

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ADLİ TIP ANABİLİM DALI**

**POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİNDE HÜCRE DIŞI  
SERBEST DNA VE HMGB-1'İN ROLÜ**

**Dr. Emrah EMİRAL**

**ADLİ TIP ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMANLAR  
Prof. Dr. İ. Hamit HANCI  
Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN**

**Ankara – 2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ADLİ TIP ANABİLİM DALI**

**POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİNDE HÜCRE DIŞI  
SERBEST DNA VE HMGB-1'İN ROLÜ**

**Dr. Emrah EMİRAL**

**ADLİ TIP ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMANLAR**

**Prof. Dr. İ. Hamit HANCI**

**Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinasyon Birimi  
tarafından 14L0230005 proje numarası ile desteklenmiştir**

**Ankara – 2016**

# ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

## TEZ SINAVI TUTANAĞI

### I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN

Adı, Soyadı	: EMRAH EMİRAL	Sınav tarihi: 03 / 06 / 2016
Anabilim/Bilim Dalı	: ADLİ TIP ANABİLİM DALI	
Tez Danışmanı	: Prof.Dr.İ.Hamit HANCI Prof.Dr.N.Lale ŞATIROĞLU TUFAN	

### II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER

Tezin Başlığı: "Postmortem İnterval Tayininde Hücre Dışı Serbest DNA ve HMGB 1'in Rolü"

Tezin Niteliği:  Ana Dal Uzmanlık Tezi  Yan Dal Uzmanlık Tezi

Kaçıncı tez sınavı olduğu:  1  2  3

### III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

Kabulüne

Reddine

Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

Oy birliği  Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

### IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız.

#### Jüri Başkanı

Prof.Dr.Gürol CANTÜRK  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Adli Tıp Anabilim Dalı




Jüri Üyesi

Prof.Dr.N.Lale ŞATIROĞLU TUFAN  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Adli Tıp Anabilim Dalı



Jüri Üyesi

Doç.Dr.Murat EKE  
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Adli Tıp Anabilim Dalı

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezimin konusunun belirlenmesinde, alıőılımasında, yazımında bana destek olan ve her konuda yol gösteren Prof. Dr. N. Lale Őatirođlu TUFAN hocama, tez alıőımam ve uzmanlık eğitimim boyunca her türlü katkı ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. İ. Hamit HANCI hocama, asistanlığım boyunca her konuda yardımlarını esirgemeyen ve uzmanlık eğitimimde geliőimimi sağlayan, bana yol gösteren, bilimsel katkı sağlayan Prof. Dr. Gürol CANTÜRK ve Prof. Dr. Yaőar BİLGE hocalarıma, tezimin laboratuvar aőamasında bana desteklerini esirgemeyen Duygu Yavuz'a, birlikte çalıőmaktan onur duyduğum, çok kıymetli çalışma arkadaőlarıma, hayatım boyunca bana her konuda destek olan ve destek olmaya devam eden beni hiçbir konuda yalnız bırakmayan hayat arkadaőım Gülsüm ztrk EMİRAL 'a ve son olarak hayatıma renk katan kızım Meryem'e teşekkür ederim.

**Dr. Emrah EMİRAL**

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa No:**

<b>KABUL VE ONAY</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	vii
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>1.GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	10
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	12
2.1. ÖLÜM .....	12
2.1.1. Somatik Ölüm.....	12
2.1.2. HücreseL Ölüm.....	12
2.1.3. Yalancı Ölüm.....	13
2.2. ÖLÜM SINIFLAMASI.....	13
2.2.1. Doğal Ölümler .....	13
2.2.2. Zorlamalı Ölümler .....	14
2.3. POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİ.....	14
2.3.1. Postmortem İnterval Tayininde Kullanılan Yöntemler .....	15
2.3.1.1. Ölü Soğuması (Algor Mortis) .....	15
2.3.1.2. Ölü Lekeleri (Livor Mortis) .....	17
2.3.1.3. Ölü katılığı (Rigor Mortis).....	18
2.3.1.4. Oftalmolojik Değişiklikler .....	19
2.3.1.5. Mide İçeriği.....	19
2.3.1.6. Postmortem Koagülasyon ve Hemoliz.....	20
2.3.1.7. Plazma Çalışmaları ve Kan Hücreleri Değişiklikleri.....	20
2.3.1.8. Vitröz Sıvı Çalışmaları.....	22
2.3.1.9. Sinovyal Sıvı Çalışmaları.....	22
2.3.1.10. Perikardial Sıvı Çalışmaları .....	23

2.3.1.11. Kanın Donma Noktası.....	23
2.3.1.12. Beyin Omurilik Sıvısındaki Değişiklikler.....	24
2.3.1.13. Kemik iliği İncelemeleri .....	24
2.3.1.14. Dekompozisyon .....	25
2.3.1.15. Entomolojik Çalışmalar .....	27
2.3.1.16. Moleküler Çalışmalar.....	29
2.4. HIGH MOBILITY GROUP BOX PROTEİNLERİ.....	30
2.5. HÜCRE DIŞI SERBEST DNA .....	31
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>33</b>
3.1. ÖRNEKLEM YÖNTEMİ .....	34
3.2. ÖRNEKLEM SAYISI.....	34
3.3. SERUM ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....	35
3.4. YÖNTEM .....	38
3.4.1. Serumdan HMGB-1 protein miktarı tayini.....	38
3.4.2. Serumdan Hücre Dışı DNA miktarı tayini .....	40
3.4.3. Araştırma Bütçesi .....	41
3.4.4. İstatistiksel Analiz .....	42
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>43</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>51</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>56</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>60</b>
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>62</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>Ark.</b>	: Arkadaşları
<b>BOS</b>	: Beyin Omirilik Sıvısı
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>EKG</b>	: Elektrokardiyografi
<b>ELİSA</b>	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
<b>HMG</b>	: High Mobility Group
<b>HMGB-1</b>	: High Mobility Group Box 1
<b>mEq</b>	: miliekivalan
<b>mm<sup>3</sup></b>	: milimetre küp
<b>mmol/l</b>	: milimol/litre
<b>mg/kg</b>	: miligram/kilogram
<b>NK</b>	: Natural Killer
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PMI</b>	: Postmortem İnterval
<b>RNA</b>	: Ribo Nükleik Asit
<b>µl</b>	: mikrolitre

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No:

<b>Tablo 3.1:</b> Deney hayvanlarının ortam sıcaklığı ve postmortem süreye göre gruplaması.....	36
<b>Tablo 4.1:</b> 12. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum HMGB-1 konsantrasyonları (ng/ml).....	44
<b>Tablo 4.2:</b> 48. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum HMGB-1 konsantrasyonları (ng/ml).....	45
<b>Tablo 4.3:</b> 48. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum HMGB-1 konsantrasyonları (ng/ml).....	45
<b>Tablo 4.4:</b> 6. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları (ng/ml).....	47
<b>Tablo 4.5:</b> 9. Saatte +4°C ve +24°C'deki serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları (ng/ml).....	47
<b>Tablo 4.6:</b> 48. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları (ng/ml).....	48
<b>Tablo 4.7:</b> 72. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları (ng/ml).....	48



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No:

<b>Şekil 2.1:</b> Normal bir çevre ısısında postmortem sürenin hesaplamasında kullanılan ana değişiklikler .....	15
<b>Şekil 2.2:</b> Henssge normogramı .....	16
<b>Şekil 2.3:</b> Ölü lekeleri.....	17
<b>Şekil 2.4:</b> Ölü katılığı .....	18
<b>Şekil 2.5:</b> Tache noire sklerotica .....	19
<b>Şekil 2.6:</b> Nötrofillerde görülen dejeneratif morfolojik değişiklikler.....	21
<b>Şekil 2.7:</b> Sağda daha belirgin olmak üzere her iki fossa iliakada, çürümenin ilk belirtisi olan yeşil renk değişimi .....	25
<b>Şekil 2.8:</b> Üst ekstremitede çürümeye bağlı kirli-kırmızı yeşil renk değişimi ve çürüme haritası (mermerleşme) .....	27
<b>Şekil 2.9:</b> Sineklerin yaşam döngüsü. Saat yönünde yumurtalar, larva ya da kurtçuklar, pupa ve yetişkin sinek .....	28
<b>Şekil 3.1:</b> Deney hayvanları çalışma grupları.....	34
<b>Şekil 3.2:</b> Deney hayvanlarından otopsi ile kan örneklerinin toplanması .....	35
<b>Şekil 3.3:</b> 24 °C’de 72. saatte görülen batın perforasyonu .....	37
<b>Şekil 3.4:</b> 24 °C’de 72. saatte kurtlanma ve ciltte soyulma .....	37
<b>Şekil 3.5:</b> 24 saatlik inkübasyon sonrası plakanın görünümü .....	39
<b>Şekil 3.6:</b> Renk reaksiyonu sonrası plakanın görünümü .....	40
<b>Şekil 4.1:</b> +4 °C’de serum HMGB-1 protein konsantrasyonunun postmortem zaman ile ilişkisi.....	43
<b>Şekil 4.2:</b> +24 °C’de serum HMGB-1 protein konsantrasyonunun postmortem zaman ile ilişkisi.....	44
<b>Şekil 4.3:</b> +4 °C’de hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun postmortem zaman ile ilişkisi.....	46
<b>Şekil 4.4:</b> +24 °C’de hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun postmortem zaman ile ilişkisi.....	46
<b>Şekil 4.5:</b> +4 °C’de hücre dışı serbest DNA ve HMGB-1 protein konsantrasyonlarının zaman ile ilişkisi .....	49
<b>Şekil 4.6:</b> +24 °C’de hücre dışı serbest DNA ve HMGB-1 protein konsantrasyonlarının zaman ile ilişkisi .....	50

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Adli ölümlerin soruşturma evresinde Adli tıp uzmanlarının sık karşılaştığı sorulardan birisi ölüm zamanının tam ve doğru belirlenmesinin istenilmesidir (1). Adli ölümlerde ölüm nedeni kadar ölüm zamanı da önemlidir. Adli ölüm bir şüphelinin olması durumunda, ölüm zamanının belirlenmesiyle şüpheli kişinin suçsuz olduğu ya da başka bir kişinin ölüm ile ilişkisi olduğu saptanabilir. Ayrıca bazı sigorta ve miras gibi hukuk davalarında ölüm zamanı kovuşturmayı yönlendirecek oldukça önemli bilgi sağlayabilir. Ölüm zamanının tayininde kullanılan klasik metodlar; Ölüm belirtileri, kanın donma derecesi, sakal ve kılların ölçümü, mide muhtevası, kan şekeri ölçümü, kemik iliği hücrelerindeki değişiklikler, kan pH'sının ölçümü şeklinde sıralanabilir (2). Ölüm belirtilerinden; ölü lekelerinin ve ölü sertliğinin başlaması, yayılması, sonlanması, rektumdan ölçülen vücut ısısı, dış genital organların parşömenleşmesi, çürümenin evreleri, adelelerin ve kemiklerin özelliklerinden yararlanılmaktadır. Kılların kesilme zamanı biliniyorsa kılların ölçülmesiyle ölüm zamanı tahmin edilebilir(2, 3). Laboratuvar analizlerinin gelişmesiyle postmortem interval tayininde, vücut sıvılarında protein fraksiyonlar, üre, kreatinin, glukoz, demir, potasyum, kalsiyum ve enzim gibi birçok biyokimyasal belirteçler kullanılmıştır (4). Kullanılan birçok yöntemle rağmen postmortem interval tayininde halen kesin sonuç veren bir metod bulunmamaktadır.

HMGB1 proteini; makrofajlar, monositler, NK hücreleri, dendritik hücreler, endotelial hücreler ve trombositler dahil olmak üzere, immün hücrelerden aktif olarak salınabildiği gibi pasif olarak da nekrotik, apoptotik ve hasar görmüş hücrelerden salınmaktadır. Nekrotik hücreler, apoptotik hücrelere göre daha fazla HMGB1 salınımına neden olurlar (5). Postmortem dönemde meydana gelen değişiklikler sonucunda hücrelerde nekroz meydana gelir ve nekroza uğrayan hücrelerden HMGB1 proteini salınır. Postmortem dönemde serumda saptanan bu HMGB1 protein miktarından postmortem interval (PMI) tayininde yararlanılabilir. Yapılan bir çalışmada HMGB1 ölçümünün PMI tayinini belirlemede kullanılabileceği ve HMGB-1 analizinin adli tıpta yeni bir yöntem olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca PMI tayininin

tam ve doğru belirlenmesi için bu yöntemin diğer mevcut yöntemlerle kombine kullanılabileceği gösterilmiştir(4).

Ölümden sonra hücrelerde meydana gelen nekroz nedeniyle hücrelerin karbonhidrat, yağ ve protein yapısında parçalanmalar meydana gelerek normal biyokimyasal ve morfolojik yapıları bozulur. Çekirdek ve hücre membranları ile korunmuş olan DNA açığa çıkar. Ölümün meydana gelmesi ile özellikle damar endotelinde meydana gelen nekroz sonucunda periferik kandaki hücre dışı serbest DNA miktarının artması beklenmektedir. Postmortem intervalin özellikle ilk 72 saatlik döneminde zamanla paralel olarak hücre nekrozunun artışı, hücre dışındaki serbest DNA miktarındaki olası değişikliklere neden olabilir ve hücre dışı serbest DNA miktarının belirlenmesi postmortem interval tayininde önemli bir belirteç olabilir.

Literatür taraması sonucunda PMI tayininde hücre dışı serbest DNA miktarının araştırıldığı çalışmaya rastlanılamamıştır. Ancak, postmortem interval tayininde postmortem serum HMGB1 protein seviyesinin araştırıldığı Kagoshima Üniversitesinde yapılan bir çalışma bulunmaktadır. Tez kapsamında yapılan araştırmaya serum HMGB1 protein miktar tayininin dahil edilme amacı, postmortem interval tayininde olası yeni bir belirteç olabilecek olan hücre dışı serbest DNA miktarının deney sonuçlarının, daha önce literatürde yeni bir belirteç olarak tanımlanan HMGB1 proteininin deney sonuçları ile karşılaştırılmasının sağlanmasıdır.

Postmortem geçen süre arttıkça hücre dışı serbest DNA ve serum HMGB1 protein miktarının zamana paralel olarak artacağı hipoteziyle yürütülen bu tez çalışmasında postmortem süreçte, serumda bulunan hücre dışı serbest DNA ve HMGB1 protein miktarının ölçülerek ölüm sonrası geçen sürenin doğru ve tam olarak tespit edilmesi için olası yeni bir belirtecin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. ÖLÜM

Ölümün felsefi, sosyolojik, antropolojik, dini, hukuki ve tıbbi olmak üzere birçok yönü vardır. Tıbbi açıdan, kısaca yaşamın ve canlılık halinin sona ermesi ‘ölüm’ olarak tanımlanabilir. Ölüm bazen birkaç dakikada hatta bir anda meydana gelebilirken bazen saatler hatta günlerce sürebilen bir süreçtir (6). Ölüm kavramı, somatik ölüm ve hücrel ölüm olarak iki şekilde karşımıza çıkmaktadır.

#### 2.1.1. Somatik Ölüm

Bireyin toplumun bir parçası olarak işlevini yitirdiği anlamına gelen ölümdür (7). Klinik ölüm ya da sistemik ölüm olarak da adlandırılır. Hareket ve duyarlılık yeteneğinin tam kaybı ile karakterizedir. ‘Yaşam tripodu’ olarak adlandırılan dolaşım, solunum ve merkezi sinir sistem fonksiyonları tam ve geri dönüşümsüz olarak sona ermiştir(8). Esasen hukuki anlamda önemli olan ölüm tanımı bu tanımdır. Kişinin toplum içerisindeki hukuki varlığı somatik ölüm ile sonlanır (6).

#### 2.1.2. Hücrel Ölüm

Hücrel ölüm farklı doku ve organlara ait hücrelerin kademe kademe ölmesi anlamına gelir. Dolaşım ve solunum yokluğunda meydana gelen somatik ölümden sonra farklı doku ve organlardaki metabolik aktivite ve oksijen durumuna göre hücrel ölüm de farklı zamanlarda gerçekleşir (8). Kemik, kas ve vücudun çatısını oluşturan bağ dokusu elemanları hipoksiye uzun süre direnç gösterebilir. Örneğin, deride fibroblastlar ölümden bir gün sonraya kadar canlı kalabilmektedirler (7). Spermiler 2 ile 3 gün, titrek tüylü epitel hücreleri 13-14 saat kadar hareket kabiliyetini muhafaza edebilmektedirler. Kas hücreleri elektriksel uyarılarla 1.5–6 saat kadar uyarılabilir (9). Hücrel ölüm, hukuksal açıdan çok önemli olmadığı halde kadavra donörden organ-doku nakli yapılacak olgularda, nakil olacak organ ya da dokunun canlılık durumunun başarı şansını etkilemesi nedeniyle oldukça önemlidir (6).

### 2.1.3. Yalancı Ölüm

Kişinin ölmediği ancak öldü zannedildiği durumdur. İç ve dış kanamaların neden olduğu senkopta, asfikside, ilaç ve uyuşturucu madde zehirlenmelerinde, yıldırım ve elektrik çarpmalarında, soğukta kalanlarda, inhibisyonda, korku ve heyecanın etkisiyle bayılmada, histeriklerde ve kafa travmalarında yalancı ölüm olabileceği için dikkatli olunmalıdır (3). Dolaşım ve solunumun saptanamadığı şüpheli durumlarda EKG gibi kesin bulgular veren yardımcı tetkikler mutlaka kullanılmalı ve kısa aralıklarla tekrar tekrar muayene yapılmalıdır (10).

## 2.2. ÖLÜM SINIFLAMASI

Ölüm türleri çeşitli kriterlere göre farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. Adli tıp pratiğinde; doğal ölümler ve doğal olmayan zorlamalı ölümler şeklinde iki sınıfa ayrılmaktadır

### 2.2.1. Doğal Ölümler

Normal yaşam süresini tamamlayan, kendisinde mevcut organik bir hastalığının sonucunda olan ya da bu hastalığın seyri sırasında oluşan komplikasyonlar sonucunda oluşan ölümlerdir (11). Hastalığa bağlı ölüm şekli olduğundan 'patolojik ölüm' olarak da isimlendirir (12). Bu ölümden üçüncü şahısların etkisi olmadığı gibi makul şüphe uyandıracak bir zorlama da yoktur (11). Ancak doğal ölüm olmasına rağmen 'ani' ve 'beklenmeyen' ölümler adli kovuşturmayı gerektiren ölüm olarak karşımıza çıkabilirler (12). Ani ölümün tanımı otoritelere göre farklılık göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü semptomların başlangıcından sonra 24 saat içinde ölümün gerçekleşmesini ani ölüm olarak tanımlamaktadır. Diğer bir tanım ise semptomların başlangıcından sadece birkaç saat içinde ölümün meydana gelmesidir (13). Ani ölüm olayı genelde insanlar tarafından farkedilirken; beklenmeyen ölüm ani ya da uzun süren bir zaman aralığında olabildiği için genelde insanlar tarafından görülmeyen ölüm türüdür (12).

