıllarda araştırmacıların ilgisini çeken bir alandır. Adli profilendirme yapılması amacı için kullanılan belirteçler 1980'lerden bu yana değişmiştir. Vakalarda kullanılan minisatellit dizileri DNA veritabanlarının oluşturulmasına temel olan daha hassas mikrosatellit belirteçleri ile değiştirilmiştir (36). Modern moleküler yöntemler ayrıca, genellikle bozulmuş DNA örneklerini tanımlamanın yolu olan tek nükleotid

polimorfizmlerinden yararlanır. Bireyler arasında varyasyonların belirlenmesi ve genetik materyalin kaynağı olan bireyin göz veya saç rengi gibi fenotipik özelliklerin belirlenmesinde aynı çeşitlilik ortaya çıkmaktadır. SNP'ler STR'lerden daha düşük mutasyon oranına sahip olup daha küçük degrade ürünlerde STR'lere göre bu özellikleri ile mukayese elverişli olmayan örneklerde daha avantajlılardır (45). SNP'ler tek bazda görülen mutasyonlardır. SNP'ler, genomda STR'lerden daha yüksek sıklıkta bulunurlar ve daha kararlıdır. Bu kararlılıkları sayesinde SNP'ler nesilden nesile aktarılıp çok fazla oranda değişmezler. 300 baz çiftinde 1 SNP yer alır bu durumda yaklaşık 17 milyon SNP vardır. Bireyler arasındaki varyasyonun % 85'i SNP nedeniyle oluşmaktadır. Popülasyon çalışmalarında takip edilmesi kolay olup evrim genetiği gibi araştırmalarda güvenilir sonuçlar verirler (43). Yüksek sıcaklık ve nem olumsuz çevre koşulları gibi faktörlerin oluşturduğu ileri degradasyona sahip kalitesiz örneklerde 150 bç'den küçük örneklerde adli kimliklendirme yapılmasına imkan tanımaktadır (46). STR lokusları ise 300 bç'den daha uzun olduğundan ileri derecede degrade örneklerde PCR başarısız olmakta SNP'ler 150 bç'den küçük olduğundan DNA çalışmalarına imkan tanımaktadır. SNP'ler transisyonlar ve transversiyonlar gibi değişimler sonucu oluşmaktadır. Son zamanlarda otozomal SNP lokuslarının teknolojik gelişmeler ile birlikte bilgi birikimi gün geçtikçe artmakta, çok sayıda SNP panel sistem çalışmaları yapılmaktadır (47).

2.4.1. SNP'lerin Adli DNA Kimliklendirmesinde Kullanımı

STR'ler uzun yıllar boyunca adli çalışmalarda DNA analizlerinin altın standardı olmuştur. Ancak SNP'lerin adli genetikte suç davaları, afet mağdurları tespit etme ve babalık ve akrabalık soruşturması testleri gibi her türlü yasal sorunu çözmeye çok yararlı olduğu gösterilmiştir (67). SNP'lerin, adli çalışmalar için onları çok uygun kılan bir takım özelliklere sahip olmasından dolayı bilim insanlarını rutin laboratuvar çalışmalarında ve adli süreçte SNP belirteçlerini kullanmaya teşvik etmektedir. SNP'lerin adli çalışmalara katkılarına bakıldığında ilk olarak,

çok düşük mutasyon oranlarına sahiptir. İkincisi, yüksek verimli teknolojiler kullanarak analizi için çok uygundur. Veri tabanı ve otomasyon için ve özel olarak kısa ampliconlarda bile genetik analizleri yapılmaktadır (43). Bu sayede çok küçük ampliconlara (çoğaltılan gen ürünü) dayalı ayırma gücü oldukça bozulmuş olay yerinden elde edilen numunelerde daha iyi tespit çalışmalarının yapılmasını sağlar (48). SNP'ler fenotipleme için çok ayırım gücü yüksek bir genetik işarettir. STR bazlı çalışmalara benzer olmakla beraber yanı sıra genetik olarak güçlü ayırım elde etmek amacıyla çalışmalarda SNP lokuslarının sayıca STR'lere göre daha fazla olması beklenir. SNP'lerin dezavantajı bu yöndedir. Gerekli SNP'lerin sayısı STR'lerin sayısının ortalama olarak dört katıdır. Rutin olarak kullanılan 10-15 STR lokuslarına ait genetik ayırma gücüne uyan bir 52 SNP lokusu geliştirilmiştir. Adli alanda kullanılan multiplekslerden daha fazla benzer bir ayırım gücüne sahip olmak için yaklaşık 60 SNP gereklidir. SNP çalışmalarının maliyet avantajları hala net değildir. Standartlaştırma ve araştırmalar arası doğrulama deneyleri ile adli alanda SNP'lerin kullanımı anahtar görevi görecektir. Rutinde kullanılmasada büyük ölçekli genotipleme projeleri ile birlikte SNP çalışmaları hız kazanacaktır. SNPforID konsorsiyumu 'dan 52 SNP multipleksi adli çalışmalar için SNP paneli geliştirmiştir (47). Geliştirilen 52-pleks SNP'nin degrade örneklerde STR analizine göre daha iyi performans gösterdiğini ancak kontaminasyon ve primer kalitesi ile ilgili ek sorunlar da var olduğunu bildirmişlerdir (48,49). Ayrıca Kidd tarafından geliştirilmiş olan bir diğer 44-pleks sisteminin 52-pleks sistemine kararlı sonuçlar vermiştir (50). Fenotipleme sayesinde olay yerinden elde edilen biyolojik kalıntılardan şüphelinin görünüm özellikleri tahmin edilebilir. SNP validasyon çalışmaları ile DNA test sistemleri geliştirilmiştir bu testler bireylerin görünüşü hakkında tahmin etme imkanı tanımakta bireylerin göz rengi ve saç rengi tahmin etme gibi kalıtsal fenotip bilgilerini kullanmaktadır (47). Genomda SNP bölgesinin nerede olduğuna bağlı olarak fenotipik seviyede varyasyonlar oluşturabildikleri için kodlanan bölgelerde proteinlerin işlev ve yapılarını değiştirebilirler bazende intron bölgede yüksek

oranda yer almasından dolayı fenotipik varyasyonda hiç bir etkiye sebep olamazlar (45). SNP'ler kimliklendirme, nesep belirleme, soy belirleme, fenotip belirleme gibi ileri derecede parçalanmış DNA örneklerinde çalışma imkanı sunmasıyla büyük potansiyele sahiptir. Günümüzde kısmi profil elde edilen örneklerde bile 120 SNP bölgesi çalışılarak ya da mitokondrial DNA'nın tümünü dizinleyerek yeni nesil dizileme teknolojileri (Next Generation Sequencing; NGS) ile yüksek verim elde edilebilir ve sadece adli bilimlerde değil çok farklı bilimsel alanda avantaj sağlamaktadır. Ticari kitlerde, 124 SNP seçilerek %99,999' luk ayırım gücü yakalanmaya çalışılmıştır. Tüm bunlara rağmen SNP'lerin STR teknolojisinin yerini almaktan ziyade birlikte kullanıldıklarında daha başarılı sonuç elde edileceği bildirilmektedir (49).

2.5. Biyolojik Deliller ve DNA Kaynakları

Canlıların vücudundan kopan, düşen veya akan her türlü delile biyolojik delil denir. Biyolojik delillerin incelemesinde temel amaç; DNA'ya ulaşmaktır. Adli bilimlerde ise DNA analizlerin asıl amacı, suç mahallerinden elde edilmiş örnekleri şüphelilerden ve mağdurlardan referans örnekler olarak toplanan örnekleri şüphelilerle karşılaştırmak, mahkemeye sunulabilecek bir bilimsel teknik rapor ile materyalin mevcut durumu hakkında bilgi vermektir.

Biyolojik materyal olduğu düşünülen bulguların tespiti için olay soruşturmalarında öncelikle ne tür bir bulgu olduğunun tespiti ve sonraki yapılacak çalışmalarda ise kime ait olduğu veya olabileceğine ilişkin çok büyük önem arz etmektedir. Çünkü bu biyolojik materyalden elde edilen bilgiler birlikte DNA'nın aracılığı ile genetik profillendirilme yapılabilmesi mümkündür. Tarama ve doğrulama testlerinin en önemli avantajı bulgunun yerinin belirlenmesinin yanında, delil niteliği taşımayan örneklerin elenmesini sağlamak ve gereksiz DNA analizi çalışmasının yapılmasının önüne geçilmesi ve böylece zaman kaybının ve

ekonomik kayıpların önlenmesini sağlamaktır. Bu sebepten dolayı biyolojik kalıntılar düşünüldüğünde çalışmalar içerisinde ilk akla gelen DNA'dan genetik profillemeye yapılması gelmektedir. Biyolojik kalıntıların doğası gereği çevresel etkenlerden etkilenebilmektedir ve bunun sonucu olarak DNA miktarı ve kalitesi düşmektedir (51,52). Biyolojik kalıntılar, olay yerinde çok az miktarda olduğundan çok dikkatli, uzmanlık gereken olay yeri inceleme ekipmanları ile en fazla materyal temin edilecek şekilde çalışılmalıdır. Cinayet olaylarında veya saldırı gibi şiddet olaylarında olay yeri incelemesi için olay mahallindeki kan lekelerini ortaya çıkarmak kritik öneme sahiptir. Olay yeri genellikle şiddet suçlarını kapsadığından en çok karşılaşılabilecek biyolojik materyal kan ve kan lekeleridir (53,54). Semen ve semen lekeleri, vajinal sıvı, pubik kıl, saç kıl, diş, kemik ve doku (tükürük, tırnak altı, kepek, mide içeriği, temas ile yüzeyde kalan hücreler, vücuttan giysilere vs. dökülen, yiyeceklerde, sigarada, bardakta kalan kalan epitel hücreleri) adli genetik çalışmalar için olay yerinden elde edilen biyolojik delil niteliği taşıyabilecek kalıntılardır. İçerisinde hücre içermeyen örneğin balgam, sümük, kusmuk, cerehat, ruj lekesi, idrar, gaita vb. kalıntılarında çok az sayıda epitel hücre içerebilmesinden dolayı biyolojik delil olabileceği ve DNA elde edilmesine olanak sağlayacağını gösteren çalışmalarda yapılmıştır (55-56).

Son yıllarda ise çalışmalarda bilim ve teknolojinin de gelişmesi ile şüphelinin olmadığı durumlarda olay yerinden gelen biyolojik materyalden bir takım veriler elde etmek mümkün olabilmektedir. Bunlar arasında fenotipe özgü SNP'ler kullanılarak şüpheliye ait fiziksel özelliklerin belirlenmesi, biyocoğrafik soyun belirlenmesi ve olay yerinden gelen biyolojik materyalin yaşının belirlenmesi ile birlikte olayın aydınlatılması örnek olarak sayılabilir (57).

Bazı vakalarda olay yerinden örnekler toplansa da karşılaştırmaya konu olacak şüpheliler olmayabilir. DNA veri bankası bulunmadığında ise şüpheliye ulaşmak mümkün olmayabilir. Bu durumlarda olay yerindeki biyolojik materyal olayın oluş zamanını verirken hem de ifadelerdeki çelişkileri ortadan kaldıracak nitelikte anamnezleri doğrular ya da reddeder. Olay zamanını

belirlemek soruşturmaya yön verecek, şüpheli çemberini daralatacak nitelikte bir adımdır (58). Biyolojik örneklerden elde edilen mRNA'lar DNA'da saklı bulunan kalıtsal bilginin protein yapısına aktarılmasında kalıplık görev yapan bir RNA türüdür. Doku-vücut sıvısına özgü genler ve mRNA biyobelirteçleri son zamanlarda tanımlanmış olmakla birlikte; vücuttan çıktıktan sonra yarılanma ömürleri olduğundan olay zamanını belirlemek soruşturmaya yön verebilmek adına geleneksel yöntemleri desteklemek amacıyla doku-vücut sıvısına özgü genler ve mRNA biyobelirteçleri yapılan son çalışmalarda geliştirilmektedir (59-60).

2.5.1. Biyolojik Delillerden Kan ve Kanın Yapısı

Kan, plazma ve şekilli elemanlarından oluşur. Kan içeriği %55'i plasmadan, %45'i hücrelerden oluşan bir vücut sıvısıdır ve plasmanın %91'i su, %8'i proteinlerden, %1'i ise organik asit ve tuzlardan oluşmakta ve protein kısmında yer alan önemli bir protein fibrinojen bulunmakta ve fizyolojik olarak kanın pıhtılaşmasında son adım olarak önemli derecede yer almaktadır. Bu kısımda belirtilen diğer proteinler ise albümin, alfa-beta ve gama globulindir. Globulin ise, antikor görevi yapmaktadır. Albumin ise oluşturduğu ozmotik basınçla plazmadaki sıvının damar dışına kaçmasına engel olmaktadır. Hücresel kısım oluşturan ise eritrosit, lökosit ve trombositlerdir. Trombositlerde de çekirdek bulunmaz bu nedenle, esas DNA içeren hücre tipi lökositlerdir (61). Kan, kolloit bir madde olup içeriği homojen bir madde gibi görünse bile, heterojen bir karışım halindedir. Plazmanın asıl amacı, kanın dokuların ilgili bölümüne taşınmasını sağlamaktır. Eritrositler, kan hücrelerin çoğunluğunu oluşturmakta ve çok özel bir yapı olan hemoglobulini barındırmaktadır. Hemoglobulin çok özel bir yapıdır, toplamı globin olarak adlandırılan 2 alfa ve 2 beta olmak üzere 4 polipeptid yapısından oluşur. Kana kırmızı rengini veren de hemoglobindir. Her bir polipeptid zincirine bir hem yapısı bağlıdır. Oksijen taşımayı her bir hem yapısındaki Fe⁺² iyonu ile yapar (62-63).

2.6. Biyolojik Delillerin Belgelenmesi, Toplanması, Korunması Ve Paketlenmesinde

Genel Kurallar

Olay yeri, suç ve fail üçgeninin arasındaki ilişkinin kurulabilmesini sağlayacak delilleri barındıran ve bu sebeple delillerin toplaması, saklanması, transferi kriminal çalışmalarda inceleme aşamasında atılacak adımların en önemli kısmını oluşturmaktadır. Laboratuvar aşamasında çalışan personel ve kullanılacak cihazlar ne kadar ileri teknolojiye sahip olursa olsun alınacak sonucun doğruluğu olay yerinden elde edilen bulgunun kalitesi ile sınırlı olacaktır. Olay yerinden elde edilen biyolojik materyal üzerinde başarılı bir DNA analizi yapılması bulguların örneklerin toplanma ve korunmasına bağlıdır. DNA çalışma usullerinde yapılan hatalar çalışmanın niteliğini oluşturmaktadır. Olay yeri güvenliği sağlanmalı güvenlik sağlanan bölgeye sadece görevlilerin erişimi olmalı ve giriş çıkışlar kontrol altına alınmalıdır. Olay yerine dikkatle bir şekilde, herhangi bir delile zarar verilmeden girmelidir. Olay yerine uygun ekipman ve özel tek kullanımlık tulum, eldiven, ağız maskesi kullanılmalıdır. Bu sebeple olay yerine gidecek ilk ekibin olay yeri sınırlarını oldukça geniş tutmalı ve güvenliği sağlanmalıdır. Eğer DNA delili uygun bir şekilde paketlenmez ise transfer DNA olabilir. Biyolojik bulgunun bozulmasına sebebiyet verebilecek çevresel etmenlerden dolayı biyolojik kalıntı delil özelliğini kaybedebilir bu sebeple olay yerinden toplanacak her bulgu delil niteliği taşıyabileceği göz önüne alınarak bozulmaya meyil verecek davranışlardan kaçınılmalıdır. Olay yeri çalışmaları usulüne uygun yapılmalıdır. Prosedüre uyulmadığında söz konusu DNA çalışmalarını etkileyebileceği bilincinde olunmalıdır. STR teknolojisi ile 20 yıldan fazla bir süre boyunca oda sıcaklığında depolanmış kan lekelerinde dahi kimliklendirme yapılabildiği bildirilmiştir (64). Ayrıca, hemoglobine beta gibi kandaki mRNA belirteçlerinin kan lekelerinde saptanabilir olduğu adli genetik incelemelerden elde edilen sonuçların saklama koşulları üzerinde çok büyük etkisi olduğu gözlenmiştir (65).

2.6.1. Delillerin Belgelendirilmesi

Laboratuvar incelemeleri için olay yerinde elde edilen bulgular oldukça yön göstericidir ve bulguların delil niteliği kazandıklarında soruşturmanın akışını değiştirebilmektedir (66,67). Bu sebeple delillerin kaybolmaması ve birbirine ilişki kurulabilmesi amacıyla her bir detayın kaydedilmesi önem taşımaktadır (68). Olay yerinde delilin bulunduğu orijinal koşullar ve pozisyonu kayıt altına alınmadan önce hiçbir şekilde değiştirilmemelidir. Delile dokunmadan, hareket ettirmemeli toplanmadan önce olay yerinde bulunduğu şekilde numaralandırılmalı, toplayan kişinin adı soyadı, tarih, saat ve hava durumu bilgisi verilmeli delil paketine etiketlenmelidir. Her delil numaralı ve numarasız şekilde ayrı ayrı bulgunun özelliklerine uygun şekilde fotoğraflandırılmalı fotoğraf (logu) kaydı tutulmalı ve olay yeri referans konumlarla bilgisi ile fotoğraflar ilişkilendirilmeli buna uygun olay yeri krokisi çizilmelidir (69). Tüm kayıtlarda fotoğraflar şekilde kronolojik kaydetmeye ve olay yerine girildiği ilk andan itibaren birbirini takip edecek şekilde boşluk bırakmadan fotoğraflama yapılmalıdır. Çünkü olay yerinde her adım birbirini tamamlar niteliktedir. Olay yerinden ayrıldıktan sonra detayları hatırlamak amacıyla olay ile ilgili notlar ve video kaydı alınmalıdır (70).

2.6.2. Delillerin Toplanması

Biyolojik kalıntılarda patojenler olabileceği, hem çapraz kontaminasyonu engellemek hem de delil toplayan kişinin kendisini de muhtemel enfeksiyona karşı koruması amacıyla; eldiven, maske, bone ve tek kullanımlık önlük kullanılmalıdır. Doğru paketlenme çok önemlidir bulgu kontamine olabilir ve doğru saklanmazsa yapısında bozulma olabilir. Makas, pens gibi örnek almada kullanılan aletler numuneye özgü ve her zaman her bir örnek için tek kullanımlık olmalıdır. Eldiven sık sık değiştirilmelidir (30). Deliller tek tek ve ayrı şekilde toplanmalıdır. Delil toplama alanında yiyecekler yenilmemeli ve sıvı içecekler tüketilmemelidir. Islak numuneler toplanırken öncelikle kurutulmalı çevresel etmenlerin delilin kalitesini düşürmesini

önlemek amacıyla kurutulmuş vaziyette kağıt zarflarda saklanmalıdır. Her türlü delil için mukayese örneği olarak sanık ya da mağdurdan kan, saç örneği, ağız içi svab alınmalı ve laboratuvara gönderilmelidir (71,72).

2.6.2.1. Kan Lekelerinin Toplanması Sırasında Yapılması Gerekenler

Adli vakaların aydınlatılmasında biyolojik lekelerin önemi büyüktür ve olay yerinden toplanan ve incelemeye gönderilen kalıntının büyük bir kısmını kan lekeleri oluşturmaktadır. Bu lekelerin toplanması saklanması ve incelenmesi kurallara uygun yapılmalıdır. Aksi takdirde laboratuvarında analiz kısmında biyolojik kalıntılardan veri elde edilemez. Kan lekeleri olay yerinde, bir fiil esnasında vücutta açılan bir yaradan çıkan veya kan akması ile meydana gelebileceği gibi, bir fiile bağlı olmadan da ağız, burun, kulaklar gibi deliklerden akış ile meydana gelebilir. Kan lekeleri, taze iken parlak kırmızıdır. Güneş ışığında pıhtılar koyu kırmızı, beyaz ışıkta ise parlak, yarı seffaf, koyu kırmızıya yakın bir renk skalası içinde görünürler. Canlıdan akan kan yıkansa bile, bulaştığı yerden kolay kolay çıkmayabilir ancak ölü kanı, bulaştığı yere pıhtı halinde bulastığı için yıkandığında çabuk temizlenir. Olay yerinden elde edilen materyalin kan lekesi olduğuna dair bir takım tarama ve doğrulama testleri kullanılır. Tarama testlerinin olay yerinde yapılması ve bu testlere göre örnek alınması daha idealdir. Bu tarama ve doğrulama testleri sayesinde olay yeri inceleme ekibine olay hakkında fikir verir (73). Kan lekesi büyük boyuttaki objelerden kazınarak, kesilerek özel yapışkan bantlar kullanarak ve özel bir nemli beze (svab) yada özel kağıtlara emdirilerek toplanılabilir. Büyük ve taşınmaz objelerde bu yöntemler daha kolay uygulanabilir olacaktır. Başka bir yol ise kan lekesine birkaç saf su damlatılarak ardından spatül ile kazınarak yumuşaması sağlanıp pipet yardımıyla numune toplama tüpüne aktrılması ile kan lekesi alınabilir. Islak kan lekeli çamaşırlar temiz bir ortamda direk güneş görmeyecek şekilde kurutulup paketlenmelidir. Islakken hava geçirmeyen, plastik bir malzeme içine konursa kan

lekesi bozulmaktadır. Bu nedenle kuruyan giysiler kâğıt malzeme kullanılarak temiz bir zarf içerisine paketlenmelidir (30).

