



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**TÜKETİCİ HAKLARININ GÖZETİLMESİ AÇISINDAN,  
ANKARA İLİ KASAPLIK SIĞIR ETLERİNDE CİNSİYET VE  
YAŞIN BİYOLOJİK ANALİZLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Büşra CUMHUR**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL**

**ANKARA  
2019**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜKETİCİ HAKLARININ GÖZETİLMESİ AÇISINDAN,  
ANKARA İLİ KASAPLIK SIĞIR ETLERİNDE CİNSİYET VE  
YAŞIN BİYOLOJİK ANALİZLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Büşra CUMHUR**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL**

**ANKARA  
2019**

## Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Tüketici Haklarının Gözetilmesi Açısından, Ankara İli Kasaplık Sığır Etlerinde Cinsiyet ve Yaşın Biyolojik Analizlerle Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususun doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Büşra CUMHUR

Tarih: Aralık 2019

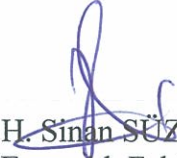
İmza: 

## KABUL ve ONAY


Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinler Arası Adli Bilimler Anabilim Dalında Büşra CUMHUR tarafından hazırlanan “Tüketici Haklarının Gözetilmesi Açısından, Ankara İli Kasaplık Sığır Etlerinde Cinsiyet ve Yaşın Biyolojik Analizlerle Değerlendirilmesi” Aşağıdaki jüri tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

19.12.2019

  
Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN  
Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi  
Jüri Başkanı

  
Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL  
Ankara Ü. Veteriner Fakültesi  
Üye-Danışman

  
Doç. Dr. M. Eray ALÇIĞIR  
Kırıkkale Ü. Veteriner Fakültesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Cinsiyet ve Yaşın Sığır Karkas Sınıflandırmasında Önemi	3
1.1.1. Cinsiyet ve Yaşın Etin Kalitesi Üzerindeki Etkisine Yönelik Çalışmalar	15
1.2. Adli Bilimler ve Diğer Alanlarda Cinsiyet Belirleme ve Yaş Tahmininin Önemi ve Gerekliliği	19
1.2.1. Cinsiyet Belirlemek İçin Kullanılan Yöntemler ve Materyaller	21
1.2.1.1. Cinsiyet Belirleme İle İlgili Yapılan Çalışmalar	24
1.2.2. Yaş Tahmininde Kullanılan Yöntem ve Materyaller	26
1.2.2.1. Lipofuskin; “Yaş Pigmenti”	34
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>40</b>
2.1. Gereç	40
2.2. Yöntem	43
2.2.1. Genetik Analizler	43
2.2.1.1. Cinsiyet Analizi İçin DNA Eldesi	43
2.2.1.2. DNA Saflık, Yoğunluk ve Bütünlük Kontrolü	44
2.2.1.3. <i>AMELX/AMELY</i> Bölgesinin Yükseltgenmesi	45
2.2.2. Histokimyasal Analizler	48
2.2.2.1. Doku Preparatının Hazırlanması ve Boyanması	48
2.2.2.2. Floresans Mikroskop Çalışması	49
2.2.2.2.1. Preparatların Floresans Mikroskopunda İncelenmesi	49
<b>3. BULGULAR</b>	<b>51</b>
3.1. Genetik Bulgular	51

3.2. Histokimyasal Bulgular	53
3.2.1. <i>Musculus biceps femoris</i> (but) Preparatlarında Lipofuskin Birikimi	53
3.2.2. <i>Musculus longissimus dorsi</i> (kol) Preparatlarında Lipofuskin Birikimi	56
3.2.3. Satın Alınan Eterde Yaş Tayini	60
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>62</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>66</b>
<b>ÖZET</b>	<b>71</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>72</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>73</b>
<b>EKLER</b>	<b>83</b>
Ek-1. DNA İzolasyon Protokolü	83
EK-2. <i>Musculus longissimus dorsi</i> ve <i>Musculus biceps femoris</i> Enine ve Boyuna Kesitlerini İçeren Lipofuskin Floresans Skorlama Listesi	84
Ek-3. Kullanılan Solüsyonların İçerikleri ve Hazırlanışları	86
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>87</b>

## ÖNSÖZ

Tez konusunu oluşturan “Adli bakımdan sığır etinde yaş ve cinsiyet tayini” genetik ve mikroskopik yöntemler ile ele alınarak gerçekleştirilmiş, gerekli materyal saha çalışmaları ve kombinalardan temin edilmiştir. Tez sürecinde yaşadığım sıkıntıları hafifleten, bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik A.D. Başkanı ve aynı zamanda danışmanım olan sayın Doç. Dr. Bengi Çınar Kul’a; Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Sinan Süzen’e; Doç. Dr. Özge Özmen ve Dr. Öğr. Üyesi Nüket Bilgen’e; floresans mikroskop çalışmalarında yardımcı olan Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji A.D. Başkanı Prof. Dr. Oğuz Kul’a; süreç içerisinde bilgi ve desteklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği A.D. Başkanı Prof. Dr. Engin Sakarya’ya ve öğretim üyesi Prof. Dr. Yılmaz Aral’a; manevi desteğini hiç bırakmayan Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Disiplinlerarası Adli Bilimler A.D. öğretim görevlisi sevgili Doç. Dr. H. Nihal Açıkgöz’e; laboratuvar çalışmalarım ile ilgili bilgi ve tecrübelerini aktaran sorularımı yanıtlayan Arş. Gör. M. Yenal Akkurt ve doktora öğrencisi Ö. Şebnem Çıldır’a; Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji A.D. Arş. Gör. Merve Bişkin Türkmen’e; kombinada gerçekleştirilen çalışmalarda desteklerini esirgemeyen Vet. Hek. Zafer Acar’a teşekkür ederim. Bugüne kadarki eğitim hayatım boyunca bana güç veren çok değerli annem Nuray, babam Sinan Cumhuriyet’a ve kardeşlerime tüm kalbimle minnetlerimi sunuyorum. Hayatıma ışık oldukları için anne ve babama teşekkür ediyorum.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
USDA	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Teşkilatı
AAR	Amino Asit Rasemizasyonu
A.D.	Anabilim Dalı
S-EUROP	Avrupa karkas sınıflandırma sistemi
AUS-MEAT	Avustralya-Et Derecelendirme Sistemi
MSA	Avustralya Et Standartları Derecelendirme Sistemi (Meat Standard Australia)
bç	Baz çifti
ZNFs	Çinko-parmak proteinleri
dk	Dakika
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dH <sub>2</sub> O	Distile su
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent analizi
EtOH	Etanol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ESK	Et Süt Kurumu
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
FAPRI	Gıda ve Tarım Politikası Araştırma Enstitüsü
kg	Kilogram
<i>COL1A1</i>	Kollajen, tip I, alfa 1
$\lambda$	Lamda (dalga boyu)
LC/APCI-MS/MS	Likit kromatografi-ardışık kütle spektrometresi
LF	Lipofuskin
LAMP	Loop-mediated izotermal amplifikasyon
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
MALDI-TOF MS	Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi
$\mu$ l	Mikrolitre



$\mu\text{m}$	Mikrometre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
miRNA	Mikro ribonükleik asit
mM	Milimolar
mtDNA	Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
mtDNAm	Mitokondriyal deoksiribonükleik asit metilasyonu
MYB	Moleküler yaş belirteçleri
MLD	<i>Musculus longissimus dorsi</i>
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
ör.	Örnek
PAS	Periyodik asit schiff boyama
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TRF	Restriksiyon Terminal Fragment
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
s	Saniye
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
<i>BRY1</i>	Sığır-spesifik tekrarlayan Y kromozom bölgesi 1
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
tl	Türk lirası
TSE	Türk Standartları Enstitüsü
U	Ünite
V	Volt
<i>AMELX</i>	X Kromozomuna özgü amelogenin geni
FAS	Yağ asidi sentaz enzimi
<i>AMELY</i>	Y kromozomuna özgü amelogenin geni
HPLC-MS/MS	Yüksek performans sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Dünya üzerinde kişi başına düşen yıllık ortalama et tüketim haritası	3
Şekil 1.2. Türkiye’de günlük kişi başına düşen et tüketim grafiği	4
Şekil 1.3. Kırmızı etin yaş, cinsiyet ve hayvanın beslenme bilgisini içeren etiket örneği	7
Şekil 1.4. TÜİK hayvancılık istatistikleri, sığırların kategorize edilmiş bilgileri web görüntüsü	14
Şekil 1.5. DNA metilasyon analiz yöntemlerinin sınıflandırılması	31
Şekil 1.6. Hedef DNA ya da global DNA üzerine yapılan metillenme analizlerinin yapıldığı canlı grupları ve doku tipleri	33
Şekil 1.7. Genç ve yaşlı hücre içerisinde şematik olarak lipofuskin birikim karşılaştırması	38
Şekil 2.1. Karkas üzerinde numune alınan kas bölgelerinin gösterimi	40
Şekil 2.2. Satın alınan etlerin Ankara ilçelerine göre toplanma bölgelerinin harita üzerinde gösterimi	43
Şekil 2.3. Amelogenin X ve Y gen bölgeleri üzerinde primerlerin yerleşim yerleri	47
Şekil 2.4. AMELX/AMELY üzerinde primer bağlanma bölgelerini içine alan baz dizilim karşılaştırması	47
Şekil 2.5. Allred skorlama metodu	50
Şekil 3.1. İzole edilen sığır DNA’larının jel elektroforez görüntüsü	51
Şekil 3.2. AMELX/AMELY genlerinin (♂, sığır) gradient PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü	51
Şekil 3.3. AMELX/Y-F ve AMELX/Y-R primerleri kullanılan sığır eti DNA’sı PZR ürünlerinin jel elektroforezi	52
Şekil 3.4. <i>Musculus biceps femoris</i> enine kesiti floresans mikroskop görüntüsü	54
Şekil 3.5. Farklı skorlamalara sahip preparatlarda floresans mikroskop görüntüleri	54
Şekil 3.6. <i>Musculus biceps femoris</i> enine kesiti lipofuskin ışımaya şiddeti görüntüsü	55
Şekil 3.7. Otolitik doku enine kesit floresans mikroskop görüntüsü	55
Şekil 3.8. <i>Musculus biceps femoris</i> enine kesiti floresans mikroskop görüntüsü	56
Şekil 3.9. <i>M. longissimus dorsi</i> floresans mikroskop görüntüsü	57
Şekil 3.10. Farklı skor değerlerine sahip doku preparatları floresans mikroskop görüntüleri	57
Şekil 3.11. Otolitik kas doku floresans mikroskop görüntüsü	58
Şekil 3.12. Enine kesit preparatta hiyalin dejenerasyon görüntüsü	59