### 2.2.2. Zorlamalı Ölümler

Bir kişinin herhangi bir hastalığa bağlı olmaksızın önceden belirlenemeyecek şekilde intihar etmesi, cinayete kurban gitmesi ya da meydana gelen bir kaza sonucu ölmesi zorlamalı ölüm olarak tanımlanmaktadır (11). Meydana gelen zorlamalı ölümlerin tümü adli tıbbın çalışma kapsamındadır. Bir ölüm nedeninin belirlenmesi olay yeri adli soruşturması ile başlayan, cesedin muayenesi, otopsi ve postmortem incelemeler ile devam eden ve sonuç olarak hukuken karar verilen bir süreci ifade eder (12).

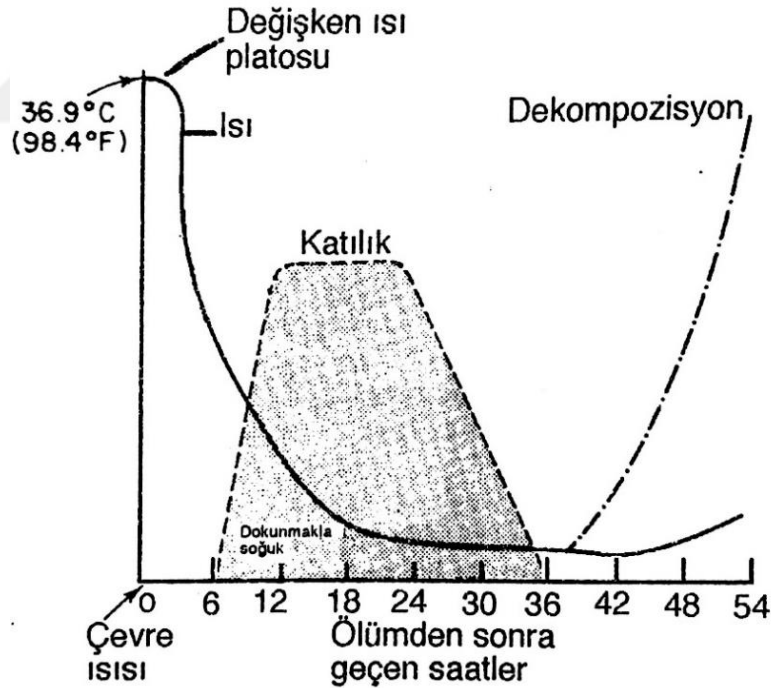
### 2.3. POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİ

Ölümün görgü tanığı olmadıkça gerçek ölüm zamanı ile bulunduğu süre arasında geçen zaman dilimi kesin olarak belirlenememektedir. Bununla birlikte, yeterli bilgi olması gerçek ölüm zamanını içeren bir zaman dilimi tahmininde bulunmaya izin verebilir (14). Ölümden sonra vücutta birçok fiziksel, metabolik, otolitik ve biyokimyasal süreçler meydana gelir. Bu süreçler sonucunda oluşan değişiklikler vücut bütünlüğü dağılana kadar düzenli bir şekilde ilerler ve postmortem interval tayinini belirlemede büyük önem taşırlar (15). Tıbbın tüm alanlarında olduğu gibi postmortem interval tayininde klinik öykü çok önemlidir. Kolluk kuvvetlerinin soruşturmasının yanı sıra otopsideki elde edilen fiziksel bulgular klinik öykü ile örtüşmeyebilir. Bütün bulguların sonucunda kesin ölüm zamanından ziyade bir zaman aralığı belirlenebilmektedir (16). Ölümden sonra vücut soğuması, ölü katılığı ve ölü lekelerini içeren birçok fiziksel değişiklikler iyi bilinen postmortem değişikliklerdir. Bu değişiklikler PMI belirlenmesinin ana temeli olmaya devam etmektedir. Yüzyıldan daha fazla zamandan bu yana çeşitli fiziksel değişiklikler, çeşitli vücut doku ve sıvılarındaki biyokimyasal değişiklikler, DNA/RNA degradasyonu ve adli entomoloji dahil olmak üzere birçok yaklaşım PMI tahmini için kullanılmıştır (17). PMI erken dönemde saat aralıkları, geç dönemde gün ve haftalar, çok ileri dönemde ay ve yıllarla ifade edilir (12).

### 2.3.1. Postmortem İnterval Tayininde Kullanılan Yöntemler

#### 2.3.1.1. Ölü Soğuması (Algor Mortis)

Yaşayan normal bireylerde oral sıcaklık 37 °C'dir. Rektal sıcaklık ise oral sıcaklıktan yaklaşık 0.5°C yüksektir. Ölüm sonrası fiziksel, kimyasal ve metabolik aktivitenin kaybı nedeniyle ısı merkezi inaktif hale gelir ve ısı üretimi sonlanır. Bu nedenlerle vücut sıcaklığı çevre sıcaklığına ulaşana kadar düşmeye devam eder. Ölü soğuması kondüksiyon, konveksiyon ve radyasyon olmak üzere üç mekanizmayla gerçekleşir. Kondüksiyon, direk temas yoluyla ısının iletilmesidir. İç organlar bu yolla soğur. Konveksiyon hava akım hareketiyle ısının transferidir. Radyasyon yoluyla soğuma ise vücuttan çevreye kızıl ötesi ışınlar yoluyla ısı transferinin olmasıdır (8). Rektum dahil derin organlar cesedin merkeziyle yüzeyi arasında ortalama bir ısı oluşmadan soğumazlar. Bu gecikme nedeniyle bir ısı platosu oluşur. Bu plato birkaç dakikadan 2-3 saate kadar sürebilir (7).

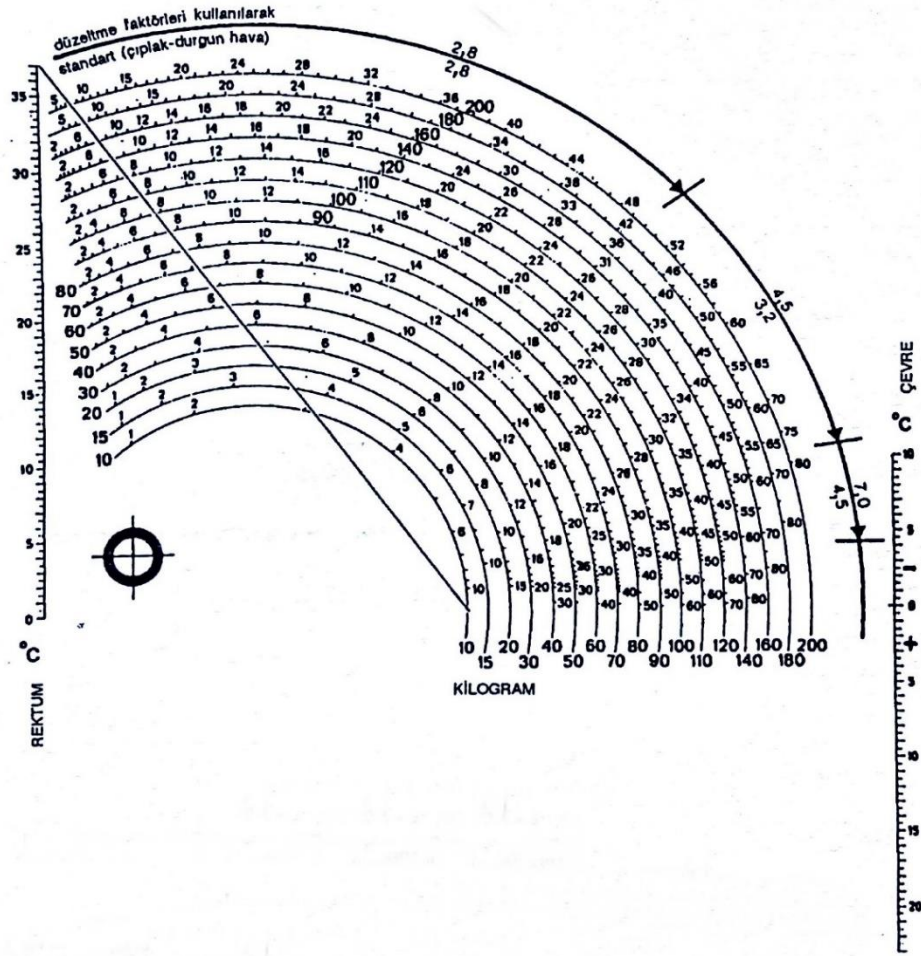


**Şekil 2.1:** Normal bir çevre ısısında postmortem sürenin hesaplamasında kullanılan ana değişiklikler (7).

Soğuma hızını etkileyen faktörler; çevre sıcaklığı, vücudun giysili ya da örtülü olması, hava hareketi ve nemi, vücudun beslenme durumu ve gelişmesi, cesedin sıvı

içinde olması sayılabilir. Enfeksiyon, ödem, beyin kanaması gibi başlangıç ısını yükselten, hipertermi nedenleri ve başlangıç ısını düşüren hipotermi nedenleri de soğuma hızını etkilemektedir (12). Ölümden sonra vücut ısısının en güvenilir ölçme metodu visseral sıcaklığın ölçülmesidir. Visseral sıcaklık ölçülemez ise rektal sıcaklık kullanılabilir (3). Isı platosu geçtikten sonra rektal ısı çevre ısısına 5 °C yaklaşıncaya kadar, saat başında 1 °C den daha az düşer. Pratikte çevre ısısı 16-20°C kabul edildiğinde ölümden 6 saat sonra rektal ısının 30-34°C, 10 saat sonra 28°C olması beklenir (7). Ölü soğumasından faydalanarak kullanılan en kullanışlı kılavuz Henssge'in yayınladığı normogramdır. Henssge normogramı vücut ağırlığı, ortam sıcaklığı, giysilerin kuru veya ıslak olması, havanın durgun veya hareketli olması, suyun hareketli veya durgun olması gibi düzeltmeler içermektedir (18).

%95 Güvenirlikle Ölüm Zamanının Tayini (±Saat)



Şekil 2.2: Henssge normogramı(7)



Henssge normogramı, 23 °C'ye kadar olan çevre ısısında C. Henssge ve B. Madea tarafından yapılmıştır. Ölüm zamanı hesaplamasında rektal ısı ve çevre ısısı ölçümüne dayanmaktadır. İkisi arasına düz bir çizgi çekilir. Bu çizgi normogramı bir noktada keser. Normogramın sol alt bölgesindeki dairenin merkezinden birinci çizgiyi kesecek şekilde ikinci bir çizgi çekilir. İkinci çizginin vücut ağırlığını gösteren yarım daireyi kestiği noktada ölüm zamanı okunur. Bu şekilde % 95 güvenilirlikle ölüm zamanı hesaplanır (7).

### 2.3.1.2. Ölü Lekeleri (LivorMortis)

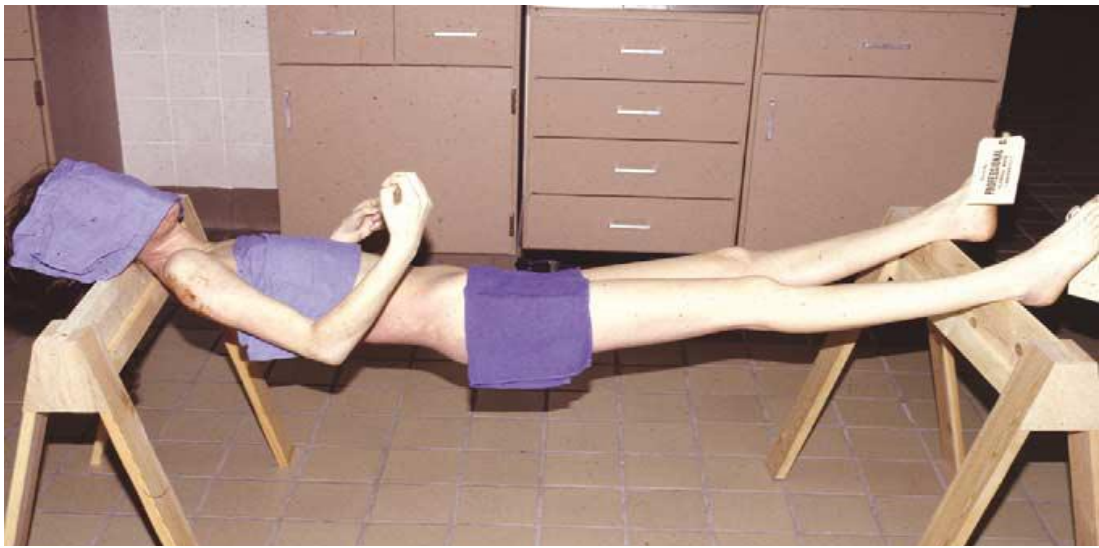
Ölü lekeleri yer çekiminin etkisiyle vücudun yere yakın kısımlarındaki küçük damarlarda kan birikmesi sonucunda görülen kırmızı - mor renk değişiklikleridir (19).Vücut yüzeyine dışarıdan bası olduğunda, bası olan bölgedeki küçük damarlarda obstrüksiyon olur ve bu bölgelerde ölü lekesi oluşmaz. Ölümden sonra 30 dakika ila 3 saat içerisinde ölü lekeleri görülmeye başlar. Zaman geçtikçe oluşan lekeler birleşir ve genellikle 4 ila 8 saat içerisinde bütün olurlar. Ölümden 10 saat sonra maksimum yoğunluğa ulaşırlar (20). Ölümden sonraki ilk 10 saat içerisinde cesedin yeri ya da pozisyonu değiştirilirse ölü lekeleri ilk oluştukları yerden kaybolarak cesedin yeni konumuna göre yeniden oluşmaktadırlar. Cesedin yeri ya da pozisyonu 10- 15 saat arasında değiştirilirse her iki durumuna uygun yerlerde ölü lekeleri oluşur. 15-20 saatten sonra hiçbir şekilde ölü lekelerinin yeri değişmez ve artık sabit kalır (12).



Şekil 2.3: Ölü lekeleri (18)

### 2.3.1.3. Ölü katılığı (RigorMortis)

Ölü katılığı ölüm sonrası miyoplazmadaki kimyasal değişiklikler sonucunda kasların sertleşmesidir (21). Kasların kasılması için temel enerji kaynağı Adenozin Trifosfat (ATP)'dir. Kaslarda mevcut olan ATP miktarı kasın sadece birkaç saniye kasılmasını sağlayabildiği için kasların kasılabilmesi için kesintisiz olarak ATP ihtiyacı duymaktadırlar. Ölümden sonra ATP üretimi durmakta tüketim ise devam etmektedir. ATP olmadığında, aktin ve myozin filamentler kalıcı kompleks halini almakta ve çürüme başlayana kadar bu kompleks kalmaktadır (22). Ölü sertliği genellikle yüzden başlayarak boyun, omuz, kol, önkol, gövde, karın, uyluk, gövde, bacak, ayak sırasını takip etmektedir (3). Ölü katılığı genellikle ölümden 2 ila 4 saat sonra görülmeye başlamakta olup 6 ila 12 saat içerisinde tamamlanmaktadır. Ancak bu süreler değişkenlik gösterebilmektedir (22). Ölü katılığı tam geliştiğinde baş ve ayak bilekleri ile vücudu destekleyecek kadar güçlü olur (Şekil 2.4). Ölü katılığı, gelişim sırasında ceset hareket ettirilerek katılık bozulursa vücudun son pozisyonuna göre yeniden katılık oluşurken; katılık tamamlandıktan sonra katılık bozulursa tekrar oluşmamaktadır. Ölü katılığının yerçekimi ya da vücudun pozisyonu ile uyumsuz olması cesedin taşındığını düşündürmektedir (21). Ölümden hemen önceki egzersiz vücuttaki ATP'yi tüketeceği için ölü katılığının hızla gelişmesine neden olur. Ayrıca cesedin bulunduğu ortamın sıcaklığı, açık ya da kapalı bir alan oluşu, kilo ve giysi durumu ölü katılığının süresi üzerinde etkili değişkenlerdir (23).



Şekil 2.4: Ölü katılığı (21).

#### 2.3.1.4. Oftalmolojik Değişiklikler

Postmortem interval tayinine gözlerde meydana gelen değişikliklerden yardımcı bulgular olarak yararlanılabilmektedir. Korneal bulanıklık ve opasite dakikalar ile saatler arasında gelişir. Ancak gözlerin açık ya da kapalı oluşu bu süreleri etkileyebilir (24). Açık kalan gözde korneal bulanıklık 10-12 saatte gelişir. Bu süreç üremi, narkotik zehirlenmesi ve kolera nedenli ölümlerde erken görülürken, inme, karbonmonoksit ya da hidrosiyamik asit zehirlenmelerinde gecikir. Çürümenin başlamasıyla da kornea opaklaşmaktadır. Gözler açık kaldığında konjktiva ve skleranın kurumasıyla sklerada siyahımsı kahverengi renk değişikliği görülür. Bu renk değişikliği 'tache noire sklerotica' olarak adlandırılır (Şekil 2.5). Açık kalan gözleri skleralarında; 2-3 saatte sarımsı renk değişikliği, 8-10 saatte kahverengi renk değişikliği oluşmaktadır (8). Bu bulguların dışında gözde ölüm sonrası 6 saate kadar yararlanılabilen göz içi basınç ölçümünden, oftalmoskop ile direkt retinal damarların görüntülenmesine kadar birçok yöntem PMI tayini için kullanılabilmektedir. İrisin bir elektrik yükleme veya farmasötik stimülasyon sonucunda refleks olarak kasılması erken postmortem dönemde görülebilir. Lokal katekolamin enjeksiyonu ölüm sonrası 46 saate kadar bu refleksi indükleyebilir (25).



Şekil 2.5: Tache noire sklerotica (8).

#### 2.3.1.5. Mide İçeriği

Mide içeriğinin bulunması, görünümü ve miktarı ölüm zamanının tahmininde yararlı olabilir. Bu tahmin midenin bilinen boşalım oranı varsayımına dayanmaktadır.

Bu oran; yemeğin içeriği ve miktarı, ilaç veya medikal içeriği, cesedin önceki medikal ve emosyonel durumu gibi çeşitli faktörlerden etkilendiğinden yaklaşık olarak bilinir. Nişastalı ve yağlı gıdalar midenin boşalmasını geciktirebilir. Hafif yemekler 1 ila 2.5 saate kadar, orta ağırlıkta yemekler 3 ila 4 saate kadar, ağır yemekler 4 ila 6 saate kadar midede kalabilir. Mide boşalımı kompleks ve multifaktöriyel bir süreç olduğu için ölüm zamanının hesaplanmasında kullanımında çok dikkatli olunmalı ve sınırlayıcı faktörler dikkatlice değerlendirilmelidir (26).