2.6.3. Delilin Korunması ve Paketlenmesi

Depolama koşulları başta olmak üzere delilin korunması ve paketlenmesi adli DNA örnekleri için oldukça önemlidir. Özellikle delilin yeniden incelenmesi gerektiği durumlarda, numuneler yeni teknolojiler kullanılarak test edilmesi gerektiğinde adli kimliklendirme için önemli olduğundan, DNA'nın korunması gerekir. Özetle, laboratuvar çalışmaları için DNA degradasyonu engellenmelidir. Biyolojik delillerin DNA analizi için toplanan numuneler +4 °C 'de saklanmalıdır (30, 72). Toplanan delillerde oluşabilecek küf ve bakteri çoğalması gibi aşırı sıcak nemli ortamlarda tutulmamalı ve nemi alan ve kurutmaya yardımcı olacak kağıt zarflarda tutulmalıdır. Delille ilgili bir tutanak tutulmalıdır. Bu tutanakta delilin ayrıntılı tanımı yapılmalı ve delile uygun paketleme metodları seçilmelidir. Örnekler ideal şekilde ayrı ayrı ve tek şekilde paketlenmeli ve laboratuvar çalışmalarına gönderilmeden önce uygun sıcaklık koşullarında kuru ve soğuk ortamlarda tutulmalıdır. Biyolojik kalıntılar temiz bir şekilde paketlenmeli üzerine delil numarasını tarih, saat, toplayan görevlinin ismi, olay numarası ve delil numarasını bulundurmalıdır. Muhakkak delil teslim zincirini takip edecek şekilde delil paketi mühürlenip, imzalanmalıdır.

2.6.4. Delilin Laboratuara Teslimi Ve Laboratuvar Süreci

Olay yerinden toplanan biyolojik bulgular temiz bir ortamda doğal seyri ile havada kurutularak ayrı ayrı ambalajlanmış bir şekilde etiketlenerek gönderilmelidir. Etiket üzerine tarih, saat, şahsın ismi, delilin bulunduğu yer, toplayıcının ismi, olay numarası ve gösterim numarası yazılmalıdır. Gelen delil işleme alınmadan önce ilk olarak paketin açık olup olmadığına dikkat

etmelidir. Delilin mühür, imza ve etiketinin tam olması kontrol edilmelidir. Delil verileri çalışma için kabul edildiğinde delile ait laboratuvar kodu verilmelidir ve ilgili yere kaydı sisteme yapılmalıdır (71,72). DNA delillerini toplayanlar ile bu materyaller üzerinde çalışanların çok özel eğitimlerden geçmesi şarttır. Öte yandan laboratuvarın kalite güvencesi ancak akreditasyon ve dış kalite kontrolü ile sağlanabilir. Delil açılacak ortamın temiz ve kontaminasyonu engelleyecek havalandırma sistemine sahip olması gerekmektedir. Delil açılmadan önce tek kullanımlık beyaz bir delil açma kağıdı serilmelidir. Deliller, kontaminasyonu önlemek için temiz bir ortamda açılmalıdır. Delili açan kişilerin bone, maske, eldiven ve tek kullanımlık önlük giymesi ve sık sık eldiven değiştirmesi gerekir. Delil tutanak kağıdına delil açıldıktan sonra ayrıntılı şekilde bilgi verilmelidir. Bu bilgilendirmeler delilin genel anlamda boyutu çeşidi miktarı rengi hakkında olmalıdır. Delil açma odalarında kamera sistemi ile kayıt altına alınmalı her delil için delil mührü açılmaya başlamadan önce ve işlem bitinceye kadar kayıt altına alınıp sözlü bir şekilde bilgi verilmelidir (72).

2.6.5. Kan Lekeli Kıyafet ve Kumaşların İncelenmesi

Olay yerinin multidisipliner şekilde analizi ortamda bulunabilecek her türlü bulgunun olayın çözümünde yardımının olabileceğinin bilinci ile olayın incelenmesi ile olay ile ilgili kişilerin ve durumun orjin tayininin kolaylıkla yapılmasını sağlayacaktır. Benzer şekilde otopsi yapılacak olan bir cesedin, varsa elbiseleri üzerinde yoksa vücudu üzerindeki kan lekelerinin dikkatli bir şekilde incelenmesi ve belgelendirilmesi de orijin tayininde faydalı bilgiler verebilmektedir (75). Kıyafet incelemeleri olay yerinde maktülün üzerinde ise bulunduğu şekil ve pozilyonda fotoğraflandırılmalı ve çevresel etmenlerden etkilenmemesi amacıyla korumaya alınmalıdır (74) . Eğer olay yerinde tıbbi girişimler sebebiyle çıkarıldıysa, kan lekeli kumaş parçasında bulunan delik ve yırtıklar not edilmelidir. Söz konusu kumaşlar ıslak ise kurutulmalı ve kağıt zarfa konulmalıdır. Kan lekeli bölgelerden adli genetik kimliklendirme amacıyla örnekler toplanmalıdır. Kanın yapısından dolayı kan lekeleri HGB, yani hemoglobin, kanda

demir molekülü içeren kırmızı kan hücrelerinde bulunan kompleks bir protein içermektedir. HGB, zamana bağlı olarak çevresel etmenlerden etkilenmekte kırmızı kan hücrelerinin hava ile teması sonucunda dört oksijen molekülünü kaybedebilmekte ve bu sebeple zamana bağlı kırmızı renkten kahverengiye ve yeşile doğru renk değişimi göstermekte olduğundan personelin bu durumu göz önüne alarak olay yerinde bulunan örneklerin çalışmaya başlaması amacıyla kurallara uygun ve olabilecek en hızlı şekilde laboratuvar transfer sürecini gerçekleştirmelidir (76).

2.6.5.1. Kan Tanımlama Testleri

Giysilerdeki kan lekelerini tespit etmek için birçok varsayım testi kullanılır. Araştırmacılar tarafından, taze dökülen- sıçrayan kanın neye benzediğini bilebilir ancak kumaş, ahşap, demir, cam, taş vb. materyallerin üzerindeki lekelerin gerçekten kandan kaynaklandığını belirlemek kolay değildir (77). Lekenin rengi mat kırmızıdan kırmızımsı kahverengiden kirli griye kadar herhangi bir renkte olabilir; çünkü ışığa ve havaya uzun süre maruz kalmış olabilir, yağmurla kar sularıyla seyretmiş ya da suçlanan kişinin suçluluğunun kanıtlarından kurtulma çabalarıyla yıkanmış olabilir. Kan için çoğu tanımlama testlerinin hemoglobinin peroksidaz aktivitesinin etkininden kaynaklı olduğu görülmektedir. Hemoglobin ve yapısında bulunan demir iyonik formadaki birçok organik bileşik ile birlikte halkasal bir yapıya benzer bir şekilde şelat oluşturabilir. Demir oksidasyon reaksiyonlarında katalitik aktivite gösterebilir. Günümüzde en yaygın kullanılan tanımlama testleri yalnızca kan için özgül değildir (78). Meyve gibi peroksidaz aktivitesine sahip olan ajanların yüzeylerinde bulunabilir bu sebeple kan tanımlama testlerinde iki farklı tanımlama yöntemi ile tespit edilmesi tavsiye edilir. Fenolftalein içeren test ayrıca kan için çok popüler bir test olan Kastle-Meyer testi olarak da bilinir (79). Söz konusu leke bir bez veya filtre kağıdı ile toplanır ve daha sonra numuneye fenolftalein reaktifi ve hidrojen peroksit uygulanır. Numune hemoglobin içeriyorsa, sonuç

hidrojen peroksit ilavesinden sonra numune fenolftaleinin oksidasyonu ile pembe renge döner (80). Her ne kadar kimyasal maddeler ve bitkisel peroksidazların varlığında yanlış pozitifler bildirilmiş olsa da, test 10.000'de kanı 1 olarak seyreltilmiş olan kanı tespit edebilir (81-82). Ek olarak, bu test DNA analizini içeren veya daha sonraki testlerde numuneye zarar vermez. Fenolftalein, hemoglobin ile temas edince, pembe renk oluşturan peroksidaz enzimleri salar ancak patates peroksidazla reaksiyon verebilmektedir (83). Kimyasal testler genellikle belirli bir vücut sıvısıyla temas ettiğinde belirli bir reaktifin renk değişimine veya kemilüminesans parlama esasına dayanır. Luminol ise görünmez kan lekelerini tespitinde halılara ve mobilyalara sıkılarak oradaki kan lekelerini karanlıkta hafif ışık açığa çıkarmak için kullanılan bir kimyasaldır (78). Bununla birlikte, luminolün, bakır içeren kimyasal bileşikler, belirli ağartıcılar, tükürük ve çeşitli hayvansal ve bitkisel proteinler dahil olmak üzere diğer maddelerle reaksiyona girdiği bilinmektedir. Luminol testi, diğer tarama testlerine kıyasla nispeten yüksek hassasiyet, özgüllük ve kolay kullanımı nedeniyle popüler olmaya devam etmektedir. Kan lekelerini karanlıkta metalik mavi hafif ışık açığa çıkarmak için kullanılan bir kimyasal olduğundan kullanımı sınırlıdır. Luminol, DNA'ya zarar vermeden daha hassas ve kararlı sonuçlar verir ve böylece lekelerin daha sonra genotiplenmesini sağlamada yardımcı olur (86-87). Adli bilimlerde kullanılan kan testlerden biride spesifik antikor-antijen reaksiyonuna dayanan immünolojik testlerdir. Mevcut kanın insan kanı olup olmadığını tanımlanması çalışmaya başlamadan önce immunokromatografik bir test olan Hema Trace Testi ile sağlanabilir. Bu test iz miktardaki kan lekesindeki hemoglobini tespit eder (85). 150 µl ortalama 4 damla 'S' ibaresi olan yere damlatılıp ıslatılması sağlanır. Eğer dökülen kan insan kanı ise hemoglobin hareketli monoklonal antihuman hemoglobini ile antikorları ile reaksiyona girer ve 'T' bölgesinde sabitlenmiş vaziyette olduğundan burada pembe renkli bant oluşturacaktır. Bu insan kanı olduğunun tespitini yapar. 'C' bölgesi ise kontrol bantıdır. Bu bölgede insan hemoglobin antikoruna ve boya bileşimi T bölgesinde bağlanamaz ve C

bölgesindeki sabit antikorlar sayesinde tutulurlar. 'C' bölgesindeki tek bant görülürse negatif sonuç gösterilir. İki bandında görülmemesi test hata olduğunu gösterir ve tekrar edilmesi gerekmektedir (87). HemaTrace'in hem laboratuarda hem de olay yerlerinde insan kanının tanımlanması için son derece hassas, kullanışlı ve hızlı bir test olduğunu göstermiştir (24). Ek olarak, adli genetikte son gelişmeler ile birlikte dokuya özgü RNA ekspresyonunun insan vücut sıvılarının tanımlaması amacıyla kullanılabileceğini ortaya koymuştur (58).

2.6.5.2. Kan Lekelerinin Luminol ile Görünürleştirilmesi

Luminol testi, 50 yıldan fazla bir süredir adli soruşturmalarda, olay yeri incelemelerinde ön identifikasyon amacıyla kan ve kan lekelerinin görselleştirilmesine imkan tanınmasından dolayı araştırmacılar tarafından kullanılmaktadırlar. Luminol, görünür olmayan kan lekelerini görünürlüğünü arttırmak için kullanılan bir reaktif maddedir ve adli bilimler içerisinde kullanımına sunulan bu tür reaktiflerin içerisinde en hassas tarama testlerinden biridir. Açık formülü 5-amino-2,3 dihidro-1,4-fitalazinedion'dur. Luminol reaksiyonu kimyasal bir reaksiyondur. Gözlemleyebilmek için karanlıkta değerlendirmek gerekir. Çıplak göz ile görülmesi mümkün olmayan çok az miktardaki kan veya yıkama teşebbüsünde bulunmuş kan örneklerinin tespitinde kullanılmaktadır. Luminol ile kan bulgusunun olduğu tahmin edilen bölgeye püskürtmek suretiyle gerçekleştirilir (87). Sprey formunda olan olay yerinde uygulanabilen luminol çözeltisi kandaki hematin ile reaksiyona girerek ultraviyole (UV) ışık altında güçlü floresans metalik mavi ışık vermektedir. Parlama olan bölgede kan lekesi ve kan olması ihtimali göz önünde bulundurulur. Bakır içeren pirinç, bronz gibi alaşımlarla, meyve/sebze peroksidazları yalancı pozitiflik göstermektedir. Bu sebeple Luminol incelemesi bir olasılık belirtmekle beraber kesinlik göstermemektedir (88). İncelenecek bölgeden numune alma amaçlı kullanılabilir. Luminol, yükseltgenici ajan kaynağı olarak hidrojen peroksit, sodium karbonat ve sodium perborat kullanıldığı bir çözelti şeklinde hazırlanır. Ortamda kan

var ise demir atomu katalizör görevi görür luminolün oksidasyon reaksiyonu ile elektronlar oksitleyici ajan sodyum perborat aktarılır ve kararsız enerji bakımından düşük olan haline dönüşürken fazla enerjileri ile gözle görülürülür olan lüminesans olarak geri yansır. Kullanımı kolaydır ve DNA analizi için iz kanıtları sağlarken fenolfitaleyn testi gibi herhangi bir sağlık riski oluşturmaz. Bununla birlikte, özellikle İngiltere ve diğer bazı Avrupa ülkelerinde kullanımı, esasen reaktifin insan sağlığı ve güvenliği ile ilgili endişeler nedeniyle sınırlı olmuştur. Luminolün insan sağlığı ve güvenliği ile ilgili literatürü gözden geçirilmiş ve yazarların görüşüne göre, luminol çözeltisinin hazırlanması ve bunun olay yerinde veya laboratuvarında uygulanmasıyla ilgili önemli sağlık ve güvenlik kaygılarının olmadığını göstermektedir. Çalışmalarda insan üzerinde etkisi 1990'lara kadar çalışılmamış ve çok az çalışma mevcuttur. Luminolün yarılanması insanlardaki mekanizması farelerde benzesede luminol dermal absorpsiyon, dokularda biyoakümülyasyon ve kronik toksisite için çok az potansiyele sahip olabileceği bildirilmiştir (84,85).

Kumaş ve kıyafet incelemesi için genellikle tercih edilen yöntemdir. Suç sırasında giyilen giysiler genellikle suçlular tarafından tahrip edilir veya yıkanır. Luminol uygulanmış taze kan örnekleri eski kan lekelerine kıyasla daha zayıf luminesans ışımaya gösterdiği bildirilmiştir (79). Kan lekesinde Fe'nin Ferröz durumda bulunduğu, kan lekesi hemoglobinin methemoglobine dönüştüğü ve demirin de Fe⁺³, yani ferrik duruma geçtiği, hidrojen peroksit eklendiğinde ise demirin Fe⁺⁴ yani durumuna geldiği, luminolün oksidasyonu sırasında ise demirin tekrar Fe⁺⁴'ten Fe⁺³'e indirgendiği, böylelikle demirin tekrar tekrar da reaksiyona girebildiği, yani luminol tekrar püskürtüldüğünde ise daha güçlü olarak reaksiyon gerçekleşebilmektedir. Kuru ve yapısı bozulmuş kan lekelerinde kemilüminesans ışımaya reaksiyonu göstermektedir (89). Kumaşlarda kan izlerinin ortadan kaldırılması, genel olarak tahmin edildiğinden daha zordur. Yüksek sıcaklıklarda ve yoğun kimyasala maruz kalmış yıkanmış kan lekeli

kumaşların tespitinin çıplak gözle görülemediği durumlarda Luminol'ün bu düşük miktardaki konsantrasyona sahip şüpheli kan örneğinin identifikasyonunu sağlamaktadır (86-90).

2.7. Biyolojik Delillerin Laboratuvarda Analizi

Genotipleme, DNA'da bulunan bilgilerin canlı türleri arasında genetik varyasyonun moleküler prensiple ölçümünü sağlayan bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Belirli DNA bölgelerinin diğerine karşı farklılıkları ve benzerlikleri ile bireyler arasında ayırım yapılmasına izin verebilir. Genotipleme genel itibari ile Adli Bilimler'de genetik kimlik tespiti ve akrabalık tayininde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. STR analizleri, adli amaçlı DNA tiplendirme ve genetik hastalıkların tespitinde rutin olarak uygulanan moleküler biyolojik yöntemlerle temelde aynı prensip ile çalışılmaktadır. Genel hatları ile biyolojik delillerin laboratuvarda analizleri aşağıdaki basamaklardan oluşabilmektedir.

- **DNA'nın izolasyonu:** İçinde bulunduğu hücreden DNA'nın çıkarılması,
- **DNA Miktar tayini:** DNA'nın ng/µl cinsinden miktar tayini,
- **DNA'nın Amplifikasyonu:** Analiz cihazının görebileceği ölçülere kadar DNA'nın çoğaltılması
- **Elektroforez:** Çoğaltılmış moleküllerin ilerleme hızındaki ve görülen büyüklük farklılıklarına göre örneğin genetik materyalin yürütülmesi
- **Analiz:** Anneden ve babadan gelen allere göre örneğin profilinin belirlenmesi

Bu prensip ile STR lokusunu PCR ile amplifiye ederek elde edilen PCR ürünü DNA amplikonlarını kapiller elektroforez veya jel elektroforez ile büyüklüklerine göre analiz edilmesi ile yapılmaktadır (87,91) . Her lokusun tekrar sayısı ile elde edilen her ticari kitin kendine uygun alelik merdiven ("allelic ladder") ile karşılaştırılması ile saptanmaktadır (87) . İlk aşama olarak izole edilen DNA'nın çoğaltılması amacıyla amplifikasyonu elektroforez ve

sonuçların değerlendirilmesi ve genotiplendirme kısmı olarak 4 ana başlıkta detaylı olarak incelenmiştir. PCR ile çoğaltılan allelerin moleküler biyolojide çok tercih edilen DNA moleküllerinin yüksek çözünürlükte ayrılmasını sağlayan elektroforez ile fragmanlar birbirinden ayırarak alel uzunluklarının ölçümü ve değerlendirilmesi yapılır.

2.7.1. DNA İzolasyonu

Adli bilimlerde, DNA ekstraksiyonunun iki ana amacı vardır. Birincisi, DNA profilini gerçekleştirmek için bir numuneden yeterince çok verimli DNA çıkarmaktır. İkincisi, daha sonraki analizler için yeterince saf bir şekilde DNA elde etmektir. DNA izolasyonu sağlandıktan sonra, DNA'nın doğru bir şekilde ölçülmesi sonraki analizler için önemlidir. DNA miktarının doğru bir şekilde ölçülmesi ve ayrıca DNA ekstrakt kalitesi bilinmesi PCR'ye doğru miktarda DNA eklenmesi, en kısa sürede en iyi kalitede sonuçları üretecektir. DNA'yı izole etmek için birçok yöntem vardır ancak hangi yöntemin kullanılacağına seçimi, örnek tipi ve miktarı gibi bir dizi faktöre bağlıdır. Diğer bir önemli faktör ise laboratuvar personelinin tecrübesidir. Bu durumda DNA izolasyonu temelde 3 aşamadan meydana gelir (92-93).

1. Hücre duvarının parçalanması
2. DNA protein kompleksinin çözülmesi
3. DNA'nın denatüre protein ve diğer hücresel bileşenlerden ayrılması

2.7.2. DNA Amplifikasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR- Polymerase chain reaction), DNA replikasyonunun benzer bir şekilde sıcaklık ile taklit edilmesi olarak tanımlanabilir (18). Bu işlemin invitro koşullarda bir tüp içerisinde hızlı bir şekilde ard arda döngüler olarak tekrarlanmasıyla DNA miktarının artırılmasını sağlayan bir metoddur. İnsan Genom Projesi gibi kapsamlı araştırmalar içerisinde yürütülmüş, tıbbi alanda araştırmacılar gen dizileri, hastalıkların teşhisi amacıyla

genomik çalışmalarda kullanılmışlardır (94). DNA içerisinde yer alan dizisi bilinen iki segment arasındaki bir veya birden fazla bölgenin kimyasal olarak sentezlenmiş oligonükleotid primerler tarafından enzimatik sıcaklıkla DNA'nın çoğaltılma metodudur. PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin amplifikasyonunu sağlayan basit ama çok başarılı bir invitro DNA sentezi yöntemidir. PCR; DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir. PCR döngüsü temelde denatürasyon aşamasında DNA molekülünün çift zincirli yapısı yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır (94°C). Denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendi eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar bu aşamaya bağlanma denir (50°C-65°C). Son aşama olan uzama safhasında ısı 72°C'ye kadar arttırılarak DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması sağlanır. Çalışma ard arda tekrarlanan döngüler ile birlikte DNA fragmanlarının çoğaltılması esasına dayanmaktadır (95).

2.7.3. Elektroforez

“Electro” yunanca elektrik enerjisi, “Phoresis” ise, “phoros”tan türetilerek içinden taşımak anlamına gelmekte ve genel anlamda, özel bir sıvı ortamda, parçacıkların içerdikleri elektriksel yüke göre farklı hızda ve farklı yönde hareket etmesi sonucu, bütün bir maddenin yapısındaki farklı maddelerin ayırt edilebilmesini sağlayan bir inceleme yöntemidir. Elektroforezin çalışma ilkesi molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yükten diğerine giderken kat ettiği mesafe farklılıklarını ele almaktadır. DNA izolasyonu ve çoklu PCR çalışmasından sonra elde edilen çok sayıda farklı alle sahip DNA'ların elde edilmesine müteakip çalışma elektroforezle ayrılma işlemi için jel elektroforez veya kapiller elektroforezle ile metod uygulanır. Bahsedilen ayrılma işlemi DNA yapısında sahip olduğu fosfat grupları ve H⁺ iyonu ve tampon içinde negatif yüklenmesi sayesinde oluşan elektirik alanda DNA, negatif alandan

pozitif alana göç hareketi gerçekleşir (96). Agaroz ya da poliakrilamid matriksinden geçirilen bir elektrik akımıyla hareket ettirilir bu işleme 'koşurma'adı da verilir. Elektroforez aygıtında oluşan direncin tamamı jel tarafından oluşturulur. Direnç, akımın geçtiği bölgenin alanının ve kullanılan tamponun iyonik kuvveti ile ters orantılıdır (82) . Belli bir akım oluşturma amacıyla jelin kalınlığının veya tamponun miktarının ve iyonik kuvvetinin azalması direnci artırır; böylece jel boyunca oluşan voltaj derecelenmesi ve jele uygulanmış molekülün elektroforetik göç hızı artar. Sistemin oluşturduğu güç, direnç akımın karesinin çarpımına eşittir. Üretilen güç ısı şeklinde ortaya çıkar ve elektroforez aygıtı, jelin sıcaklığını artırmaksızın ancak belli miktarda gücü dağıtabilir. Bu nedenle voltajın üst sınırı genellikle elektroforez aygıtının ısıyı dağıtma yeteneğine bağlıdır. Bu bağlamda hareketin hızı moleküler büyüklüğe göre değişim gösterip küçük moleküller daha hızlı büyük moleküller daha yavaş ilerlemektedir (83).