**Şekil 3.13.** Aynı preparat üzerinde görünür ışık ve floresans ışık altında çekilmiş fotoğraflar 59

**Şekil 3.14.** Aynı preparat üzerinde parazit hücrelerinin görünür ışık ve floresans ışık altındaki görüntüleri 60

**Şekil 3.15.** Satın alınan et parçasına ait enine kesit preparatı floresan mikroskobu görüntü örneği 60



## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> ABD’de uygulanan, sığır karkaslarının kalite derecelendirmesi	6
<b>Çizelge 1.2.</b> Bazı ülkelerin et sınıflandırma ve derecelendirmede baz aldıkları kriterler	9
<b>Çizelge 1.3.</b> ESK Hayvan Alım Fiyat Listesi	12
<b>Çizelge 1.4.</b> Türkiye’de kesilen sığırların TÜİK’in baz aldığı cinsiyet ve yaş aralıkları	14
<b>Çizelge 1.5.</b> Türkiye’nin yıllara göre kırmızı et üretim miktarı	15
<b>Çizelge 1.6.</b> Cinsiyet belirlemede kullanılan gen bölgeleri ve yöntemler	22
<b>Çizelge 1.7.</b> Yaş tahmininde kullanılan moleküler, kimyasal, fiziki belirteçler	26
<b>Çizelge 1.8.</b> Farklı tür, doku ve hücre tipi üzerinde yapılan DNA metilasyon çalışmaları, yaşla korelasyon gösteren genler ve çalışılan CpG adaları	32
<b>Çizelge 1.9.</b> Lipofuskin analizinde kullanılan canlı, doku ve yöntem bilgileri	37
<b>Çizelge 2.1.</b> <i>M. longissimus dorsi</i> ve <i>M. biceps femoris</i> kas dokularının alındığı karkaslara ait bilgiler	41
<b>Çizelge 2.2.</b> Satın alınan etlerin bilgileri	42
<b>Çizelge 2.3.</b> <i>AMELX/AMELY</i> primer sekansları	45
<b>Çizelge 2.4.</b> <i>AMELX</i> ve <i>AMELY</i> primer bölgeleri PZR reaksiyonu kimyasal yoğunlukları	46
<b>Çizelge 2.5.</b> <i>AMELX</i> ve <i>AMELY</i> primer bölgeleri PZR reaksiyonu yükseltgenme koşulları	46
<b>Çizelge 2.6.</b> Allred skorlama metodu	50
<b>Çizelge 3.1.</b> Satın alınan etlerde genetik çalışma sonucu belirlenen cinsiyetin market ve kasaplara göre dağılımı	52
<b>Çizelge 3.2.</b> Satın alınan etlerin 15 adetinin floresans mikroskop çalışması skorlama sonuçları	61

# 1. GİRİŞ

Hayvansal gıdaların insan diyetindeki önemi, ülke nüfusunun sağlıklı olabilmesi için göz ardı edilemez bir gerçektir. Bilhassa vücudun gereksinimi olan hayvansal proteinin karşılanımı için kırmızı ve beyaz et, birlikte insan beslenmesinde önemli bir yer teşkil etmektedir (Karakuş, 2011). Günlük protein ihtiyacının %40-50'si, sağlıklı ve dengeli beslenme için, hayvansal kaynaklı proteinlerden karşılanmalıdır (Kallem, 2015). İnsan diyetinde önemli bir yer alan kasaplık sığır eti farklı kalite özelliklerine ırk, cinsiyet, besi süresi, besleme ve bakım gibi birçok faktörle bağlantılı olarak sahip olabilmekte, bahsi geçen faktörler sığır karkasının ticari değerini belirlemektedir (Craigie, 2012). Tüketicinin ödediği para ederinde kaliteye sahip et almasına olanak vermesi, üretim kalitesinin ve randımanın artırılması bakımından, karkas kalitesinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Sığır karkaslarının kalite ile fiyat arasındaki ilişkiyi belirleyen ticari kalite değerlendirmesi, Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde “karkas sınıflandırma” sistemi (S-EUROP), Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kanada, Japonya, Güney Kore ve Avustralya gibi ülkelerde “karkas derecelendirme” sistemi kullanılarak yapılmaktadır (Şeker ve ark., 2017). Avustralya’da; “Avustralya Et Standartları derecelendirme sistemi (MSA)” ve “Avustralya-Et derecelendirme sistemi (AUS-MEAT)” olmak üzere iki sistem uygulanmaktadır (Strydom, 2011). Et kalitesinin çeşitliliğinin sebebi genetik (ırk), beslenme, yaş, besi bitirme dönemi ve cinsiyettir (Venkata-Reddy ve ark., 2015). Kırmızı et derecelendirme ve sınıflandırma kriterlerinden biri olan ‘cinsiyetin’ etin kalite ve lezzetini değiştirdiği birçok bilimsel çalışma ile erkek ve dişi sığır eti arasındaki farklılıklar ortaya konularak doğrulanmıştır (Buskirk ve Schweihof, 2013; Venkata-Reddy ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2010). Derecelendirme unsuru olan mermerleşme de sığırlarda farklı cinsiyetlerde çeşitlilik göstermektedir ve özellikle dişilerde etkili şekilde yağ katmanı oluşumunu kontrol eden genetik mekanizmalar mevcuttur. Sığırların hormonal durumu da karkastaki yağ ve protein dağılımını direkt olarak etkilemektedir (Venkata-Reddy ve ark., 2015). Etin sınıflandırılması ve derecelendirilmesinde genç sığırların karkasları yaşlı sığır karkasından daha kaliteli olduğu düşüncesiyle Güney Afrika’da 1936’dan beri

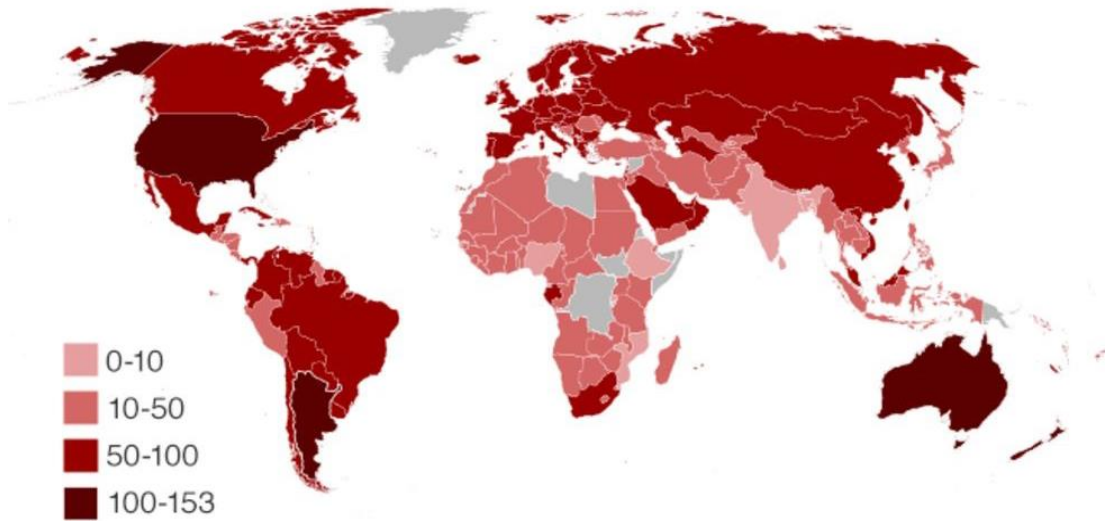
“yaş” karkas derecelendirme kriteri olarak kullanılmaktadır (Strydom, 2011). Hayvanlarda yaş ilerlemesiyle beraber protein birikimi azalmakta ve canlı ağırlığa da bağlı olarak vücutta yağ miktarı artmaktadır (Ergün ve ark., 2011). Dentasyon ve osifikasyona dayalı yaş belirleme işlemleri kesimhane ya da üretim çiftliklerinde değerlendirilebilecek belirteçler olduğu için parçalanmış et ve et ürünlerinden yaş belirlemede uygulanabilir değildir. Türkiye’de 1966 yılında Türk Standartları Enstitüsü (TSE) kasaplık sığır için gerekli sınıflandırma standartları belirlemiştir. Standartlar; yaş, cinsiyet, konformasyon, etlilik ve yağlılığı değerlendiren özellikleri kapsamaktadır (Sakarya ve ark., 2014). Türkiye’de et alım ve satışta bir nevi standart belirleme birimi olan “Et ve Süt Kurumunun (ESK)” 29/07/2019 tarihinde yürürlüğe koyduğu “hayvan alım fiyat listesi” incelendiğinde kurumun hayvanları cinsiyet ve yaşın kriter alındığı üç kategori altında sınıflandırdığı görülmektedir (Et ve Süt Kurumu, 2019). Türkiye’nin uyguladığı kalite sıralaması Amerika, Avustralya, Avrupa Birliği (AB) ülkelerinin kabul ettiği sınıflandırma ve derecelendirmeler ile karşılaştırıldığında bu sistemlerin baz alınmadığı görülmektedir. Örneğin düve etinin kalitesi bilimsel çalışmalarla da ortaya konmuşken ülkemizde ikinci ve üçüncü kalite et kategorisinde olması tüketiciye sunulan etin kalite-fiyat kriterlerinde çelişki uyandırmaktadır. Ayrıca tüketiciye bu ayrımı belirten etiket bilgisi de sunulmamaktadır. Bu durumda satıcının tüketiciyi bilgilendirmeyerek haksız kazanç sağlamasını önlemek ve tüketicinin kalite standartlarından üst düzeyde yararlanmasını sağlamak için, alımı yapılan bu hayvanların satışında cinsiyetinin ve yaklaşık yaşının belirtilmesi ve gerektiğinde laboratuvar ortamında incelenebilmesi önem taşımaktadır. Aynı zamanda hayvansal kaynaklı besin değerlerinin tüketilebilmesi açısından farklı fiyat aralıklarında et ve ürünlerinin sunumu/satışı tüketicinin alım gücünü kolaylaştıracağı için sağlıklı toplum oluşumuna ve bilinçli tüketime destek sağlayacağı açıktır.