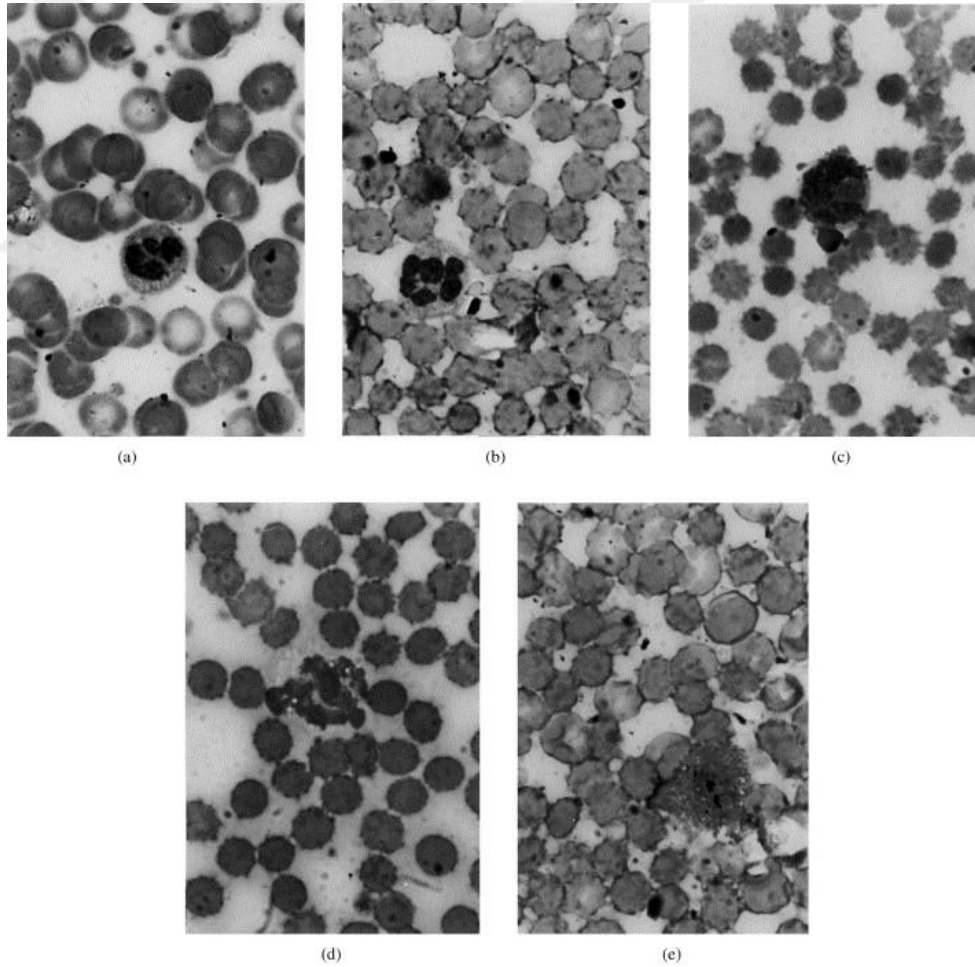
### **2.3.1.6. Postmortem Koagülasyon ve Hemoliz**

Ölümden sonra pıhtılaşma süreci bir müddet daha devam eder ve 12 saat sonra tamamen durur. Laboratuvar tetkiklerinde kanda pıhtılaşma görülmediğinde ölümün üzerinden en az 12 saat geçtiği kabul edilmektedir (9). Postmortem dönemde yaklaşık ilk yarım saatten sonra postmortem pıhtılaşma süreci başlar. Ancak postmortem dönemde oluşan pıhtı antemortem dönemde oluşan pıhtıdan farklıdır. Postmortem dönemde pıhtının şekilli elemanları fibrinden oluşur. Bu pıhtıya 'aleka' denir. Postmortem pıhtı sarımtırak bir renkte olup büyük damar ve kardiyak boşlukları doldurmaktadır. Ölümden yaklaşık 3 saat sonra bu pıhtı erimeye başlar ve postmortem hemoliz yaklaşık olarak 24 saatte tamamlanır (27).

### **2.3.1.7. Plazma Çalışmaları ve Kan Hücreleri Değişiklikleri**

PMI tayini için protein fraksiyonları, üre, kreatin, glukoz, demir, potasyum, kalsiyum, enzimler, myo-albumin fraksiyonu ve stronsiyum 90 kalsiyum analogu seviyeleri gibi birçok biyokimyasal belirteç araştırılmıştır (28). Literatürde serum sodyum konsantrasyonunun düşüş oranı saatte ortalama 9 meq olarak, serum potasyum konsantrasyonunun ise ölüm sonrası ilk 1-2 saat hızla yükseldiği rapor edilmiştir. Serum sodyum, potasyum konsantrasyonu ve oranları ile ölüm sonrası geçen süre arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Ancak PMI tayininde bu elektrolitler kullanılırken çevre sıcaklığı ve ölüm nedeni gibi elektrolit düzeyini etkileyebilecek konularda oldukça dikkatli olunmalıdır (29).

Standart histokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak kan hücrelerinin morfolojik değişimlerinin tanımlanması erken postmortem dönemde yardımcı olabilir (25). Dokgöz ve ark. yaptığı bir çalışmada nötrofil, eozinofil ve monosit hücrelerinde postmortem ilk 6 saatte piknotik değişikliklerin olduğu, 12 saat sonra nükleer vakuolizasyonun gözleendiği, nükleer parçalanmanın nötrofil ve eozinofillerde 18 saat sonra monositlerde 24 saat sonra başladığı, parçalanmanın ise nötrofillerde 48- 96 saat arasında, eozinofil ve monositlerde 48-72 saat arasında görüldüğü, lenfositlerde nükleer şişme ve hücre membranı belirsizliği 24 saat sonra gözleendiği, piknotik değişikliğin 36 saatte, nükleer parçalanmanın 72 saatte, hücre parçalanmasının 96 saatte görüldüğü raporlanmıştır (30). PMI tayininde bu tekniğin kullanılması ortalama 120 saat ile sınırlıdır. Ayrıca bu değişiklikler subjektiftir ve gözlemci deneyimi oldukça önemlidir (25).



**Şekil 2.6:** Nötrofillerde görülen dejeneratif morfolojik değişiklikler.

a) Normal; b)Piknozis; c) Sitoplazmik ve nükleer vakuolizasyon; d) Nükleer fragmentasyon; e) Parçalanma (30).

### 2.3.1.8. Vitröz Sıvı Çalışmaları

Vitröz sıvı postmortem dönemde oldukça stabil bir sıvıdır ve geç postmortem interval de bile güçlükle kontamine olmaktadır (31). Kolay ulaşılabilir olması, beyin omurilik sıvısı ve serum gibi vücut sıvılarıyla içeriğinin benzer olması nedeniyle postmortem interval tayininde kullanılabilir (32). PMI tayini için vitröz sıvıda potasyum, sodyum, klorid, kalsiyum, magnezyum, fosfat, üre, kreatin ve laktat gibi maddelerin biyokimyasal analizi yapılmıştır (31). Vitröz sıvının normal potasyum değeri yaklaşık olarak 3.8mmol/l dir (32).Ölümden sonra selektif hücre membran geçirgenliğinin bozulmasıyla önemli miktarda potasyum kademeli olarak hücre dışına sızarak ekstrasellüler sıvıya geçer. Vitröz sıvı az miktarda hücre içerir ve potasyum konsantrasyonu diğer hücre dışı sıvılara benzer seviyelerdedir. Postmortem dönemde çevre retinal ve koroidal hücrelerden sızan potasyum nedeniyle vitröz sıvı potasyum seviyeleri yükselir (33).Ölüm zamanının tahmininde potasyum seviyelerinin kullanılmasında ilk 24 saatte  $\pm 10$  saat, ilk 48 saatte  $\pm 20$  saat, ilk 72 saate  $\pm 30$  saatlik bir değişkenlik potansiyeli vardır. Vitröz sıvıdaki potasyum konsantrasyonu çürüme oranından etkilendiği için çok geniş değişim gösterebilmektedir. Çürümeyi hızlandıran faktörler potasyum düzeyini de artıracaktır (22). Chandrakanth ve ark.yaptığı bir çalışmada; ölüm zamanı arttıkça sodyum ve klorür konsantrasyonlarında minimal bir düşüş, potasyum konsantrasyonunda ise minimal bir yükseliş görülmesine rağmen, PMI ile vitröz sıvı sodyum, potasyum ve klorür konsantrasyonları arasında anlamlı bir korelasyon olmadığı bu nedenle PMI tayininde tek başına kullanılmasının sınırlı olduğu raporlanmıştır (31).

### 2.3.1.9. Sinovyal Sıvı Çalışmaları

Sinovyal sıvı izole bir komponent olup bursa keseleri tarafından korunmaktadır. Bakteriyal çoğalmayla gelişen çürümeye daha az miktarda maruz kalır. Elektrolit konsantrasyonu, üre, kreatin, glukoz, laktoz ve alkol gibi biyokimyasal testler için oldukça kullanışlıdır. Siddhamsetty ve ark. yaptığı bir çalışmada ölüm zamanı ile sinovyal sıvı sodyum ve glukoz konsantrasyonu ile negatif korelasyon gösterirken, potasyum konsantrasyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir

(34). Madea ve ark. yaptığı çalışmada ise sinovyal sıvı sodyum, potasyum, kalsiyum, klorür, üre, kreatinin ve glikoz konsantrasyonları vitröz sıvı ile karşılaştırılmış olup postmortem sürenin değerlendirilmesinde glukoz ve potasyum dışındaki verilerin yararlı olmadığı gösterilmiştir. Özellikle postmortem potasyum konsantrasyonunun ölüm sonrası geçen süreye bağlı olarak artışının sinovyal sıvıda vitröz sıvı kadar güvenli olduğu sonucuna ulaşılmıştır (35).

#### **2.3.1.10. Perikardial Sıvı Çalışmaları**

Literatürde perikardiyal sıvıda elektrolit, total protein, rezidüel azot ve enzim ölçümlerinin postmortem interval tayininde önemli rol oynadığı, postmortem süre arttıkça potasyum ve fosfat konsantrasyonun yükseldiği, sodyum konsantrasyonun ise düştüğü bildirilmiştir (36). Niranjana ve ark. yaptıkları bir çalışmada postmortem perikard sıvısı potasyum iyon konsantrasyonunun saatte ortalama 2.39 meq/l yükseldiğini ve yaş, cinsiyet, ölüm nedeninin perikard sıvısındaki potasyum miktarını etkilemediği bildirilmiştir (37). PMI tayininde postmortem dönem ile perikardial enzim aktivitesi arasındaki ilişkide kullanılmaktadır. Sing ve ark. postmortem perikard sıvısında enzimlerin aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada, kreatinin fosfokinaz, gama glutamil transferaz, laktik dehidrogenaz ve amilaz aktivite derecelerinin postmortem interval tayininde 36 saate kadar kullanılabileceğini gösterilmiş olup, enzim aktivite derecelerinin genellikle ilk 12 saat içinde daha hızlı olmak üzere 36 saate kadar arttığı daha sonra düştüğü tespit edilmiştir (38).

#### **2.3.1.11. Kanın Donma Noktası**

Kanın donma derecesinden yararlanarak postmortem interval tayini yapılabilir. Kanın donma derecesi normal değeri 0.57 olarak kabul edilir (9). Ölüm sonrası süre ilerledikçe serum elektrolit değerleri artacağı için donma derecesi düşmektedir. Donma derecesi günde ortalama 0.10 derece kadar düşer (39). Ölüm zamanı hesaplamasında bir formül üretilmiştir. Bu formüle göre; cesetten ilk alınan kanın donma derecesi ölçülür (a) ve kaydedilir. 24 saat sonra ikinci kez kan alınarak tekrar

donma derecesinin ölçümü yapılır (b) ve kaydedilir. Daha sonra;  $(a - 0,57) / (b - a) \times 24$  formülü uygulanır ve çıkan sonuç ölümden sonra geçen zaman olarak değerlendirilir (9).

### **2.3.1.12. Beyin Omurilik Sıvısındaki Değişiklikler**

Beyin omurilik sıvısında (BOS) normal sağlıklı kişilerde 1-6 hücre / mm<sup>3</sup> kabul edilebilir olsa da nispeten asellülerdir. Ölüm sonrası ilk saatlerde BOS'da hücre sayısı artmaya başlar ve 12 saate kadar hücreler gösterilebilir. 12 saatten sonra hücre sayımı güçleşir. Nötrofil ve monositler 12 saate kadar, lenfositler ise 20 saate kadar tanımlanabilmektedir (40). Postmortem dönemde beyin omurilik sıvısında yapılan bir araştırmada nörolojik bozukluğu ya da nöropatolojik bir hastalık öyküsü olmamasına rağmen olgularda belirgin bir pleositoz gözlemlendiği bildirilmiştir. Postmortem örneklerde uzamış ölüm zamanı ile BOS'da ki hücre miktarının artışı arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (41). Lateral ventriküllerden alınan kontamine olmayan serebrospinal sıvıdaki sodyum, potasyum konsantrasyonları ve birbirine oranları ölüm zamanı tayininde önemli bir parametredir. Ancak sıcaklık ve hastanede yatış öyküsü gibi faktörler sodyum iyon konsantrasyonundan PMI tayini yaparken dikkate alınmalıdır. Sodyum ve potasyum konsantrasyon oranının PMI tayininde kullanılması tek başına sodyum ya da potasyum konsantrasyonundan daha iyi bir parametredir (42).

Ölüm sonrası BOS'nın protein içeriğinde de bazı değişiklikler olduğu bulunmuştur. Protein kinaz B gibi bazı enzimlerin ölüm sonrasında arttığı gösterilmiş ve bunun sebebinin postmortem dönemde hücre ölümü ve kan-beyin bariyerinin bozulması gibi nedenler olduğu düşünülmüştür (43). BOS içeriğindeki albumin miktarı da PMI tayininde kullanılabilir. Albumin miktarında ölüm sonrasındaki ilk 72 saatte lineer bir azalma görülür (44).

### **2.3.1.13. Kemik iliği İncelemeleri**

Kemik iliğinde yer alan hematopoetik hücrelerin morfolojik ve sitokimyasal özellikleri postmortem interval tayini için yararlı bilgiler sağlayabilir. Babu ve ark.



yaptığı bir çalışmada kemik iliğinde eritroid, myeloid ve megakaryosit serilerindeki piknotik değişikliklerin yanısıra çekirdek değişikliklerinin de postmortem interval tayininde zamana bağlı olarak 16 saate kadar ipuçları verebileceği gösterilmiştir (45).

#### 2.3.1.14. Dekompozisyon

Dekompozisyon genellikle çürüme anlamında kullanılmasına rağmen otoliz ve çürüme olmak üzere iki farklı süreç içerir. Otoliz hücre ve organların yapısının bozulması sonucunda hücre içi enzimlerinin neden olduğu aseptik kimyasal bir süreçtir. Otoliz yüksek sıcaklıkta hızlanır düşük sıcaklıklarda yavaşlar. Donma ya da çok yüksek sıcaklıklarda enzimlerin inaktive olması nedeniyle durabilir. Enzim miktarı fazla olan organlar diğer organlara oranla daha hızlı otolize olur. Örneğin pankreas yoğun enzim içerdiğinden ilk otoliz gelişen organlardandır. Çürüme ise bakteriler ve fermantasyon ile gerçekleşir. Ölüm sonrası gastrointestinal bakteri florasının vücuda yayılması çürümeyi başlatır (22).



**Şekil 2.7:** Sağda daha belirgin olmak üzere her iki fossa iliakada, çürümenin ilk belirtisi olan yeşil renk değişimi (46).

Çürüme ölümün en kesin işaretidir. Ölü muayenesinde çürümenin ilk bulgusu bakterilerin yoğun olduğu karın alt kadranslarında, karın ön duvarına yakın bölgelerde, çekumun üzerinde, sağ fossa iliakada kirli yeşil renk değişikliğidir (46). Daha sonra bütün batına oradan da göğüs bölgesine yayılır. Yeşil renk değişikliğinin kaynağı sülfmethemoglobin oluşumudur ve ölümden yaklaşık olarak 24 – 36 saat sonra görülmektedir. Çürüme sırasında hidrojen sülfür, hidrojen fosfat, metan, karbondioksit, karbon monoksit, amonyak ve hidrojen gibi gazlar açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan gazlar mide ve bağırsaklarda birikerek şişmeye neden olur. Damar içerisinde hemolize olan kandaki hemoglobin ile hidrojen sülfid reaksiyona girer. Damar boyunca yeşilimsi siyah renk değişikliği gelişerek damarlar belirginleşir. Bu görünüme ‘mermerleşme’ denir (Şekil 2.8). Ölüm sonrası 60 ila 72 saatte tüm vücutta şişme meydana gelir ve krepitasyon alınabilir. Bu süre 5-6 güne kadar uzayabilmektedir. Şişlik genellikle ilk yüz bölgesinde oluşmakta olup özellikle skrotum, penis ve göz kapaklarında belirgindir. Epidermolizis, vezikül oluşması, cilt soyulmaları, tırnak ve saçların çıkması gibi değişiklikler 4-7. günde görülebilir. Çürüme sıvısı ağız ve burundan dışarıya akabilir ve vücut boşluklarında birikebilmektedir. Bu durum otopside hemotoraks gibi yanlış tanımlara neden olabilmektedir. Çürüme sırasında asetik asit, palmitik asit, oksalik asit, süksinik asit, laktik asit gibi asitlerin, lösin, trozin, putresin, kadaverin gibi amin ve aminoasitler, indol, skatol gibi aromatik maddeler açığa çıkmaktadır. Birçok faktör çürüme üzerine etki etmektedir. Ortam ısısı, havanın nem ve hareketleri, cesedin bulunduğu ortamın yapısı gibi çevresel faktörler, cesedin yaş ve beslenme durumu, hidrasyon durumu, giysileri, ölüm nedeni gibi cesede ait özellikler ve cesedin etobur, kemirici hayvanlar tarafından parçalanması bu faktörlerden sayılabilir (8, 12, 22, 27).



**Şekil 2.8:** Üst ekstremitelerde çürümeye bağlı kirli-kırmızı yeşil renk değişimi ve çürüme haritası (mermerleşme) (46).

İklim koşullarına göre ceset çürümenin yanı sıra bazı değişikliklerde uğrayabilmektedir. Özellikle sıcak hava akımının olduğu, serin, kuru ortamda bulunan cesetlerde mumyalaşma görülebilmektedir. Dokular kuru, meşinleşmiş ve kahverengidir. Vücut dehidrate olur ve deri gerilerek yüzde maske gibi görülür. Mumyalaşma genellikle vücutta kısmi olarak görülür. Islak toprağa gömülü ya da su içerisinde kalan cesetlerde de sabunlaşma görülebilir. Vücut yağı hidrolize olur ve kimyasal olarak sabuna benzer bir dönüşüme uğrar. Vücut gri, yağlı ve gevrek bir hal alır. Sabunlaşma genellikle birkaç hafta ya da birkaç ay içerisinde görülebilir. Mumyalaşmada olduğu gibi sabunlaşmada da genellikle vücutta kısmi olarak görülmektedir (7).