PCR ile çoğaltılmış DNA, elektrokinetik yöntemle kapiller boru içerisinde sabit voltaj ve sabit sıcaklıkta anot kutba doğru hareket ederken lazer ışığı primerin işaretli olduğu boyaya denk geldiğinde; boyanın dalga boyuna göre farklı renklerde yansır ve kapillerden geçen bu numune dedektör paneli ile foto reseptör olarak algılanır. Bu sayede DNA molekül ağırlığına göre mesafe kat ederek ölçümü gerçekleştirilmiş olacaktır. Ancak bu özellikten yararlanmak için önceden büyüklüğü bilinen standart bir örneğin ölçümü yapılacak olan diğer DNA 'larla birlikte elektroforeze tabii tutulması gerekmektedir (84-85).

Modern yüksek teknoloji barındıran adli bilimlerde DNA analizlerinin kullanılması şüphesiz, hedeflenen DNA polimorfizmlerinin tanımlanması ile mümkün olmaktadır. Kapiller elektroforez, 1980'li yılların sonlarında uygulanan tekniklerden biri olmasına rağmen hızla uzman kişilerin ilgisini çekmiş ardından 1990'lı yılların ortalarına doğru ise bu yöntem kısa sürede benimsenmiş ardından rutin laboratuvarlarda gerçekleştirilen analizlerde tercih sebebi olmuştur. Adli bilimlerde elektroforez işlemleri kapiller elektroforez ile yapılmaktadır. Agaroz ve poliakrilamid jeller ile gerçekleştirilen elektroforez bireylerin genotiplerini

saptamada standart ve geleneksel yöntemler içerisinde bulunmaktadır. Adli bilimlerde ihtiyaç duyulan hedeflenen bireysel genotiplerin saptanması amacıyla yöntemin hızlı, güvenilir, tekrarlanabilir olması gerekmektedir. Agaroz ve poliakrilamid jel elektroforez çeşitlerinin dezavantajlarının bulunması sebebiyle STR analizlerinde kapiller elektroforez tercih edilmektedir (96-97). Agaroz ve poliakrilamid jel ile çalışırken elle müdahale kontaminasyon riski barındırdığından, jel hazırlamadaki zahmetli işlemlerin mevcudiyeti, nörotoksik maddeler içermesi ve verinin elektronik ortamda işlenememesi bu elektroforez yöntemlerinin tercih edilmeme sebeplerindedir. Otomotize edilmiş olan kapiller elektroforez uygulamada güncellenilebilir mekanizmalarıyla birlikte dezavantajlara sahiptir. Kapiller elektroforez, bu çok yönlülük ve disiplinler arası yaklaşımlarda adli bilimlerde uzman kişiler için daha çok benimsenmiştir. (97).

2.7.3.1. Kapiller Elektroforez

Kapiller elektroforez, 1990'lı yılların başında rutin adli analizlerde uygulanmış olan elektroforetik hareket kabiliyeti, faz ayırımı ve moleküler boyuttaki farklılıklara göre elektrokinetik ayırım yapan bir tekniktir. İnce bir kapiller tüp iki elektrot, ikili tampon, yüksek voltajlı güç kaynağı, lazer kaynağı, floresan dedektör, numune enjeksiyonu ve tespitinin yapılabileceği bir bilgisayardan meydana gelmektedir. Jel elektroforezde olduğu gibi kapiller elektroforezde ayırıcı ortam vardır ve DNA anottan katoda doğru hareket eder. Ayırıcı ortam polimer çözeltisi ile doludur (98). DNA örnekleri numune tepsisine doldurulur ve sırasıyla kapillere enjekte edilir. Yüksek volt altında fragmentler birbirinden ayrılır. Ticari kitler, STR analizleri için floresans boya ile işaretlenmiş PCR primerleri ile işaretlenmiş haldedir. Ürünler lazer ışını ile uyarılır ve bu sayede veriler bilgisayar ortamından analiz edilir (99,30). Dış bir elektiriksel alanın etkisi ile yüklü bir parçacığın çözelti içerisine yönlendirilmesi ve ardından

uygulanan bu potansiyel fark ile oluşan elektiriksel alan etkisi kılcal kanallarda iyon akışını gerçekleştirmektedir. Kapillere dedektörlerle bakıldığında ise önce hızlı bileşenlerin sonra yavaş bileşenlerin geçtiği görülür. İyonik tamponun gücü ve pH molekülün kütesine elektrotlar arası sıcaklık uzaklığına ve şekline göre benzer konformasyondaki bir çok yüklü molekülün biçimine değil molekül ağırlığına göre doğrusal alanda ayrılmasını sağlamaktadır. Kapiller boruların çapının küçüklüğü yüksek voltaj ile ayırım yapmasına imkan sağladığından yüksek oranda daha doğru ve iyi ayırım sağlamaktadır (96-97). Ticari kitler içerisinde bulunan “Liz size standart” DNA büyüklük belirteçidir. Elde dilen pik boylarının PCR ürünlerinde hesaplanmasında kullanılmaktadır. Allelik Ladder ise PCR ürünlerinin hangi alel ile eş olduğu gösteren bir cetveldir. Ticari kitler içerisinde bireyler arasında ayırım yapılabilmesi amacıyla en sık görülen alellerde oluşan büyüklüğü bilinen veya hesaplanmış örnekler kullanılmaktadır. Kapiller elektroforez, tamamen otomatize sistem olmasından kaynaklı adli bilimlerde özellikle örneklerin çoklu bir şekilde az miktardaki DNA örneğinin varlığında hızlı çalışılması ve veri analizinin bilgisayar ortamda dizayn edilmiş olması sebebiyle sonuçların kayıt altına alınmasını sağlamaktadır (96). Ayrıca adli laboratuvarlarda kişilerin profillerinin elde edilmesinin ardından kimliklendirme için elektroforez tercihinde öne çıkmaktadır (100).

2.7.4. Sonuçların Değerlendirilmesi Ve Genotiplendirme

STR genotipi lokus içinde bulunan aleller olarak bilinir ve tanımlanması bu alellerin tekrar sayısı ile ifade edilmektedir. DNA elde edilip kalite ve miktar açısından değerlendirildikten sonra olayla ilgili sorunun cevaplandırılmasına yönelik olarak DNA profili çıkartılır. DNA molekülüne bağlanmış olan floresans boyalardan elde edilen sinyaller elektroforezde molekül ağırlıklarına göre ölçülmekte ve bu elektroforemlarda alellere ait renk, pik boyutu ve alanı ile DNA parçaları ilişkilendirilir ve size standart ile boyutlandırılır. Tekrar sayısı bilinen bir allelik ladder ile pikler isimlendirilir ve ölçüm cetveli olarak kullanılır (103).

Veriler araştırmacı tarafından değerlendirilir ve sonuçlar olay yerinden elde edilen biyolojik materyal ile oluşan profil ile aynı yöntem kullanılarak elde edilen olayla ilgili şahıslara ait mukayese profil karşılaştırılır ve sonuçların yorumlandığı bir rapor haline getirilir (101,102).

2.8. Biyolojik Materyalden DNA Eldesini Engelleyen Faktörler

Adli DNA profillendirme teknikleri temel olarak, PCR rnlerinin boyutunun veya dizisinin belirlenmesine dayanır. DNA'nın parçalanması veya ayrıştırma işlemi sırasında ortaya çıkabilecek yapısal değişiklikler, prosedürlerin sonuçlarını etkileyebilir. Bu durum olay yerinden başlamakta ve materyalin transfer sürecini de kapsayan ve analiz kısmı sırasında çok büyük problemlerle karşılaşılmaktadır. DNA, ift sarmal şeklinde bulunan negatif yüklü bir polinkleotittir. DNA degradasyonu ise bu polinkleotitlerin ayrılması yada küçük DNA'nın daha küçük parçalara ayrılması olarak tanımlanmaktadır. DNA degradasyonunda temel mekanizması endojen nükleazların fosfodiester bağlarını hidroliz etmesidir. Söz konusu durum DNA çalışmalarını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu degradasyona sebebiyet veren durumlar genellikle analizlerin yapılacağı laboratuvara gelmeden başlayabilir ve belirlenmiş bölgelerden kaliteli DNA elde edilmesini engelleyebilir (5). Bu faktörlerin ana kaynağı delilin kontaminasyonu ve buna bağlı olarak DNA degradasyondur (76).

2.8.1.Kontaminasyon

DNA kontaminasyonu, adli genetikte en sık rastlanan hata kaynaklarından biridir ve ciddi sonuçları olabilir. Adli bilimlerde DNA örneğinin yolculuğu olay yerinde başlar. Bu nedenle, bu olayları önlemek ve kontaminasyon en aza indirmeye prosedürlerinin etkileri için önlemler almak şarttır. Delil haricinde dış ortamdan gelen DNA'nın delildeki DNA ile bulaşması, karışması gibi herhangi bir durum oluşması kontaminasyona sebebiyet verir. DNA'ya zarar

veren enzim üreten mikroorganizmalar, insan DNA'sının degradasyonuna sebep olacağı için, DNA analiz sonuçlarında sıkça sorun yaşanmasına ve bu sebeple kontaminasyon çalışmayı negatif yönde etkiler. Kontaminasyonun ilk kaynağı gerekli önlemler alınmadıkça olay yeri olmaktadır. Çalışmalar ile delillerin bulunduğu yerde olay yerinde bulunan ve genomik DNA içeren delillerin toplanması sırasında oluşabileceği ve farklı tipteki biyolojik materyallerin usulüne uygun toplanmaması ile birbirine bulaşması yani çapraz kontaminasyona sebebiyet verebilir. Olay yerinde bulunan kişilerin gerekli önlemleri almaması veya özeni göstermemesi nedeniyle kendi DNA'ları ile delili kontamine edebilirler. Bu sebeple delil özelliği taşıyan her bulguya dokunurken ve incelerken DNA transferini engellemek için tek kullanımlık tulum, eldiven, maske ve bone kullanılmalıdır (30). Olay yerinin olduğu bölgeye bant çekilmeli meraklı kalabalık uzak tutulmalı giriş ve çıkışları uzman personel haricinde olay yerine erişim kısıtlanmalıdır. Personelin olay yerindeki delilleri kontamine etme potansiyeli sebebiyle incelemeler doğruluk, tarafsızlık ve gizlilik ilkesine bağlı bir şekilde yerine getirmelidir. Olay yeri inceleme timlerinin kalite yönetim sistemi kapsamında standardizasyon ve akreditasyon çalışmalarının yürütülmesi ve ekibe ait araç, gereç, malzeme, teçhizat teminine yönelik faaliyetlerin mevcudiyeti ile ana ve sarf malzeme durumlarının güncel tekniklere uygun olarak takip edilmesi gerekmektedir. Muhtemel transferi önlemek için olay yerinde mümkün olduğunca DNA örnekleri alınmadan hiçbirşeye dokunulmamalı ve bulaşmaları saptamak amacıyla olay yeri ekibinde çalışan her personel DNA profilleri kayıt altında olmalıdır (104). Kontaminasyonların yaklaşık % 86'sı olay yeri ekibinden kaynaklanırken, yalnızca % 11'i adli genetik laboratuvar çalışanlarından ve % 3'ü diğer kaynaklarla örnek olarak pozitif kontrol çalışmaları biyolojik materyalin oluşturduğu kirlilikler ile ilişkilendirilmiştir. Kontaminasyonu azaltma amaçlı uygun prosedürlerin uygulanmasından sonra % 70'den daha fazla kontaminasyonun azaldığı gözlemlenmiştir (105). Laboratuvar çalışmalarında DNA izolasyon ve STR analizlerinde kullanılan malzemelerden kaynaklanan kontaminasyonun engellemesi

amacıyla pipet ucu ve tüplerin her örneğe özgü olması ve analize uygun materyalin hazırlanması amacıyla steril olması gerekmektedir. Rutin laboratuvar çalışmalarda bir önceki PCR işlemi sırasında amplifikasyonu yapılan DNA'nın bir sonraki örneğe bulaşması ile kontaminasyon gerçekleşebilir. Söz konusu kontaminasyonun önlenmesi amacıyla DNA izolasyonunda steril otoklav işlemi görmüş DNA içermeyen sarf malzemeleri kullanılmalı ve olası kimyasal içermemesi amacıyla kontrollerin sağlanması gerekmektedir. DNA transferi önlemek amacıyla tüm çalışılan DNA örneklerine ait bir veri sistemi oluşturulmalı ve kayıt altında tutulmalıdır ki adli makama rapor yazılmadan önce çapraz kontaminasyon var ise tespit edilmeli ve karşılaştırma yapılmalıdır. Moleküler tanısal analiz ve yaşam bilimleri çalışmalarının başarısı için biyolojik numuneleri etkin bir şekilde analiz için hazırlama yeteneğine bağlıdır (76). Nükleik asitlerin numune hazırlanmasını sağlayan tamamen otomatik numune hazırlamayı sağlayan numune hazırlama işleminin her adımını taklit eden sarf malzeme ve sarf malzemesi modül sistemleri geliştirilmiştir (101). DNA çalışmalarında bu otomatik sistemlerin kullanılmasıyla laboratuvar uzman personelinin örnekler ile direkt temasının azaltılması ve bu sayede kontaminasyon riskinin düşmesi hedeflenmiştir. Laboratuvar çalışmalarının kontrolü kontaminasyon yöntem tespitlerinden biri negatif kontoldür. PCR tabanlı çalışmalarda her işlem kontaminasyon çalışan personel tarafında negatif kontrolü sağlanmalı ve tedbirler alınmalıdır. Negatif kontrol, kontaminasyona sebep olabilecek DNA elde edilecek olan materyali etkileyeceği düşünülen her türlü durumun dışlanması hedeflenmiştir. DNA'sı çalışılacak örneğin farklı serilerdeki tüplerde çalışılması, DNA izolasyonu, PCR öncesi hazırlık ve PCR işlemleri farklı ayrılmış alanlarda yapılması, laboratuvar uzman personeline ait DNA profillerinin verilerinin tespit edilmesi çalışılan delile ait profiller ile karşılaştırılması gibi adli laboratuvarlarda kalite standartlarına uygun çalışılmasıyla kontaminasyon olasılığı azaldığı bildirilmiştir. Ancak kontaminasyon tüm önlemler ve prosedürlere rağmen tam anlamıyla engellenememektedir (100-101).

2.8.2. Degredasyon (Bozunma)

DNA , yapısını ciddi şekilde etkileyebilecek olan reaktifler tarafından sürekli saldırıya uğrar. DNA'daki yapısal modifikasyonlar farklı reaktif türlere maruz kalmaları nedeniyle oluşan bazı modifikasyonlardan kaynaklanır (106). Bu yapısal modifikasyonlar mutasyon, kanser ve diğer birçok hastalıkta rol oynar. DNA degradasyonu, moleküler bir sistem içerisinde endojen ve ekzojen kaynaklı lipazlar, nükleazlar ve farklı proteaz sınıfları dahil olmak üzere çeşitli hücre içi enzim çeşitlerinin aktivasyonu ile DNA yapısında meydana gelen hasarlardır. Genel anlamda DNA'nın moleküler bütünlüğüne karşı endojen ve ekzojen kaynaklı etmenler rol almaktadır (42). DNA'da meydana gelen hasarın tipine uygun olarak hasar onarım mekanizması devreye girmekte ve hasar tamirinin gerçekleştirilmesi sonucu genomik kararlılık sağlanmakta ve canlı hayatını sürdürebilmektedir. Bu hasar tamir mekanizmaları hasarlı DNA'nın çıkarılması ve DNA çift zincirinin yeniden onarılması , DNA hasarlarını kontrol eden noktalarında düzeltilmemiş ve onarılmamış kodların hücre döngüsünde ilerlemesini engellenmesi ve tekrardan onarım mekanizmasının kontrol noktalarının aktivasyonu ile hasarlı kromozomun genetik aktarımın önlenmesi, gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde programlanması ve hasar görmüş hücrelerin engellemesi (programlı hücre ölümü, apoptoz ve transkripsiyonel cevap) ile meydana gelen hasarın önlenmesi sağlanır (107). DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları kimyasal ajanlar, çevresel ajanlar, insan genomik DNA'sının kararlılığına karşı tehdit etmektedir. Çift ve tek zincir kırıkları insersiyon ve delesyonlar ve DNA-protein çapraz baz oluşumu DNA hasarlarına örnek olarak verilebilir (109-30). Isı ve nem gibi çevresel faktörler de DNA'nın bozulmasını hızlandırabilir. Örneğin, plastik olarak paketlenmiş ıslak veya nemli deliller, DNA kanıtlarını yok edebilen bakteriler için bir büyüme ortamı sağlayacaktır. Bu nedenle biyolojik kanıtlar tamamen kurutulmalı, kağıt zarf ile paketlenmeli ve uygun şekilde etiketlenmelidir. Bu şekilde kullanıldığında, DNA oda sıcaklığında bile yoğun bozulma riski olmadan yıllarca saklanabilir (108). Olay yeri hem

mekansal hem de biyolojik örneklerin yapısı itibari ile bu tip hasarlara açık durumdadır. Olay yerindeki biyolojik materyale genetik materyalin moleküler bütünlüğüne etkisi olan etmenler sayısız derecede kombinasyonlar ile var olmaktadır. Bu etmenler aşağıda genel itibari ile belirtilmiştir.

Endojen Kaynaklı (Spontan) Etmenler

1. İnsersiyonlar ve delesyonlar
2. Kimyasal değişimler; deaminasyon, metilasyon
3. Baz kayıpları; depürinasyon/depirimidinasyon
4. Oksidatif hasar
5. Replikasyon hataları
6. Nokta Mutasyonları

Ekzojen Kaynaklı (Çevresel) Etkenler

1. **Kimyasal ajanlar:** Aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, hava kirliliği vb.
2. **Fiziksel ajanlar:** UV radyasyon, iyonize radyasyon
3. Virüsler, mikroorganizmalar

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında sağlıklı rastgele seçilmiş, bilgilendirilmiş ve DNA örneklerinin bu çalışmada kullanılmasına rıza gösteren, aydınlatılmış onam formu dolduran 10 gönüllüden 5 ml kan örneği alındı. (ayrıca bkz, Bilgilendirilmiş Onam Formu Ek-1). Çalışma için Üsküdar Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'na 30\06\2019 tarihli 06'nolu toplantısında 61351342-\2019-339 sayılı etik kurul kararı ile 'Yıkanmış Kan Lekelerinden DNA Elde Edilmesi' adlı araştırma projesi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir (ayrıca bkz, Ek-2, Ek-3). Çalışma gönüllülerinden toplanan kan örneklerinden, temsili olay yeri elde etme amacıyla bekletilmeden naylon ve pamuk kumaş parçalarına 2'şer damla olacak şekilde emdirilerek kan lekelemeleri yapıldı ve ardından oda koşullarında kurutuldu. Kumaşlar olası kontaminasyonları engelleme amacıyla lekeleme yapılmadan önce UV ışık altında 60 dakika tutuldu. Söz konusu olan kumaş parçaları steril makasla kesilip, lekeleme yapılmadan önce olası bir transfer ve kontaminasyonu önlemek amacıyla öncelikle çamaşır makinesinde yıkama haznesi deterjanlı ardından hazne boş bir şekilde 90°C derecede 2 kere yıkandı ve temiz bir bölgede oda koşullarında kurutuldu. Lekeleme yapılan farklı türdeki kumaşlar çalışma için belirenmiş olan çamaşır makinesinde Türkiye'de en market raflarında en çok bulunan çamaşır deterjanı (Persil) tercih edilerek, bu markanın önerdiği miktar ile çamaşır makinesinde 40°C, 60°C ve 90°C 'de standart programda yıkandı ve ardından oda koşullarında kurutuldu. Lekelenmiş çamaşırlardan yıkamadan sonra metrik cetvel kullanılarak fotoğraflanıp kayıt altına alındı. Kan lekesine luminol püskürtülerek tespit ve fotoğraf makinesi ile görüntüleme yapıldı. Yıkanmış ve kurumuş olan lekeli kumaşların her birinin lekeli kısımlarından 4' er adet kesilerek ependorf tüplere konuldu ve alınan örneklerin bir tüpünden Fenol-Kloroform İzomil Organik yöntemi ve QIAamp DNA Mini Kiti (Qiagen) mini spin kolon protokollerine uygun olarak 2 ayrı yöntem ile izolasyon işlemi gerçekleştirildi. İzolasyon işleminin ardından DNA

miktar ölçümü için Allsheng-Nano 400A spektrofotometre cihazı kullanıldı. İzole edilen DNA, PCR 'de amplifikasyonu sağlandı ve kapiller elektroforezde yürütüldü. Elektroforez sonucu farklı sıcaklıklarda çamaşır yıkama prosedürlerinden elde edilen elektroforegramlar kullanılarak adli soruşturmalarda kullanılmak üzere bireye ait DNA profillmesi için yeterli DNA elde edilip edilmediği belirlendi.