Bu araştırmada; Ankara ilinde farklı kasap ve et reyonu bulunan marketlerden sığır etleri satın alınmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) dayanan yöntem kullanılarak, X ve Y kromozomlarına özgü amelogenin (*AMELX/AMELY*) gen dizilerinin incelenmesine dayanan cinsiyet tayini yapılmıştır. Ayrıca kesimhanelerden yaşı bilinen sığır karkaslarından alınan iskelet kas dokuları ve satın

alınan et parçaları, otofloresans özelliği ile kimyasal biyobelirteç olarak kabul edilen lipofuskin granül birikimi yönünden analiz edilmiştir. Böylelikle hem lipofuskinin sığır iskelet kasında yaş tahmini için kullanılabilir bir biyobelirteç olma potansiyeli hem de sığırdaki kas dokusunun yaş tahmini için uygunluğu değerlendirilmiştir.

### 1.1. Cinsiyet ve Yaşın Sığır Karkas Sınıflandırmasında Önemi

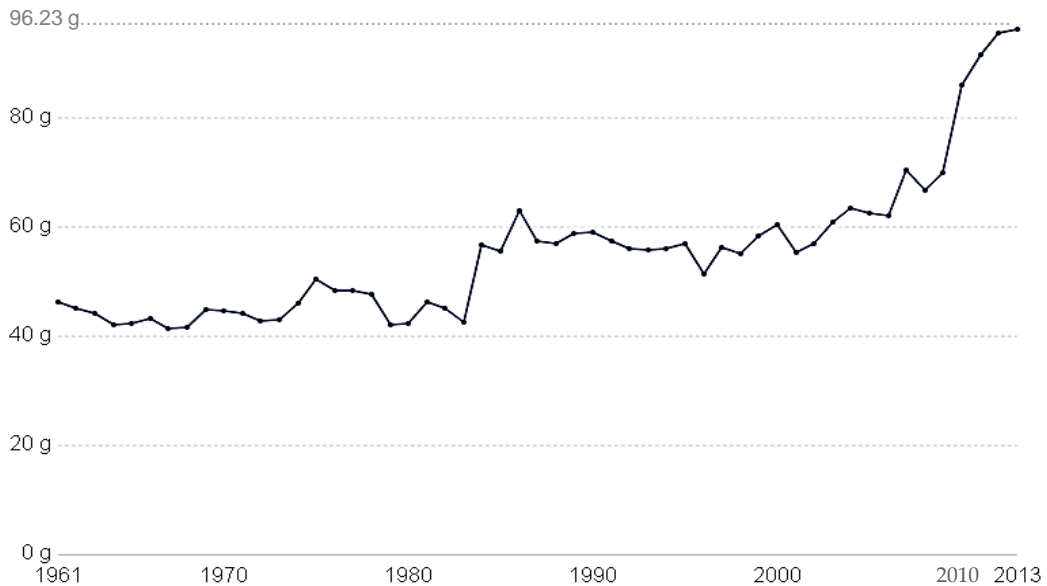
Hayvansal ürünlerin insan diyetindeki önemi, nüfusun sağlıklı olabilmesi için göz ardı edilemez bir gerçektir. Bilhassa hayvansal proteinin karşılanımı için kırmızı ve beyaz et, birlikte insan beslenmesinde önemli bir yer teşkil etmektedir (Karakuş, 2011). Günlük protein ihtiyacımızın, sağlıklı ve dengeli beslenme için, %40-50'si hayvansal kaynaklı proteinlerden karşılanmalıdır (Kalle, 2015). Missouri Üniversitesi Gıda ve Tarım Politikası Araştırma Enstitüsü (FAPRI, Kolumbiya) 2011 verilerine göre: Türkiye'nin kişi başına yıllık kırmızı et tüketimi 12 kilogram (kg); Arjantin 96,1kg; Avustralya 91,4kg; Brezilya 95,1kg; Kanada 82,7kg; AB 77,1kg; Rusya 58,7kg; ABD 107,5kg olarak belirlenmiştir (Akçay ve Vatansver, 2013). Dünya genelinde kişi başına düşen ortalama et tüketim (kg) dağılımı Şekil 1.1'de sunulmuştur (Ritchie, 2019). Türkiye'nin 1961 ve 2013 yılları arasındaki kişi başına düşen et tüketim grafiği ise Şekil 1.2'de verilmiştir (Ritchie ve Roser, 2019).



Şekil 1.1. Dünya üzerinde kişi başına düşen yıllık ortalama et (kg) tüketim haritası.

Et ve et ürünleri A, B1, B2, B6 (piridoksinin), B12 (kobalaminin) ile B3 (niasin) vitaminleri ve B5 (pantotenik asit) bakımından zengindir. Yağsız ette C vitamini, demir, bakır ve bazı B vitaminleri daha boldur. Kırmızı etin sahip olduğu besin öğeleri, insanlarda doku yapımı, onarımı ve dinamik dengenin sağlanmasında kayda değer bir önem taşımaktadır (Kallem, 2015). Sığır eti üretiminden, kırmızı et üretiminin büyük bir kısmı temin edilmektedir (Karakuş, 2011). Sığır etinin sindirim kolaylığının da fazla olması (%97), bu proteinlerin insan diyetindeki önemini arttırmaktadır (Kallem, 2015). Et ile beslenmedeki azlık ve bu nedenle oluşan protein yetersizliği, gelişimsel bozukluğa ve sağlık sorunlarına sebep olmaktadır (Ergün ve ark., 2011).

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan kasaplık sığır eti farklı kalite özelliklerine ırk, cinsiyet, besi süresi, bakım ve besleme gibi birden fazla etkenle ilişkili olarak sahip olabilmekte, bahsi geçen faktörler sığır karkasının ticari değerini belirlemektedir (Craigie, 2012). Karkas kalitesi sadece üreticiyi değil, sanayici ve tüketicuyu de doğrudan etkilemektedir. Tüketicinin ödediği para ederinde kaliteye sahip et almasına olanak vermesi, üretim kalitesinin ve randımanın artırılması bakımından, karkas kalitesinin belirlenmesi önem taşımaktadır (Şeker ve ark., 2017).



**Şekil 1.2.** Türkiye’de günlük kişi başına düşen et tüketim (g) grafiği (Our World in Data sitesinden uyarlanmıştır).



Sığır karkasının kalite ile fiyat arasındaki ilişkiyi belirleyen ticari kalite değerlendirilmesi, Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde “karkas sınıflandırma” (S-EUROP) sistemi, ABD, Kanada, Japonya, Güney Kore ve Avustralya gibi ülkelerde “karkas derecelendirme” sistemi kullanılarak yapılmaktadır (Şeker ve ark., 2017). Avustralya’da; “MSA” ve “AUS-MEAT” olmak üzere iki sistem uygulanmaktadır (Strydom, 2011). Sığır karkasları kalitesine göre sınıflandırılırken kalite derecelendirilmesi ve verim derecelendirilmesi baz alınmaktadır. Kalite derecelendirme; karkasa ait ticari özellikler ile birlikte; etin renk, sululuk, çiğnenebilirlik, tekstür, aroma ve lezzet gibi unsurlarını da belirtmektedir. Verim derecelendirmesi kesilen sığırın cinsiyeti ve yaşı ile birlikte etin olgunluğunu, mermerleşme derecesini ve karkas et-kemik yüzdesini esas almaktadır (Polkinghorne ve Thompson, 2010; Sakarya ve ark., 2014).

Amerika Birleşik Devletleri’nde sığırlarda karkas derecelendirme sistemine, üretici fiyatlarını belirleyici bir araç olarak sıklıkla başvurulmaktadır. Karkasın kalite derecelendirmesinde, sığırın cinsiyeti, yaşı, özellikle *Musculus longissimus dorsi* (MLD) kasındaki mermerleşme, kas yapısındaki sıklık/sertlik ve etin rengi önem taşımaktadır (Şeker ve ark., 2017). ABD’de derecelendirme zorunlu değildir fakat, pazarlama stratejisi olarak üreticiler tarafından yürütülmekte ve ürün paketlerinde bilgilendirme yapılmaktadır (Sakarya ve ark., 2014). Derecelendirmede kullanılan kalite kategorileri Çizelge 1.1’de verilmektedir (Şeker ve ark., 2017). Dereceler arasında çok düşük fiyat farkı olmakla birlikte, en düşük kalite ile en yüksek kalite arasında fark nispi olarak büyük olmaktadır. Japonya’da ise fiyatlandırma, derecelendirmeye bağlı olarak yapıldığından dolayı sistemin uygulanması zorunludur (Sakarya ve ark., 2014). Shackell ve Dodds (2008), tarafından bazı Japon restoranlarında yedikleri bifteğin kaynağını kontrol etmek isteyenlere bilgi verildiği bildirilmiştir.