#### **2.3.1.15. Entomolojik Çalışmalar**

Ölüm olaylarında soruşturmaya delil elde etmek için ceset üzerinde böcekler ile yapılan çalışmalar adli entomoloji olarak adlandırılır. Böceklerin ceset üzerindeki dağılımı, biyolojisi ve davranış özelliklerinden yararlanılarak adli tahkikatta; olayın ne zaman nerede, nasıl olduğu hakkında faydalı olabilir. En önemli kullanım ise PMI tayinindedir. Ölümden 48-80 saat sonra fiziksel bulgular ve biyokimyasal tetkikler ile

ölüm zamanı hakkında doğru değerlendirme yapmak oldukça zordur. Tanatolojik çalışmalar ile ilk 3 gün içinde doğru sonuçlara ulaşılabilmemesine rağmen daha geç dönemlerde ceset çevresindeki entomolojik kanıtlar çok daha önemlidir. Bu kanıtlar ölüm sonrasında haftalar hatta aylara kadar geçen zamanı gösterebilir (47). İnsektler, ölümden hemen sonra genellikle birkaç dakika içerisinde cesede çekilirler. Ceset üzerinde olgunlaşmamış aşamada bir böcek bulunması bir günden bir aya kadar PMI tahmini için kanıt sağlayabilir (48). Böceklerin ve sineklerin metamorfoz gösteren bir yaşam döngüsü vardır. Bu yaşam döngüsü yetişkin dişinin yumurta bırakmasıyla başlar. Sonra larva oluşur. Belli bir dinlenme döneminden sonra pupa şekline döner. Pupa döneminden sonra metamorfoz ile ergin sinek haline gelir (Şekil 2.9) (49). Ergin sinekler yumurtalarını vücudun gölgeli ve katlı yerlerine bırakır. Saç, gözler, burun delikleri ve vücut kavimleri yumurtlama için ideal bölgelerdir. Genç larva cesedi yemeye başlar ve üç larval dönem geçirir. Çiftleşir ve dişileri yumurtlamaya başlar. Her bir sinek cesede 300 yumurta bırakır. Yumurtadan çıkma süresi çevresel faktörlere ve sıcaklığa bağlı olarak birkaç saatten 1-2 güne kadar değişir. Minimum PMI en yaşlı larva ile tayin edilir. Pupa haline döndükten sonra PMI tayininde kullanılamamaktadırlar. PMI tayininde ısı, rüzgar, nem, basınç gibi çevresel faktörler yanılmaya sebep olabilir (12).



**Şekil 2.9:** Sineklerin yaşam döngüsü. Saat yönünde yumurtalar, larva ya da kurtçuklar, pupa ve yetişkin sinek (49).

### 2.3.1.16. Moleküler Çalışmalar

PMI tayininde buraya kadar saydığımız klasik yöntemlerin ön görülemeyen birçok faktörden etkilenmesi ve sübjektif bulgular olması nedeniyle bu bulgulardan yararlanılarak kesin ölüm zamanı tayininde bulunmak oldukça zordur. Bu nedenle son yıllarda daha objektif bir tespit için bulunabilmek için moleküler alanda birçok çalışmalar yapılmıştır. DNA bir organizmanın doku ve hücrelerinin oluşumu için bütün bilgileri içerir. DNA da depolanan bu bilgiler organizmada tanınabilir özellikleri kontrol eden gen olarak da bilinen kalıtsal birimlerde düzenlenir. Transkripsiyon sürecinde bu bilgiler RNA'ya kopyalanır. DNA ve RNA yapısal olarak birbirine çok benzer. Her ikisinde ana yapısı nükleotit adı verilen monomerlerden oluşan doğrusal polimerlerdir. RNA'ların nükleotit sayısı yüzler, binlerle ifade edilirken DNA milyonlarca nükleotit içerir. Proteinlerle ilişkili bu büyük DNA üniteleri boyalarla boyanarak ışık mikroskopunda kromozom olarak görülebilir (50). Her bir DNA molekülü nükleotidlerden oluşan birbirini tamamlayan iki iplikten oluşan çift heliks şeklindedir. İki iplik birbirine guanin – sitozin, adenin – timin bazları arasındaki hidrojen bağları ile bağlanır. Ökaryotik hücrelerde DNA, hücre hacminin yaklaşık %10'unu oluşturan hücre çekirdeği içerisinde bulunur (51). Hücre ölümü lipaz, nükleaz ve farklı sınıf proteazları içeren hücre içi enzimlerin aktivasyonu ile ilişkilidir. Histon proteinlerinin lizozomal proteazlar tarafından uzaklaştırılması DNA'nın edonükleazlar ile ayrılmasını kolaylaştırır. Postmortem dönemde ise DNA degradasyonunu sağlayan endojen nükleazlar; mikroorganizmalar ve çevresel omurgasızlardan ya da konak hücrelerinden salınır. Bunun dışında hidroliz ve oksidasyon ile oluşan spontan degradasyon çok daha yavaş meydana gelir (52).

1980'nin ikinci yarısında adli örneklerde moleküler biyoloji teknikleri kullanılmaya başlanmış. Adli bilimciler artan çevresel hasar maruziyetinin DNA degradasyonu ile sonuçlanacağını düşünmüşler. Yapılan çalışmalarda postmortem kan ve böbrek gibi dokularda DNA'nın yaklaşık bir haftada degrade olduğu, bununla birlikte kemik ve diş gibi sağlam dokularda ise DNA'nın aylar hatta yıllar boyunca bozulmadan kalabileceği saptanmıştır (53). Moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte nükleik asitlerin zamana bağlı degradasyonu ilgi odağı olmuştur. DNA'nın postmortem dönemde uzun süre stabil kalabileceği saptandıktan sonra DNA

degradasyon oranlarının ölçülmesinde; flowsitometri, tek hücre elektroforezi, in situ etiketleme, görüntü analizi/boyama, DNA amplifikasyonu, kompetitif PZR, real-time PZR gibi yöntemler kullanılmıştır. Isı, yüksek nem, ıslaklık, fungal veya bakteriyel kontaminasyon ve ultraviyole radyasyon örneklerdeki DNA miktarını ve kalitesini etkileyerek analizi olumsuz etkileyebilir (53, 54). DNA denatürasyonunun, postmortem ilk üç gün boyunca çevre sıcaklığı ve ölüm nedeninden etkilenmeden gelişen otoliz nedeniyle hemen başlayarak sabit hızla devam ettiği için DNA'nın özellikle erken dönem ölüm zamanı değerlendirilmesinde önemli bir parametre olduğu görülmektedir. Di Nunno ve ark. dalak dokusundan yaptığı bir çalışmada bu yöntemin ilk 72 saat faydalı olduğunu, 72 saatten sonra DNA denatürasyonunun çok yoğun ve sitoflorometrik bulguların anlamsız olduğunu bildirmiştir (55). Hansen ve ark. yaptığı çalışmada ciddi koagülasyon ve hemoliz nedeniyle kan örneklerinin adli incelemelerde moleküler analiz için ideal biyolojik örnek olmadığı, kas dokusundaki DNA'nın nispeten stabil olduğu ve postmortem interval tayininde kullanımının kolay olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda beyin, lenf düğümleri ve böbrek dokularında DNA stabilitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir (56).

#### **2.4. HIGH MOBILITY GROUP BOX PROTEİNLERİ**

High mobility group (HMG) proteinleri ilk olarak memeli hücresi çekirdeğinden izole edilerek elektroforetik mobilitelerine göre adlandırılmışlar. Daha sonra HMGA, HMGB ve HMGN olarak üç aileye ayrılmışlar (57). Memeli HMGB proteinleri, HMG box alanı olarak adlandırılan ardışık iki DNA bağlayıcı bölge ve ardından yaklaşık 30 amino asit uzunluğunda bir asidik kuyruk ile karakterize edilir. Bu iki kutu yapısal olarak birbirine benzer ve hareketleri birbirinden bağımsızdır. Asidik kuyruğun ise yapısal olmadığı düşünülmektedir (58).

HMGB proteinleri intranükleer ve ekstrasellüler düzenleyici proteinler olarak işlev görür. Transkripsiyon, replikasyon ve onarım gibi çok sayıda faaliyeti düzenleyen proteinlerdir (59). HMGB-1 makrofajlar, monositler, NK hücreleri, dentritik hücreler, endotelyal hücreler ve trombositler gibi immünolojik hücrelerden aktif olarak salınır. Ayrıca nekrotik ya da zedelenmiş hücrelerden de pasif olarak

salınır. Her iki mekanizma ile de ekstrasellüler alanda HMGB-1 önemli miktarda artar. Ayrıca apoptotik hücreler nekrotik hücelere göre daha az miktarda HMGB-1 salar (5). HMGB-1 intrasellüler alanda; yapısal DNA bağlayıcı protein, nükleozom stabilizasyonu, transkripsiyon düzenleyici gibi ko-transkripsiyonel olarak işlev görür. Ekstrasellüler alanda ise nötrofil kemotaksisi, makrofaj aktivasyonu, dentritik hücre matürasyonu, vasküler geçirgenlik, akut akciğer hasarı, akut karaciğer hasarı, multipl organ yetmezliğinde inflamatuvar sitokin olarak görev yapar (60).

HMGB1 interfaz evresinde ve mitotik hücelerde kromatine gevşek bağlıdır. Membran bütünlüğü kaybolarak geçirgenliği arttığında veya nekrotik hücelerden hızla ortam içerisine sızar (61). Hücre harabiyet ve intrasellüler içeriğin hücre ölümünün olduğu bölgeden uzağa difüze olması hücre nekrozunun işaretidir (62). Postmortem dönemde geçen süre uzadıkça hücre ölümde artacağından çalışmamızda serumda bulunan HMGB-1 protein miktarının da artacağı öngörülmektedir.

## **2.5. HÜCRE DIŞI SERBEST DNA**

Son yıllarda doğru, güvenilir, invaziv olmayan, ucuz ve kolay uygulanabilen moleküler tanı yöntemleri klinik rutinde olası kullanımını sağlamak amacıyla pek çok araştırmacı yoğun olarak çalışmaktadır. Ekstrasellüler veya hücre dışı nükleik asitler ilk olarak 1948 yılında Mandel ve Metais tarafından raporlanmıştır. Sağlıklı ve hasta bireylerin plazmalarında serbest dolaşan DNA ve RNA varlığını keşfetmişlerdir (63). Geçtiğimiz yıllar boyunca, apoptoz ve nekroz nedenli hücre ölümünden kaynaklanan ve periferik kanda serbest dolaşan nükleik asitler, doku hasarının potansiyel bir belirteci olarak ilgi odağı olmuştur (64). Normal koşullarda sağlıklı bireylerin kanında az miktarda bulunmakla birlikte enfeksiyon, enflamasyon, kanser, bağ dokusu hastalıkları, iskemik inme, miyokard infarktüsü, gebelikle ilişkili bozukluklar, ve hemodiyaliz gibi çeşitli klinik durumları olan hastalarda yüksek değerler raporlanmıştır (65, 66). Gebeliğin 7 haftasından itibaren bebeğe ait hücre dışı serbest fetal DNA, annenin periferik kanında tespit edilebilir ve terme kadar bu değerler yükselir (67). Kanser olgularında tedavi öncesi ve sonrası tümör yükünün

belirlenmesi, tedavinin moleküler belirteçler ile takip edilebilmesi için tümöre ait hücre dışı DNA kullanımları mevcuttur (68, 69). Adli genetik çalışmalarda hücre dışı DNA'nın potansiyel değeri çok az bilinmektedir (63).

Ölüm sebebi, yaş, cinsiyet gibi farklı faktörlere bağımlı olmaksızın her insanın canlılığını yitiren doku ve organlarda bazı ortak değişiklikler meydana gelmektedir. Ölümden sonra hücrelerde meydana gelen nekroz nedeniyle hücrelerin karbonhidrat, protein ve yağlarında parçalanmalar meydana gelerek normal biyokimyasal ve morfolojik yapıları bozular. Çekirdek ve hücre membranları ile korunmuş olan DNA açığa çıkar. Ölümün gerçekleşmesi ile özellikle damar endotelinde meydana gelecek olan nekroz periferik kandaki hücre dışı serbest DNA miktarının artmasına neden olabileceği düşünülebilir. Postmortem intervalin özellikle ilk 72 saatlik döneminde zamanla paralel olarak hücre nekrozunun artışı, hücre dışındaki serbest DNA miktarındaki olası değişikliklere neden olabilir ve hücre dışı serbest DNA miktarının belirlenmesi postmortem interval tayininde önemli bir belirteç olabilir.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 05/03/2014 tarih ve 2014-6-35 karar nolu izni ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp A.D. Adli Genetik Laboratuvarı, Çocuk Genetik Hastalıkları B.D. Moleküler Genetik Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

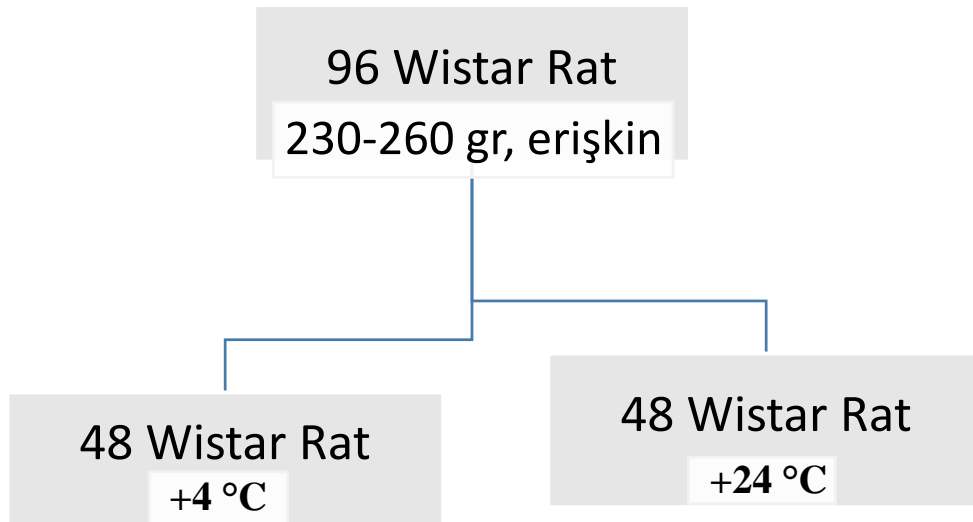
- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı:
  - Deney hayvanlarının yetiştirilmesi
  - Anestezi ve servikal dislokasyon ile sakrefikasyonu
  - Ratların +4°C ve +24°C'de bekletilmesi
  - Otopsi işlemi ile kan örneklerinin toplanması
- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp A.D. Adli Genetik Laboratuvarı ve Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarı:
  - Kan örneklerinin santifrj edilerek serumların elde edilmesi
  - Serum örneklerinin uygun şartlarda saklanması
  - Elisa tekniği ile serum HMGB-1 protein düzeylerinin ölçülmesi
  - Sonuçların analizi
- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Genom Bilim Laboratuvarı:
  - SYBR nükleik asit boya yönteminin uygulanması
  - Luminometre okuyucu ile serum hücre dışı serbest DNA miktarlarının analizi

### 3.1. ÖRNEKLEM YÖNTEMİ

Çalışmada, 230-260 gr arasındaki erişkin Wistar ratlar model sistem olarak kullanılmıştır. Ratlar; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'nda üretilmiş olup yeterli su ve yem varlığında 12 saatlik yapay gündüz/gece siklus şartlarında yetiştirildi. Anestezi için 100mg/kg ketamin + 10mg/kg ksilazin intraperitoneal yolla uygulandı. Yeterli seviyede anestezi sağlandıktan sonra servikal dislokasyon metoduyla ratlar sakrefiye edildi. Serumda araştırılacak olan hücre dışı serbest DNA ve HMGB1 protein deney sonuçlarını etkileyebileceği için servikal dislokasyon tercih edilmiştir.

### 3.2. ÖRNEKLEM SAYISI

Örneklem hacminin hesaplanmasında standart sapmasının  $\pm 0,05$  dolayında olacağı tahmin edilmektedir. Hesaplanan ortalamalar arasındaki farkın anlamlılık düzeyinin 0,03 ve altında olacağını dikkate alarak örnek hacmi hesaplandı. Güç= 0.80, alfa= 0,05 ve  $p(1-\text{Beta}) = 0,20$  alınarak  $n > (2X(z_1+z_2)^2 \sigma^2)/d^2 =$  formülüyle  $2 \times 7.8 \times (0.05)^2 / (0.03)^2 = 44$  sayısına ulaşıldı. %1'lik deney hayvanı kayıp oranı dikkate alındığında her bir sıcak için 48 deney hayvanı, toplamda 96 rat çalışmaya dahil edildi. Ratlar 48'er 2 (iki) gruba ayrıldı.



Şekil 3.1: Deney hayvanları çalışma grupları.

### 3.3. SERUM ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Postmortem interval araştırması için ratlar yeterli seviyede anestezi sağlandıktan sonra servikal dislokasyon metoduyla sakrefiye edildi ve öncelikle iki gruba ayrılarak 4°C ve 24°C’de postmortem beklemeye bırakıldı. 4°C ve 24°C’de postmortem bekletilen ratlar 8 ayrı gruba ayrılarak 0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde otopsi ile intrakardiyak ve/veya büyük venlerden kan alındı. Kan alımını takiben (15 dakikadan daha fazla bekletilmeden) 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek serum ayrılarak, deneylerde kullanılabileceği kadar -80 C’de bekletildi.



**Şekil 3.2:** Deney hayvanlarından otopsi ile kan örneklerinin toplanması

**Tablo 3.1:** Deney hayvanlarının ortam sıcaklığı ve postmortem süreye göre gruplaması

Grup No:	4°C postmortem bekleme	24°C postmortem bekleme süresi	Grup başına hayvan adedi
1	0	0	6
2	3. saat	3. saat	6
3	6. saat	6. saat	6
4	9. saat	9. saat	6
5	12. saat	12. saat	6
6	24. saat	24. saat	6
7	48. saat	48. saat	6
8	72. saat	72. saat	6

Çalışmamızda, sıcaklığın hücre dışı serbest DNA'nın ve HMGB-1 proteinin bozulmasında etkili olabileceği ve farklı sıcaklıklarda PMI tayini açısından fark olup olmayacağını anlaşılması için sakrefiye edilen deney hayvanları 4°C ve 24°C olarak iki farklı çevre sıcaklığında beklemeye bırakıldı.

Otopsi ile kan örneklerinin toplanması sırasında +4 °C'de 9. saatte bir rattan, 12. saatte bir rattan, 24. saatte bir rattan ve +24 °C'de 72. saatte bir rattan yeteri kadar kan alınamadı. İlk olarak serum HMGB-1 protein miktarı çalışıldığı için hücre dışı DNA miktarı hesaplamalarında 4 serum örneği çalışmamızın dışında bırakıldı.

24 °C'de yapılan otopsiler sırasında 48. saatte ağız ve burun boşluklarından çürüme sıvısının sızdığı, batında da yeşil renk değişikliğinin olduğu görüldü. 72. saatte bazı ratların batın perforasyonunun gerçekleştiği, kurtlanmanın başlamış ve tüm vücuda yayıldığı gözlemlendi.