Deneyle belirtilen plana göre gerçekleştirildi :

- Kumaşların temini ve hazırlanması
- Örneklerin Toplanması
- Toplanan kan örneklerinin kumaşlara kan lekesinin oluşturulması
- Kan lekelerinin fotoğraflanması
- Kan lekelerinin farklı sıcaklıklarda yıkanması
- Yıkanmış kan lekeli kumaşların Luminol ile görünürleştirilmesi
- Yıkanmış kan lekelerinden DNA izolasyonu
- Farklı sıcaklıklarda yıkanmış kan lekeli kumaşlardan izole DNA miktarının belirlenmesi
- PCR aşaması
- PCR ürünlerinin elektroforezi
- Verilerin analiz aşaması ve sonuçların değerlendirilmesi

3.1.Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışmanın aşamaları Üsküdar Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Kompleksine ait Laboratuvarlar'ında gerçekleştirildi. Bu çalışmada yıkanmış kan lekelerinden adli soruşturmalarda kullanılan DNA profillemesi için yeterli DNA elde edilip edilmediği belirlendi. Öğrenci Laboratuvarında bulunan demirbaş cihazlar ve laboratuvar ekipmanları ile

gerçekleştirildi. Tez çalışmasında kullanılan cihaz, malzeme ve kitlerin listesi detaylı bir şekilde verilmiştir.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar :

- 3500 Genetik Analizatör 3500 Genetic Analyzer for Human Identification (Applied Biosystems)
- Bilgisayar (Dell)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Çamaşır Makinesi (Regal, Pratica 5080 TY A++)
- Distile Su Cihazı PURELAB Option – Q (Elga)
- Etüv (Nüve)
- Fotoğraf Makinesi Alpha 35 (Sony)
- Isı döngü cihazı (Thermal Cycler (PCR) Veriti™ 96-Well (Applied Biosystems)
- İnkübatör - Heating Block (Four E's Scientific)
- Mikropipet Seti (Isolab)
- Nano Spektrofotometre (Allsheng-Nano 400As)
- Otoklav (Nüve)
- Santrifüj (Nüve)
- Vorteks (Velp)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Kullanılan Kitler:

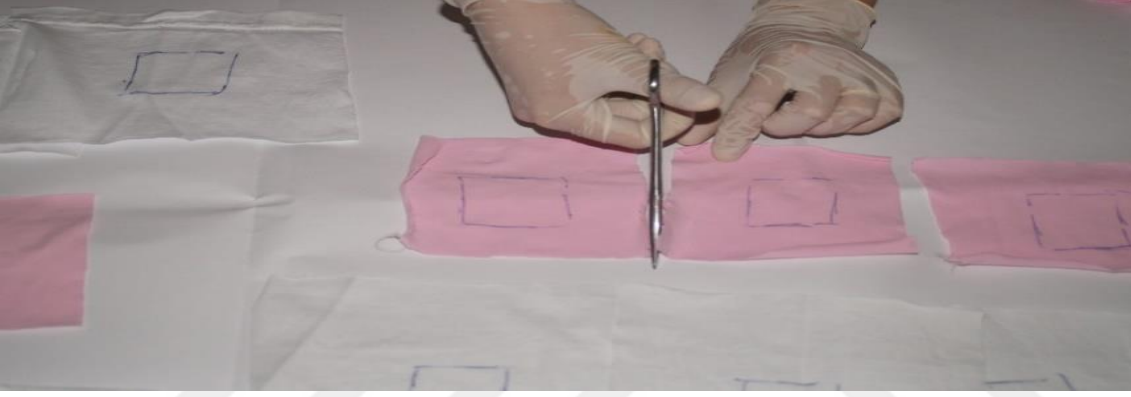
- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- The GlobalFiler PCR Amplification Kit

Kullanılan Kimyasallar:

- DNA Control 9947A
- EDTA (Thermo Fisher Scientific)
- Etanol (%96- 100)
- Fenol Kloroform İzooamil Alkol (25:24:1)
- GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0 (Applied Biosystems)
- Hi-Di Formamide (Applied Biosystems)
- NaCl
- Proteinaz K (Qiagen)
- RNase-free water (Thermo Fisher Scientific USA)
- SDS - Sodyum dodesil sülfat (Thermo Fisher Scientific USA)
- Tris Base (Thermo Fisher Scientific USA)

3.2. Kumaşların Temini ve Hazırlanması

Pamuk ve naylon türlerine ait kumaşlar sıfır paketli raf ürünlerden temin edildi. Ardından öncelikle çamaşır makinesinin içerisinde çamaşır deterjanı koyularak ve daha sonrasında kumaş parçası makinenin yıkama haznesi boş bir şekilde ard arda 90°C yıkandı ve kurutuldu. Herhangi bir transfer ile kontaminasyona sebep vermemek amacıyla 1 saat fazla bir süre UV kabin içerisinde bekletildi. 10x10 cm boyutunda kare şekli biçiminde steril makas yardımı ile kesildi (Şekil 1) .



Şekil 1: Kumaşların lekeleme için hazırlanması (Fotoğraflar Işıl Tuna Erdoğan'a aittir.)

3.3.Kan Örneklerin Toplanması

Aydınlatılmış onam formu imzalatılmış ve çalışma için bilgilendirilmiş 10 kişiden enjektör ile etik kurulda belirtilen miktar olan 5 ml miktarında kan alındı.

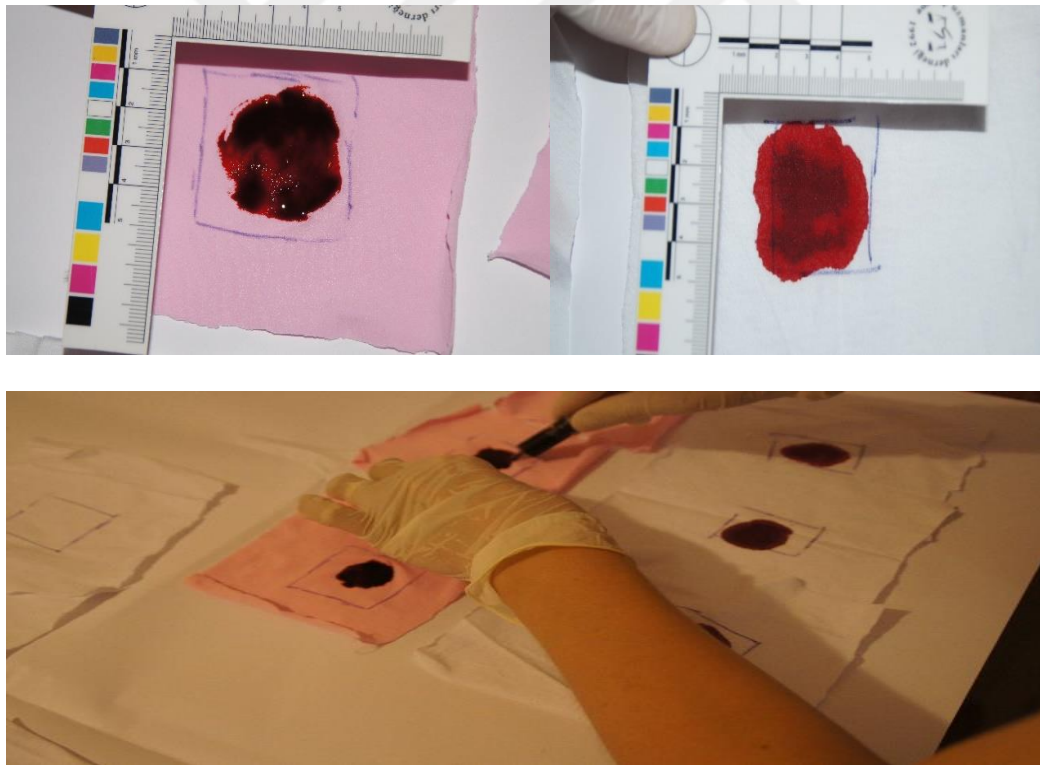
3.4.Kumaşlara Kan Lekelerinin Oluşturulması

Bu çalışmayı gerçekleştirebilmek için 6 erkek ve 4 kadın donörden kan toplandı. Yıkamalar gerçekleşmeden önce makine boş bir şekilde 90°C derecede ön yıkama programı ile birlikte

çalıştırıldı. Sonra her bir kumaş lekelenmeden önce kontaminasyonu önlemek için 90°C derecede ön yıkama programı ile yıkanıp UV ışık altında bekletildi.

Donörlerden taze toplanan 5 ml kan, bekletilmeden enjektör yardımıyla hazırlanmış olan naylon ve pamuk türündeki kumaşlara 2' şer damla arka ve ön kısmına emdirilerek lekeleme yapıldı. Bu kan lekeler ortalama 30 ml kanla ve 50 mm² alana uygulandı. Lekelenme işleminden sonra kumaşlar bulaşma olmaması amacıyla birbirlerine değdirilmeden muhafaza edildi.

Kan lekeli kumaşlar, oda koşullarında temiz bir bölgede kurutuldu ve ardından fotoğraflandırıldı. Kurutulan kumaşlar yıkama prosedürüne ve donör kodlarına göre kağıt zarflarına ayrı ayrı paketlenildi.



Şekil 2: Kan lekelerinin naylon ve pamuk kumaşlara oluşturulması

3.5. Kan Lekelerinin Yıkanması

Kan lekeli pamuk ve naylon türdeki kurutulmuş kumaş parçaları Regal Pratica 5080 TY A++ 800 Devir 5 kg Çamaşır Makinesi ile Türkiye’de market raflarında en kolay elde edilebilen çamaşır deterjanlarından biri (Persil) ile markanın tavsiye edilen deterjan miktarı olan normal su sertliğinde, 40°C, 60°C ve 90°C ‘de standart programda çamaşır detarjanının içindeki yumuşatıcı ile birlikte her örnek ayrı ayrı yıkandı ve ardından oda koşullarında kurutuldu. (104).

3.6. Luminol Hazırlama ve Kan Lekelerinin Görünürleştirilmesi

Bu çalışmada Pionner Forensic marka Luminol kiti kullanılmıştır. Protokole göre; Bileşik A (Su, Luminol) ve Bileşik B (Sodium Perborate, Monhydrate) karıştırıldı (105). Karıştırılan bileşik yıkanmış kan lekeli örneklerle püskürtülüp karanlıkta incelendi. Kana özgü metalik mavi parlama olup olmadığı değerlendirildi.

3.7. DNA İzolasyonu

İzolasyon çalışması için her bir numune için kesilen örneklere numara verildi. Yıkama derecelerine ve donöre göre kodlandı. Kodlamalar her örnek için ependorf tüpe yazıldı. Luminol ile parlama yapan bölgelerden kesim işlemi yapılan yıkanmış kan lekeli kumaşlardan 0,5 cm’lik 3 parça her örnek için steril makas yardımıyla kesildi. 1.5ml’lik ependorf tüpe tek kullanımlık pens yardımı ile aktarıldı.

3.7.1. Yıkanmış kan lekelerinde örnek hazırlama DNA izolasyon protokolü:

Yıkanmış kan lekeli kumaşlardan DNA izolasyonu için Qiagen QIAamp® DNA Mini Kit’in (DNA Purification from Dried Blood Spots) protokolü çalışmaya uygulandı (110). Bu yöntemle bilgilendirilmiş onam formu imzalamış 10 gönüllü kişiden elde edilen numunelerden her bireye ait ayrı 40°C, 60°C ve 90°C’de yıkanmış pamuk ve naylon türündeki kumaşlardan

toplam 60 tane örnek izole edilmiştir. Bütün santrifüj aşamaları oda sıcaklığında (15-25 °C) gerçekleştirilmiştir. İzolasyon prosedürü aşağıda verilmiştir.

1. Yıkanmış kan lekeli materyalden 0,5 cm'lik 3 parça her örnek için steril makas yardımıyla kesildi ve küçük parçalara ayrıldı. 1.5ml'lik ependorf tüpe tek kullanımlık pens yardımı ile aktarıldı.
2. Üzerine 180 µl Buffer ATL tamponundan eklendi ve 10 dakika 85 °C'de inkübe edildi.
3. Tüp üzerine 20 µl Proteinaz K eklendi ve vortekslendi.
4. Tüp 56 °C'de 1,5 saat inkübasyona bırakıldı. (10 dakika aralarla ter düz edildi)
5. Tüplerin kapağındaki damlacıkların aşağı inmesi için santrifüj edildi.
6. 200 µl Buffer AL eklendi ve 10 saniye vortekslendi.
7. 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
8. 200 µl %96-100 saflıkta etanol eklendi ve vortekslendi. Elde edilen karışım QIAamp® mini spin kolona aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Tüpte kalan sıvı boşaltıldı.
9. 500µl AW1 tamponu eklendi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpte kalan sıvı boşaltıldı.
10. 500µl AW2 tamponu eklendi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. tüpte kalan sıvı boşaltıldı.
11. QIAamp® mini spin kolon steril 1,5µl'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
12. 150µl AE tamponu eklendi. Oda ısısında 1-2 dakika inkübe edilerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. DNA'lar -20 °C'ye saklanma amacıyla parafinlenip buzdolabına kaldırıldı.

Yıkanmış kan lekeli kumaşlardan DNA izolasyonu için Fenol Kloroform İzomil Organik İzolasyon protokolü çalışmaya uygulandı (87). Bu yöntemle bilgilendirilmiş onam formu

imzalamış 10 gönüllü kişiden elde edilen numunelerden her bireye ait 40°C, 60°C ve 90°C’de yıkanmış pamuk ve naylon türündeki kumaşlardan toplam 60 tane örnek izole edilmiştir.

Bütün santrifüj aşamaları oda sıcaklığında (15-25 °C) gerçekleştirilmiştir. İzolasyon prosedürü aşağıda verilmiştir.

1. Numune ve son ürün ayrı olacak şekilde kodlamaları ile birlikte tüpler ayrı ayrı hazırlandı.
2. Yıkanmış kan lekeli materyalden 0,5 cm’lik 3 parça her örnek için steril makas yardımıyla kesildi ve küçük parçalara ayrıldı. 1.5ml’lik ependorf tüpe tek kullanımlık pens yardımı ile aktarıldı.
3. Numune tüpüne sırasıyla 400 µl TE tamponu, 45 µl NaCL solüsyonu, 40 µl SDS (%10’luk hazırlanan), 10 µl Proteinaz K eklendi.
4. Numuneler kısa vorteks yapıldı ve tüplerin kapağındaki damlacıkların aşağı inmesi için santrifüj edildi.
5. Tüp 56 °C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. (10 dakika aralarla ter düz edildi.)
6. Numuneler kısa vorteks yapıldı ve tüplerin kapağındaki damlacıkların aşağı inmesi için santrifüj edildi.
7. Numune tüpüne çeker ocak altında 500 µl miktarında Fenol Kloroform İzooamil (25:24:1) eklendi.
8. Tüpler ayran kıvamına gelene kadar vortekslendi ve 2500 rpm 3 dakika santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrasında numunelerin üst faz ve alt faz oluştuğu ve üst faz alınarak hazırlanan 1,5µl’lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
10. Boş tüplerin üzerine – 20 °C ‘de bekleyen %100’lük 1000 µl miktarında soğuk alkol eklendi.
11. Tüpler vorteks yapılarak 10.000 rpm 10 dakika santrifüj edildi.

12. Tüpün içindeki sıvı faz 50 µl kalana kadar üst faz pelet atıldı. Üzerine 500 µl miktarında hazırlanmış olan %70'lik sıcak alkol eklendi.
13. Tüpler vorteks yapılarak 10.000 rpmde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte 50 µl kalana kadar üst faz pelet atıldı.
14. Tüpler ağzı açık bir şekilde etüvde 60 °C'de 1 saat kurumaya bırakıldı.
15. Kuruyan numunelerin üzerine 150 µl RNA içermeyen su eklendi. (RNase-free water)
16. Tüpler vorteks ve kısa santrifüjden sonra 15 dakika ağzı kapalı bir şekilde etüvde bekletildi.
17. Son ürün olan DNA'lar -20 °C'ye saklanma amacıyla buzdolabına 1,5µl'lik mikrosantrifüj tüp içerisinde parafilm ile kapatılarak kaldırıldı.

3.8. DNA Miktarının Belirlenmesi

İzolasyonu takiben yapılan DNA miktar tayini söz konusu çalışmanın proteinler ve nükleik asitler gibi numunelerin saflığını hızlı ve kolay bir şekilde ölçme ve değerlendirmesini sağlamak amacıyla yapılmıştır. DNA miktarının belirlenmesi için Allsheng-Nano 400A spektrofotometre cihazında ölçüm yapıldı. Ölçümün yapılması için öncelikle referans –blank- sıvısı olarak, içinde incelenecek herhangi maddenin olmadığı bir çözelti kullanıldı (111).

Referans çözelti ile spektrofotometrenin ölçüm değerinin daha hassas olmasını sağlama amacıyla QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit içerisinde bulunan EA Buffer 2.0 µl miktarında ile sıfırlama işlemi yapıldı. Miktar ölçümün sıfırlanması ve her numuneden sonra kalıntı kalmasını önlemek amacıyla test platformu ultra saf su ve alkol temizlendi.

Ölçümde aşağıdaki DNA miktar tayini protokolu uygulandı.

1. Pipet ile test platformu üzerine 2.0 µl örnek eklendi.
2. Örneklem kolu kapatıldı.
3. "Ölç" düğmesine basıldı ve numunenin sonucu dokunmatik ekranda görüldü.
4. Test platformu temizlendi. Hesaplanan DNA miktarı kayıt altına tutuldu.
5. "Yazdır" düğmesine basıldı, yerleşik yazıcı örnek sonucunu yazdırıldı.
6. Numune ölçümü için EA Buffer 2.0 µl miktarı ile sıfırlama işlemi yapıldı ardından test platformu ultra saf su ve alkol temizlendi ve bu basamak her örnek için tekrarlandı.
7. Her numune ardışık 3 kez ölçülerek aritmetik ortalaması alındı.

3.9. PCR Aşaması

24 STR bölgesini içeren multipleks PCR çalışması GlobalFiler™ PCR Amplification Kit kullanılarak ve firmanın tavsiye ettiği prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir (112).

3.9.1. PCR Bileşenleri ve Miktarları

GlobalFiler™ PCR Amplification Kit içeriğindeki Master Mix ve Primer Set açılmadan 3 saniye kısa bir vorteks işlemi ve santrifüj işleminden sonra açıldı. Aşağıda verilen gerekli miktardaki bileşenler uygun büyüklükteki şeffaf bir polipropilen tüpüne pipetlendi (Tablo 1) . PCR karışımı seçilen 7 numune için her bir örnek için miktarı ve hacmi toplam 25 µL olacak şekilde hazırlandı. Genotipini bildiğimiz kontrol DNA kontrol örneği olarak 9947A kullanıldı.

Tablo 1: PCR için kullanılan bileşenler ve miktarları

Reaksiyon Bileşeni	Reaksiyon Hacmi
Master Mix	7.5 µL
Primer Set	2.5 µL
DNA	15 µL
Total Hacim	25 µL

3.9.2. PCR Programı

Hazırlanan PCR karışımı Veriti™ 96-Well Thermal Cycler ısı döngü cihazında reaksiyona tabi tutuldu (113).

95 °C 1 dakika

94 °C 10 saniye

59 °C 90 saniye

60 °C 10 dakika

4°C ∞

**30
Döngü**

3.9.3. PCR Ürünlerinin 3500 Genetik Analizör Cihazında Analizi

3.9.3.1. PCR Ürünlerinin Elektroforeze Hazırlanması

Öncelikle 9.6 µL Hi Di™ Formamide 0.4 µL GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 karışımı negatif, pozitif kontrol ve allelik ladder göz önünde bulundurulacak şekilde her bir örnek için hazırlanarak vortekslendi (Tablo 2). Hazırlanan karışım her bir plate kuyucuğuna 10 µL dağıtıldıktan sonra üzerine 1 µL PCR ürünü eklendi. Ayrıca benzer şekilde allelik ladder ve kontroller için de 1 µL yükleme yapıldı. Bu aşamada kuyucukların dibinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. 3500 Genetik Analizör Cihazın' da analiz edilecek her bir örnek için aşağıdaki tablodaki gibi karışım hazırlandı (114).

Tablo 2: Elektroforez için kullanılan bileşenler ve miktarları

Reaksiyon Bileşeni	Reaksiyon Hacmi
Hi-Di™ Formamide	9.6 µL
GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0	0.4 µL
PCR Ürünü	1 µL
Total Hacim	2 µL

3.10. Örneklerin Elektroforezi

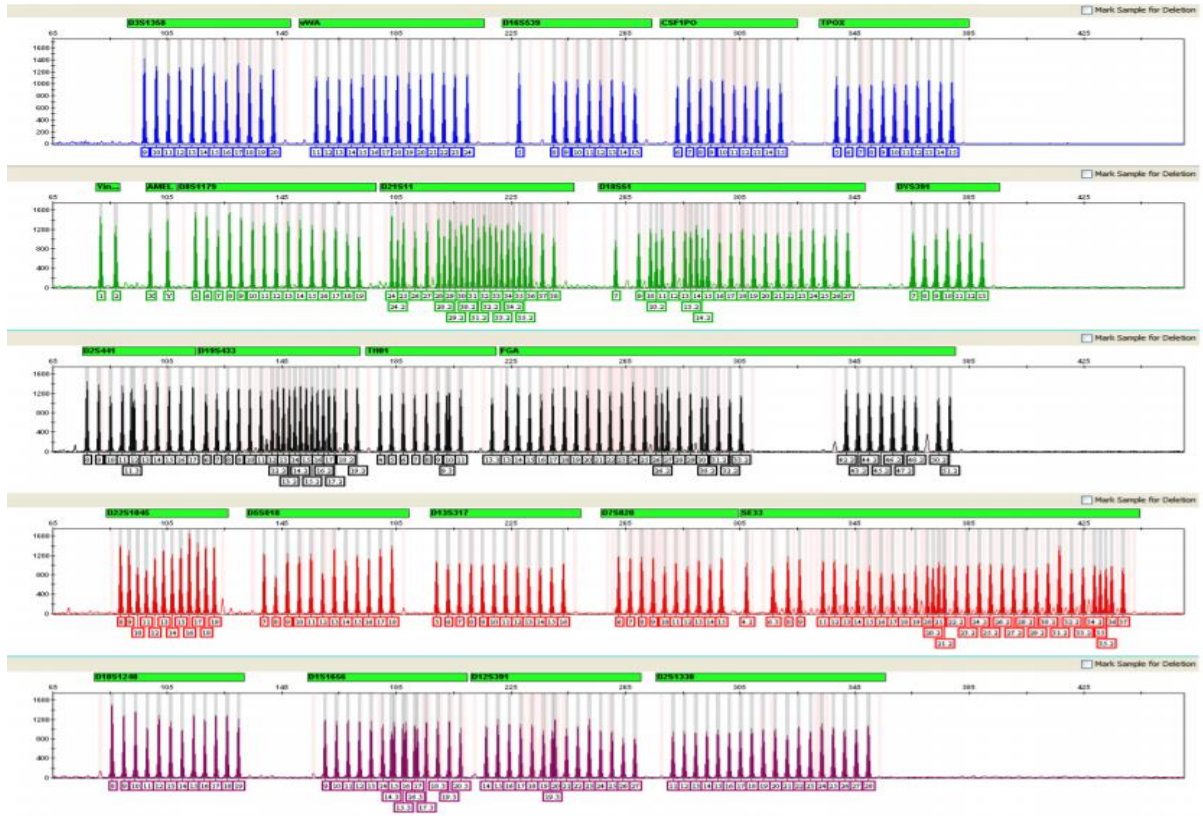
Yukarıda hazırlanan PCR ürün karışımı 3500 Genetik Analizör cihazına yerleştirildi. Örnekler, 8 cm'lik kapiller ve (Performance-Optimized Polymers) POP-4 polimeri kullanarak, J6 (Dye Set J6) boya seti, enjeksiyon süresi 3 kV \ 5 saniye, çalışma koşulları 15 kV \ 1500 saniye ve yürütme süresi 30 dakika olacak şekilde DS-36 Matrix standartı - G6-RCT filtresi seçilerek yürütüldü.