**Çizelge 1.1.** ABD’de uygulanan, sığır karkaslarının kalite derecelendirmesi.

<b>Kalite Kademesi</b>	<b>Karkas Özellikleri</b>
En iyi	Tosun, düve, öküz ve boğa karkası
Üstün	Daha çok boğa ve öküz karkası
Seçkin	Az yağlı; iki, üç yaş; çoğunlukla boğa, öküz ve inek karkası
Standart	İki ve üç yaş; boğa, öküz ve inek karkası
Orta düşük kalite	Dört, altı yaş; daha çok boğa, inek ve öküz karkası
Düşük kalite	Çoğunlukla boğa, inek ve öküz karkası
Konservelik (En düşük kalite 1 ve 2)	Daha çok dört, altı yaş; inek ve öküz karkası

AB’ye üye ülkelerde “ticaret sınıfları” düzenlemeleri doğrultusunda, tüketime ya da satışa sunulan sığır eti cinsiyet, konformasyon ve yağ dokusuna göre sınıflandırılmaktadır. Cinsiyet ile ilişkili kategoriler; A (genç boğa), B (boğa), C (öküz), D (inek) ve E (düve) olarak (Department of Agriculture, Food and the Marine, 2019a), konformasyon ile ilişkili kategoriler; “S; süper, E; mükemmel, U; çok iyi, R; iyi, O; orta, P; kötü” olarak, yağ dokusu ile ilişkili kategoriler ise “1; düşük, 2; zayıf, 3; ortalama, 4; yüksek, 5; çok yüksek” olarak belirlenmekte ve belirtilmesi zorunlu tutulmaktadır (Sakarya ve ark., 2014). İrlanda hükümetinin resmi internet sitesinde karkasların %90’ından fazlasının makine ile sınıflandırılmasının yapıldığı ve sınıflandırma bilgileri, fabrika tarafından satıcıya bildirildiği belirtilmiştir (Department of Agriculture, Food and the Marine, 2019b). AUS-MEAT derecelendirme sistemine ilişkin etiket örnekleri Şekil 1.3’te sunulmuştur (King, 2011).

YG: Karkas yaş ve cinsiyeti



**GRAIN FED – SYMBOL – GF**

- ◆ Number of days on feed: 100 days
- ◆ Age of animal (Dentition): 6 permanent incisor teeth (maximum) except where carcasses with thoracic vertebrae are only partially ossified.
- ◆ P8 Fat depth (mm): 7 mm (minimum)
- ◆ Meat Colour Score: 1 a-b-c – 3
- ◆ Fat Colour Score: 0 – 3

**Feed Ration**  
Cattle must have been fed in a feedlot for not less than 100 days, and for not less than 80 days of that, on a nutritionally balanced ration of a recognised high energy feed of which grain is the highest single component. Rations must have an average metabolisable energy (ME) content greater than 10 megajoules (MJ) per kilogram of dry matter.

**GRAIN FED YOUNG BEEF – SYMBOL – GFYG**

- ◆ Number of days on feed: 70 days (Females not less than 60 days)
- ◆ Age of animal (Dentition): 0 to 2 permanent incisor teeth
- ◆ P8 Fat depth (mm): 5 mm (minimum)
- ◆ Meat Colour Score: 1 a-b-c – 3
- ◆ Fat Colour Score: 0 – 3

**Besi süresi**  
**Yaş (dentisyon)**  
**Yağ yoğunluğu**  
**Etin renk derecesi**  
**Yağ renk derecesi**

**Besi süresi**  
**Yaş (dentisyon)**  
**Yağ yoğunluğu**  
**Etin renk derecesi**  
**Yağ renk derecesi**

Şekil 1.3. Kırmızı etin yaş, cinsiyet ve hayvanın beslenme bilgisini içeren etiket örneği.

Avustralya’da 1987 yılından sonra MSA’nın oluşturduğu standartlar çerçevesinde cinsiyet, yaş tayini ve karkas ağırlığı kriterleri ile sistem devam ettirilmiştir. MSA derecelendirme sisteminde oluşturulan veri tabanı üzerinden etin bölgesi, ırk, pişirme metodu, cinsiyet, yaş, karkas ağırlığı, fizyolojik yaş, mermerleşme, karkasın asım metodu ve pH değerleri üzerinden hesaplanan istatistiksel bir öngörü metodu aracılığı ile derecelendirme yapılmaktadır (Sakarya ve ark., 2014).

Türkiye’de etiket bilgisine yönelik “Tarım ve Orman Bakanlığında: Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları ve Et Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2018/52)” ve “Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği, Sayı: 28157 (3. Mükerrer)” incelendiğinde kalite sınıflandırma ve derecelendirmeye yönelik her

hangi bir kriteri baz alan tanımlayıcı ifadenin etikete konulmasından söz edilmediği görülmektedir (Resmî Gazete 2011; Resmî Gazete, 2019).

İrlanda'da Gıda Tarım ve Denizcilik Bakanlığı (sığır eti ve ürünlerinin etiketlenmesine ilişkin yönetmeliklerin uygulanmasında yetkili kuruluş), tarafından uygulanan "EU Parliament and Council Regulation 1760/2000 and S.I. No. 435 of 2000" mevzuatına göre; sığır eti pazarlamasında yer alan operatörler ve kuruluşlar, tüketicilere aşağıdaki bilgileri sağlayan etiketlemeyi yapmak zorundadır:

- Sığır etinin elde edildiği hayvan veya hayvan grubunun tanımlanmasını sağlayan bir referans numarası veya kodu;
- Kesimhanenin onay numarası ve ülkesi – Kesildiği yer (Üye Devletin veya üçüncü ülkenin adı) (onay numarası);
- Kemiklerin ayrıldığı yerin onay numarası ve ülkesi – Kesildiği yer (Üye Devletin veya üçüncü ülkenin adı) (onay numarası);
- Hayvanın doğduğu, beslendiği ve kesildiği üye ülke veya üçüncü ülke (Menşei) (Department of Agriculture, Food and the Marine, 2019b).

Mercosur ülkelerinde (Brezilya, Arjantin, Uruguay ve Paraguay) birbirine oldukça benzer sınıflandırma ve derecelendirme sistemleri, yaş bağımlı cinsiyet sınıfları ve çeşitli kalite etkenlerine göre öngörülen verimlilik dereceleri ile yapılmaktadır (Sakarya ve ark., 2014). Güney Afrika (SA) ve AUS-MEAT sistemlerinde derecelendirme kriteri olan "yaş" dentisyon ile belirlenmektedir. MSA, Kanada ve USDA derecelendirme sistemi, dentisyon yerine osifikasyon (kemikleşme) puanı kullanmaktadır. MSA, USDA, AUS-MEAT, Kanada, Kore ve Japon sistemlerinde olgunluğu belirlemek için kullanılacak diğer karakterler; etin tekstürü, rengi ve yağlılık durumudur. Bahsi geçen ülkelerin baz aldığı sınıflandırma ve derecelendirme kriterleri Çizelge 1.2'de sıralanmıştır (Strydom, 2011).

**Çizelge 1.2.** Bazı ülkelerin et sınıflandırma ve derecelendirmede baz aldıkları kriterler (makaleden uyarlanmıştır).

Ülke	Kanada	Japonya	Güney Kore	ABD	Avustralya	
Sistem	Canada	JMGA	Korea	USDA	AUS-MEAT	MSA
Derecelendirme birimi	Karkas					Kesim
Sınıflandırma	--	--	--	--	+	--
Kalite derecesi	+	+	+	+	--	+
Verim derecesi	+	+	+	+	--	--
Kesim öncesi					Tahılla beslenen	<i>Bos indicus</i> % HGP aşılı
Kesimhane	Karkas ağırlığı Cinsiyet Konformasyon	Karkas ağırlığı Cinsiyet	Karkas ağırlığı Cinsiyet	Karkas ağırlığı Cinsiyet	Karkas ağırlığı Cinsiyet But şekli Dentasyon P8 yağ	Karkas ağırlığı Cinsiyet Elektriksel stimülasyon Asma
Soğutma	Mermerleşme puanı Et rengi ve tekstürü Yağ rengi Yağ kalınlığı İskelet gelişimi	Mermerleşme p. Et rengi, parlaklığı Yağ rengi, parlaklığı, tekstürü, sertliği Rib ve yağ kalınlığı	Mermerleşme p. Et ve yağ rengi Sertlik Et tekstürü Yağsız olgunluk Yağ kalınlığı	Mermerleşme Osifikasyon puanı Et rengi ve tekstürü Rib yağı Böbrek ve çevresi yağı	Mermerleşme p. Et rengi Yağ rengi	Mermerleşme ve osifikasyon p. Et rengi Hump yüksekliği En yüksek pH
Son soğutma	--	--	--	--	--	Dinlendirme süresi Pişirme metodu

**HGP:** Hormonal büyüme düzenleyiciler

(+): var

(--): yok

Et kalitesinin çeşitliliğinin sebebi genetik (ırk), beslenme, yaş, besi bitirme dönemi ve cinsiyettir (Venkata-Reddy ve ark., 2015). Kırmızı et derecelendirme ve sınıflandırma kriterlerinden biri olan ‘cinsiyetin’ etin kalite ve lezzetini değiştirdiği; erkek ve dişi sığır eti arasındaki farklılıklar bilimsel çalışmalar ile ortaya konularak doğrulanmıştır (Buskirk ve Schweihofen, 2013; Venkata-Reddy ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2010). Cinsiyet, büyüme ve karkas özellikleri üzerinde büyük farklılıklar oluşturmaktadır (Onogi ve ark., 2017). Sığırın cinsiyetinin, etin dokusunu yüksek düzeyde etkilemesinin sebebi ineklerdeki daha küçük kas lif çapı ve kas içi yağların varlığıdır. Bu da inek etini boğa etinden daha yumuşak yapmaktadır (Venkata-Reddy ve ark., 2015), boğa etine kıyasla inek eti en yüksek mermerleşme derecesine ve yüksek karkas kalite değerlendirmesine sahiptir (Choi ve ark., 2002; Frickh ve ark., 2003; Lazzaroni ve Biagini, 2008; Litwinczuk ve ark., 2006; Panjono-Kang ve ark., 2009; Schreurs ve ark., 2008). Kas içi yağ birikiminde, cinsiyetin lipidlerin yağ asidi kompozisyonu üzerinde önemli etkisi vardır (Zhang ve ark., 2010).