**Şekil 3.3:** 24 °C’de 72. saatte görülen batın perforasyonu



**Şekil 3.4:** 24 °C’de 72. saatte kurtlanma ve ciltte soyulma

### 3.4. YÖNTEM

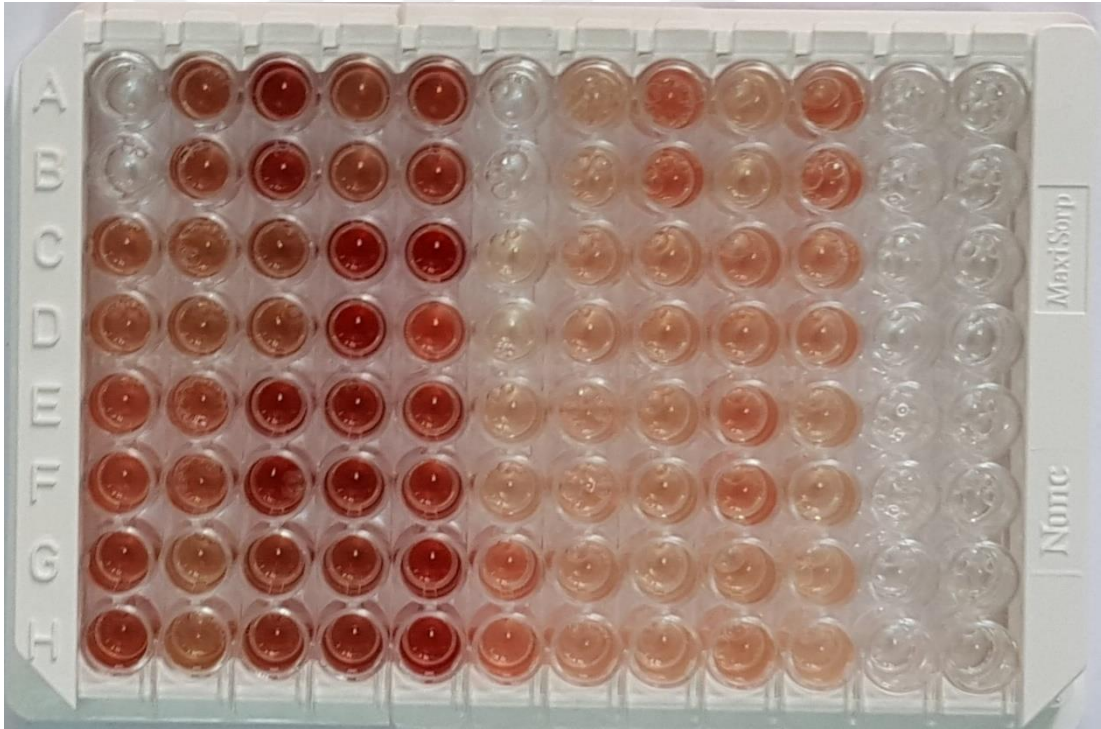
#### 3.4.1. Serumdan HMGB-1 protein miktarı tayini

High Mobility Group Box 1 protein miktarının ölçülmesinde HMGB-1 ELİSA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) (Kod no: ST51011, IBL International GmbH, Hamburg, Almanya) kit kullanıldı. ELİSA, Antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif ölçüm yöntemidir. Sandwich ELISA' da antikorlar (yakalama antikor) mikrotitre kabının kuyucuklarının katı fazına immobilize edilir. Antijeni içeren örnek daha sonra ilave edilir ve antijen-antikor kompleksinin oluşması beklenir. Bağlanmamış proteinler yıkama basamakları ile uzaklaştırılır. Enzim işaretli ikinci bir antikor (deteksiyon antikor), yakalama antikoruna bağlanmış antijene farklı bir epitopundan bağlanır. Bağlanmayan deteksiyon antikorunun yıkama işlemi ile uzaklaştırılmasından sonra, ortama enzime ait substrat eklenir. Substrat deteksiyon antikoruna bağlı enzime reaksiyona girerek renk değişimine neden olur. Bu renk değişimi de spektrofotometre ile ölçülür.

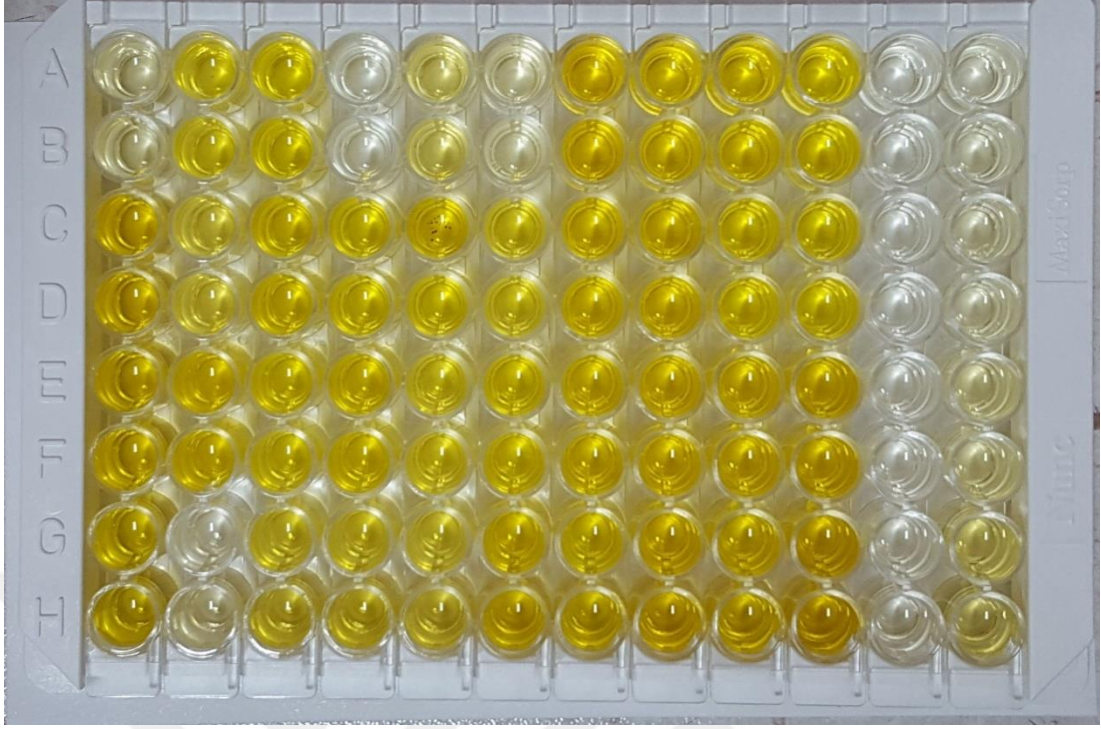
Test öncesinde liyofilize halde bulunan kit içeriği ve standart solüsyonlar prosedüre uygun olarak hazırlandı.

- Anti-HMGB-1 antikorlu 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 100 mikrolitre seyreltici tampon (%0.01 NaN3) eklendi.
- Boş kuyucuklara 10 mikrolitre daha seyreltici tampon eklendi.
- Pozitif kontrolden, standartlardan ve her bir serum örneklerinden ilgili kuyucuklara 10'ar mikrolitre eklendi.
- Plaka yapışkan folyo ile kapatılarak +37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında yapışkan folyo çıkarılarak inkübasyon çözeltisi boşaltıldı. Her bir kuyucuk 400µl seyreltilmiş yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
- Yıkama sonrası her bir kuyucuğa 100 µl enzim konjugat eklendi.

- Yapışkan folyo ile tekrar kapatılarak +25 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra bütün kuyucuklar 5 kez 400µl seyreltilmiş yıkama tamponu ile yıkandı.
- 8 kanallı mikropipet kullanılarak her bir kuyucuğa 100 mikrolitre renk çözeltisi eklendi.
- 24 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 100µl stop çözeltisi eklenerek renk reaksiyonu durduruldu.
- Fotometre ile 450 nanometre dalga boyu ve 600-650 nanometre referans dalga boyu kullanılarak optik yoğunluk ölçüldü.



**Şekil 3.5:** 24 saatlik inkübasyon sonrası plakanın görünümü



**Şekil 3.6:** Renk reaksiyonu sonrası plakanın görünümü

### 3.4.2. Serumdan Hücre Dışı DNA miktarı tayini

Çalışmamızda serumdaki hücre dışı serbest DNA tayini için moleküler biyoloji ve genetikte sıklıkla kullanılan SYBR Gold NucleicAcid Gel Stain (Katalog no: S11494, Life Technologies, CANADA) nükleik asit boyama yöntemi kullanıldı. SYBR Gold en duyarlı nükleik asit boyasıdır. Saflaştırılmış DNA ya da RNA'nın miktarını ölçmek için kullanılabilir. SYBR Gold un seyreltilmesinde kullandığımız Dimetilsülfoksit (DMSO) (Ürün kodu: AI0231-500, AMRESCO LLC, Cochran Road Olon, OH A.B.D) renksiz ve sıvı halde bulunan önemli bir polar çözücüdür. İlaç olarak bazı kanser hastalıklarında, inflamasyon, romatizmal hastalıklar ve interstisyel sistit tedavilerinde kullanılmıştır. Moleküler çalışmalarda özellikle çözücü olarak kullanılır.

- DNA standartlarının hazırlanmasında; Salmon Sperm (Ürün kodu: D1626-250MG, Sigma-AldrichCo. LLC, 3050 Spruce Street, St. Louis, MO USA) ve insan DNA örneği için 1 tüp kan kullanıldı. 0,02 gram salmon sperm DNA ile 10 ml PBS karıştırıldı. Homojen karışımın sağlanması için önce



vorteks kullanıldı. Oluşan çözelti seyreltilerek 16 adet salmon sperm DNA standart çözeltisi hazırlandı.

- İnsan DNA örneği kullanılarak hazırlanan standartlar için 1 tüp kan alınarak DNA izolasyonu yapıldı. DNA konsantrasyonunun saptanması için nano-dropspektrofotometre kullanıldı. Oluşan çözelti seyreltilerek 16 adet insan DNA standartı çözeltileri hazırlandı.
- SYBR Gold, Dimetilsülfoksit (DMSO) ile 1:1000 oranında seyreltildi.
- Oluşan çözelti Fosfat tamponlu salin (PBS) ile 1:8 oranında seyreltildi.
- 96 kuyucuklu plakanın ilgili kuyucuklarına serum örneklerinden, standartlardan 10'ar mikrolitre koyuldu.
- Seyreltilmiş SYBR Gold'dan her bir kuyucuğa 10 mikrolitre eklendi.
- 96 kuyucuklu luminometre kullanılarak 535 nm'lik emisyon dalga boyunda ve 485 nm'lik eksitasyon dalga boyunda optik yoğunluk ölçümü yapıldı.

HMGB-1 ve hücre dışı serbest DNA miktarı için okunan optik yoğunlukların nanograma çevrilmesi için; Microsoft Office 2016 programında, konsantrasyonları bilinen standartlar ve optik yoğunluklara lineer regresyon analizi uygulanarak  $Konsantrasyon = a(Optik\ Dansite) + b$  şeklinde kestirim denklemi elde edildi. Kestirim denkleminin kestirim gücü ( $R^2$ ) HMGB-1 standartlarında %99,81, hücre dışı DNA standartlarında %96,36 olarak bulundu. Kestirim denklemleri her bir serum örneği optik yoğunluk değerlerine uygulanarak HMGB-1 protein konsantrasyonları ve hücre dışı DNA konsantrasyonları ng/ml cinsinden hesaplandı.

### **3.4.3. Araştırma Bütçesi**

Çalışmamız Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 14L0230005 proje kodu ile desteklenmiştir.

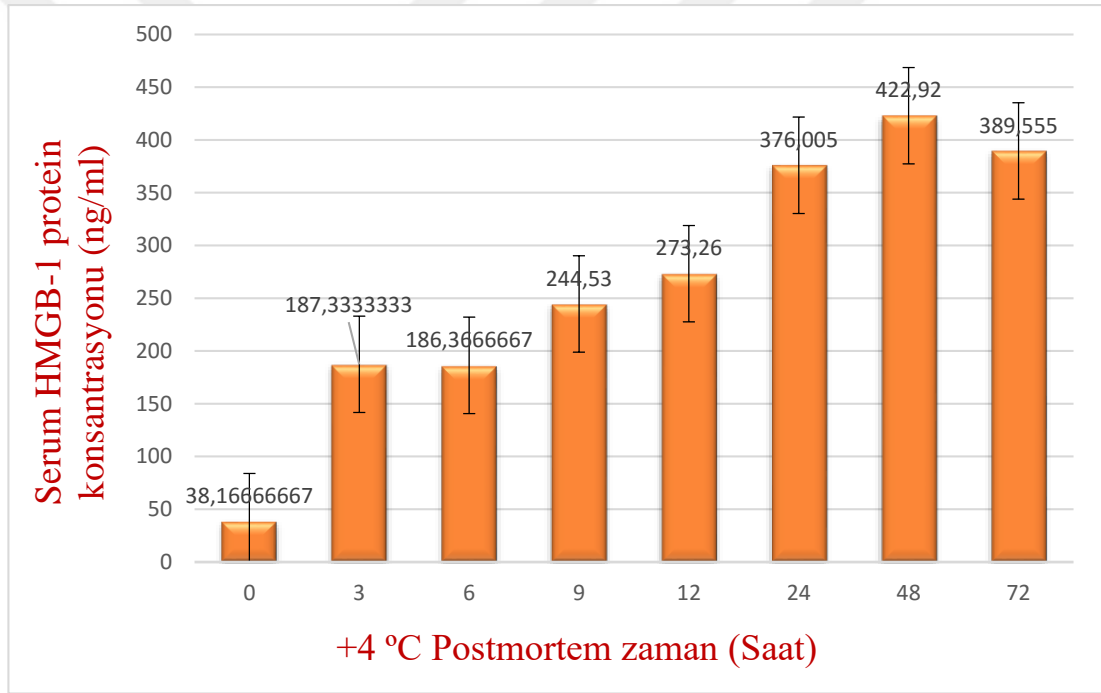
#### **3.4.4. İstatistiksel Analiz**

Hesaplanan konsantrasyon cinsinden veriler IBM SPSS 20 (Statistical Packagefor Social Sciences) programı kullanılarak normal dağılıma uygunluk göstermeyen analizler nonparametrik testlerden ‘Mann Whitney U’ ve ‘Kruskal Wallis’ varyans analiziyle değerlendirildi. HMGB-1 proteinin ve hücre dışı DNA miktarının zamana bağlı değişimi ‘Spearman’ korelasyon testiyle ile analiz edildi. ‘P < 0.05’ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.



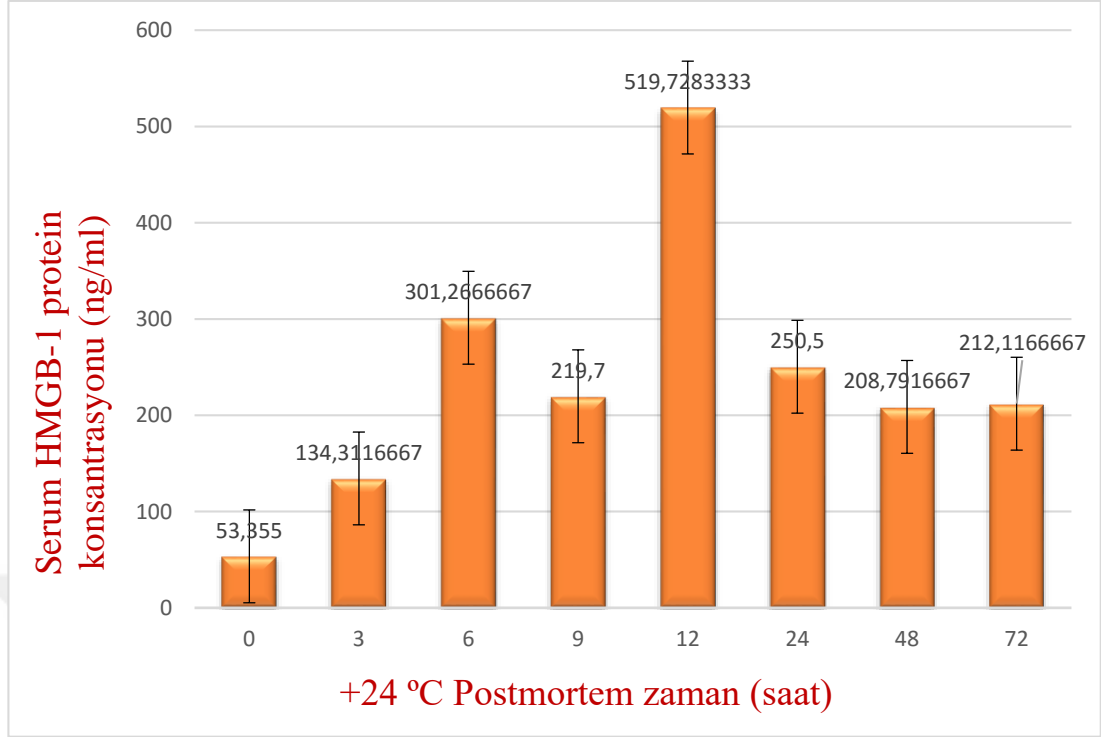
## 4. BULGULAR

Çalışmamızda cinsiyet ve yaş ayrımı yapılmaksızın ağırlıkları, 230-260 gr arasındaki erişkin Wistar ratlarda çalışılmıştır. +4 °C’de serum HMGB-1 protein konsantrasyonunun postmortem zaman ile ilişkili olduğu saptandı (p=0.01). +4 °C’de serum HMGB-1 proteini ile postmortem zaman arasındaki ilişkiyi bulmak için yapılan Sperman korelasyon analizinde, HMGB-1 konsantrasyonunun postmortem zaman uzadıkça arttığı saptandı (r =0.698 p<0.001). +4 °C’de serum HMGB-1 proteininin postmortem zaman arasındaki ilişki Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1:** +4 °C’de serum HMGB-1 protein konsantrasyonunun postmortem zaman ile ilişkisi

+24 °C’de serum HMGB-1 protein konsantrasyonunun zaman ile ilişkili olduğu saptandı (p<0.001). +24 °C’de serum HMGB-1 protein konsantrasyonu ile postmortem zaman arasında ilişkiyi bulmak için yapılan Sperman korelasyon analizinde HMGB-1 konsantrasyonu ile postmortem zaman arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki olduğu saptandı (r=0.313 p=0.030). +24 °C de serum HMGB-1 protein konsantrasyonu ile postmortem zaman arasındaki ilişkisi Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.2:** +24 °C’de serum HMGB-1 protein konsantrasyonunun postmortem zaman ile ilişkisi

Postmortem dönemde aynı saatlerde alınan kan örneklerinden bakılan serum HMGB-1 protein konsantrasyonlarının +4 °C ve +24 °C’deki değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. 3. saatteki serum HMGB-1 proteininin +4 °C ve +24 °C’deki konsantrasyonları arasında bir ilişki saptanmadı ( $p=0.485$ ). 6. saatteki serum HMGB-1 proteininin +4 °C ve +24 °C’deki konsantrasyonları arasında bir ilişki saptanmadı ( $p=0.394$ ). 9. saatteki serum HMGB-1 proteininin +4 °C ve +24 °C’deki konsantrasyonları arasında bir ilişki saptanmadı ( $p=0.937$ ). 12. saatteki serum HMGB-1 proteininin +4 °C ve +24 °C’deki konsantrasyonları karşılaştırıldığında 24 °C’de daha yüksek olduğu saptandı ( $p=0.004$ ). 12. saate +4 °C’de 6 rat ve +24 °C’de 6 rat olmak üzere 12 ratın serum HMGB-1 protein konsantrasyonları tablo 4.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1:** 12. saatte +4 °C ve +24 °C’deki serum HMGB-1 konsantrasyonları (ng/ml)