Tablo 3: Applied Biosystems'in 3500 Genetik Analizör için standart boya setleri

Boya	Renk	Etiket
6-FAM™	Mavi	Örnekler, kontroller, allelik ladder
VIC™	Yeşil	
NED™	Sarı	
TAZ™	Kırmızı	
SID™	Mor	
LIZ™	Turuncu	GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0

3.11. Elektroforegramların Değerlendirilmesi

Örneklerin yürütülmesinden sonra elde edilen veriler GeneMapper™ ID-X Software kullanılarak analiz edildi. Çoğaltılan PCR ürünleri tam uzunluklarının tespiti amacıyla öncelikle cihazın elektroforez koşulları ve kullanılan Size Standartına bağlı olduğundan çalışmada kullanılan GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 fragman uzunlukları her örnek için kontrol edildikten sonra PCR ürünlerine ait allelik ladder ile karşılaştırılarak elektroforegramdaki pikler değerlendirilmiş ve allel boyutları belirlenmiştir. Ayrıca yürütmede kontrol DNA yüklenmiştir ve bu sayede kontaminasyon kontrolüde yapılmıştır.



Şekil 3: GeneMapper™ ID-X Software görüntülenen GlobalFiler™ Allelik ladder'a ait elektroforegram görüntüsü (112)

BULGULAR

4.1. Yıkanmış Kan Lekelerin İncelenmesi

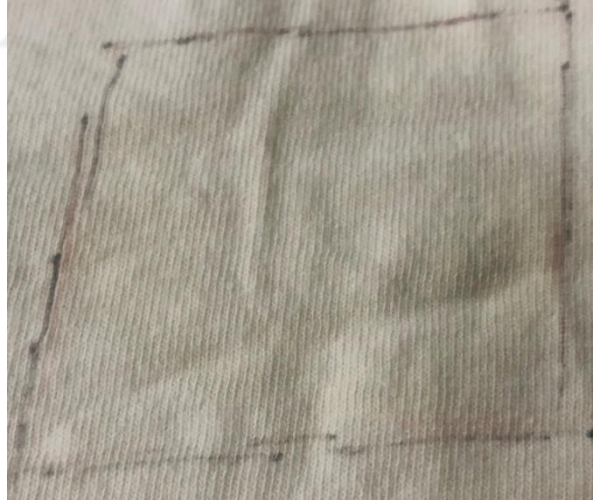
Bu tez çalışmasında 10 donörden elde edilen kan lekeli naylon ve pamuk kumaş parçaları 40°C, 60°C, 90°C yıkandı. 40 °C’de yıkanmış olan pamuklu ve naylon kumaşlarda ayrıca 60 °C’de yıkanan pamuklu kumaşlarda lekeleme için belirlenmiş olan bölgelerde çıplak göz ile bakıldığında kan lekesinin orijinal kontörü belirlenebilmiştir. 60 °C ‘de yıkanan naylon ve 90 °C ‘ yıkanan pamuklu ve naylon kumaşlarda herhangi bir şekilde çıplak gözle görülebilir bir leke izine rastlanmamış ve kan lekesine ait orijinal kontör belirlenememiştir. Yıkanmış kumaşlara serolojik inceleme için Luminol püskürtüldüğünde 40-60-90°C’de yıkanmış kan lekelerine ait metalik mavi renk çalışına donörlere ait tüm kumaş parçalarında parlama yaptığı görülmüştür.



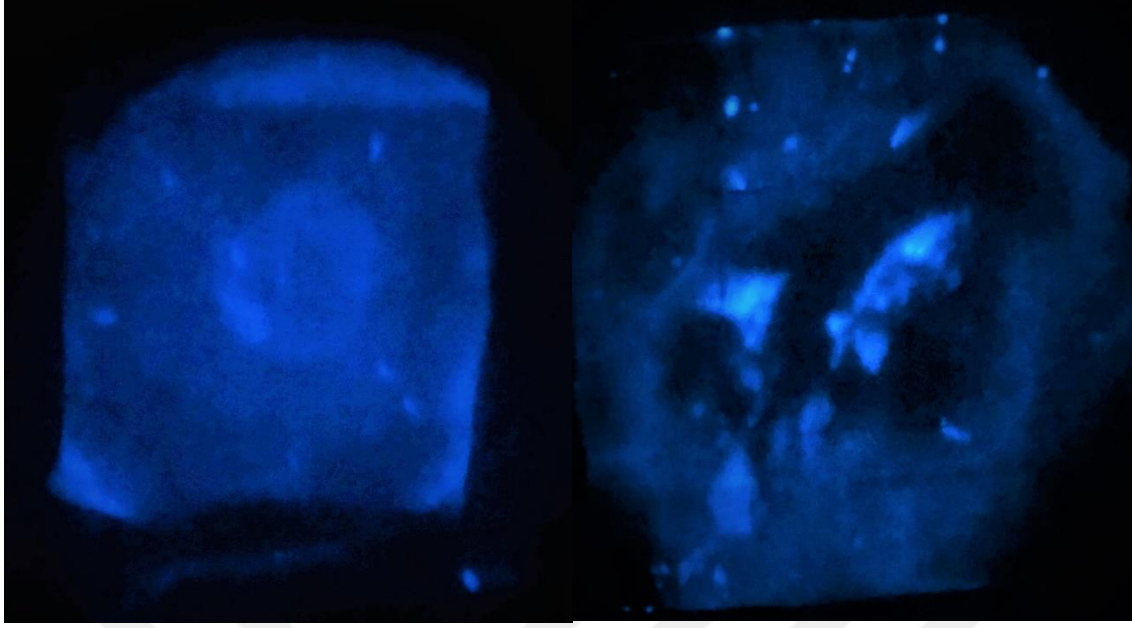
Şekil 4: Kan lekesi oluşturulan pamuk kumaşların 40 °C yıkama sonrası kan lekesinin orijinal kontörü



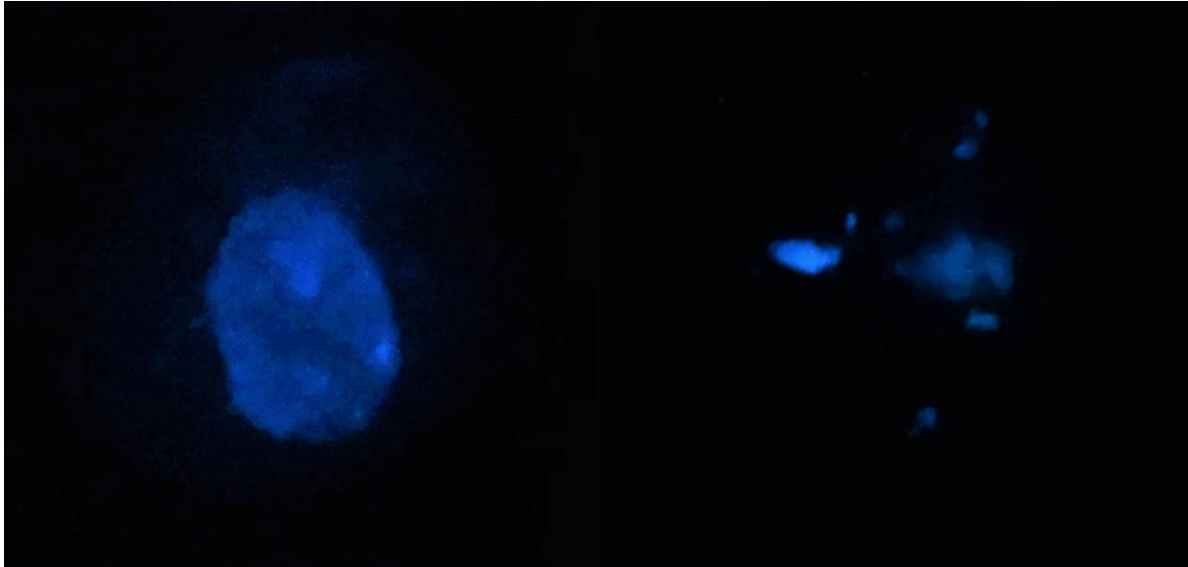
Şekil 5: Oluşturulan kan lekesi 60 °C yıkama sonrası kan lekesinin pamuk kumaşa ait orijinal kontörü



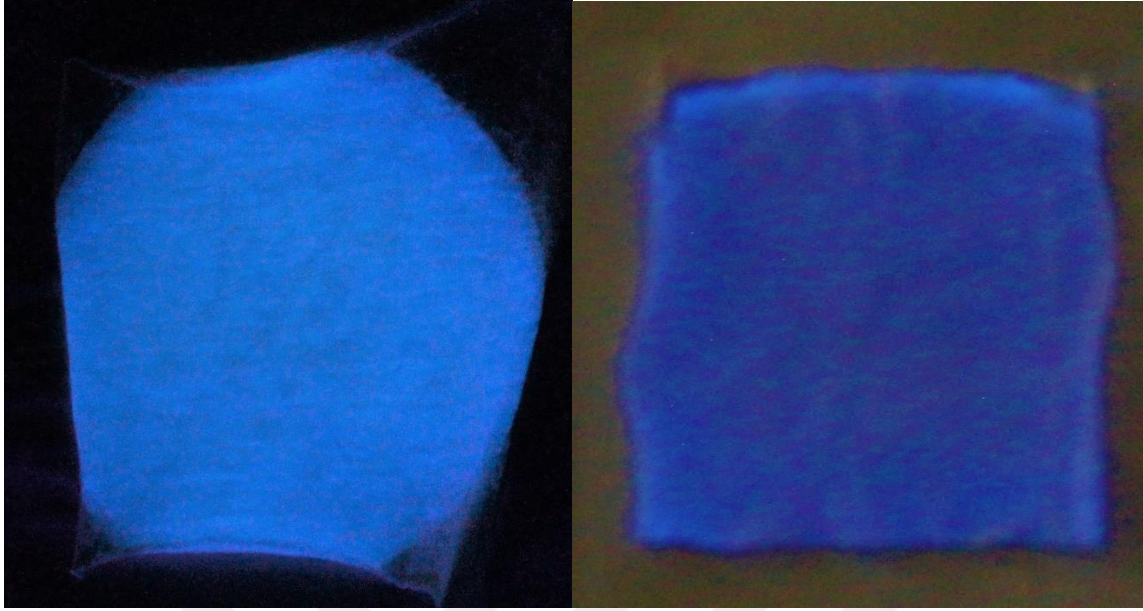
Şekil 6: Oluşturulan kan lekesinin 90°C yıkama sonrası pamuk kumaşa ait görüntüsü



Şekil 7: 40°C derecede yıkanmış pamuklu (sol), naylon (sağ) kumaşlara luminol kullanılarak görünürleştirme



Şekil 8: 60°C derecede yıkanmış pamuklu (sol), naylon (sağ) kumaşlara luminol kullanılarak görünürleştirme



Şekil 9: 90°C derecede yıkanmış pamuklu (sol), naylon (sağ) kumaşlara luminol kullanılarak görünürleştirme

4.2. DNA İzolasyonu

Yıkanan kumaşlar, spin kolon yöntemine dayalı Qiagen QIAamp® DNA Mini Kit kullanılarak ve Fenol Kloroform İzooamil Organik yöntemleri ile DNA izolasyonu sağlanmasının ardından Allsheng-Nano 400A spektrofotometre cihazı ölçülen numunelerin DNA miktarları aşağıda verilmiştir. Tüm örnekler başarı ile izole edildi, miktar tayini belirlendi sonuçlar aşağıdaki tabloda verildi. (Tablo 4-5).

Tablo 4: Qiagen QIAamp® DNA Mini Kit ile izolasyonu yapılan Allsheng-Nano 400A spektrofotometre cihazı ile ölçülen numunelerin DNA miktarları

Numune Numarası	40°C Yıkanmış Kan Lekeli Kumaş ng / µl		60°C Yıkanmış Kan Lekeli Kumaş ng / µl		90°C Yıkanmış Kan Lekeli Kumaş ng / µl		260nm/280nm ortalaması	
	P	N	P	N	P	N	P	N
Pamuklu Kumaş (P) Naylon Kumaş (N)								
1	18.406	17.892	47.707	16.807	6.265	14.933	1.06	1.03
2	6.846	3.122	27.086	11.511	20.207	15.712	1.12	1.05
3	4.902	25.525	2.334	9.513	5.504	6.253	1.17	1.06
4	4.197	3.481	26.461	130.149	1.024	5.232	1.22	1.15
5	1.681	4.073	0.752	2.019	1.130	4.012	2.40	1.08
6	29.699	7.845	0.841	2.565	12.628	3.486	1.44	1.12
7	8.197	2.288	3.142	5.201	1.093	1.954	1.12	1.22
8	2.520	2.611	2.702	5.488	7.753	3.05	1.74	2.34
9	2.181	5.826	5.769	2.870	149.887	1.913	1.59	1.15
10	33.556	7.092	225.66	6.758	52.788	3.625	1.48	1.18

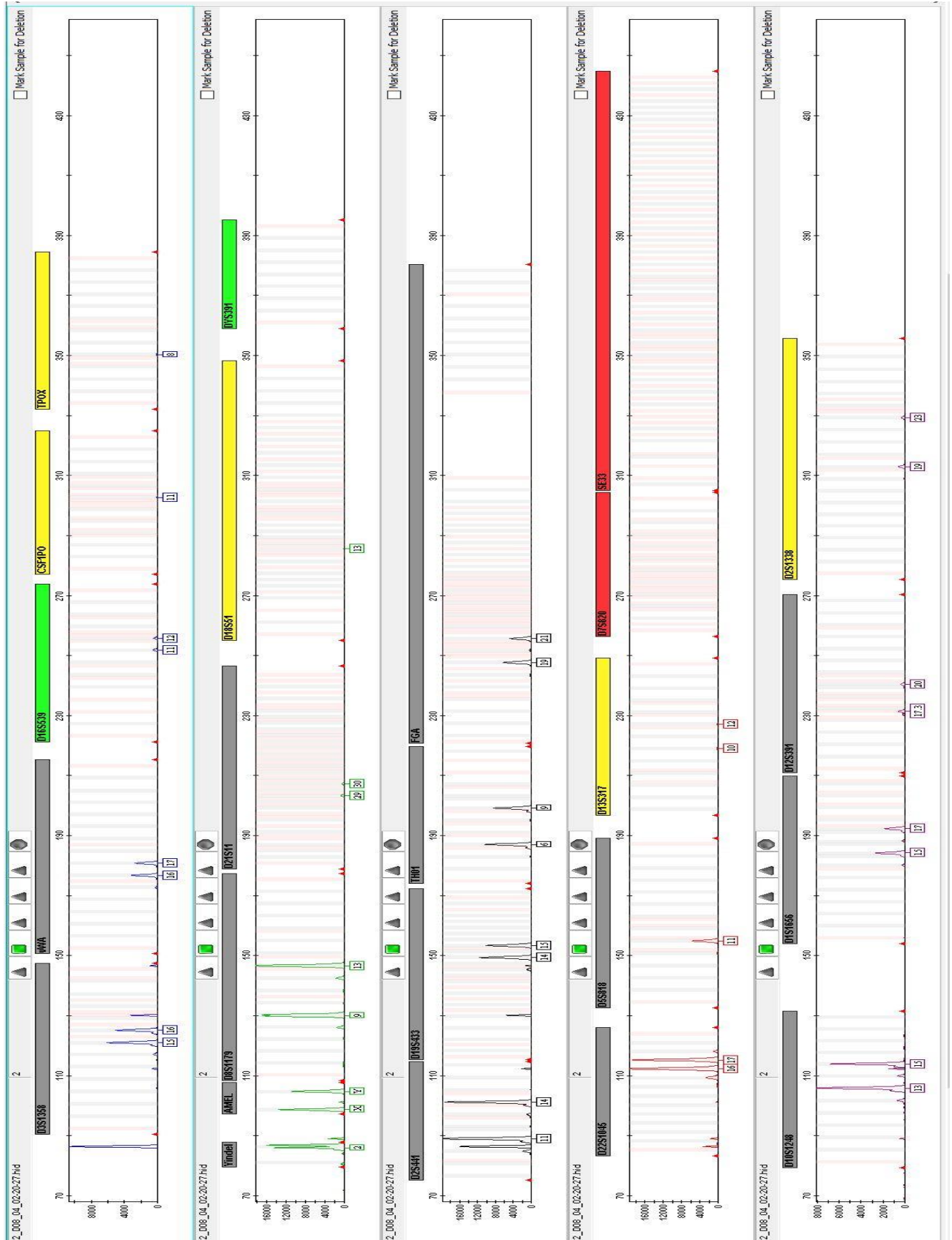
Tablo 5. Fenol Kloroform İzoamil Organik ile izolasyonu yapılan Allsheng-Nano 400A spektrofotometre cihazı ile ölçülen numunelerin DNA miktarları

Numune Numarası	40°C Yıkanmış Kan Lekeli Kumaş ng / ul		60°C Yıkanmış Kan Lekeli Kumaş ng / ul		90°C Yıkanmış Kan Lekeli Kumaş ng / ul		260nm/280nm ortalaması	
	P	N	P	N	P	N	P	N
Pamuklu Kumaş (P) Naylon Kumaş (N)								
1	18.989	52.192	10.664	114.921	11.958	45.559	1.05	1.24
2	26.586	79.858	11.284	116.289	38.307	422.613	1.06	1.19
3	47.673	32.532	30.873	10.36	2.307	17.297	1.18	1.10
4	29.404	144.704	23.302	116.285	46.084	144.709	1.02	1.18
5	36.377	69.686	28.467	51.035	29.097	130.695	1.09	1.17
6	26.017	365.716	364.196	369.284	33.04	259.02	1.16	1.05
7	27.069	228.001	363.04	39.849	39.774	72.121	1.17	1.28
8	14.812	52.772	93.473	29.382	109.616	39.573	1.08	1.30
9	29.142	52.08	10.818	74.483	54.055	31.801	1.14	1.26
10	28.632	29.496	42.084	58.399	164.545	16.075	1.13	1.10

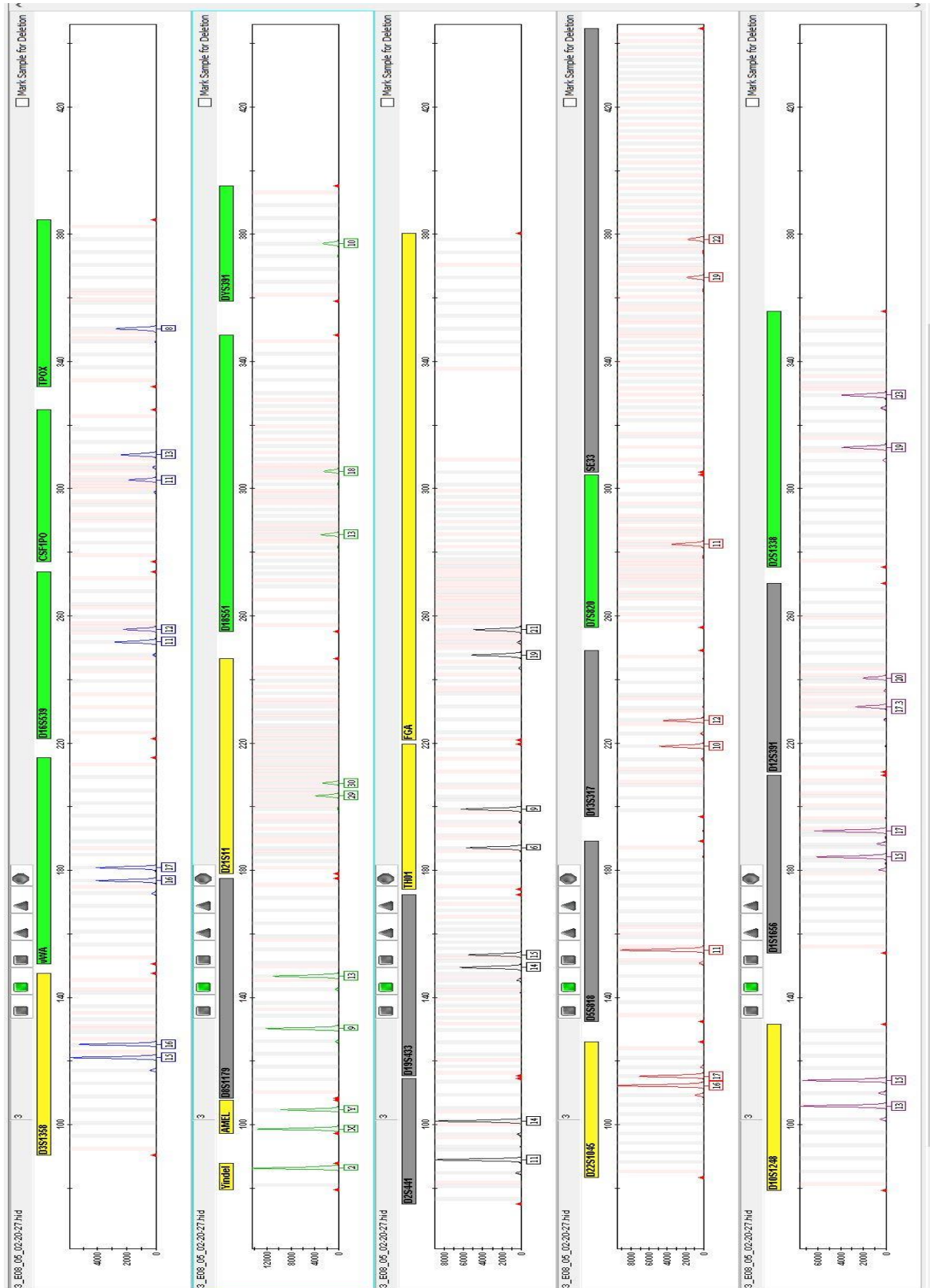
4.3. Genotiplerin Belirlenmesi

3500 Genetik Analizör kapiller elektroforez cihazında GlobalFiler™ PCR Amplification Kit kullanılarak genotipleme yapıldı. Kan lekeli pamuk kumaştan elde edilen tam DNA profiline ait elektroforegram görüntüsü başarı ile elde edildi (Şekil 10). 40°C ve 60 °C de yıkanan tüm pamuk kumaşlardan başarı ile profil elde edildi. (Şekil 11-14) 90°C’de yıkanmış pamuk kumaştan QIAamp DNA Mini Kit spin kolon yöntemi ile izolasyon sonucu DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsünde pikler oluşmuş ancak DNA profili doğrulanamamıştır (Şekil 15-16) Yine aynı kitle yapılan 90°C yıkama sonrası naylon kumaştan herhangi bir sonuç alınamamıştır (Şekil 17). Fenol Kloroform İzoamilalkol ile yapılan organik yöntemde yıkama prosedürü 90°C’de yapılan naylon ve pamuk kumaşların tümünde elektroforegam görüntülerinde piklere rastlanılmamıştır.