Etin sınıflandırılması ve derecelendirilmesinde göz önünde bulundurulmuş diğer bir unsur olan “yaş”; genç sığırların karkasları yaşlı sığır karkasından daha kaliteli olduğu düşüncesiyle, Güney Afrika’da 1936’dan beri karkas derecelendirme kriteri olarak kullanılmıştır (Strydom, 2011). Hayvanlarda yaş ilerledikçe protein birikimi azalmakta ve canlı ağırlığa da bağlı olarak vücutta yağ miktarı artmaktadır (Ergün ve ark., 2011). Güney Afrika’da 1984’te yapılan araştırmada, A-yaş (en fazla iki diş) kategorisindeki hayvanların kas kollajen çözünürlüğünün anlamlı derecede daha yüksek olduğu, kas pigmenti konsantrasyonunun ve pişirme kaybının (%) anlamlı olarak daha düşük olduğu kanıtlanmıştır. Bu sonuçlara göre de “A” kategorisindeki hayvanların etlerinin yaşlı olanlardan daha yumuşak, daha açık renkli ve sulu olduğu söylenerek genelleştirilmiştir (Strydom, 2011).

“Dentasyon ve osifikasyona dayalı yaş belirleme” işlemleri, kesimhane ya da üretim çiftliklerinde değerlendirilebilecek belirteçlerdir. Bu sebeple satışa sunulmuş olan parçalanmış et ve et ürünlerinde dentasyon ve osifikasyon değerlendirilmesi yaş belirlemede uygulanabilir kriterler değildir.

Önceki paragraflarda Türkiye dışındaki ülkelerde kasaplık sığır etinin sınıflandırılmasına yönelik uygulamalar anlatılmış olup, buradan sonraki metin akışında Türkiye’de bu uygulamaların süreci ve durumu özetlenmiştir.

Türkiye’de 1966 yılında TSE kasaplık sığır için gerekli standartları belirlemiştir. Standartlar; yaş, cinsiyet, randıman (etlilik), konformasyon ve yağlılığın göz önüne alındığı kalite sınıflandırılmasının özelliklerini kapsamaktadır. Bu bağlamda; Sığırlar, Ekstra (AA), Birinci (A), İkinci (B), Üçüncü (C), Dördüncü (D) kalite sınıflarına ayrılmıştır. Fakat standartlar oluşturulurken; Türkiye’de bulunan hayvanların anatomik yapıları göz önünde bulundurulmadan, üzerlerinde yeteri kadar bilimsel, deneysel araştırmalar yapılarak bulunabilecek geçerli değerlere dayandırılmadan oluşturulması sebebiyle, et piyasasında uygulanma şansı olamamıştır (Sakarya ve ark., 2014).

Türkiye’de güncel olarak uygulanan sığır kesimine yönelik takip edilen prosedürler zaman içerisinde aşağıdaki mevzuatları takiben gerçekleşmiştir;

Başbakanlık (Diyanet İşleri Başkanlığı)’tan: (21.06.2017), (19.06.2018) tarihli Kurban Hizmetlerinin Uygulanmasına Dair Tebliğe göre;

-Kurban olarak satın alınacak hayvanların sağlıklı, besili, veteriner sağlık raporu/hayvan pasaportu/nakil belgesi olan, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığınca belirlenen koruyucu aşıları yapılmış ve hayvan kimlik sistemine kayıtlı olanlardan seçilmesi, “gebe ve damızlık değeri yüksek dişi hayvanların kurbanlık olarak kesilmesinin önlenmesi, kurban edilmesi uygun olan hayvanlardan öncelikle erkek olanların tercih edilmesi gerektiği hatırlatılır” ibaresi ile dişi hayvan kesimine yönelik düzenleme iller düzeyinde dişi hayvanlar için özel, veteriner hekimlerden alınan “gebe değil ve damızlık değeri yoktur” ibareli raporlar ile kesilebileceği (Resmî Gazete, 2017; Resmî Gazete, 2018) İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlükleri tarafından duyurulmuştur.

Benzer şekilde; Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün; 28.12.2012 tarihli (Gümüşhane İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 2014) ve 04.12.2017 (Malatya İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 2017) tarihli bakanlık yazılarınca, hayvan sayısında artışı temin etmek için gebe veya damızlık değeri taşıyan dişi hayvanların kesimine izin verilmemesi kararları alınmıştır.

Türkiye'de dişi hayvan kesimi ülkenin büyükbaş hayvan sayısına göre şekillenmiş olup belirli tarihlerde (04.11.2017; 11.01.20018) hayvan varlığını korumak ve üretimi arttırmak için üreme yeteneğine sahip olan dişi hayvan kesimi yasaklanmıştır (Ağrı İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 2018; Malatya İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 2017).

Bahsi geçen tebliğler ve Türkiye'de satışa sunulacak etlerin de aynı şekilde kombinalarda kesimi göz önüne alındığında, üreme yeteneği olan hayvanların korunması politikasının kalite-fiyat sınıflandırılması aracılığıyla sağlanmaya çalışıldığı görülmektedir. Bu bağlamda; Türkiye'de et satış ve alımda bir nevi standart belirleme birimi olan "ESK" tarafından 29/07/2019 tarihinde yürürlüğe konulan "hayvan alım fiyat listesi" incelendiğinde kurumun hayvanları cinsiyet ve yaşa göre üç kategoride sınıflandırdığı görülmektedir (Çizelge 1.3) (Et ve Süt Kurumu, 2019).

**Çizelge 1.3.** ESK Hayvan Alım Fiyat Listesi.

BÜYÜKBAŞ HAYVAN ALIM FİYATI (YERLİ)				ÖDEMEYE ESAS TL / ET KG
HAYVAN CİNSİ	KESİM ŞEKLİ	ASGARİ KARKAS AĞIRLIĞI (Kg)	RANDIMAN ASGARİ %	
I. KALİTE (Tosun)	Yağsız	170,00	57,00 ve üzeri	32,00
			55-56	30,50
			53-54	30,00
II. KALİTE (Düve-Erkek Manda)	Yağsız	155,00	51-52	29,50
III. KALİTE (İnek-Öküz-Dişi Manda)	Yağsız	145,00	49-50	26,50
			48 ve altı	24,75



Çizelge 1.3. Devam.

BÜYÜKBAŞ HAYVAN ALIM FİYATI (İTHAL)				ÖDEMEYE ESAS TL / ET KG
HAYVAN CİNSİ	KESİM ŞEKLİ	ASGARİ KARKAS AĞIRLIĞI (Kg)	RANDIMAN ASGARİ %	
I. KALİTE	Yağsız	170,00	57,00 ve üzeri	31,00
			55-56	29,50
			53-54	29,00
II. KALİTE	Yağsız	155,00	51-52	28,50
III. KALİTE	Yağsız	145,00	49-50	26,00
			48 ve altı	24,25

Kalite dereceleri ifadeleri:

- I. Kalite: Yağsız kesim karkas ağırlığı 170kg ve üzeri, %53 ve üstü karkas verimine sahip 1-4 yaş (dahil) arası erkek sığırlardır,
- II. Kalite: Yağsız kesim karkas ağırlığı 155kg ve üzeri,
  - a. %51 (dahil)- %52 (dahil) arasında karkas verimine sahip 1-4 yaş (dahil) arası erkek sığırlar,
  - b. Reforme olan ve/veya gebe olmayan %51 ve üzerinde karkas verimine sahip 1- 3 yaş arası düvelerdir.
- III. Kalite: Yağsız kesim karkas ağırlığı 145kg ve üzeri,
  - a. 4 yaşını aşmış erkek sığırlar,
  - b. %50 ve altında karkas verimine sahip tüm erkek sığırlar,
  - c. 3 yaşını aşmış, reforme olan ve/veya gebe olmayan düveler,
  - d. %50 ve altında karkas verimine sahip reforme olan ve/veya gebe olmayan düveler, reforme olan ve/veya gebe olmayan dişi sığırlardır (inekler)” (Et ve Süt Kurumu, 2019).

Türkiye'nin uyguladığı kalite sıralaması Amerika, Avustralya, AB ülkelerinin kabul ettiği sınıflandırma ve derecelendirme elemanları ile karşılaştırıldığında bu sistemler ile arasında farklar olduğu görülmekte ve düve etinin kalitesi bilimsel çalışmalarla da ortaya konmuşken Türkiye'de 2. ve 3. kalite et kategorisinde olması tüketiciye sunulan etin kalite-fiyat değerlendirmesi bakımından şüphe oluşturmaktadır.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verileri değerlendirildiğinde, veri tabanında kesilen sığırların yaş ve cinsiyetlerine göre kategorize edildiği görülmektedir. Şekil 1.4'te TÜİK'e ait istatistik verileri web görüntüsü, Çizelge 1.4'te de tabloya dönüştürülmüş formu sunulmaktadır (Türkiye İstatistik Kurumu, 2018), ayrıca Çizelge 1.5'te son 4 yıl içerisinde sığırları içeren kırmızı et üretim miktarı verilmektedir (Türkiye İstatistik Kurumu, 2019).

Şekil 1.4. TÜİK hayvancılık istatistikleri, sığırların kategorize edilmiş bilgileri web görüntüsü.

Çizelge 1.4. Türkiye'de kesilen sığırların TÜİK'in baz aldığı cinsiyet ve yaş aralıkları.

Hayvan Adı	Yaş (ay)	Cinsiyet
Dana	0-12	Erkek ve Dişi
Düve	12<	Yavrulamamış Dişi
Tosun	12<	Erkek
İnek		Yavrulamış Dişi
Boğa		Damızlıkta Kullanılan Erkek
Öküz	12<	Kastre Edilmiş Erkek

12<: 12 aydan büyük

Süt fiyatlarının düşmesi ve yem fiyatlarının artmasının yanında kırmızı et fiyatlarının da artması ile süt üreticileri hayvanlarını kesimhanelere götürerek ekonomik açıdan zarar etmeyecekleri bir yol bulmaya yönelmiştir (Gündoğdu, 2019; Uğur, 2018; Yıldırım, 2016). Türkiye'de kırmızı et (sığır eti) üretimindeki artışın nedenlerinden birini bu durumun oluşturduğu görülmektedir. Dolayısıyla reyonlarda

ya da et ürünlerinde (paketlenmiş ürünler) yaşlı dişi hayvan etine rastlanma olasılığı artmaktadır.