°C	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
+4	194.45	438.56	137.27	360.66	351.27	157.35
+24	550.9	584.97	623.18	453.29	417.1	488.93

24. saatteki serum HMGB-1 proteininin +4 °C ve +24 °C'deki konsantrasyonları arasında bir ilişki saptanmadı (p=0.394). 48. saatteki serum HMGB-1 proteininin +4 °C ve +24 °C'deki konsantrasyonları karşılaştırıldığında 4°C'de daha yüksek olduğu saptandı (p=0.026). 48. saate +4 °C'de 6 rat ve +24 °C'de 6 rat olmak üzere 12 ratın serum HMGB-1 protein konsantrasyonları tablo 4.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2:** 48. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum HMGB-1 konsantrasyonları (ng/ml)

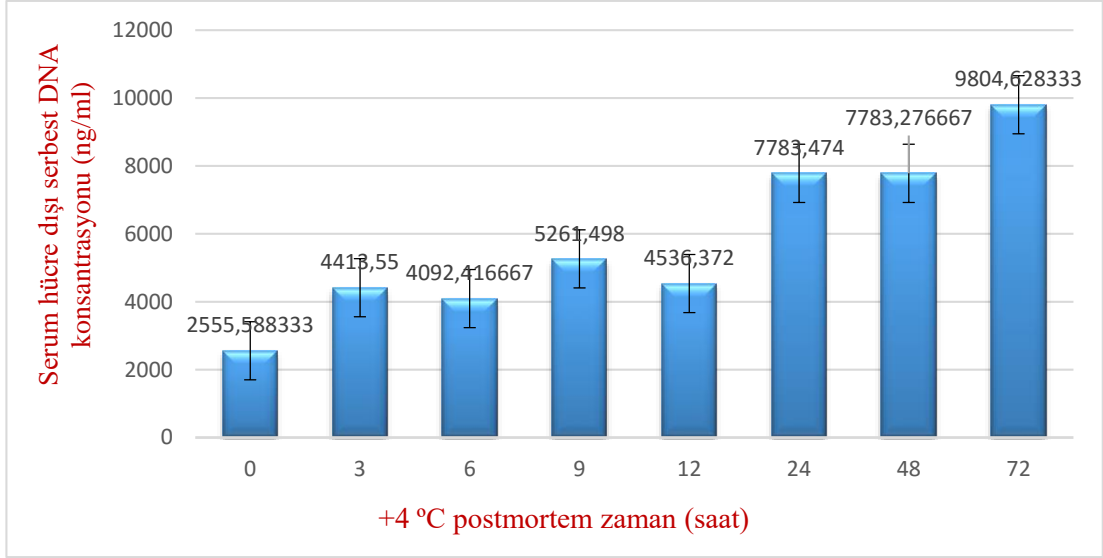
°C	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
+4	439.57	446.66	506.33	519.04	387.64	238.28
+24	255.69	330	256.61	150.26	0.17	260.02

72. saatteki serum HMGB-1 proteininin +4 °C ve +24 °C'deki konsantrasyonları karşılaştırıldığında 4°C'de daha yüksek olduğu saptandı (p=0.41). 72. saate +4 °C'de 6 rat ve +24 °C'de 6 rat olmak üzere 12 ratın serum HMGB-1 protein konsantrasyonları tablo 4.3'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3:** 48. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum HMGB-1 konsantrasyonları (ng/ml)

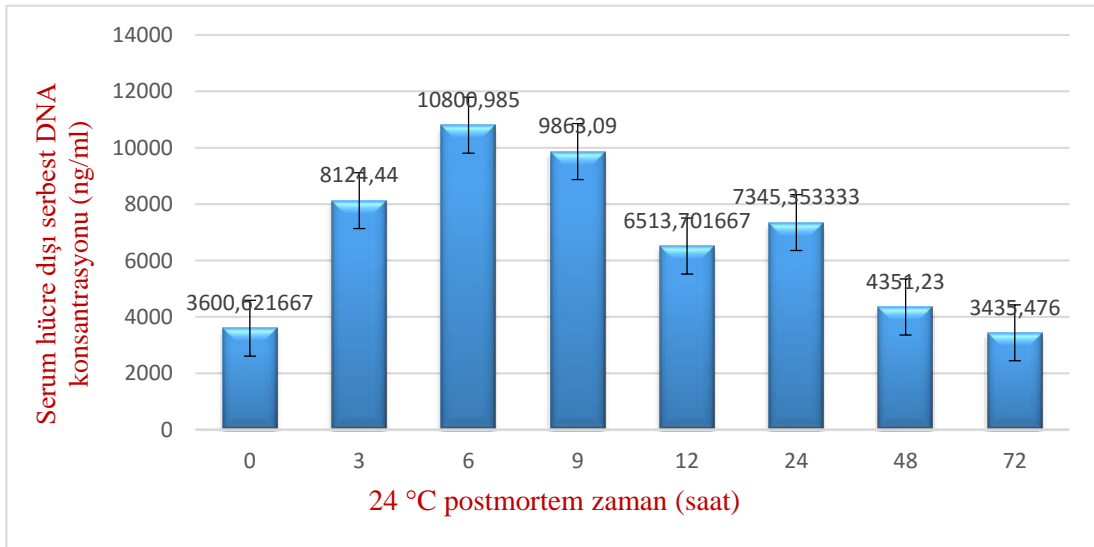
°C	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
+4	460.29	379.44	278.98	217.11	466.27	535.24
+24	401.17	168.03	68.30	320.33	178.43	136.44

Çalışmada +4 °C'de hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun zaman ile ilişkisi Kruskal Wallis testi ile analiz edildi ve +4 °C'de hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun zaman ile ilişkili olduğu saptandı (p=0.000). +4 °C'de hücre dışı serbest DNA konsantrasyonu ile postmortem zaman arasındaki ilişkiyi bulmak için yapılan Sperman korelasyon analizinde, hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun postmortem süre uzadıkça arttığı saptandı (r=0.751 p<0.001). +4 °C'de serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonu ile postmortem zaman arasındaki ilişki Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3:** +4 °C’de hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun postmortem zaman ile ilişkisi

+24 °C’de hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun zaman ile ilişki olduğu saptandı ( $p < 0,001$ ). +24 °C’de hücre dışı serbest DNA konsantrasyonu ile postmortem zaman arasındaki ilişkiyi bulmak için yapılan Spearman korelasyon analizinde, hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun postmortem 3-9 saat arasında arttığı ancak süre daha da uzadıkça hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun azaldığı saptandı ( $r = -0.213$   $p=0.15$ ). +24 °C’de serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonu ile postmortem zaman arasındaki ilişki Şekil 4.4de gösterilmiştir.



**Şekil 4.4:** +24 °C’de hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun postmortem zaman ile ilişkisi

Postmortem dönemde aynı saatlerde alınan kan örneklerinden bakılan serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonlarının +4 °C ve +24 °C'deki değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. 3. saatteki serum hücre dışı serbest DNA'nın +4 °C ve +24 °C'deki konsantrasyonları arasında bir ilişki saptanmadı (p=0.310). 6. saatteki serum hücre dışı serbest DNA'nın +4 °C ve +24 °C'deki konsantrasyonları karşılaştırıldığında 24 °C'deki hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun daha yüksek olduğu saptandı (p=0.02). 6. saate +4 °C'de 6 rat ve +24 °C'de 6 rat olmak üzere 12 ratın serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları tablo 4.4'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.4:** 6. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları (ng/ml)

°C	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
+4	7314.77	5316.72	3543.04	1801.42	2665.12	3913.43
+24	9804.33	9494.47	16505.47	9635.14	10732.15	8634.35

9. saatteki serum hücre dışı serbest DNA'nın +4 °C ve +24 °C'deki konsantrasyonları karşılaştırıldığında 24 °C'deki hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun daha yüksek olduğu saptandı (p=0.04). 9. saate +4 °C'de 5rat ve +24 °C'de 6rat olmak üzere 11ratın serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları tablo 4.5'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.5:** 9. Saatte +4°C ve +24°C'deki serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları (ng/ml)

°C	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
+4	3528.78	5541.10	6264.08	6974.62	3998.01	-
+24	13960.22	7882.83	9442.81	8887.20	8725.17	10279.81

12. saatteki serum hücre dışı serbest DNA'nın +4 °C ve +24 °C'deki konsantrasyonları arasında bir ilişki saptanmadı (p=0.052). 24. saatteki serum hücre dışı serbest DNA'nın +4 °C ve +24 °C'deki konsantrasyonları arasında bir ilişki saptanmadı (p=0.792). 48. saatteki serum hücre dışı serbest DNA'nın +4 °C ve +24 °C'deki konsantrasyonları karşılaştırıldığında 4 °C'deki hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun daha yüksek olduğu saptandı (p=0.26). 48. saate +4 °C'de 6 rat ve +24 °C'de 6 rat olmak üzere 12 ratın serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları tablo 4.6'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.6:** 48. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları (ng/ml)

°C	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
+4	6457.32	11163.07	6935.46	8162.45	7790.25	6191.11
+24	3382.77	6378.09	2980.33	3555.49	7549.84	2260.86

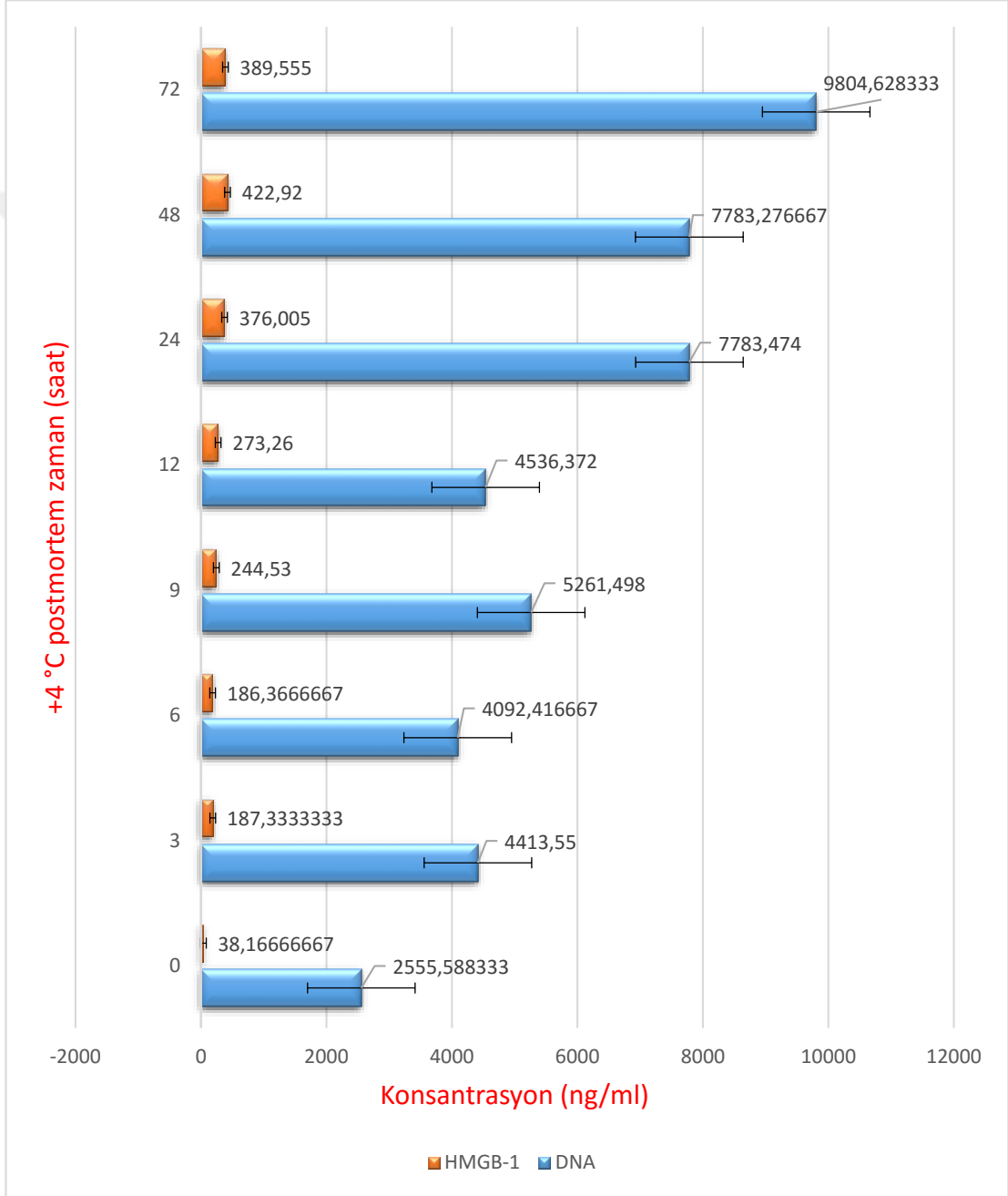
Çalışmada 72. saatteki serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonlarının +4 °C ve +24 °C'deki değerleri karşılaştırıldığında +4 °C'deki hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun daha yüksek olduğu saptandı (p=0.04). 72. saate +4 °C'de 6 rat ve +24 °C'de 5 rat olmak üzere 11 ratın serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları tablo 4.7'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.7:** 72. saatte +4 °C ve +24 °C'deki serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları (ng/ml)

°C	Rat 1	Rat 2	Rat 3	Rat 4	Rat 5	Rat 6
+4 °C	7808.04	8548.87	7752.85	8922.84	10148.92	15646.25
+24 °C	3003.46	4180.44	4063.92	3489.62	2439.83	-

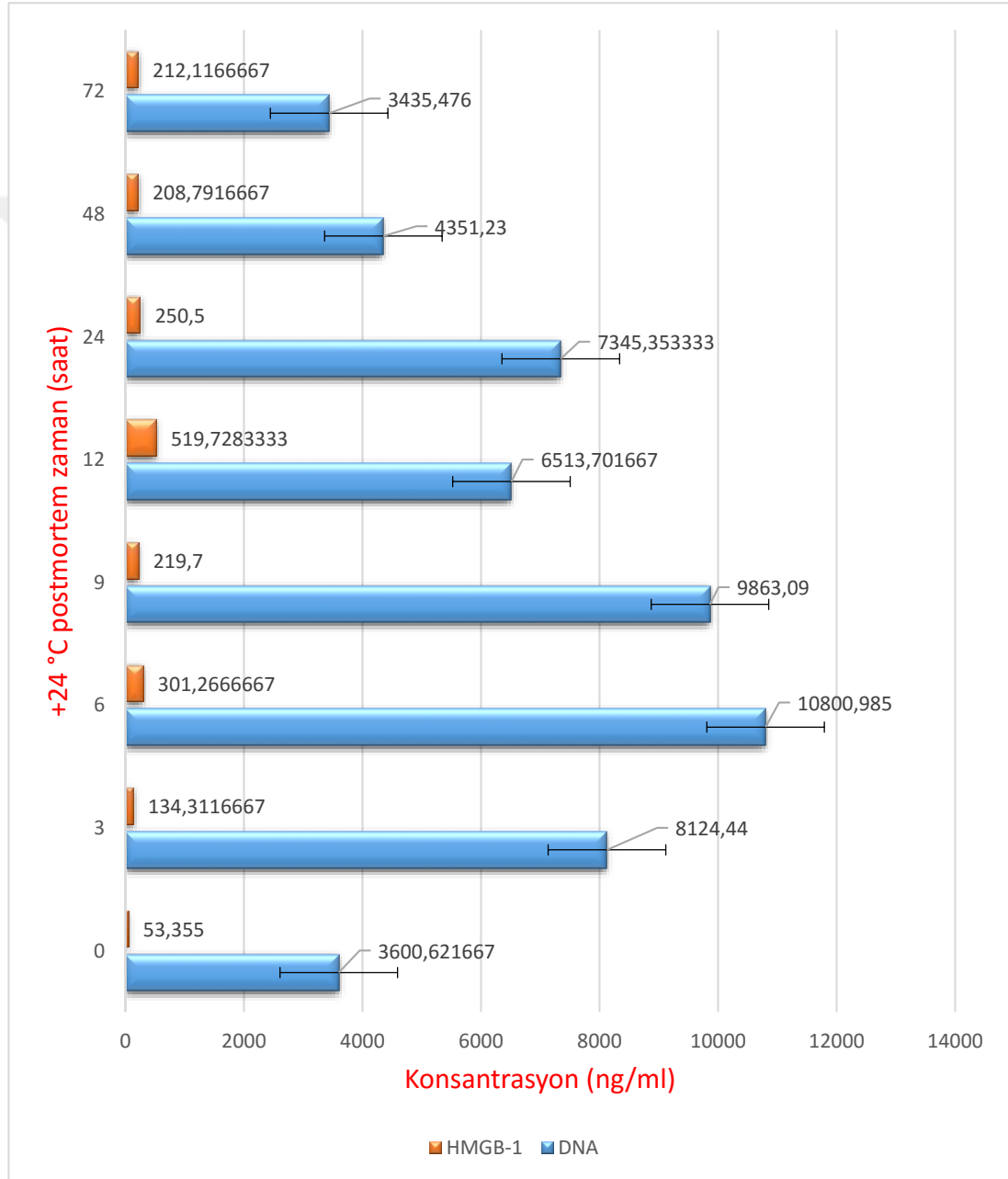


+4 °C’de serum HMGB-1 proteininin zamana göre değişimi ile serum hücre dışı serbest DNA miktarının zaman ile değişimini karşılaştırmak için yapılan Sperman korelasyon analizinde, +4 °C’de serum HMGB-1 protein ve serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonlarının zaman uzadıkça benzer şekilde arttığı saptandı ( $r=0.587$   $p<0.001$ ). +4 °C’de serum HMGB-1 proteini ve serum hücre dışı serbest DNA miktarının zaman ile ilişkisi şekil 4.5’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.5:** +4 °C’de hücre dışı serbest DNA ve HMGB-1 protein konsantrasyonlarının zaman ile ilişkisi

+24 °C’de serum HMGB-1 proteininin zamana göre değişimi ile serum hücre dışı serbest DNA miktarının zaman ile değişimini karşılaştırmak için yapılan Sperman korelasyon analizinde +24 °C’de serum HMGB-1 proteini ve serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonlarının birlikte zaman ile ilişkili olmadığı saptandı ( $r=0.093$   $p=0.533$ ). +24 °C’de serum HMGB-1 proteini ve serum hücre dışı serbest DNA miktarının zaman ile ilişkisi şekil 4.6’da gösterilmiştir.