Şekil 11: 40°C’de yıkılmış naylon kumaştan organik izolasyon sonucu elde edilmiş DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsü

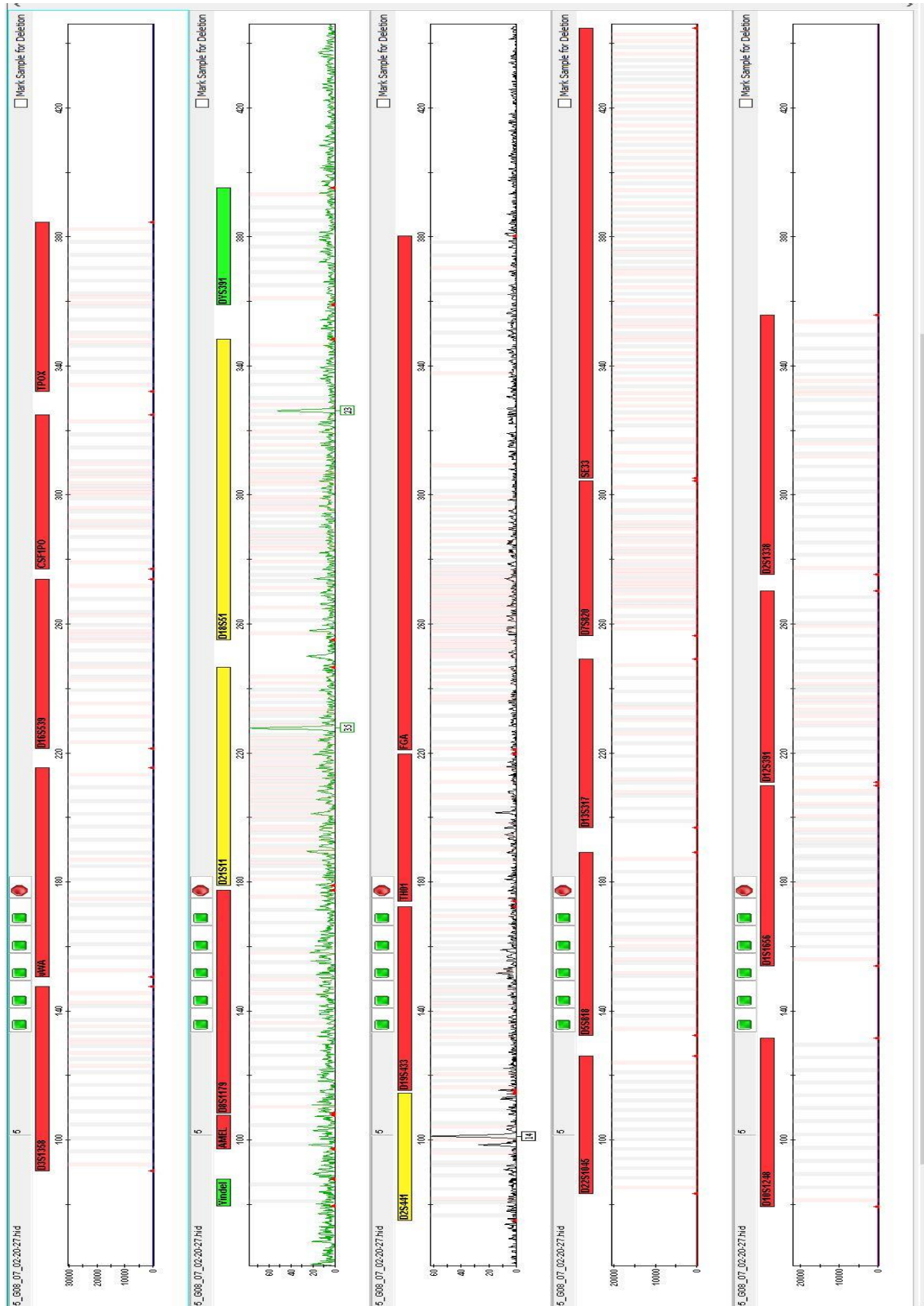


Şekil 13: 60°C’de yıkılmış pamuk kumaştan organik izolasyon sonucu elde edilmiş DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsü



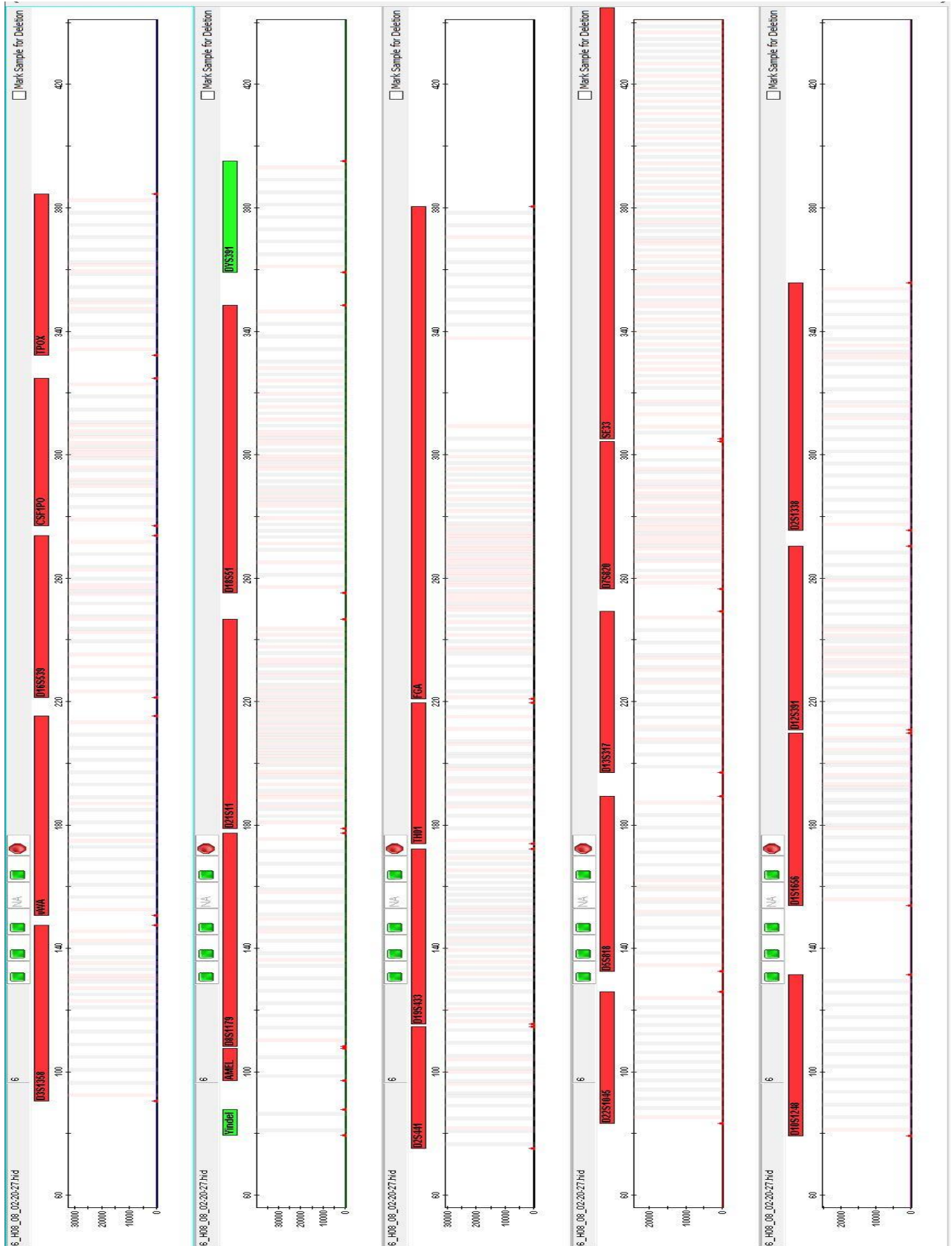
Şekil 15: 90°C’de yıkılmış pamuk kumaştan QIAamp DNA Mini Kit ile izolasyon sonucu

DNA örneğine ait elektroforegram görüntüsü



Şekil 17: 90°C’de yıkamış pamuk kumaştan organik izolasyon sonucu elde edilen DNA

örneğine ait elektroforegram görüntüsü



5. TARTIŞMA

Olay yerinde en sık rastlanan biyolojik delil kan lekeleridir. Bu sebeple kan lekesi, adli bilimlerde araştırmacıların bir suçu çözmeye yardımcı edebilecek önemli delillerden biridir. Bir şüpheliyi bir suça bağlayabilir ve ayrıca suç mahallini yeniden canlandırmaya yardımcı olabilir. Suçlular genellikle olay yerindeki kanıtları temizleme ve ortadan kaldırma eğilimindedirler (115). Bir suç işleminden sonra bir fail, ya soğuk suda elde yıkayarak ya da normal bir çamaşır makinesini kullanarak kan lekelerini yıkamayı deneyebilir. Bu girişimler kan lekelerinin değişmesine sonuç olarak kısmen veya tamamen giderilmesine neden olabilir. Ayrıca kan lekeleri olay yerinde çeşitli yüzeyler üzerinde bulunabilmektedir. Bu sebeple olay yerinde en çok karşılaşılan naylon ve pamuk türündeki kumaşlar bu çalışmada tercih edilmiştir. Yıkanmış kan lekeli naylon ve pamuk kumaş türündeki örneklerde DNA üzerinde daha çok yer kaplayan klasik STR lokusları ile tiplendirme sorunu yaşanabilmekte ve sonuç alınmadığı bilinmektedir (30). Bu tez çalışmasında bu durumlar göz önüne alınıp adli genetik uygulamalarda yıkanmış kan lekeli kumaşlarda DNA elde edilmesi üzerinde etkili olabilecek önemli iki faktörün: sıcaklık ve kumaş türlerinin DNA profillendirmesi üzerinde olumsuz etkilerinin olup olmadığı ve profillendirme için yeterli DNA elde edilip edilmeyeceği detaylı olarak incelendi. Bu çalışmaya gönüllü, rastle seçilmiş, 10 kişiden 5 ml kan örneği alındı. Çalışma gönüllülerinden toplanan kan örneklerinden temsili olay yeri elde etme amacıyla bekletilmeden 10 x10 boyutundaki kontaminasyonu önlemek amacıyla 90 °C yıkanmış ardından UV kabinde 1 saat bekletilmiş haldeki naylon ve pamuk kumaş parçalarına 2'şer damla emdirilerek kan lekesi yapılmış ardından oda koşullarında temiz bir bölgede kurutuldu . Bu mevcut model, damlanın kumaşın her iki tarafını ıslattığını varsayar. Bu nedenle, modelin belirli bir boyuttaki damlalara uygulanabilirliği açısından belirli sınırlamaları vardır. Çalışmalar incelendiğinde kan lekesi oluşturma amaçlı toplanan kan EDTA'lı tüplere koyulmuş sonra kumaşlara lekeleme

yapılmıştır (116). Literatür çalışmalarındaki bu durumun olay yerinden elde edilen kan lekelerini yansıtmadığı düşünülerek toplanılan taze kandan kumaşlara doğrudan lekeleme yapılmıştır. Çünkü bir olay yeri düşünüldüğünde vücuttan çıkan kan doğrudan kumaşla temas edecektir, pıhtılaşmayı önleyici EDTA olay yerinde olmayacaktır. Bu sebeple kan lekeleri beklemeden doğrudan kumaşlara üzerine damlatılmıştır.

Bu tez çalışmasında kullanılan kumaşlardan pamuk, en yaygın bitki liflerinden biridir ve emiciliği ve nem tutması yüksektir. Polyamid lifi dünyada üretilen ilk sentetik liftir. Polyamid lifleri için naylon sözcüğü genel bir ad olarak kullanılmaktadır. Leke tutmayan yapısı ve parlak, sağlam, kaygan ve hafif bir kumaş olduğu göz önüne alınarak emiciliği ve nem tutması çok düşük olmasından 2 tür kumaş seçilmiş kumaşlar arasında fark karşılaştırılması yapılması hedeflenmiştir.

Kumaşların yıkanması ile DNA, olay yerinde bulunan nesnelere, veya dolaylı olarak kişi ve kişilere objeler vasıtasıyla herhangi bir birincil temas olmadan, istemeden bir suç mahalline DNA'sının transferini gerçekleştirebilir. Voskoboinik L. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ikincil DNA transferine sebep olabilecek senaryolar içerisinde yıkanmış kan lekeli kumaşların elde yıkama ve çamaşır makinesinde henüz ıslakken yıkanması ile diğer çamaşırlara transfere sebep olabileceği bildirilmiştir (115) . Bu sebeple tez çalışmasında donörlerin kumaş parçaları ayrı ayrı yıkanmış ve her yıkamadan sonra muhtemel bir transferi önleme amacıyla çamaşır makine boş bir vaziyette 90°C boş bir şekilde çalıştırılmıştır.

Yıkamalar sonucu hem naylon hem de pamuk kumaş türlerine ait kan lekeleri gözle görülemeyecek şekilde çıkmıştır. Ancak 40 °C'de ve 60°C 'de yıkanan pamuklu kumaş üzerindeki kan lekesinin yıkamaya rağmen kan lekesinin orijinal konturu silinemediği

gözlenmiştir (Şekil 4,5,6). Test edilen tüm numuneler 60 ve 90 ° C'de Türkiye'de en çok erişilebilen yumuşatıcı içerikli deterjan kullanımıyla yapılan çamaşır makinesinde yıkama prosedürünün, kan lekelerini pamuklu ve naylon kumaştan görünür halden çıkarmak için yeterli olduğunu göstermektedir. Ardından, test edilen bu numunelerin hepsine Luminol püskürtülerek ile görünürleştirme sağlandığında 40, 60 ve 90°C 'de yıkanan kan lekeli pamuk ve naylon türdeki kumaşlarda tüm numunelerde kana ait parlama görüntülenebilmiştir (Şekil 7,8,9). Bu da kan hücrelerinin gözle görünür halden çıksa bile hala kumaşlar üzerinde olduğunu göstermektedir. Bu sayede yüksek sıcaklıklarda yıkanan kan lekeli kumaşların luminol kullanılarak görünür hale getirilebilir ve DNA analizi için kullanılabilir olduğu görülmüştür. Caroline Edler ve arkadaşları çalışmalarında (30, 60 ve 95 °C) yıkama sonrası luminol incelemesinde parlama göstermekte olduğunu ancak az parlama gösteren örneklerin var olabileceği söz konusu bu az parlamanın denatürasyona uğramış kan kalıntıları içerdiği bu sebeple düşük parlama yaptığı belirtilmiştir. Bununla birlikte yazarlar çalışmada kanın bazı çamaşır deterjanı bileşenleriyle reaksiyona girmesi olasılığının daha yüksek olduğuna inanmaktadır, bu yüzden kemilüminesansı engellediğini belirtmişlerdir. Ayrıca, Caroline ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada EDTA'lı tüplere toplanan kan ile olay yerini yansıtacak taze toplanan kan arasında Luminol reaksiyon yoğunluğunda belirgin bir fark olmadığını belirtmiştir Caroline Edler ve arkadaşlarının bu sonucu çalışmamızda uygulanan gizli kan lekelerini tespit etmek için yıkanmış kumaşlarda luminol kullanılarak adli soruşturmalarda kan lekelerinin görünür hale getirilebilirliği sonucunu desteklemektedir (117). Bu sonuç, yıkama sıcaklığının ve deterjan kullanımına bakılmaksızın, ev tipi çamaşır makinelerinde yıkamanın görünür ve gizli kan lekelerinin pamuklu kumaştan tamamen çıkarılması için yeterli olmadığını göstermektedir. Ancak çalışmanın koşullarının kontrollü olay yeri oluşturulup temsili olmasından kaynaklı farklı olay yerlerinin kendilerine özgü olabileceği sıcaklık koşullarında lekeleme yapılmamış ve kan lekesi sıçrama modellerinde denenmemiştir. Kanın miktarı

arttırılarak bir DNA profilinin elde edilmesinin daha mümkün olacağı aşıkardır. Erin L. Houston çalışmasında da belirttiği gibi yıkanmış kan lekeli çamaşırlarda kanın 5ml – 10 ml arasındaki miktarda olması DNA elde etmede farklılık göstermediği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada standart teknikler kullanılarak DNA profilini elde etmek için başlangıç kan leke miktarı değişkenliğinin etkilerini gözlemek için daha fazla çalışma yapılması gerektiğini önermektedir (118). Bu tez çalışmasında farklı etkenler denendiği için başlangıç kan miktarı denemeleri yapılamamıştır. Bir sonraki çalışma için bu etken de düşünölmektedir.

Edler ve arkadaşlarının çalışmasında farklı yıkama sıcaklıklarında yıkandıktan sonra pamuk lifleri üzerindeki makroskopik kan kalıntılarının gözlemlenmesinin mümkün olduğunu ve bu sonuç çalışmamızda gözlemlediğimiz 40ve 60°C pamuk kumaşlarda çıplak gözle tespit edilebilen orjinal kan kontrolleri ile paralel sonuç vermiştir (117).

Bu tez çalışmasında yıkanmış örneklerden DNA'nın kontaminasyondan engellenmesi amacıyla kumaş parçaları steril makasla kesilmiştir. Ancak literatürdeki Sabine Hess ve arkadaşları kumaş türünden bağımsız olarak yapışkan bantlar kullanılarak giysi üzerinden az miktarda bulunan biyolojik materyalden DNA toplanabildiğini belirtmiş fakat genel itibari ile bu çalışma kan ile ilgili olmadığından bu çalışmada örnek toplama protokolü steril makas ile olmuştur (119).

Bu tezde yıkanmış kan lekelerinde QIAamp DNA Mini Kit (spin kolon) ile Fenol Kloroform İzöamil Organik izolasyon yöntemleri karşılaştırılmıştır. 40 ve 60 °C 'de iki izolasyon yöntemide iki kumaş türünde DNA profilini elde etmede başarılı olmuştur. Caroline Edler ve arkadaşları ile çalışmasında yıkanmış kan lekeli kumaşlardan DNA elde etme amacıyla

QIAamp DNA Mini Kit kullanmıştır ve tez çalışmamız ile paralel sonuçlar vermiştir (Tablo 5, Şekil 11-17) (117).

Erin L. Houston tez çalışmasında yıkanmış kumaşlardan Fenol- Kloroform İzoamil yöntemi ile ekstraksiyon yöntemi ile DNA materyalini izole etmiş ancak bu yöntemin geleneksel ve olay yerinden gelen numunelerde Fenol-Kloroform İzoamil Alkol organik ekstraksiyon yöntemlerinin yıkanmış kumaşlardan kişinin DNA profilinin ortaya çıkarılması için çok yoğun kimyasal bir işlem olduğunu bildirmiştir (118). Organik yöntem ile kişi profili elde etmede başarısızlıklar olabileceği belirtilmiş ve ayrıca bazı çamaşır deterjanlarının bileşiklerinin DNA izole etmede miktarca kayıp yarattığı bildirilmiştir. Bu çalışmadaki sonucun çalışmamızda kullanılan fenol kloroform izoamilalkol organik DNA izolasyon yönteminde 90°C derecede yıkanan naylon ve pamuklu kumaşlardan sonuç alınamaması ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 17).