**Çizelge 1.5.** Türkiye'nin yıllara göre kırmızı et üretim miktarı.

Kriter	Yıl	Üretim Miktarı (Ton)
Sığır ya da dana karkasları, Yarım ya da çeyrek kemikli, Taze ya da soğutulmuş	2016	359727
	2017	290395
	2018	306638
	2019	398024

TÜİK ve ESK'nın verileri göz önüne alındığında hayvanların yaş ve cinsiyete göre farklı fiyatlarla alımı yapıldığı ve bu hayvanların cinsiyeti/yaşı farklı olarak tüketime sunulduğu görülmektedir. Fakat reyonlarda bu ayırım yapılmadan ya da bu bilgi müşteriye sunulmadan etler satışa sunulmaktadır. Ayrıca bu farkların gözetilerek satışa sunulduğuna dair hiçbir ibare tüketiciyle paylaşılmamaktadır.

Oluşan koşullar her iki taraf (tüketici ve satıcı) açısından mağduriyet doğurduğu/doğurabileceği için konu adli kapsam taşımaktadır. Bu durumda satıcının tüketiciyi bilgilendirmeyerek haksız kazanç sağlamasını önlemek ve tüketicinin kalite standartlarından üst düzeyde yararlanmasını sağlamak için, alımı yapılan bu hayvanların satışında cinsiyetinin ve yaklaşık yaşının belirtilmesi ve gerektiğinde laboratuvar ortamında belirlenebilmesi “özellikle gelir seviyesi düşük ülkelerde” büyük önem taşımaktadır.

### **1.1.1. Cinsiyet ve Yaşın Etin Kalitesi Üzerindeki Etkisine Yönelik Çalışmalar**

Peachey ve ark. (2002), 59 baş öküz ve 58 baş boğa (Hereford-Angus, 20 ile 27 aylık ve 2 yaş olan iki grup) ile yaptıkları çalışmada *M. longissimus thoracis* kasının duyuşal yumuşaklığının (sertlik, çiğnenebilirlik) iki cinsiyette birbirine yakın değerlerde olduğunu ortaya koymuştur. Purchas ve ark. (2002), boğa ve öküz

karkaslarından (toplam 117 baş Angus ve Angus melezi; 16-18 ay ve 26 aylık iki grup) aldıkları longissimus kası ile yaptıkları çalışmanın sonucunda; boğa etlerinin öküz etinden daha sert olduğunu bildirmişlerdir. Frickh ve ark. (2002), Simmental ırkı sığırlarla (81 baş) yaptıkları çalışmada; düve, öküz, boğa olarak gruplandıkları sığırları değişen besi yoğunluğu sistemine (düşük, orta, kapsamlı) tabi tutarak kıyaslanmalarını gerçekleştirmiş, çalışma sonucunda; düvelerin öküzlerden daha yoğun (ikisinde boğalardan daha yoğun) yağ dokuya sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Aynı zamanda kas yoğunluğunun besi yoğunluğuyla benzer artış gösterdiği ya da çok az oranda düşük olduğu bildirilmiştir. Yine Frickh ve ark. (2003), boğa etinde kas içi yağ oranının öküz ve düve etinden daha düşük olduğunu; düvelerin beslenme derecesine bağlı olarak artış gösteren mermerleşme puanına ulaştığını; düve etinin su tutma kapasitesinin öküz etinden nispeten daha yüksek olduğunu; düve etinin duyusal olarak öküz ve boğa etinden daha yüksek değerlere sahip olduğunu yaptıkları bir diğer çalışmada rapor etmişlerdir. Velik ve ark. (2008), üç farklı ırktan düve ve boğa etleriyle yaptıkları çalışmada; düve etlerinin, et kalite parametrelerinde (et protein içeriği, parlaklık) önemli ölçüde boğa etlerinden daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Bu çalışma ile uyumlu olarak, McIntyre ve ark. (2009), çalışmalarının sonucunda düvelerin öküzlerden daha yüksek mermerleşme skoruna sahip olduğunu bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (2010), 18 baş (30 aylık; 6 dişi, 6 erkek, 6 kastre erkek) sığırla yaptıkları çalışmada, etin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki cinsiyet etkisini özellikle sululuk, pH, hafiflik, yumuşaklık, kas içi yağların birikimi ve hidroksprolin üzerinde açık olarak gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Bass ve ark. (2010), Magnezyum destekli beslenmenin kesimde sığırlarda görülebilecek stres kaynaklı Longissimus kas kalitesinin değişiminde cinsiyet farkının etkisini inceleyerek (düve (72 baş), öküz (72 baş)); iki grup arasında strese karşı kayda değer cevap farklılıklarının olduğunu ve öküzde Longissimus etinin düvelerden daha sert yapıya sahip olduğunu yayınlamışlardır. Hanzelková ve ark. (2011), Galloway, Simmental, Charolais, Czech Fleckvieh ırkına ait 72 adet sığır karkasının (düve ve boğa) *L. lumborum* kası ile yaptıkları et yumuşaklık değerlendirmesinde; tüm test faktörlerinden (cinsiyet, ırk, kesim sonrası etin bekletilmesi) etkilendiğini söyleyerek, boğa etinin önemli ölçüde düve etinden daha az yumuşak olduğunu belirtmişlerdir. Moss ve ark. (2013), kesimhanelerden rastgele

seçtikleri ellişer düve, öküz ve boğa ile çalışma yaparak; düve ve öküzlerin et kalitesinin boğalardan daha yüksek olduğu, boğalarda et yumuşaklığının düşük olduğu, pH 5.8'den yüksek karkaslara boğalarda daha sık rastlandığı, boğaların önemli ölçüde daha düşük sululuğa sahip olduğu sonuçlarına varmışlardır. Aynı zamanda yağ-asit profilinin boğalar ile düve, öküz arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştirlerdir. Daza ve ark. (2014), buzağı (16 baş), öküz (8 baş) ve dişi (8 baş) sığır ile çalışma yaparak, *Longissimus thorachis* kası kas içi yağlanma yüzdesinin erkeklere göre düvelerde daha yüksek olduğu, cinsiyetin  $\alpha$ - tokoferol üzerine etkisi olmadığını, kesim sonrası soğutucuda bekletilen etlerdeki renk değişkenliğinin cinsiyetten etkilenmediği rapor edilmiştir. Onogi ve ark. (2017), düve ve öküz ile (sırası ile 1354 ve 1797 baş) yaptıkları çalışmada fizikokimyasal özellikleri ele alarak; alanin, glutamin, taurin (serbest amino asitler) ve anserin, karnosin (peptitler) değerlerinin düve etinde öküz etine oranla daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır. Böylelikle ele aldığımız çalışmalar ışığında, genel anlamda düve, öküz ve boğa etleri arasında farklılıklar kanıtlanarak “cinsiyetin et kalitesine olan etkisinin” doğrulandığı söylenebilmektedir.

Bir diğer derecelendirme unsuru olan “yaş” parametresi üzerine yapılmış olan çalışmalar devam eden metinde yıl sıralamasına göre ele alınarak sonuçları ile verilmiştir.

Yukarıdaki metinde de geçtiği gibi cinsiyet farkının et üzerine etkisini ortaya koyan Purchas ve ark. (2002), aynı çalışmanın (16-18-26 aylık boğa ve öküz; 117 baş Angus ve Angus melezi) sonucunda; genç hayvanların daha yumuşak et yapısına sahip olduğunu da bildirmişlerdir. Li ve ark. (2011a), Qinchuan ırkı sığırlar (36 erkek, 3-9-12-15 aylık) ile çalışarak; artan yaşla beraber önemli ölçüde kesim gücü, protein içeriği, hidroksiprolin içeriği, kırmızılık, kas fibril çapı ve yoğunluğunda artış; pişirme kaybı, sululuk, parlaklık, kas fibril boşluklarında kayda değer bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Bunlara ek olarak; *COL1A1* (Kollajen, tip I, alfa 1; fibril oluşturan tip1 kollajenin alfa-1 alt ünitesini kodlayan gen) mRNA (mesajcı ribonükleik asit) 3. ve 9. ayda düşük seviyede ifade edilirken 12. ve 15. ayda ciddi şekilde yükseldiği, Leptin (adipoz dokudan salgılanan hormon) ve FAS (yağ asidi

sentaz enzimi) ifadesinde kayda değer değişim gözlemlenmediği rapor edilmiştir. Bureš ve Bartoň (2012), 24 baş (12 boęa, 12 düve) Charolais × Simmental ırkı 14 ve 18 aylık sığırlarla yaptıkları çalışmada; *Longissimus lumborum* kasının düvelerde boğalara göre daha çok kuru madde, protein, kas içi yağ, daha az total kolojen içerdiğini ve duyuşsal parametrelerce daha yumuşak olduğunu belirlemişlerdir. Bunun üzerine yeme kalitesinin yaş ile pozitif ilişki gösterdiğini; sululuk, genel kabul, lezzet yoğunluğu için en yüksek skorları gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Pesonen ve Huuskonen (2015), 21.642 baş boęa (1-2 yaş) ve 8.743 baş düve (8-20 ay) (Hereford, Charolais, Limousin, Aberdeen-Angus, Simmental, Blonde d'Aquitaine ırkı) ile yaptığı çalışma sonucunda; düvelerde yağ ve *M. longissimus* skorunun boğalardan yüksek olduğunu bildirmiştir. Nogalski ve ark. (2018), Chorolais × Hoistein ırkı 20 baş düve ve 20 baş boęa (her iki cinsiyetin 10'u 15 aylık, 10'u 18 aylık) ile yaptıkları çalışmada hem cinsiyet hem yaş farkının et kalitesine olan etkisini inceleyerek; 18 aylık kesilen boęa ve öküzlerin karkas kalitesinin 15 aylıklara göre daha yüksek olduğu; öküz etinin duyuşsal açıdan daha lezzetli ve yumuşak olduğu belirtilmiştir. Kopuzlu ve ark. (2018), Doęu Anadolu Kırmızı boğalarıyla yaptıkları çalışmada kesim yaşı ve kas bölgesinin et kalitesine olan etkisini araştırarak; 15, 17, 19, 25, 27 aylık 46 adet boęa karkasının *L. dorsi* ve *Gluteus medius* kaslarını ele almışlardır. Sonuç olarak et-renk parametrelerinin yaştan etkilendiğini, 19 aya kadar yumuşaklık, sululuk, lezzet yoğunluğunda artış gözlenildiğini ilerleyen yaşlarla bu skorda düşüşün görüldüğünü, iki kas arasında pişirme verimi ve kesim kolaylığı *L. dorsi*'de daha yüksek olduğu sonuçları bildirilmiştir.