**Şekil 4.6:** +24 °C’de hücre dışı serbest DNA ve HMGB-1 protein konsantrasyonlarının zaman ile ilişkisi

## 5. TARTIŞMA

Adli Tıp'ın birincil çalışma alanlarından biri de postmortem interval 'in belirlenmesidir. Günümüzde adli tıp pratiğinde daha çok geleneksel yöntemler kullanılmakta olup, bu yöntemlerin birçok faktörden etkilenmesi sonuçların farklı yorumlanmasına neden olabilmektedir. Bu durum, PMI tayininde yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerektiğinin önemini açıkça ortaya çıkarmaktadır. Çalışma pratikte kullanılan rutin yöntemlerin dışında serum HMGB-1 protein ve hücre dışı serbest DNA konsantrasyonlarının farklı sıcaklıklarda zaman olan ilişkisinin saptanması amacıyla yapılmıştır.

HMGB-1 proteininin hücre hasar sinyalizasyonu, inflamasyon ve doku onarımının koordinasyonunda anahtar rol oynadığı ileri sürülmektedir. Hücre hasarı ve iskemi sırasında hücrelerden pasif olarak salınır (70). HMGB-1 proteininin bu özelliği dikkate alınarak; hücre ölümde dokuların oksijene duyarlılığının farklı olması neticesinde postmortem dönemde geçen süre uzadıkça, nekroza uğrayacak hücre sayısı da artacaktır. Nekroza uğrayan hücre sayısının artması HMGB-1 proteininin pasif olarak salınımına neden olacaktır. Çalışmamızda da +4°C'de postmortem süre uzadıkça serum HMGB-1 konsantrasyonlarının arttığı bulunmuştur. +24 °C'de ise postmortem 12. saate kadar bir artış gösterdiği, 12. saatte pik değere ulaştığı daha sonra düşüşe geçtiği görülmüştür. Kikuchi ve ark tarafından Japonya'da Postmortem interval tahmininde HMGB-1'in değişiminin araştırıldığı çalışmada da +4 °C'de serum HMGB-1 konsantrasyonunun zamana bağlı olarak arttığı,+24 °C'de 2. günde en yüksek seviyeye ulaştığı ve takiben 7. güne kadar düştüğü bildirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca çalışmamızdan farklı olarak ratlardan alınan kan örneklerinde +14°C'de ve yaşayan insanlardan alınan kan örneklerinde +24 °C'de 0., 1., 2., 3., 4., 5., 6. ve 7. günlerde HMGB-1 proteininin serum konsantrasyonları çalışılmıştır. Ratlardan alınan örneklerde serum HMGB-1 protein konsantrasyonunun 3. günde en yüksek seviyeye ulaştığı ve takiben plato çizdiği, yaşayan insanlardan alınan kan örneklerinde +24 °C'de zamana bağlı olarak 7 güne kadar artış gösterdiği ancak kan hücrelerindeki HMGB-1 konsantrasyonunun postmortem kan örnekleriyle

karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (4). Çalışmamızda elde edilen serum HMGB-1 düzeyleri de yaşayan insanların serum HMGB-1 seviyelerinden oldukça yüksektir. Postmortem dönemde vasküler yatakta endotel hücreleri gibi kan hücreleri dışındaki hücrelerin de nekroze olarak HMGB-1 protein düzeyinin artmasına katkı sağlamış olabilir.

Bu sonuç bize postmortem dönemde nekroze olan hücre sayısının arttıkça serum HMGB-1 serum konsantrasyonlarının artacağını dolayısıyla PMI tayininde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Sepsis, akut ve kronik enfeksiyonlar, hemorajik şok, travma, pankreatit, romatoid artrit, mycobacterium tuberculosis enfeksiyonu, plasmodium falciparum sıtması, kanser, miyokardial ve serebral iskemi, otoimmün ve kronik böbrek yetmezliği gibi klinik durumlarda kanda artmış HMGB-1 seviyeleri raporlanmıştır (71). Gibot ve ark. septik şok tanılı kritik hastalarda plazma HMGB-1 konsantrasyonlarını araştırdığı bir çalışmada; sağlıklı gönüllülerde plazma HMGB-1 konsantrasyonlarının 1 ng/ml'nin altında olduğu, septik şoklu hastalarda ise ortalama 4.4 ng/ml seviyelerinde olduğu bildirilmiştir (72). Goldstein ve ark. myokard infarktüsü ve serebral iskemisi olan hastalarla sağlıklı gönüllülerin serum HMGB-1 konsantrasyonlarını karşılaştırdığı bir çalışmada; myokardiskemisi olan hastaların serum HMGB-1 konsantrasyonlarının myokardiyal kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (myokardiyal kontrol serum HMGB-1,  $1.94 \pm 2.05$  ng/ml. Myokardial iskemi serum HMGB-1,  $159 \pm 54.3$  ng/ml). Serebra liskemisi olan hastaların serum HMGB-1 konsantrasyonlarının sağlıklı kontrollere göre oldukça yüksek seviyelerde olduğu bildirilmiştir (serebral kontrol serum HMGB-1,  $16.8 \pm 10.9$  ng/ml. Serebral iskemi serum HMGB-1,  $218 \pm 18.4$  ng/ml) (73). Mykart iskemisi ve serebral iskemi gibi hücre nekrozunu artıran klinik durumlarda pasif olarak salınan HMGB-1 protein konsantrasyonunun, sepsis gibi inflamatuvar yollardan salınan aktif HMGB-1 protein konsantrasyonlarından çok daha yüksek seviyelerde olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda ratların 0. saat serum HMGB-1 konsantrasyonları  $+4$  °C'de ortalama 38.16 ng/ml,  $+24$  °C'de ortalama 53.35 ng/ml iken 3. saatte  $+4$  °C'de ortalama 187.3ng/ml,  $+24$  °C'de ortalama 134.3 ng/ml olarak ölçüldü. İlk 3 saatte ki bu hızlı artış oranı, 6., 9., 12., 24., 48. ve 72. saat ölçümlerindeki artış oranına göre daha yüksek saptanmıştır. Bu bulgu postmortem dönemde; nekroza giden hücrelerden

pasif HMGB-1 protein salınımının en yüksek seviyelerde ilk 3 saat içerisinde gözlenebileceğini düşündürmektedir

Kikuchi ve ark. ratlarda yaptığı çalışmada postmortem dönemde serum HMGB-1 konsantrasyonunu çalışmamız ile benzer olarak yüksek saptamışlar ve ölüm nedeninin, serum HMGB-1 seviyelerini etkileyebileceğini bildirmişlerdir.

Palmiere ve ark. 16 'sı sepsisle, 16'sı travma ve kardiyak nedenli ölümle ilişkili toplam 32 vaka ile yaptığı çalışmada; antemortem ve postmortem serum örneklerinde HMGB-1 düzeyleri ölçülmüş ve postmortem dönemde yükseldiğini rapor etmişlerdir. HMGB-1 proteini; DNA ile ilişkili nükleer bir protein olup, yaşayan kişilerde apoptotik, nekrotik veya hasarlanan hücrelerden de hücre membranının bozulmasına bağlı olarak kan dolaşımına salınır ve antemortem dönemde de yüksek saptanır. Bu nedenle HMGB-1 düzeyinin belirlenmesi sepsis ilişkili ölümlerin tanısında Adli Patoloji rutininde faydası beklenen düzeyde değildir (71). Bununla birlikte; sepsis, kanser, DIC, myokardial infarktüs ve serebral iskemi gibi antemortem dönemde serum HMGB-1 seviyelerinde önemli derecede artışa neden olacak bir hastalıkla ilişkili olmayan ölümlerde, postmortem HMGB-1 analizi PMI tayininde faydalı olabilmektedir.

Geçtiğimiz yıllar boyunca, apoptoz ve nekroz nedenli hücre ölümünden kaynaklanan ve periferik kanda serbest dolaşan nükleik asitler, doku hasarının potansiyel bir belirteci olarak ilgi odağı olmuştur (64). Normal koşullarda sağlıklı bireylerin kanında az miktarda bulunmakla birlikte enfeksiyon, inflamasyon, kanser, bağ dokusu hastalıkları, iskemik inme, miyokard infarktüsü, gebelikle ilişkili bozukluklar ve hemodiyaliz gibi çeşitli hastalıklarda yüksek hücre dışı serbest DNA değerleri raporlanmıştır (65, 66). Hücre dışı serbest DNA yüksekliğinin morbidite ve mortalite için olumsuz bir prognostik belirteç olduğu bildirilmiştir(64). Gautschi ve ark. 185 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanılı ve 46 sağlıklı kişilerde yaptığı bir çalışmada; artmış plazma ve serum DNA konsantrasyonları ile tümörün ileri evreleri arasında pozitif yönde korelasyon olduğu bildirilmiştir (74). Sonuç olarak artan hücre sayısı ve nekrozunun serum hücre dışı DNA konsantrasyonlarını arttırdığını düşündürmektedir. Gebelikte; down sendromu gibi anöploidi durumlarının, preeklampsi, eklampsi, intrauterin gelişme geriliği ve preterm eylem gibi gebelik komplikasyonlarının tanısında hücre dışı serbest DNA miktarının

kullanıldığı bildirilmektedir (75-78). Manokhina ve ark. yaptığı bir çalışmada; gestasyonel yaş arttıkça, anne plazmasındaki hücre dışı serbest plasental DNA miktarının yükseldiğini ve doğumdan sonra hızla düşerek sıfırlandığını raporlanmıştır (79). Gestasyonel yaş arttıkça fetüs büyüyecek ve hücre sayısının artışına bağlı olarak plasentadan geçerken hasara uğrayan hücre sayısı artacağı için nekroza uğrayan hücre sayısı da artacaktır. Bu da hücre dışı serbest DNA miktarını arttıracaktır.

Adli genetik çalışmalarda hücre dışı DNA'nın potansiyel değeri çok az bilinmektedir. Vandewoestyne ve ark. çeşitli adli biyolojik örneklerde hücre dışı serbest DNA'nın varlığını araştırdığı bir çalışmada; kan örneklerinde %90.9, sigara izmaritinde %50, tırnak temizleyiciler üzerinde %100 oranında hücre dışı serbest DNA saptayabildiklerini bildirmişlerdir (63). Çalışmamız; hücre dışı serbest DNA miktarının, postmortem internal tayininde kullanılabilirliği konusunda yapılan ilk çalışmadır.

Postmortem+4 °C'de bekletilen ratlarda; postmortem 0. saatten 72. saate kadar geçen süre uzadıkça serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonlarının doğrusal olarak arttığı saptanmıştır. 24 °C'de bekletilen ratlarda ise serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonlarının 6. saatte en yüksek değere ulaştığı (ortalama 10.800,985ng/ml) ve takiben düştüğü gözlenmiştir. Her iki sıcaklık koşullarında; HMGB-1 artışına benzer olarak serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonlarının postmortem ilk üç saatte hızla arttığı saptanmıştır. Dolayısıyla, postmortem dönemde hücre ölümünün ilk üç saatte en hızlı seviyelerde olduğu söylenebilir. 24 °C'de serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonlarının 6. saatte pik yaptıktan sonra 72. saate kadar düşmesi; DNA'nın 24 °C'de hızlı bir şekilde degradasyona uğradığını ve böylece analizlerde daha az miktarlarda DNA olduğu için 6. saatten sonra ölçümlerde postmortem süre uzadıkça DNA konsantrasyonunun düştüğü düşünülmektedir.

Zapico ve ark. ratların kaslarında RNA ekspresyon miktarının postmortem interval ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada da çalışmamızdaki serum DNA konsantrasyonu ile zaman korelasyonuna benzer olarak erken postmortem dönem ile ekspresyon miktarının pozitif yönde doğrusal güçlü bir ilişkisi olduğu bildirilmiştir (80).

Çalışmamızda +24 °C'de serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonu ile zaman arasında negatif yönde bir korelasyon gözlenirken serum HMGB-1

konsantrasyonu ile pozitif yönde bir ilişki olduğu saptanmıştır. Benzer durumun +4°C’de gözlenmemesi, postmortem dönemde +24 °C’de hücre dışı serbest DNA’nın HMGB-1 proteininden daha çabuk bozulduğunu düşündürülebilir.

Postmortem dönemde serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonunun, 6. ve 9. saatlerde +4 °C’de daha yüksek iken 48. ve 72. saatlerde 24 °C’de daha yüksek seviyelerde gözlenmesi; postmortem dönemde sıcaklığın arttıkça hücresel nekrozun daha hızlı gerçekleştiğini ve seruma sızan hücre dışı serbest DNA’nın hızla artarak degradasyona uğradığını düşündürmektedir.



## 6. SONUÇ

Ölüm zamanının saptanması; adli soruşturma ve konuşurma sırasında son derece önemli olabilir. Suçlu görünen bir kişinin suçsuzluğunu kanıtlanmasında ya da suçsuz gibi görünen birinin suçun faili olduğunu aydınlatmada PMI tayini adli tahkikatı yönlendirecek tek faktör olabilir. Bazı miras davalarında da kişinin ölüm zamanı mirasın dağılımını tamamen değiştirebilmektedir. Örneğin aynı aile bireylerinin birlikte ölü olarak bulunduğu bir durumda, kişilerden hangisinin daha önce öldüğünün belirlenmesi, hangi yakınlarının mirastan ne kadar pay alacağını belirleyen faktör olacaktır. Bu konu, Türk Medeni Kanunu'nda ve Yargıtay içtihatlarında ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

Ölüm zamanının kesin olarak belirlenmesini sağlayan herhangi bir tıbbi yöntem bulunmamaktadır. Adli tahkikat ve olay yeri incelemeleri ile güvenilir verilere ulaşılabilir. Olay yerinin araştırılması, ölen kişinin günlük aktiviteleriyle ilgili bütün delillerin örneğin; hayatta iken son gören kişinin ifadeleri, son telefon konuşması kaydı, ödenen para makbuzu gibi bulgular hukuki açıdan çok değerlidir. Ölüm zamanını belirlemede kullanılan klasik yöntemler kesin sonuç vermediği gibi yanlış yönelmelere de yol açabilir. Bu nedenle, tıbbi açıdan ölüm zamanından ziyade postmortem interval terimini kullanmak daha doğrudur. PMI tayininde net bir süreden ziyade bir zaman aralığı tespit edilmektedir (12).

Günümüze kadar PMI tayini için ölüm sonrası görülen birçok fiziksel ve biyokimyasal değişikliklerden yararlanılarak çalışmalar yapılmıştır. Ölü soğuması, ölü lekeleri, ölü katılığı pratikte en sık kullanılan fiziksel yöntemlerdir. Laboratuvar yöntemleri olarak, plazma ve kan hücre değişiklikleri, vitröz sıvı, sinoviyal sıvı, perikart sıvısı, BOS gibi çeşitli vücut sıvılarının içeriğindeki değişiklikler, kemik iliği incelemeleri yapılmıştır. Çürümenin derecesi ve entomolojik bulgularda geç dönemlerde faydalanılan yöntemlerdir. Ortam sıcaklığı, nem oranı, havanın rüzgarlı ya da durgun oluşu, suda bulunma gibi çevresel faktörler ile vücut ağırlığı, yaş, cinsiyet, antemortem hastalıklar ve giysi durumu gibi kişisel özellikler PMI tayininde



bazen ciddi problemlere neden olmaktadır. Bütün bu yöntemlerin sübjektif olması nedeniyle objektif sonuçlar verebilen yöntem arayışları halen devam etmektedir.

Günümüzde teknolojik gelişmelerin hızlanması ve moleküler alanlarda yeni yöntemlerin bulunmasıyla Adli Bilimler alanında özellikle de Adli Genetik araştırmalarda PMI tayini konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Artan çevresel hasar maruziyetinin DNA degradasyonuna neden olabileceği düşünülerek yapılan çalışmalarda postmortem kan ve böbrek gibi dokularda DNA'nın yaklaşık bir haftada degrade olduğu, bununla birlikte kemik ve diş gibi sağlam dokularda ise DNA'nın aylar hatta yıllar boyunca bozulmadan kalabileceği saptanmıştır (53). DNA'nın postmortem dönemde uzun süre stabil kalabileceği saptandıktan sonra DNA degradasyon oranlarının ölçülmesinde flowsitometri, tek hücre elektroforezi, in situ etiketleme, görüntü analizi/boyama, DNA amplifikasyonu, kompetitif PCR, real-time PCR gibi yöntemler kullanılmıştır. Isı, yüksek nem, ıslaklık, fungal veya bakteriyel kontaminasyon ve ultraviyole radyasyon örneklerdeki DNA miktarını ve kalitesini etkileyerek analizi olumsuz etkileyebileceği raporlanmıştır (53, 54).

High mobility group (HMG) proteinleri, hücre çekirdeğinde bulunan intranükleer ve ekstrasellüler düzenleyici olarak işlev gören transkripsiyon, replikasyon ve onarım gibi çok sayıda faaliyeti düzenleyen proteinlerdir. HMG proteinlerinin elektroforez özelliklerine göre alt grubu olan HMGB-1 proteini makrofajlar, monositler, NK hücreleri, dentritik hücreler, endotelial hücreler ve trombositler gibi immünolojik hücrelerden aktif olarak salındığı gibi nekrotik ya da zedelenmiş hücrelerden de pasif olarak salınır. Özellikle nekrotik hücrelerden diğerlerine göre oldukça yüksek düzeylerde salınmaktadır (5). Bu özelliği bize nekroza olan hücrelerin erken postmortem dönemde zaman ilerledikçe pasif olarak seruma salacağı HMGB-1 proteininin artacağını düşündürmüştür.

Ekstrasellüler veya hücre dışı nükleik asitler ilk olarak 1948 yılında Mandel ve Metais tarafından raporlanmıştır. Sağlıklı ve hasta bireylerin plazmalarında DNA ve RNA varlığını keşfetmişlerdir (63).Geçtiğimiz yıllar boyunca, apoptoz ve nekroz nedenli hücre ölümünden kaynaklanan ve periferik kanda serbest dolaşan nükleik asitler, doku hasarının potansiyel bir belirteci olarak ilgi odağı olmuştur (64). Normal koşullarda sağlıklı bireylerin kanında az miktarda bulunmakla birlikte enfeksiyon,

enflamasyon, kanser, bağ dokusu hastalıkları, iskemik inme, miyokard infarktüsü, gebelikle ilişkili bozukluklar, ve hemodiyaliz gibi çeşitli klinik durumları olan hastalarda yüksek değerler raporlanmıştır (65, 66). Gebeliğin 7 haftasından itibaren bebeğe ait hücre dışı serbest fetal DNA annenin periferik kanında tespit edilebilir ve terme kadar bu değerler yükselir (67). Kanseri olgularında tedavi öncesi ve sonrası tümör yükünün belirlenmesi, tedavinin moleküler belirteçler ile takip edilebilmesi için tümöre ait hücre dışı DNA kullanımları mevcuttur (68, 69). Adli genetik çalışmalarda hücre dışı DNA'nın potansiyel değeri çok az bilinmektedir (63). Ölüm sebebi, yaş, cinsiyet gibi farklı faktörlere bağımlı olmaksızın her insanın canlılığını yitiren doku ve organlarda bazı ortak değişiklikler meydana gelmektedir. Ölümden sonra hücrelerde meydana gelen nekroz nedeniyle hücrelerin karbonhidrat, protein ve yağlarında parçalanmalar meydana gelerek normal biyokimyasal ve morfolojik yapıları bozulur. Çekirdek ve hücre membranları ile korunmuş olan DNA açığa çıkar. Ölümün gerçekleşmesi ile özellikle damar endotelinde meydana gelecek olan nekroz periferik kandaki hücre dışı serbest DNA miktarının artmasına neden olabileceği düşünülebilir. Postmortem intervalin özellikle ilk 72 saatlik döneminde zamanla paralel olarak hücre nekrozunun artışı, hücre dışındaki serbest DNA miktarındaki olası değişikliklere neden olabilir ve hücre dışı serbest DNA miktarının belirlenmesi postmortem interval tayininde önemli bir belirteç olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, +4 °C'de serum HMGB-1 protein konsantrasyonu ile postmortem geçen süre arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki olduğu saptanmıştır ( $r=0.698$   $p<0.001$ ). Erken postmortem dönemde süre arttıkça HMGB-1 konsantrasyonunun da arttığı dolayısıyla PMI tayininde kullanılabileceği bulunmuştur.