DNA elde etmede verim, yıkama sıcaklığıyla ters orantılıdır. 90°C yıkanan kumaş parçalarında mukayese elverişsiz pikler oluşmuştur. Çamaşır makinesinde 90°C yıkanan pamuk kumaşa pikler oluşmuş ancak güvenilir bir DNA profili doğrulanamamıştır bu durum Caroline Andrews ve arkadaşları yaptığı çalışma ile paralel sonuçlanmış ve araştırmacılar kumaşlarda Chelex protokolü ile DNA izolasyon sağlanan numunelerde 95 °C de yıkanan agaroz jel elektroforez sonuçlarda söz konusu kumaşlardan herhangi bir DNA elde edilemediği bildirilmiştir (120). Ancak çalışmamızda 90°C'de yıkama prosedürü çalışılmış ve modern adli bilimlerde kabul görülen kapiller elektroforez aracılığıyla elektrofretik ayırım yapılarak daha doğru ve güçlü sonuçlar verilmiştir (Şekil 15).

DNA izolasyonundan sonra miktar ölçümü kısmında DNA'nın saflığı, numunenin protein konsantrasyonu için 280 nm'de ve DNA konsantrasyonu için 260 nm'de baz alınarak belirlenmiştir. DNA saflığını değerlendirmek için nano spektrofotometri kullanılmış ve DNA

miktarı belirlenmiştir. 260 /280 oranındaki ve 1.6-2 aralığındaki DNA örneği saf olarak kabul edilmiştir. Bu aralığın üzerindeki numuneler, protein ve RNA tarafından alınanlarla kirlenmiş olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızdaki yıkamış kan lekeli kumaş örneklerinden elde edilen DNA, PCR ile gen amplifikasyonu için başlangıç materyali olarak kullanılacak kadar yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, sadece DNA değil aynı zamanda RNA, protein, serbest nükleotidler ve fenol de 260 nm’de yüksek absorbans gösterdiği tüp içerisindeki DNA miktarı olduğundan daha yüksek olarak hesaplanabileceği göz önünde bulundurulmuştur (120). Yıkama prosedürlerinden sonra bile lekelerin hala ölçülebilir miktarda DNA içerdiği görülmüştür (Tablo 5).

Yıkama sonrası kumaş türü ve DNA eldesi karşılaştırıldığında değerlendirilen naylon ve pamuklu kumaş türü göz önüne alındığında ve yıkamış kan lekelerinden DNA profillerinin eldesi açısından bir sonuca ulaşmak gerekirse emici olan pamuklu yüzeylerden emici olmayan naylon kumaşa göre daha iyi DNA profili elde edilebildiği; ancak emici olmayan naylon kumaşın üzerinde DNA’nın dış etkilere pamuk kumaş yüzeyden daha fazla maruz kaldığı, farklı sıcaklık ve farklı sürelerde çamaşır detarjanları ile birlikte çamaşır makinesinde kan lekeli kumaşları yıkamanın DNA elde etmede emici olmayan naylon kumaş düşünüldüğünde daha zor bir hal aldığı ve bununla DNA profilendirme üzerinde etkisi olduğu görülmüştür (Şekil 11-17) (121).

Pamuklu kumaş türünden naylon yüzeye göre göreceli olarak daha kolay DNA elde edilebildiği görülmüş ancak profillemeye sıcaklık ve kimyasal gibi sebeplerle DNA’nın degradasyona uğramasından dolayı çalışılan örnekte bozulmalar olduğu sıcaklık artması sebebiyle ampikon boyutunun giderek düşen pik yükseklikleriyle gözlemlendiği düşünülmektedir. Stojanović I ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tüm bu etkileşimler, kan lekelerinin yıkanmasından sonra biyolojik malzemenin bozulmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (121).

Erin L. Houston yaptığı tez çalışmasında deterjan tarafından kumaş yüzeyindeki hücrelerin, muhtemel kan lekelerinin çözülmesi DNA profili elde edilme oranını büyük miktarını azalttığını bildirmiştir. Ayrıca, biyolojik kalıntıların doğası gereği çevresel etkenlerden etkilenebilmekte olduğu ve bunun sonucu olarak DNA miktarı ve kalitesinin düştüğünü bildirmiştir (117).

Ayrıca, DNA'yı parçalayan ağartıcılar veya oksijen radikalleri içeren deterjan bileşimi, sonuçlardan kısmen sorumlu olabilmektedir. Oldfield C. Ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada toz haldeki çamaşır deterjanları ile (Ariel –Persil) kan lekeli kumaşlar üzerinde yapılan yıkama işlemlerinde toz deterjanların kan lekesini yok etmede başarılı olduğu sonucuna varılmış ancak sıvı türdeki ve farklı markalardaki çamaşır deterjanları arasında değişim olduğunu gösterecek araştırmalar bu tez çalışmasında yapılmadığından deterjanlar arasında herhangi karşılaştırma yapılamamıştır (122).

Mushtaq ve arkadaşlarının 6 farklı çamaşır deterjanı ile yaptığı çalışmada içlerinden Ariel'in en etkili lekeleri çıkardığı sonucuna varılmıştır (123). Ancak, bu sonuç varsayımsal olarak kalmış çünkü çalışma protokolü sadece DNA izole etmekle sınırlı kalmış, DNA profilendirilmesi yapılmamıştır. Kulstein ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Persil ile yıkamanın Ariel yıkama sonuçlarıyla paralel bir şekilde etkili çıkarıcı olduğunu başka toz deterjanlar ile karşılaştırma amacıyla deneyler yapılması gerektiği belirtilmiştir.

Bu tez çalışmamızda yumuşatıcı içerikli toz deterjan olarak Persil kullanılmış olduğundan benzer bir şekilde Kulstein ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarında Persil marka toz deterjan kullanarak mRNA düzeyinde ve DNA düzeyinde incelemeler gerçekleştirmiştir. Çalışmada 40 ve 60°C 'de yıkanmış pamuk ve naylon içerikli kumaşlar çalışılmış olup mRNA düzeyinde genetik çalışmada kana özgü olan mRNA belirteci olan HBB tespit edilebileceği ayrıca, art arda 40°C yıkananan naylon ve pamuk kumaşlarda alel düşmelerin

gerçekledebileceğinden bahsedilmiştir Kulstein ve ark. aksine bu çalışmada 40 ve 60°C 'de DNA profili elde edilebilmiştir ancak art arda yıkama gerçekleştirilmemiştir (124-125).

Salahuddin Z. ve ark ile Mayesa C. ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, hem her olay yerinin kendine özgü şartlarının olması hem de farklı kişilerin kanlarının farklı pH ve elektrolit seviyesine sahip olmasından dolayı degradasyonun değişebileceği ve farklı sonuçlar elde edilebileceğinin üzerinde durmuşlardır. Bu sebeple her zaman DNA profilinin elde edilemeyeceğini düşünmektedirler. Ayrıca farklı yüzey özelliklerinin degradasyondan çok, kanı tutma kapasitesinin DNA eldesi üzerinde etkili olduğu yorumunu da eklemişlerdir (125-126).

Kan lekelerinin su ile seyreltilmesi veya hücrelerin kumaş yüzeyinden deterjanla çözülmesi, yıkamadan sonra kumaşın aşınması ile birlikte DNA profili elde etme oranını azaltmaktadır (127). Ayrıca çalışmalarda ülkeler arasında rutinde kullanılan popüler markalar kullanılmış olup, Arjun Rao I. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Hindistan ülkesine ait en sık tercih edilen çamaşır deterjanları yıkamada kullanılmış fakat Arjun ve ark. sadece biyolojik materyal ihtiva ettiğini belirtmiş, DNA profili elde etmemişlerdir. Yine Hofmann ve ark. Persil ve Ariel marka deterjan kullanmış olup 30, 60 ve 95 °C'de yıkama yapıp 95°C'de DNA profili elde edemediğini bildirmiştir. Bu tez çalışmasında Hofmann ve ark.'larına paralel olarak Persil marka deterjan kullanılmış 30 ve 60 °C'de profil elde edilirken 90°C'de DNA profili de elde edilememiştir (128). 90°C'de DNA profili elde edilememesinin sebebinin yüksek sıcaklık etkisiyle özellikle kan hücrelerinin kolay parçalanması yani degradasyona uğramasıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

Tüm bu sebeplerle bu tez çalışması dünya literatürüne göre 90°C'de yıkamanın ilk kullanıldığı çalışma olup; Türkiye literatürüne göre ise 40, 60 ve 90 °C'lerin ve farklı kumaşların (pamuklu-naylon) kullanıldığı ilk çalışma olmuştur. Bu tez çalışması kumaş üzerine kan lekesinin

yıkamaya kadar geçen kuruma süresine bakılmaksızın, kan lekelerinin orjinal konturunu tamamen yok etmeye yetmeyeceğini ve yıkama sıcaklığının adli çalışmalar için DNA profili elde edilmesini büyük oranda etkilediğini göstermektedir.



6. SONUÇ

Cinayet, hırsızlık, cinsel saldırı gibi şiddet suçlarını barındıran olay yerlerinde çoğu zaman kan lekeleri kıyafet ve kumaşlarda suçu gizleme amacıyla yüksek sıcaklıklarda yıkanmış vaziyette bulunabilmekte ve bu sebeple DNA profillemelerde sonuç alınamayacağı düşünülmektedir. Bu tez çalışması ile suçu gizleme ve delilleri yok etme misyonu ile yapılan davranışlar içerisinde bulunan kan lekeli kıyafetlerin çamaşır makinesinde yıkanması işleminden sonra DNA profilinin ortaya çıkacağı ve olay yeri, mağdur ve fail arasında üçgeni kurabilecek bir maddi delil olma potansiyeli olduğu ayrıca olay yerinin yeniden canlandırılmasına olanak sağlayacağı gösterilmektedir.

Bu tez çalışmasında kan lekeli pamuk ve naylon kumaş türüne ait kumaşlarından 40 °C ve 60°C 'de yumuşatıcı içerikli çamaşır deterjanı ile çamaşır makinesinde yıkanarak DNA profili elde edilebildiği, 90°C 'de ise DNA miktarı tespit edilmiş fakat DNA profili elde edilemediği sonucuna varılmıştır. Naylon kumaşın üzerinde bulunan kan lekesinin pamuk kumaş yüzeyine göre dış etkilere daha fazla maruz kaldığından, DNA elde etmede emici olan pamuk kumaşa göre dezavantajlı olduğu yani; naylon kumaşın 90°C yıkanmasıyla DNA profillendirme için yeterli DNA elde edilemediği gözlenmiştir. Bu da kumaş türünün DNA elde etme ve analizi üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar çerçevesinde; yıkama sıcaklığının ve kumaş türünün kişinin DNA profilini elde edilmesini büyük oranda etkilediğini söylenebilir.

Sonuç olarak bu tez çalışması, olay sonrası delil karartma misyonu ile gerçekleştirilen veya başka bir sebeple 60 °C'ye kadar yıkanmış çamaşırlarda delil niteliği taşıyabilecek DNA'nın elde edilebildiğini, bu sayede yıkanmış kan lekeli delillerin olay yeri, fail, mağdur üçgeni ile ilişkilendirilip adaletin tecellisi konusunda önem arz ettiğini göstermektedir.

Bu tez çalışması Türkiye’de öncü bir çalışma niteliğinde olup, bu çalışmada denenememiş olan farklı izolasyon metotları ve farklı kumaşlarda çalışmanın denenmesi; ayrıca semen, adet kanı, ter ve vajinal sıvılar gibi diğer vücut sıvıları ile birlikte karışım örneklerde sonuçların değerlendirilmesi ve yine art arda yıkama senaryolarının da eklenip ikincil - üçüncül DNA transferi durumlarında DNA profile elde etme çalışmalarının yapılması bir sonraki çalışmalar için önerilmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. “Bond JW, Hammond C. The Value of DNA Material Recovered from Crime Scenes J Forensic Sci. 2008;53(4):797-801.”
2. “Doğan Alakoç Y. Adli Bilimlerde DNA Analizleri Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi, 2010; Cilt 9, Sayı 2.”
3. “National Institute of Justice. Predictions of the Research and Development Working Group. The Future of Forensic DNA testing. U.S. Department of Justice Office of Justice Programs. 2000; 32-36.”
4. “Lee H. C., Ladd C., Bourke M. T., Pagliaro E., Tirnady FDNA typing in forensic science I. Theory and background, Am J Forensic Med Pathol; . 1994-15 (4) ; 269-82.”
5. “Lee H. C. ve Ladd C. Preservation and Collection of Biological Evidence, Croatian Medical Journal. 2001; 42(3): 225-228.”
6. “Anson ML. The denaturation of proteins by synthetic detergents and bile salts. J Gen Physiol. 1939;23(2):239–246.”
7. Voskoboinik L., Amiel M., Reshef A., Gafny R., Barash M. Laundry in a washing machine as a mediator of secondary and tertiary DNA transfer. Int J Legal Med. 2018 Mar;132(2):373-378.
8. “Cox M. A study of the sensitivity and specificity of four presumptive tests for blood. J Forensic Sci. 1991;36:1503–1511.”
9. “Bell S., Sah S., Albright A.D., Gates S.J., Denton M.B., Casadevall A. A call for more science in forensic science Proc Natl Acad Sci. U S A. 2018 May 1; 115(18): 4541–4544.”
10. “Eckert WG., Linacre A., Hadi S. “Introduction to Forensic Sciences” Introduction to forensic genetics editör Eckert WG. , 2007,New York, s.1–10.”

11. “Jeffreys, Alec J., Wilson V., Thein SL. "Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA." *Nature* 316.6023 (1985): 76.”
12. “ Jeffreys, Alec J., Brookfield J.F.Y., Semeonoff R. "Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints." *Nature* 317.6040 (1985): 818.”
13. “Jeffreys A. J., Wilson V., Thein SL. Hypervariable “minisatellit” regions in human DNA, *Nature*; (1985) 314: 67-73.”
14. “Dumache R., Ciocan V., Muresan CO., Enache A. Chapter 5 Molecular Genetics and its Applications in Forensic Sciences. Shetty BS., Padubidri JR. editörler. *Forensic Analysis - From Death to Justice* 2016: 88-96. <http://dx.doi.org/10.5772/63530>.”
15. “Butler JM. Overview and History of DNA Typing. Butler JM editör. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. San Diego, Elsevier Academic Press 2010 ; 1-18.”
16. “Jobling, M. A., Gill, P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nature Reviews Genetics*, 5, 2004 ;739–751.”
17. “Butler JM. DNA Amplification (The Polymerase Chain Reaction). Butler JM editör. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. San Diego, Elsevier Academic Press 2010 ; 125-146.”
18. “Mullis K. B.The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* , 1990 ; 262 , 56 – 65 .”
19. “Fowler C. Polymorphism in the major human repetitive DNA sequences: theory, practice, and comparison with other methods of measuring human genome variation DNA in *Forensic Science: Theory, Techniques and Applications*, . Robertson J., Ross A. M., Burgayne editörler. L. A London 1990;89-103”
20. “Sequencing, T. C., Waterson, R. H., Lander, E. S., Wilson, R. K. (2005). Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature*, 437(7055),69.”

21. "Kreiling, Kenneth R. "DNA technology in forensic science." *Jurimetrics J.* 33 (1992): 449."
22. "Buckleton J.S., Bright JA., Taylor D. *Biological Basis for DNA Evidence. Forensic DNA Evidence Interpretation* . Buckleton J.S., Bright JA., Taylor D. editörler. CRC press, 2016."
23. "Filoğlu G. 7 Tetramerik STR Lokusunun Kriminal İdentifikasyondaki Önemi, İ.Ü Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri A.B.D. [Doktora Tezi] 1999;İstanbul. 3-38."
24. Gomolka M., Hundrieser J., Nürnberg P., Roewer L., Epplen J. T., Epplen C. Selected Di- And Tetranucleotide Microsatellites From Chromosomes 7, 12, 14, And Y In Various Eurasian Populations. *Hum. Genet.* 1994.93: 592–596.
25. Gill P., Urquhart A., Millican E., Oldroyd N., Watson S., Sparkes R., Kimpton C. P., A new method of STR interpretation using inferential logicdevelopment of a criminal intelligence database, *Int J Leg Med*; 1996. 109: 14-22.
26. Jeffreys, A.J. and Wilson, V. Hypervariable regions in human DNA. *Genetical Research* 1985. 45, 213–213.
27. Açar E. X Kromozomuna Bağlı 8 Str Lokusunun Polimorfizmi Ve Adli Bilimlerdeki Önemi [Yüksek Lisans Tezi] İstanbul Üniversitesi, 2009.
28. Yükseloğlu E. H. Y Kromozomu STR Polimorfizminin Babalık Tayini ve Adli İdentifikasyonda Kullanımı. [Doktora Tezi], İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, 2003.
29. 58. Dönbak L. Kısa Ardarda Tekrar Eden DNA Dizilerinin Adli Amaçlı DNA Çalışmalarındaki Yeri Türkiye Klinikleri *J Med Sci.* 2002;22(2):233.
30. Ünsal T. D10S1248, D14S1434, D22S1045, D4S2364, D2S441, D1S1677 Yeni Mini Str Lokuslarının Kan ve Kan Lekelerinde Optimizasyonu [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul Üniversitesi, 2011.

31. Yükseloğlu E. H. Y Kromozomu STR Polimorfizminin Babalık Tayini ve Adli İdentifikasyonda Kullanımı. [Doktora Tezi], İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, 2003.
32. Kayser M. Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Hum Genet.* 2017 May;136(5):621-635.
33. Kayser M, Sajantila A. Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Sci Int* 2008;118:116–121.
34. Ruivo D., Ribeiro T., Espinheira R., Geada H. Use of eight X-chromosomal STRs in paternity investigation. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2008; 1:522–4.
35. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44:388-96.
36. Butler, J. M., Coble, M. D. & Vallone, P. M. STRs vs. SNPs: Thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 2007;3, 200–205.
37. Gill P, Urquhart A, Millican E, Oldroyd N, Watson S, Sparkes R, Kimpton CP. A new method of STR interpretation using inferential logic-development of a criminal intelligence database. *Int J Leg Med* 1996;109:14-22.
38. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991; 49:746-56.
39. Urquhart A, Kimpton PC, Downes TJ, Gill P. Variation in short tandem repeat sequences- a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Leg Med* 1994; 107:13-20.
40. Miller K.W.P., Brown B.L., Budowle B. The Combined DNA Index System. *International Congress Series*2003; 1239, 617–620.

41. Hill, C.R., Duewer, D.L., Kline, M.C., Coble, M.D., Butler, J.M. U.S. population data for 29 autosomal STR loci. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2013;7: 82-83.
42. Coble M. D., Butler J. M. "Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA", *J Forensic Science*; Vol.2005;50: 43-53.
43. "SNPforID browser <http://spsmart.cesga.es/snpforid.php>" (Son Erişim Tarihi 20.08.2019).
44. Sobrinoa B., Brio'na M., Carracedo A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International* 2005;154,181–194.
45. Gill P. An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes, *Int. J. Legal. Med.* 2001; 114, 204–210.
46. Li, H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 2011; 27, 2987–2993.
47. Musgrave-Brown E., Ballard D, Balogh K, Bender K, Berger B, Bogus M, Court D. Forensic validation of the SNPforID 52-plex assay. *Forensic Sci Int Genet.* 2007;1(2):186-90.
48. Sanchez JJ, Phillips C, Borsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevilla M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 2006; 27,1713-1724.
49. Yang Y, Xie B, Yan J. Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2014;12: 190-197.
50. Kidd KK., Pakstis AJ, Speed WC, Grigorenko EL, Kajuna SL, Karoma NJ, Kungulilo S, Kim JJ, Lu RB, Odunsi A, Okonofua F, Parnas J, Schulz LO, Zhukova OV, Kidd JR. Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. *Forensic Sci Int.* 2006 Dec 1;164(1):20-32. Epub 2005 Dec 19.

- 51.** Açıkgöz N., Kendi İ.Ö., Bilge Y. Kan Lekelerine Etki Eden Çevresel Faktörler. Ankara Üniversitesi Hukuk Fakültesi Dergisi 2007 Cilt:56 Sayı:3 Ankara – TÜRKİYE DOI: 10.1501/Hukfak_0000000319
- 52.** Mayesa C.,Houstona R.,Seashols-Williamsb S.,LaRuea B., Hughes-Stamm S. The stability and persistence of blood and semen mRNA and miRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples. Legal Medicine Volume 38, May 2019, Pages 45-50.”
- 53.** Aşıcıoğlu F. Kan Lekesi Model Analizi Adli Tıp Dergisi, 2004; 18(2): 12-22.
- 54.** “Bucka U. Kneubuehla B., Näthera S.,Albertini N., Schmidt L., Thali M. 3D bloodstain pattern analysis: Ballistic reconstruction of the trajectories of blood drops and determination of the centres of origin of the bloodstains. Forensic Science International Volume 206, Issues 1–3, 2011; 22-28”
- 55.** Lee H. C., Ladd C., Bourke M. T., Pagliaro E., Tirnady F. DNA typing in forensic science I. Theory and background, Am J Forensic Med Pathol; 1994;15: 269-82.
- 56.** Lee H. C. ve Ladd C. Preservation and Collection of Biological Evidence, Croatian Medical Journal; 2001; 42(3): 225-228.
- 57.** Kowalczyk M., Zawadzka E., Szewczuk D., Gryzinska M., Jakubczak A. Molecular markers used in forensic genetics Medicine, Science and the Law 2018;58:4, 201-209.
- 58.** Juusola J., Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids, Forensic Sci. Int. 152 (2005) 1–12.
- 59.** Bauer M. RNA in forensic science. Forensic Sci Int: Genetics. March 2007;1(1):69-74.
- 60.** Bauer M., Patzelt D., Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood, J. Forensic Sci. 47, 2002; 1278–1282.
- 61.** Melez İE. Kan Lekesi Tarama Testlerinin DNA Bütünlüğü Üzerine Etkileri. [Uzmanlık Tezi] T.C Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, 2011.