Ele alınan literatürlerden elde edilen bilgiler doğrultusunda, kalite-fiyat belirlenmesinde, “et derecelendirme ve sınıflandırılmasının” gerekliliği anlaşılmaktadır.

## 1.2. Adli Bilimler ve Diğer Alanlarda Cinsiyet Belirleme ve Yaş Tahmininin Önemi ve Gerekliliği

Bu başlık altında teze konu edilen “yaş ve cinsiyet belirlemenin”, diğer adli kullanım sahaları ve amaçlarının yanında, “yaş ve cinsiyet belirlemenin” kullanıldığı bilim alanlarının, yararlanış amaçları özetlenmiştir.

Adli tıp ve hukuk uygulamalarında ele alınan iki tip kimlik (adli ve tıbbi kimlik) vardır ve bunlardan “tıbbi” olan; kesin ve güvenilir, şahsın üzerinden temin edilen belgelere dayanmayan, boy, vücut ağırlığı, cinsiyet, yaş, dişler, yara izleri, sünnet, kızlık zarı, doğum bulguları ve anomalileri kapsayan kimliktir (Zeyfeolu ve Hancı, 2001). Tıbbi kimlik elemanlarından olan “yaş” (Atılgan ve Akkoyun, 2017) ve “cinsiyet”in belirlenmesi, kimlik tespitinin önemli unsurlarıdır ve ilk adımlarındandır. Türkiye’de yaş tayini, gelişmiş ülkelerdeki gibi kimlik tayini yerine, çoğunlukla kimliği bilinen kişilerin doğru yaşlarının belirlenmesi için yapılmaktadır. Bu durumun en çok rastlanan uygulamalarına, örnekleri (yaşayan bireylerde); göçmenler, sığınmacılar, suçlular, insan kaçakçılığı, çocuk pornografisi sorunları olarak sıralanabilir (Atılgan ve Akkoyun, 2017). Cinsiyet tespiti adli vakaların araştırılması için değerli bir araçtır (Shaw ve ark., 2003).

Adli incelemelerin dışında cinsiyet analizi, hastalık dağılımı, cinsiyetler arasındaki ölüm oranı, sosyo ekonomik durum, evlilik ve defin şekillerinin belirlenmesini sağlayarak antik toplumların sosyal yapısının aydınlatılmasına da olanak sağlamaktadır (Akbaba, 2017). Aynı zamanda hayvan üremesi, fizyolojisi ve davranışı hakkındaki en önemli bilgi parçalarında biri de cinsiyettir. Bu nedenle zoolojiyi, ekolojiyi kapsayan birçok çalışma alanında da cinsiyet belirlenmesi için yöntem geliştirilmesi gerekmektedir (Okuyama ve ark., 2014). Memelilerin doğal popülasyonlarında cinsiyetin belirlenmesi de, popülasyon dinamiğini, yapısını, habitat kullanımını, davranış ve çiftleşme sistemlerini anlamak için gerekli bir adımdır (Shaw ve ark., 2003).

Adli incelemelerde cinsiyet analizi, bireysel kimliklendirmede gerektiği gibi antik kültürlerin, demografik ve soy çalışmalarında da insan kaynaklı örneklerde önem taşımaktadır (Masuyama ve ark., 2017).

Cinsiyet belirlemenin bir diğer gerekliliği ve önemi ticari alanda karşımıza çıkmaktadır. Özellikle Batı ülkelerinde etin ticari değerini belirleme ve sınıflandırmada önemli bir kriterdir (Gokulakrishnan ve ark., 2015). Birçok et paketlenme fabrikasının inek etini erkek eti olarak satması gibi çeşitli et üretim sektörüne ticari hasar verdiği durumlar söz konusudur (Curi ve ark., 2002; Gokulakrishnan ve ark., 2015). Aynı zamanda Hindistan gibi dini inançlara göre inek kesiminin yasak olması nedeniyle tüketiciye güvenilir etiket bilgisi sunmak adına etin cinsiyetinin belirlenmesi büyük önem taşır (Gokulakrishnan ve ark., 2012; Gokulakrishnan ve ark., 2015).

Avrupa birliğinin market pozisyonunu güçlendirmek adına sığır eti üreticilerine Avrupa dışına ihraç ettikleri etler için, ihraç iadesi ödenmektedir. Burada koşul kemiksiz “erkek” eti ihraç edilmesidir ve bu durumda devlet desteğinin sağlanmasında illegal durumları ortadan kaldırabilmek için güvenilir ve hızlı cinsiyet analizi önem kazanmaktadır (Ballin ve Madsen, 2007; Gokulakrishnan ve ark., 2012). Bu sistemin legal olarak ilerleyebilmesi için; Avrupa komisyon yönetmeliği (EC) “765/2002” kararında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemine dayalı deoksiribonükleik asit (DNA) temelli analizin yapılması adına gen bölgeleri (*AMELX/AMELY* ve Çinko-parmak proteinleri (*ZNFs*)) ve primer setleri belirtilmektedir (European Commission, 2002).

Olay yeri ve arkeolojik kazılarda cinsiyet tayini iskelet kalıntılarında (Ünlütürk ve İşcan, 2013); kemik, diş, kurumuş hayvan ve bitki dokuları, yumuşak doku tabakası, mumyalaşmış dokulardan yapılabilmektedir (Akbaba, 2017). Fakat morfolojik tanısal karakterlerden yoksun adli ve arkeolojik numunelerde morfolojik cinsiyet analiz uygulanabilir olmadığı için DNA analizine dayanan yöntemler kritiktir (Masuyama ve ark., 2017). Aynı zamanda invaziv olmayan genetik



numuneler yaban hayatı korumasında ve moleküler ekolojide vahşi hayvanların cinsiyetlerinin belirlenmesinde de son derece kıymetli araçlardır (Liu ve ark., 2015).

### 1.2.1. Cinsiyet Belirlemek İçin Kullanılan Yöntemler ve Materyaller

Parça etten cinsiyet belirlemek için hormon ve DNA temelli çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Hormon analizine dayanan; basınç ve kimyasal iyonizasyon kullanılarak yapılan likit kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC/APCI-MS/MS) (Arslan ve ark., 2015), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), yüksek performans sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (HPLC-MS/MS) ve enzime bağlı immünosorbent analizi (ELISA) gibi immünokimyasal metodlar cinsiyet belirlemede kullanılmıştır (Arslan ve ark., 2015; Bai ve ark. 2010; Gokulakrishnan ve ark., 2012; Gokulakrishnan ve ark., 2015; Zeleny ve Schimmel, 2002).

GC-MS (numune: et), HPLC-MS/MS (numune: sığır serumu) yöntemi ile steroid hormonların öncüleri ve metabolitleri (progesteron/pregnenolon, testosteron/epitestesteron/5 $\alpha$ -dihidro-testosteron); ELISA ile anabolik steroidlerin ve erkek-spesifik doku uyuşması antijeni (H-Y antijen) analizi yapılabilmektedir (Zeleny ve Schimmel, 2002).

Yukarıda bahsi geçen metodlar sığır etinde cinsiyet hormonlarını ölçmede etkili bulunmuştur fakat cinsiyet-spesifik/steroid hormon seviyeleri bireyler arası hatta bireyin kendinde değişim gösterebilmektedir (Gokulakrishnan ve ark., 2015; Zeleny ve Schimmel, 2002). Aynı zamanda yaş, ergenlik, mevsimsel değişimler ve hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan steroid hormon uygulamaları gibi fizyolojik faktörler de değerleri değiştirmektedir (Zeleny ve Schimmel, 2002). Durumun böyle olması tek başına hormon analizine dayanan çalışmayı zorlaştırmakta ya da yöntemlerin güvenilirliğini düşürmektedir. Hatta yöntemlerin özgün ve hassas olduğu kanıtlanmasına rağmen (Gokulakrishnan ve ark., 2015), teknik kısıtlamalar veya gerekli olan ekipmanların pahalı olmasından dolayı da cinsiyet belirlemek için

rutin kullanıma elverişli görülmemektedirler (Gokulakrishnan ve ark., 2012; Gokulakrishnan ve ark., 2015).

DNA temelli yöntemler; cinsiyet kromozomları üzerinde bulunan genlerin varlıklarını ya da X ve Y kromozomu üzerindeki uzunluk farklarını ortaya koyarak cinsiyet belirlemeyi hedefleyen PZR ve gerçek zamanlı PZR yöntemleridir. Bu amaçla kullanılan genler ve yöntemler Çizelge 1.6'daki gibidir.

PZR yöntemine ek olarak gerçek zamanlı PZR ile; SYBR Green (Ballin ve Madsen, 2007) ve TagMan (Parati ve ark., 2006) teknolojisinin de sığır cinsiyet tayininde kullanılabileceği belirtilmiştir (Gokulakrishnan ve ark., 2015). Aynı zamanda döngü-aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) yöntemi ile cinsiyet belirlenebilir (Nakanishi ve ark., 2015).