+24 °C'de çalışılan serum örneklerinde erken postmortem dönemde artan süre ile HMGB-1 konsantrasyonları arasında pozitif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır ( $r=0.313$   $p=0.030$ ). Özellikle ilk 12 saate kadar serum HMGB-1 konsantrasyonlarının arttığı sonra tekrar düştüğü görülmüştür. PMI interval tayini için +24 °C'de serum HMGB-1 konsantrasyonlarının kullanımının sınırlı olduğu düşünülmüştür.

+4 °C'de erken postmortem dönemde serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları ile artan zaman arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki olduğu

saptanmıştır ( $r = 0.751$   $p < 0.001$ ). Erken postmortem dönemde hücre dışı serbest DNA konsantrasyon değişikliklerinin PMI tayininde kullanılabileceği bulunmuştur.

+24 °C’de çalışılan serum örneklerinde erken postmortem dönemde artan süre ile hücre dışı serbest DNA konsantrasyonları arasında negatif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır saptandı ( $r = -0.213$   $p = 0.15$ ). Özellikle postmortem ilk 6 saat hızla yükselerek sonra düştüğü saptanmıştır. Postmortem erken dönemde +24 °C’de serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyon değişikliklerinin PMI tayininde kullanımının kısıtlı olduğu düşünülmüştür. Bu bulgularla DNA’nın HMGB-1 proteinine göre daha hızlı bozulduğu sonucuna ulaşılabilir.



## ÖZET

### Postmortem İnterval Tayininde Hücre Dışı Serbest DNA ve HMGB-1'in Rolü

Postmortem interval (PMI) tayini, adli ölümlerde ceza ve hukuk davalarında oldukça önemlidir. Hukuk davalarında ölüm zamanının tespiti özellikle mirasın bölüşürülmesinde gereklidir. Günümüzde pratik uygulamalarda kullanılan birçok yöntem subjektiftir. Kesin sonuç veren bir yöntem bulunmamaktadır. Moleküler çalışmaların adli bilimlerde kullanımının artmasıyla özellikle Adli Genetik alanında önemli çalışmalar yapılmıştır. Çalışmada, amacımız özellikle hücre nekrozuyla serumda artış gösteren hücre dışı serbest DNA ve serum HMGB-1 protein konsantrasyonlarının postmortem erken dönem değişikliklerinden yararlanarak PMI tayini yapabilmektir. Çalışma, ağırlıkları 230- 260 gr arasında değişen 96 adet wistar ratlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ratlar, anestezi ve servikal dislokasyon sonrası +4°C ve +24°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta beklemeye bırakıldı. 0., 3., 6., 9., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde otopsi ile kan örnekleri toplandı. 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek serum ayrıldı. Serum örneklerinden HMGB-1 ELİSA kiti kullanılarak HMGB-1 konsantrasyon ölçümü ve SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain nükleik asit boyama protokolü sonrası hücre dışı serbest DNA miktarı için luminometre ile optik yoğunluk ölçüldü. Çalışmada elde edilen sonuçlar standart örneklerden elde edilen denklemler ile konsantrasyona çevrildi. +4°C'de serum hücre dışı serbest DNA miktarının postmortem süre uzadıkça arttığı saptandı ( $r = 0.751$   $p < 0.001$ ). Serum HMGB-1 konsantrasyonunun postmortem zaman arttıkça yükseldiği bulundu ( $r = 0.698$   $p < 0.001$ ). +24°C'de ise postmortem geçen sürenin, serum hücre dışı DNA miktarıyla negatif yönde ilişkili olduğu ( $r = -0.213$   $p = 0.15$ ), serum HMGB-1 konsantrasyonu ile ise pozitif yönde zayıf bir ilişkisi olduğu saptandı ( $r = 0.313$   $p = 0.030$ ). Sonuç olarak; +4°C'de serum hücre dışı serbest DNA konsantrasyonu ve serum HMGB-1 konsantrasyonunun PMI tayininde kullanılabileceği bulundu.

**Anahtar Sözcükler:** Postmortem interval, HMGB-1, Hücre dışı serbest DNA, Ölüm zamanı, ELİSA

## ABSTRACT

### Putative Role of Cell Free DNA and HMGB1 in Postmortem Interval

Postmortem interval (PMI) determination is essential in forensic deaths in criminal and judicial cases. In judicial cases, determination of the time of death is required especially for the allocation of heritage. The various methods have been used in present practice subjectively. There is no way that given the certain results. With the increasing use of molecular studies in forensic science, significant efforts were mentioned particularly in the field of Forensic Genetics. In this study, our objective was determining the PMI using the postmortem early concentration changes of extracellular DNA and serum HMGB-1 protein that raising especially after the cell necrosis. The study was conducted on 96 Wistar rats whose weights ranging between 230- 260 g. The rats were allowed to stand at 4°C and +24°C temperature after anesthesia and cervical dislocation. Post-mortem blood samples were collected at the hours of 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 and 72. Five minutes-centrifugation separated the serum at 5000 rpm. HMGB-1 concentration was measured using HMGB1-ELISA kit and the amount of extracellular free DNA measured with the luminometer optical density after the nucleic acid staining protocol of SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain. The results obtained in this study were converted to concentration with equations that obtained from standard samples. The amount of extracellular free DNA increased with the postmortem period at +4°C ( $r=0.751$   $p<0.001$ ). The serum concentration of HMGB-1 increased with the postmortem period ( $r=0.698$   $p<0.001$ ). The negative correlation was found between postmortem period and the amount of extracellular free DNA at +24°C ( $r = -0.213$   $p=0.15$ ), and the weak positive correlation was observed between the serum concentration of HMGB-1 and postmortem period at the same temperature ( $r=0.313$   $p=0.030$ ). In conclusion, it was found that the amount of extracellular free DNA and the concentration of serum HMGB-1 can be used for determination of PMI at +4°C.

**Key Words;** Postmortem interval, HMGB-1, Cell free DNA, Time of Death, ELISA

## KAYNAKÇA

1. Fatteh A. Estimation of the Time of Death, Handbook of forensic pathology. 1973:20.
2. Gök Ş. Ölüm Zamanı Tayini, Adli Tıp 1983:33-7.
3. Hancı H. Ölüm ve Postmortem Değişiklikler. Adli tıp ve Adli bilimler: Seçkin Yayıncılık; 2002. p. 285-305.
4. Kikuchi K, Kawahara KI, Biswas KK, Ito T, Tancharoen S, Shiomi N, et al. HMGB1: A new marker for estimation of the postmortem interval. Experimental and therapeutic medicine. 2010;1(1):109-11.
5. Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. 2010;1799(1):149-56.
6. Koç S, Kolusayın Ö. Adli Tıp Ders Kitabı. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları; 2011. p. 41-89.
7. Knight B. Ölümün Tıbbi Yönleri. Simpson Adli Tıp. Onuncu Baskı. İstanbul: Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı; 1995. p. 15-51.
8. Bardale R. Death and Changes after Death. Principles of forensic medicine and toxicology: JP Medical Ltd; 2011. p. 132-66.
9. Tunalı İ. Adli Tıp Bakımından Ölüm ve Ölüm Belirtileri. Adli Tıp. Ankara: Seçkin Yayıncılık; 2001. p. 79-90.
10. Polat O. Klinik Adli Tıp: Seçkin Yayıncılık; 2014.
11. KÖK AN. Türk Ceza Adalet Sisteminde Adli Tıp Uygulamaları. Ankara: Seçkin Yayıncılık; 2014.
12. Kolusayın Ö, Koç S. Ölüm. In: Soysal Z, Çakalır C, editors. Adli Tıp. 1. cilt. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları; 1999. p. 93-151.

13. Saukko P, Knight B. The Pathology of Sudden Death. Knight's forensic pathology. Third edition ed: CRC Press; 2004. p. 492-526.
14. Dix J, Graham M. Time of Death. Time of death, decomposition and identification: an atlas: CRC press; 1999.
15. Swain R, Kumar A, Sahoo J, Lakshmy R, Gupta S, Bhardwaj D, et al. Estimation of post-mortem interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry. Journal of forensic and legal medicine. 2015;36:144-8.
16. Adelman HC. Establishing the Time of Death. Forensic Medicine: Infobase Publishing; 2007. p. 13-21.
17. Sato T, Zaitso K, Tsuboi K, Nomura M, Kusano M, Shima N, et al. A preliminary study on postmortem interval estimation of suffocated rats by GC-MS/MS-based plasma metabolic profiling. Analytical and bioanalytical chemistry. 2015;407(13):3659-65.
18. Saukko P, Knight B. The pathophysiology of death. Knight's Forensic Pathology Third Edition ed: CRC Press; 2004. p. 52-97.
19. Bilge Y. Ölüm Bilimi. Adli Tıp. 3. Baskı. istanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2013. p. 248-70.
20. Tsokos M. Postmortem Changes and Artifacts Occurring During the Early Postmortem Interval. In: Tsokos M, editor. Forensic Pathology Reviews. Volume 3. p. 183-239.
21. Dolinak D, Matshes E, Lew EO. Postmortem Changes. Forensic pathology: principles and practice: Academic Press; 2005. p. 527-54.
22. DiMaio D, DiMaio VJ. Time of Death. Forensic pathology. Second Edition ed: CRC press; 2001.
23. Bucholtz A. Time of Death. 2015. In: Death Investigation [Internet]. USA: Anderson Publishing; [57-69].
24. Polat O, İnanıcı MA, Aksoy ME. Ölüm Zamanı. Adli Tıp Ders Kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1997. p. 18 - 25.

25. Swift B. The timing of death. *Essentials of autopsy practice*: Springer; 2006. p. 189-214.
26. Spitz WU, Spitz DJ. *Time of Death and Changes After Death. Spitz and Fisher's medicolegal investigation of death: guidelines for the application of pathology to crime investigation*: Charles C Thomas Publisher; 2006.
27. Koç S, Can M. Ölüm Kavramı ve Ölü Muayenesi. *Birinci Basamakta Adli Tıp*. 2. Baskı2011. p. 18 - 37.
28. Sabucedo AJ, Furton KG. Estimation of postmortem interval using the protein marker cardiac Troponin I. *Forensic science international*. 2003;134(1):11-6.
29. Singh D, Prashad R, Parkash C, Bansal YS, Sharma SK, Pandey AN. Linearization of the relationship between serum sodium, potassium concentration, their ratio and time since death in Chandigarh zone of north-west India. *Forensic science international*. 2002;130(1):1-7.
30. Dokgöz H, Arıcan N, Elmas I, Fincancı S. Comparison of morphological changes in white blood cells after death and in vitro storage of blood for the estimation of postmortem interval. *Forensic science international*. 2001;124(1):25-31.
31. Chandrakanth H, Kanchan T, Balaraj B, Virupaksha H, Chandrashekar T. Postmortem vitreous chemistry—An evaluation of sodium, potassium and chloride levels in estimation of time since death (during the first 36 h after death). *Journal of forensic and legal medicine*. 2013;20(4):211-6.
32. Ahi RS, Garg V. Role of vitreous potassium level in estimating postmortem interval and the factors affecting it. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2011;5(1):13-5.
33. Zilg B, Bernard S, Alkass K, Berg S, Druid H. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. *Forensic science international*. 2015;254:158-66.
34. Siddhamsetty AK, Verma SK, Kohli A, Verma A, Puri D, Singh A. Exploring time of death from potassium, sodium, chloride, glucose & calcium analysis of postmortem synovial fluid in semi arid climate. *Journal of forensic and legal medicine*. 2014;28:11-4.



35. Madea B, Kreuser C, Banaschak S. Postmortem biochemical examination of synovial fluid—a preliminary study. *Forensic science international*. 2001;118(1):29-35.
36. Singh D, Prashad R, Sharma SK, Pandey AN. Estimation of postmortem interval from human pericardial fluid electrolytes concentrations in Chandigarh zone of India: Log transformed linear regression model. *Legal medicine*. 2006;8(5):279-87.
37. Niranjana S, Shubhankar M, Kumar PK. Estimation of Time Since Death With Changes in Potassium Level in Pericardial Fluid. *Indian Journal of Applied Research*. 2015;5(12):215-7.
38. Singh D, Prasad R. Relationship between the postmortem intervals and the pericardial enzyme activities in subjects of Chandigarh zone of India—A preliminary study. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*. 2009;31(1):30-6.
39. Aykaç M. Ölüm Zamanının Tespiti. *Adli Tıp Ders Kitabı*. İstanbul: Çeliker Matbaacılık; 1987. p. 67 - 74.
40. Bardale R. Evaluation of cerebrospinal fluid cells in postmortem period to estimate death interval. *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine*. 2009;31(3):205-9.
41. Wyler D, Marty W, Bär W. Correlation between the post-mortem cell content of cerebrospinal fluid and time of death. *International journal of legal medicine*. 1994;106(4):194-9.
42. Yadav J, Deshpande A, Arora A, Athawal B, Dubey B. Estimation of time since death from CSF electrolyte concentration in Bhopal region of central India. *Legal medicine*. 2007;9(6):309-13.
43. Finehout EJ, Franck Z, Relkin N, Lee KH. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid changes related to postmortem interval. *Clinical chemistry*. 2006;52(10):1906-13.
44. Parmar AK, Menon SK. Estimation of postmortem interval through albumin in CSF by simple dye binding method. *Science & Justice*. 2015;55(6):388-93.

45. Babu S, Biradar G, Bakkannavar S, Kumar PG, Shaila B. Estimation of time since death from nuclei changes of bone marrow cells. *Indian Journal of Forensic and Community Medicine*. 2015;2(4):198-202.
46. Şam B. Ölümün Belirtileri. *Adli Otopsi Atlası*. İstanbul: Adli Tıp Kurumu Yayınları; 2003. p. 29-50.
47. Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Reiter C, LeBlanc HN, Hall MJ. Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *International journal of legal medicine*. 2007;121(2):90-104.
48. Amendt J, Krettek R, Zehner R. Forensic entomology. *Die Naturwissenschaften*. 2004;91(2):51-65.
49. Castner JsL. General Entomology and Insect Biology. In: Byrd JH, Castner JL, editors. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. Second ed: CRC press; 2009. p. 17-38.
50. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, et al. *Basic Molecular Genetic Mechanisms. Molecular Cell Biology*. 5th ed: WH Freeman & Company. p. 101-45.
51. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *DNA, Chromosomes and Genomes. Molecular Biology of the Cell* New York: Garland Science 5th ed 2010. p. 195-262.
52. Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review. *Forensic science international: genetics*. 2010;4(3):148-57.
53. Watson WH. DNA degradation as an indicator of post-mortem interval. 2010.
54. Bauer M, Gramlich I, Polzin S, Patzelt D. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Legal medicine*. 2003;5(4):220-7.
55. Di Nunno NR, Costantinides F, Bernasconi P, Bottin C, Melato M. Is flow cytometric evaluation of DNA degradation a reliable method to investigate the early postmortem period? *The American journal of forensic medicine and pathology*. 1998;19(1):50-3.

56. Hansen J, Lesnikova I, Funder AMD, Banner J. DNA and RNA analysis of blood and muscle from bodies with variable postmortem intervals. *Forensic science, medicine, and pathology*. 2014;10(3):322-8.
57. Bustin M. High Mobility Group Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2010;1799:1-2.
58. Reeves R. Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2010;1799(1):3-14.
59. Bianchi ME, Agresti A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current opinion in genetics & development*. 2005;15(5):496-506.
60. Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine & growth factor reviews*. 2006;17(3):189-201.
61. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002;418(6894):191-5.
62. Magna M, Pisetsky DS. The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. *Molecular medicine*. 2014;20(1):138.
63. Vandewoestyne M, Van Hoofstat D, Franssen A, Van Nieuwerburgh F, Deforce D. Presence and potential of cell free DNA in different types of forensic samples. *Forensic Science International: Genetics*. 2013;7(2):316-20.
64. Shoham Y, Krieger Y, Perry ZH, Shaked G, Bogdanov-Berezovsky A, Silberstein E, et al. Admission cell free DNA as a prognostic factor in burns: quantification by use of a direct rapid fluorometric technique. *BioMed research international*. 2014;2014.
65. Cui M, Fan M, Jing R, Wang H, Qin J, Sheng H, et al. Cell-Free circulating DNA: a new biomarker for the acute coronary syndrome. *Cardiology*. 2013;124(2):76-84.
66. Moon J-Y, Choi Y-W, Moon H, Kim K, Lee Y-H, Kim S-Y, et al. Effect of blood pressure and glycemic control on the plasma cell-free DNA in hemodialysis patients. *Kidney research and clinical practice*. 2015;34(4):201-6.
67. Lo YD, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive

- prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics*. 1998;62(4):768-75.
68. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clinical chemistry*. 2013;59(12):1722-31.
  69. Rothe F, Laes J-F, Lambrechts D, Smeets D, Vincent D, Maetens M, et al. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Annals of Oncology*. 2014;25(10):1959-65.
  70. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annual review of immunology*. 2011;29:139.
  71. Palmiere C, Augsburger M, Mangin P. High-mobility group box-1 protein determination in postmortem samples. *Forensic science international*. 2014;239:103-6.
  72. Gibot S, Massin F, Cravoisy A, Barraud D, Nace L, Levy B, et al. High-mobility group box 1 protein plasma concentrations during septic shock. *Intensive care medicine*. 2007;33(8):1347-53.
  73. Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Rosas-Ballina M, Huston JM, Czura CJ, et al. Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock*. 2006;25(6):571-4.
  74. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chassé E, et al. Circulating deoxyribonucleic acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(20):4157-64.
  75. Bianchi D. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential—a review. *Placenta*. 2004;25:S93-S101.
  76. Dugoff L, Barberio A, Whittaker PG, Schwartz N, Sehdev H, Bastek JA. Cell-free DNA fetal fraction and preterm birth. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2016.

77. Hahn S, Huppertz B, Holzgreve W. Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation? *Placenta*. 2005;26(7):515-26.
78. Hahn S, Zhong XY, Holzgreve W, editors. Recent progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*; 2008: Elsevier.
79. Manokhina I, Wilson SL, Robinson WP. Noninvasive nucleic acid-based approaches to monitor placental health and predict pregnancy-related complications. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015;213(4):S197-S206.
80. Zapico SC, Menéndez ST, Núñez P. Cell death proteins as markers of early postmortem interval. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71(15):2957-62.