- 62.** Bevel T., Gardner RM. Bloodstain Pattern Analysis. New York: CRC Press; 1997.
- 63.** Lee HC, Pagliaro EM. Serology/Blood identification. In: Payne-James J, Byard RW, Corey TS, Henderson C, editörler. Encyclopedia of forensic and legal medicine. Volume-4. Spain: Elsevier Academic Press; 2005. p.64-70.
- 64.** Hara M., Nakanishi H., Yoneyama K., Saito K., Takada A. Effects of storage conditions on forensic examinations of blood samples and bloodstains stored for 20 years. *Legal Medicine* 18 2016;81–84.
- 65.** Kohlmeier F., Schneider P.M. Successful mRNA profiling of 23 years old blood stains, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 2012;274–276.
- 66.** Aşıcıoğlu F., Arslan M. N. Kan Lekesi Model Analizi; Olay yerinin yeniden yapılandırılmasında kan lekesi delili. Beta Basım Yayım Dağıtım, İstanbul, 2009.
- 67.** Arslan M. N. Kan Lekesi Model Analizi İle Olay Yerinin Yenide Yapılandırılması. T.C Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, 2009.
- 68.** Arslan M. N., Şam B., Özbay, M. Kompleks İntihar Olgusunda Kan Lekesi Model Analizi ile Olay Yerinin Yeniden Yapılandırılması, *Adli Tıp Bülteni*, 2017; 22(2): 146-150, doi: 10.17986/blm.2017227925.
- 69.** Staggs, S. *Crime Scene and Evidence Photographer's Guide* (2nd ed.). Temecula, CA: Wildomar: Staggs Publishing 2005;20-30.
- 70.** Robinson E.M. *Crime Scene Photography*. Richard G.B. editör. *Crime Scene Photography* Second Edition USA, Elsevier, 2010;305-363.
- 71.** Açıkgöz N, Hancı İ.H., Çakır A.H. Olay Yerinden DNA Analizi İçin Biyolojik Örnek Toplama Ve Örneklerin Laboratuara Gönderilme Usulleri. *Ankara Üniversitesi Hukuk Fakültesi Dergisi* Yayın Tarihi: 2002 Sayı: 2 Cilt: 51 , 199-206.

- 72.** Lee HC, Ladd C, Scherczinger CA, Bourke MT., Forensic applications of DNA typing: part 2: collection and preservation of DNA evidence. *Am J Forensic Med Pathol.* 1998 Mar;19(1):10-8.
- 73.** Karaday B., Karadayı Ş., Sezgin N. Biyolojik Delillerin Tespitinde Kullanılan Tarama Ve Doğrulama Testleri Ve Bu Konudaki Son Gelişmeler Türkiye Klinikleri *J Foren Sci Leg Med* 2018;15(2):80-92.
- 74.** Staggs, S. *Crime Scene and Evidence Photographer's Guide* (2nd ed.). Temecula, CA: Wildomar: Staggs Publishing 2005;20-30.
- 75.** Sanchez JJ, Phillips C, Borsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevilla M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 2006; 27,1713-1724.
- 76.** Edelman G.J., Aalders M.C.G. Blood Degradation and Bloodstain Age Estimation. Schotsmans E.M.J.. Márquez-Grant N., Forbes S.L., editörler. *Taphonomy of Human Remains: Forensic Analysis of the Dead and the Depositional Environment: Forensic Analysis of the Dead and the Depositional Environment* John Wiley & Sons Ltd. 2017;54,60.
- 77.** Finnis, J.; Lewis, J.; Davidson, A. Comparison of Methods for Visualizing Blood on Dark Surfaces. *Sci. Justice.* 2013; 53, 178- 186. DOI:10.1016/j.scijus.2012.09.001.
- 78.** Castello, A.; Alvarez, M.; Verdu, F. Accuracy, Reliability, and Safety of Luminol in Bloodstain Investigation. *Can. Soc. Forensic Sci. J.* 2002; 35, 113-121.
- 79.** An J.H., Shin K.J., Yang W.I., Lee H.Y. Body fluid identification in forensics. *BMB Reports*, Vol.45(10) 2012: 545-553.
- 80.** Hunt, A. C., Corby, C., Dodd, B. E. and Camps, F. E. The identification of human blood stains: a critical survey. *J. Forensic Med.* 1960; 7, 112-130.

- 81.** Webb, J. L., Creamer, J. I. and Quickenden, T. I. A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. *Luminescence*. 2006; 21, 214-220.
- 82.** Johnston, E., Ames, C. E., Dagnall, K. E., Foster, J. and Daniel, B. E. Comparison of presumptive blood test kits including Hexagon OBTI. *J. Forensic Sci.* 2008; 53, 687-689.
- 83.** Alaeddini R., Walsh S.J., Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA. *Forensic Science International: Genetics* 4 2010;148–157.
- 84.** Spalding, R. P. Identification and characterization of blood and bloodstains; in *Forensic Science*. James, S. H., Nordby, J. J., editörler. *Introduction to Scientific and Investigative Techniques*. CRC Press, Boca Raton, USA, 2003;181-201.
- 85.** Quinones, I., Sheppard, D., Harbison, S., Elliot, D. Comparative analysis of luminal formulations. *Can. Soc. Forensic Sci. J.* 2006; 40, 53-63.
- 86.** łuczak, S., Woźniak, M., Papuga, M., Stopińska, K., Sliwka, K. A comparison of the Bluestar and luminol effectiveness in bloodstain detection. *Arch. Med. Sadowej Kryminol.* 2002; 56, 239-245.
- 87.** Adli DNA Analiz Teknikleri Karaca M. editör.T.C. İçişleri Bakanlığı Emniyet Genel Müdürlüğü KPL Dairesi Başkanlığı Yayınları. EGM İdari veMali İşler Dairesi Başkanlığı Basımevi Şube Müdürlüğü 2009; 97-105.
- 88.** Larkin T., Gannicliffe C. Illuminating the health and safety of luminol. *Science and Justice* 2008;48, 71–75.
- 89.** F. Proescher, A.M. Moody, Detection of blood by means of chemiluminescence, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 24 1939;1183–1189.
- 90.** łuczak, S., Woźniak, M., Papuga, M., Stopińska, K., Sliwka, K. A comparison of the Bluestar and luminol effectiveness in bloodstain detection. *Arch. Med. Sadowej Kryminol.* 2002; 56, 239-245.

- 91.** Jobling MA., Gill P. Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis. *Nat Rev Genet.* 2005;6(3),246.
- 92.** Nicklas J.A., Buel E. Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bionalytical Chemistry* 2003;376 (8) 1160-7.
- 93.** Greenspoon, S. A., Scarpetta, M. A., Drayton, M. L., Turek, S. A. QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. *Journal of Forensic Science,* 43(5), 1998;1024-1030.
- 94.** Andrews C., Coquoz R. PCR DNA Typing of Washed Stains. Bär W., Fiori A., Rossi U. Editörler. *Advances in Forensic Haemogenetics. Advances in Forensic Haemogenetics, vol 5.* Springer, Berlin, Heidelberg, 1994;343-345.
- 95.** Okutucu, B., Pehlivan, S. Reverz-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi,* 2013;12(2).
- 96.** Butler JM., Buel E., Crivellente F., McCord BR. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis.* 2004;25(10-11):1397-412.
- 97.** Northrop DM, McCord BR, Butler JM. Forensic applications of capillary electrophoresis. *Journal of Capillary Electrophoresis* 1994;1:158-68.
- 98.** Smith A., Nelson R.J. Capillary electrophoresis of DNA. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 2003 Unit 10.9. doi: 10.1002/0471142700.nc1009s13.
- 99.** Lemos, N., Bortolotti, F., Manetto, G., Anderson, R., Cittadini, F., Tagliaro, F., Capillary electrophoresis: a new tool in forensic medicine and science, *Science & Justice* Volume 41, Issue 3, July 2001;203-210.
- 100.** Mayes C., Seashols-Williams S., Hughes-Stamm S. A capillary electrophoresis method for identifying forensically relevant body fluids using miRNAs. *Legal Medicine* Volume 30, January 2018, Pages 1-4.

- 101.** Watts D. 17 Genotyping STR Loci Using an Automated DNA Sequencer. Lincoln P.J., Thomson J., editörler. Forensic DNA Profiling Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 98. Humana Press UK London 1998;193-208.
- 102.** Ulfelder, K.J., McCord, B. Chapter 11. Separation of DNA by capillary electrophoresis. Landers J.P. editörler. Handbook of Capillary Electrophoresis, 2nd. CRC Press, Boca Raton, Fla. 1997;347-378.
- 103.** Smith A., Nelson R.J. Capillary electrophoresis of DNA. Curr Protoc Nucleic Acid Chem. 2003 Unit 10.9. doi: 10.1002/0471142700.nc1009s13.
- 104.** Basset P., Castella V. Positive impact of DNA contamination minimization procedures taken within the laboratory. Forensic Science International: Genetics 38 2019;232–235.
- 105.** Basset P., Castella V. Lessons from a study of DNA contaminations from police services and forensic laboratories in Switzerland Forensic Science International: Genetics 33, 2018; 147–154.
- 106.** Ottoni C., Bekaert B., Decorte R. DNA Degradation: Current Knowledge and Progress in DNA Analysis Schotsmans E.M.J., Márquez-Grant N., Forbes S.L., editörler. Taphonomy of Human Remains: Forensic Analysis of the Dead and the Depositional Environment: Forensic Analysis of the Dead and the Depositional Environment John Wiley & Sons Ltd. 2017; 65-80.
- 107.** Rudin N., Inman K. An introduction of forensic DNA analysis CRC Pres LLC, Florida; 2nd edition 2002;97-131.
- 108.** Butler J.M. Advanced Topics in DNA Typing : Methodology USA Elsevier, Academic Press, USA, 2012;1-213.
- 109.** Smith A., Nelson R.J. Capillary electrophoresis of DNA. Curr Protoc Nucleic Acid Chem. 2003 Unit 10.9. doi: 10.1002/0471142700.nc1009s13.
- 110.** QIAGEN® QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. May 2016; 1-72.

111. "Allsheng-Nano 400 A Micro Spectrophotometer Technical Data <http://www.allsheng.com/Products/Nano400.html> (Son Erişim Tarihi 21.08.2019).
112. Globalfiler™ Per Amplification Kit User Guide. Thermo Fisher Scientific Inc. USA 2016; 1-166.
113. The Applied Biosystems Veriti™ User Guide USA 2010;1-124.
114. Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide, 2010; 1-369.
115. Voskoboinik L., Amiel M., Reshef A., Gafny R., Barash M. Laundry in a washing machine as a mediator of secondary and tertiary DNA transfer. *Int J Legal Med.* 2018 Mar;132(2):373-378.
116. Kamphausen, T., Fandel, S.B., Gutmann, J.S., Bajanowski T., Poetsch1 Everything clean? Transfer of DNA traces between textiles in the washtub *Int J Legal Med* (2015) 129: 709.
117. Edler C., Gehl A., Kohwagner J., Walther M., Krebs O., Augustin C., Klein A. Blood Trace Evidence on Washed Textiles - a systematic approach. *nt J Legal Med.* 2017 Jul;131(4):1179-1189.
118. Houston E.L. The Effects of Various Laundering Factors on the Recoverability of DNA [Yüksek Lisans Tezi] Wright State University 2016; 1-126.
119. Hess S., Haas C. Recovery of Trace DNA on Clothing: A Comparison of Mini-tape Lifting and Three Other Forensic Evidence Collection Techniques. *J Forensic Sci.* 2017 Jan;62(1):187-191.
120. Andrews C., Coquoz R. PCR DNA Typing of Washed Stains. Bär W., Fiori A., Rossi U. Editörler. *Advances in Forensic Haemogenetics. Advances in Forensic Haemogenetics, vol 5.* Springer, Berlin, Heidelberg, 1994;343-345.
121. Stojanović I. Detection Of Bloodstains On Cotton Fabric After Washing. *Acta Medica Medianae* 2019;58 (1):24-27.

- 122.** Oldfield C., Morgan R.M., Miles H.F., French J.C. The efficacy of luminol in detecting bloodstains that have been washed with sodium percarbonate and exposed to environmental conditions. *Australian Journal of Forensic Sciences*. Volume 50, Issue 4, 2018; 345-354.
- 123.** Mushtaq S., Rasool N., Firiyal S. Detection of dry bloodstains on different fabrics after washing with commercially available detergents, *Australian Journal of Forensic Sciences*, 2015;87-95.”
- 124.** Kulstein G., Wiegand P. Comprehensive examination of conventional and innovative bodyfluid identification approaches and DNA profiling of laundered blood- and saliva-stained pieces of cloths. *Int J Legal Med*. 2018 Jan;132(1):67-81
- 125.** Mayesa C.,Houstona R.,Seashols-Williamsb S.,LaRuea B., Hughes-Stamm S. The stability and persistence of blood and semen mRNA and miRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples. *Legal Medicine* Volume 38, May 2019, Pages 45-50.”
- 126.** “Salahuddin Z., Yasir Zahoor M., Kalsoom., Rakha A. You can't hide encoded evidence: DNA recovery from different fabrics after washing. *Australian Journal of Forensic Sciences*, Volume 50, (4) 2018;355-360.”
- 127.** Hofmann M., Adamec J., Anslinger K., Bayer B., Graw M., Peschel O., Schulz M.M. Detectability of bloodstains after machine washing. *Int J Legal Med*. 2019; 133(1):3-16.
- 128.** Arjun Rao I., Ashish P. Identification of Blood Stains on Different Fabrics after Washing with Routinely Used Detergents in India. *Australian Journal of Forensic Sciences* Volume 48, 2016 ;187-94.

8. EKLER

8.1. EK -1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ (BGOF)

ÇALIŞMANIN ADI: Yıkanmış Kan Lekelerinden DNA Elde Edilmesi

Aşağıda bilgileri yer almakta olan bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini, olası yararları ve risklerini, rahatsızlık verebilecek yönlerini anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer çalışmaya katılma kararı verirseniz,

Çalışmaya Katılma Onayı Formu'nu imzalayınız. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ödeme yapılmayacak ya da sizden herhangi bir maddi katkı/malzeme katkısı istenmeyecektir. Araştırmada kullanılacak tüm malzemeler ve yapılabilecek tüm harcamalar araştırmacı tarafından karşılanacaktır.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI :

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni, 18-50 yaş aralığında, sağlıklı bir birey olmanızdır. Bu araştırma Üsküdar Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü'nde gerçekleştirilecektir. Bu çalışmada araştırılacak olan genetik materyal olan DNA, insan organizmasında birçok fonksiyonu yerine getiren bir molekül/elementtir. Bilim dünyasındaki açılımı deoksiribo nükleik asit anlamında olan DNA, çift zincirli yapıdadır ve deoksiribonükleotitlerin birbirine bağlanması sonucu meydana gelmektedir.

DNA'lar, vücut hücrelerinin hemen hemen hepsinde oldukça fazla miktarda bulunmaktadır. Çalışmada DNA incelenecektir.

Bu çalışmanın amacı;

Olay sonrası çamaşır makinesinde yıkanmış biyolojik örneklerden DNA elde edilip edilemeyeceğinin belirlenmesi, suçun tanımının yapılabilmesi ve delillerin ortaya çıkarılmasını sağlamak, tanıkların ifadelerini doğrulamak ya da çürütmek, şüphelilerin sayısını belirlemektir. Kan olay yerinde en sık rastlanan delil olduğundan bu çalışmada kan tercih edilmiş olup yıkanmış kumaşlarda kan lekelerinden DNA miktar tayini yapılarak soruşturmalara yön vermek hedeflenmektedir.

Bu çalışma olay üzerinden süre geçtikten sonra ve deliller karartılmaya çalışıldıktan sonra dahi yıkanmış kan örneklerinde DNA elde edebilmenin mümkün olduğunu göstermek, ayrıca adaletin daha doğru işlemesi ve soruşturmaların daha doğru bir şekilde ilerlemesi açısından yararlı olacaktır.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Araştırmaya katılmak tamamen gönüllülük esasına bağlıdır. 6698 sayılı kanununun 11. Maddesi uyarınca öğrenme, bilgi talep etme, düzeltilmesini talep etme ve verileri yok etme hakkınız bulunmaktadır. Kişisel veriler projenin sona ermesini müteakip proje yürütücüsü tarafından silinecek veya anonim hale getirilecektir.

Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz kolunuzdan 1 tüp (5ml) kan alınacaktır. Genellikle bir tek örnekleme yeterlidir ancak bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir. İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz ve kolda morarma olabilir.

Daha sonra sizden alınacak olan kan numunesi farklı tipteki kumaşlara damlatılarak lekeleme yapılacak ve kan numuneniz saklanmayacaktır.

CALIŞMAYA KATILMAMIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Yapılacak olan bu çalışma ile ülkemizdeki Adli Bilimler ve Adli Genetik alanının gelişmesi için katkı sağlamış adaletin daha doğru işlemesi ve soruşturmaların daha doğru bir şekilde ilerlemesi açısından yararlı olacaktır.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Tarafınızdan alınan örnek saklanmayacaktır. Temsili bir olay yeri oluşturmak üzere, bir kumaşa sıçratılarak lekeleme yapılacaktır. Bu sebeple ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı mümkün değildir. Verdiğiniz bu gönüllü olur formları titizlikle saklanacaktır. İsim, soy isim veya şahsınızı deşifre edebilecek hiçbir bilgi kullanılmayacak ve açıklanmayacaktır.

SORU VE PROBLEMLER İÇİN BAŞVURULACAK KİŞİLER :

1- Işıl Tuna Erdoğan

(Yüksek Lisans Öğrencisi)

Gsm :

Çalışmaya Katılma Onayı

Yukarıdaki bilgileri ilgili araştırmacı ile ayrıntılı olarak tartıştım ve kendisi bütün sorularımı cevapladı. Bu bilgilendirilmiş olur belgesini okudum ve anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorum ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Araştırmacı, saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

<i>Gönüllü Adı Soyadı:</i>		<i>Tarih ve İmza:</i>
<i>Telefon:</i>		

<i>Vasi (var ise) Adı Soyadı:</i>		<i>Tarih ve İmza:</i>
<i>Telefon:</i>		

<i>Araştırmacı² Adı Soyadı:</i>	Işıl Tuna Erdoğan	<i>Tarih ve İmza:</i>
<i>Adres ve Telefon:</i>		

8.2. EK- 2



info@uskudar.edu.tr

Altunizade Mah. Haluk Türksoy Sk. No:14, 34662 Üsküdar / İstanbul / Türkiye
Tel: +90 216 400 22 22 Faks: +90 216 474 12 56

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

SAYI: 61351342-/ 2019-339

30/06/2019

Sayın Dr.Öğr.Üyesi Tuğba ÜNSAL
(Işıl Tuna ERDOĞAN)

Üsküdar Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulunun 30/06/2019 tarihinde yapılan 06 No.lu toplantısında “Yıkanmış Kan Lekelerinden DNA Elde Edilmesi” adlı araştırma projenizin etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Cumhuriyet TAŞ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'y. Maerker'.

8.3. EK-3



www.uskudar.edu.tr

Altunizade Mahallesi Haluk Türksoy Sokak No:14 34662 Üsküdar/İSTANBUL
T: 0216 400 22 22 F: 0216 474 12 56 bilgi@uskudar.edu.tr

ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Yıkanmış Kan Lekelerinden DNA Elde Edilmesi”
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr.Öğr.Üyesi Tuğba ÜNSAL
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Adli Bilimler-Genetik
	YARDIMCI ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	İşıl Tuna ERDOĞAN

KARAR BİLGİLERİ	Toplantı No: 06 Karar No: 01	Tarih: 30/06/2019
	Yukarıda bilgileri verilen girişimsel olmayan araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Doç. Dr. Cumhuri TAŞ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile ilişki		Katılım *	İmza	
Doç. Dr. Cumhuri TAŞ	Psikiyatri/Sinirbilim	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>J. Markoz</i>
Dr. Öğr.Üyesi Meltem NARTER	Psikoloji	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Markoz</i>
Prof. Dr. Abulfaz SÜLEYMANOV	Sosyoloji	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Markoz</i>
Dr. Öğr.Üyesi Asil ÖZDOĞRU	Psikoloji	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Markoz</i>
Dr. Öğr.Üyesi Çiğdem Yavuz GÜLER	Psikoloji	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Markoz</i>
Dr. Öğr.Üyesi Fatma Duygu KAYA YERTUTANOL	Psikiyatri	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Markoz</i>
Doç.Dr.Üyesi Mesut KARAHAN	Biyokimya	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Markoz</i>
Prof. Dr. Defne KAYA	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Markoz</i>
Öğr.Gör.Nuri BİNGÖL	İş Sağlığı ve Güvenliği	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Markoz</i>

Etik Kurul Başkanının

*:Toplantıda Bulunma

Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Cumhuri TAŞ

İmza:

J. Markoz

9. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Işıl Tuna ERDOĞAN

Doğum Tarihi: 18.03.1995

Doğum Yeri: ANKARA

E-posta: isiltunaerdogan1@gmail.com

EĞİTİM DURUMU:

- Üsküdar Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü
Adli Bilimler Anabilim Dalı Adli Genetik Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı (2017-)
- Uşak Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2013 - 2017)
- Bodrum Lisesi (2009-2013)

LİSANS BİTİRME TEZİ:

- Erdoğan IT. Aljlerin Potansiyel Biyoyakıt Olarak Araştırılması. Uşak, 2017.

YAYINLAR:

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler;

- Demirok A., Karaman A., Güngör A., Keleş C., Ceylan E., Fındık EH., **Erdoğan IT.**, Kazancı K., Meherov S., Ünsal T. Atasoy S. "Adli Bilimlerde Epigenetiğin Önemi Ve Kullanım Alanları". 15. Adli Bilimler Kongresi, 12-15 Nisan, Antalya, 2018.

ALDIĞI KURS VE SERTİFİKA PROGRAMLARI:

- Temel Bilirkişilik Eğitimi
- Mobbing