**Çizelge 1.6.** Cinsiyet belirlemede kullanılan gen bölgeleri ve yöntemler.

Gen	Yöntem	Kaynak
Amelogenin ( <i>AMELX/AMELY</i> )	PZR	Checa ve ark., 2002 Zeleny ve Schimmel, 2002 Fontanesi ve ark., 2008 Langen ve ark., 2010 Gokulakrishnan ve ark., 2012 Arslan ve ark., 2015 Gokulakrishnan ve ark., 2015
Zinc finger protein ( <i>ZFX/ZFY</i> )		Zeleny ve Schimmel, 2002 Gokulakrishnan ve ark., 2012 Arslan ve ark., 2015 Gokulakrishnan ve ark., 2015
Y-kodlayan testis spesifik protein ( <i>TSPY</i> )		Zeleny ve Schimmel, 2002 Gokulakrishnan ve ark., 2015
Y kromozomu cinsiyet belirleme bölgesi ( <i>SRY</i> )		Zeleny ve Schimmel, 2002 Gokulakrishnan ve ark., 2012 Gokulakrishnan ve ark., 2015
Mikrosatellit		Gokulakrishnan ve ark., 2015
Sığır-spesifik tekrarlayan Y kromozom bölgesi 1 ( <i>BRY1</i> )		Zeleny ve Schimmel, 2002 Gokulakrishnan ve ark., 2012
Tek kopya sekans ( <i>BOV97M</i> )		Gokulakrishnan ve ark., 2012
DEAD kutu polipeptit 3 ( <i>DEAD3X/DEAD3Y</i> )		Gokulakrishnan ve ark., 2012

**Çizelge 1.6.** Devam.

Y kromozomu cinsiyet belirleme bölgesi geni ( <i>SRY</i> )	Gerçek zamanlı PZR	Ballin ve Madsen, 2007
<i>AMELX/AMELY</i>	PZR-RFLP	Ennis ve Gallagher, 1994
Steroid sülfataz geni ( <i>STS</i> )	Multipleks PZR	Morikawa ve ark., 2011
<i>AMELX/AMELY + SRY</i>	PZR-APLP	Masuyama ve ark., 2017

DNA temelli tekniklerin, özellikle de PZR ürünlerinin jel elektroforezinin, cinsiyet belirlemede güvenilir, ekonomik ve hızlı olduğu kanıtlanmıştır (Arslan ve ark., 2015; Gokulakrishnan ve ark., 2015).

*AMEL* gen, *ZFX/ZFY* ve DEAD Box protein genlerinin cinsiyet belirlemede, *SRY* genine göre, X ve Y cinsiyet kromozomlarının her ikisinde de bulunmalarından kaynaklanan bir avantajları vardır (Gokulakrishnan ve ark., 2012). Bu gen bölgesi kullanılacağı takdirde genellikle ikinci bir (otozomal) lokusun amplifikasyonu olan (Ennis ve Gallagher, 1994) internal kontrol grubu (nötr bölge) gerekmektedir (Bai ve ark., 2010). Nötr bölge kullanımındaki amaç, sinyalin yokluğunun PZR başarısızlığının bir sonucu olmadığını doğrulamaktır (Ennis ve Gallagher, 1994). Bununla birlikte *ZCFs* kullanımı RFLP tekniği gerektirmektedir. *AMEL* gen ve Dead Box protein geninde ise PZR ürünlerinin boyut farkı X ve Y kromozomlarını ayırt etmede kolaylık sağlamaktadır (Gokulakrishnan ve ark., 2012).

Omurgalıların evrim sürecinde korunmuş olan (Gokulakrishan ve ark., 2015; Weikard ve ark., 2006) amelogenin (*AMEL*) geni memeli diş minesinde bulunan major matriks proteinini kodlamaktadır (Monali ve ark., 2011). Amelogenin genleri koyun keçi, insan, at, ayı ve sığır türünün cinsiyet kromozomlarının ikisine de yerleşmiştir (Gokulakrishan ve ark., 2015). Sığırlarda *AMELX*, homologu olan *AMELY* ile karşılaştırıldığında; *AMELY* lokusunun 5. ekzonu üzerinde 63 baz çiftlik (bç) delesyon belirlenmiştir (Weikard ve ark., 2006). Bu durum DNA'nın cinsiyet ayrımında çok küçük numunelerde kullanımını sağlamaktadır (Monali ve ark., 2011).

Amelogenin temelli cinsiyet belirleme, adli uygulamalarda en çok kullanılan analizdir (Masuyama ve ark., 2017).

Adli numunelerde cinsiyet belirleme, incelemelerin önemli bir yönüdür (Nakanishi ve ark., 2015) ve ilk olarak STR (kısa tekrar dizileri) tiplene kiti ile gerçekleştirilmiştir. STR tiplene kiti X ve Y kromozomu üzerindeki amelogenin incelemesine dayanmaktadır. Fakat, çalışılan numune erkeğe ait olmasına rağmen, Y-amelogenin null allel'inden dolayı STR analizinde Y kromozomu tespit edilemediği bilinmektedir. Bu gibi durumlar DNA kalitesi iyi olsa bile Y kromozomu varyasyon ve delesyonu nedeniyle cinsiyet belirlemede yanlış sonuçlara neden olabilir (Nakanishi ve ark., 2015).

Genel olarak adli vakalar göz önüne alındığında, insanlarda cinsiyet tayininin aşağıdaki yöntemlerle de belirlenebilmekte olduğu unutulmamalıdır;

- Klinik ya da görsel yöntemler; diş boyutu, kök uzunluğu, tepe çapı, köpek dişi dimorfizmi, diş indeksi.
- Mikroskopik metod; barr cisimciği belirlenmesi ile ayırt edilebilmektedir.
- Çeşitli metodlar; kraniyofasiyal morfoloji ve boyut, çene morfolojisi, frontal sinüs boyutları.
- Yumuşak doku metodu; rugoskopi (damak kırışıklığı), cheiloskopi (dudak izi) (Monali ve ark., 2011; Nagare ve ark., 2018).
- Konvansiyonel olarak; el ve elbileği ölçüsü (Karadayı ve ark., 2014), omur, kafatası, pelvis, uzun kemiklerin morfolojileri (Ünlütürk ve İşcan, 2013).

#### **1.2.1.1. Cinsiyet Belirleme İle İlgili Yapılan Çalışmalar**

Kirkpatrick ve Monson (1993), cinsiyeti bilinen 24 baş sığırdada (12 dişi, 12 erkek) *ZFX/ZFY* amplifikasyonunun doğruluk kontrolünü serum ve semen numuneleri üzerinde Yuvalanmış (Nested) PZR ile test etmişlerdir.

*AMELX/AMELY* lokuslarını hedefleyerek yapılmış cinsiyet analizlerine;

- Ennis ve Gallagher (1994),’in tam kan ve 6-7 günlük sığır embriyo biyopsileri ile PZR-RFLP yöntemini kullanması;
- Weikard ve ark. (2006),’nın yabani ve evcil (9 farklı) Bovidae familyasına ait türden ve testin kontrolü için koyun keçi, fare, insan, domuz ve atın dişisi ile erkeklerinden doku ve kan numuneleri olarak yaptığı PZR çalışması;
- Ballin ve Madsen (2007),’in 12 adet cinsiyeti bilinmeyen sığır eti ve 6 farklı ırktan 12 adet sığır (6 dişi, 6 erkek) eti ile *AMELX/AMELY* lokuslarının PZR ürünlerinin erime eğrisi (melting curve) analizine dayanan SYBR Green cinsiyet belirleme testi ile yaptığı çalışmalar örnek olarak verilebilir.

Curi ve ark. (2002), kemikli, paketlenmiş ve donmuş et örnekleri (36 adet) üzerinde, cinsiyet farklılığına nötr (değişmeyen)/bağımsız bir bölge kullanarak, erkek-spesifik bir Y kromozom bölgesinin PZR amplifikasyonu ile erkek ve dişileri ayırt edilebilmesine dayan bir teknik kullanmıştır (Amplifiye edilen “erkek-spesifik DNA” bölgesi; 307 bç’lik *BRY1*, “cinsiyete göre bağımsız” bölge; 223 bç’den oluşan büyüme hormonu (GH) geninin bir kısmıdır). PZR temelli bir diğer cinsiyet analiz çalışması; Gokulakrishnan ve ark. (2012), tarafından, veteriner fakültesi kliniğinden 16 sığırdan (8 dişi, 8 erkek) alınan kas doku numunesi ve marketten alınan 12 adet (6 dişi, 6 erkek) et numunesi ile DEAD box protein gen (*DDX3X/DDX3Y*) bölgesi hedeflenerek yapılmıştır. Benzer şekilde farklı kasap ve marketlerden 30 farklı sığır eti örneği toplayarak (Kayseri ilinde), Arslan ve ark. (2015), sığır Y kromozomuna özgü, iki çift primer seti kullanarak PZR temelli analiz gerçekleştirmişlerdir. Bai ve ark. (2010), ise; rastgele alınan 35 sığır kan numunesi ve kasaptan alınan 10 sığır (6 dişi, 4 erkek) eti numunesi ile SRY geni HGM-box bölgesi ve pozitif kontrol olarak 12S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) geni için primerler tasarlanarak, multipleks PZR ile çalışmışlardır.

### 1.2.2. Yaş Tahmininde Kullanılan Yöntem ve Materyaller

Farklı türlerde yaş belirleme/tahmin için telomer uzunluğu ve epigenetik değişimler gibi moleküler yaş belirteçleri; dentisyon, yağsız et rengi ve göz lens ağırlığı gibi fiziksel belirteçler; lipofuskin, diş dentininden aspartik asit rasemizasyonu, göz lens nitrojen içeriği ve radyokarbon (karbon 14) analizi gibi kimyasal yaş belirteçleri kullanılabilir. Yaş tahmininde kullanılan başlıca moleküler, kimyasal ve fiziki belirteçler Çizelge 1.7’de verilmiştir.

**Çizelge 1.7.** Yaş tahmininde kullanılan moleküler, kimyasal, fiziki belirteçler.

	<b>Belirteçler</b>	<b>Kaynaklar</b>
<b>Moleküler</b>	DNA	Huang ve ark., 2015 Jarman ve ark., 2015 Eipel ve ark., 2016 De Paoli-Iseppi ve ark., 2017
	RNA	Jarman ve ark., 2015
<b>Kimyasal</b>	Lipofuskin Amino asit rasemizasyonu	Jarman ve ark., 2015 Eipel ve ark., 2016, Zubakov ve ark., 2016
	Radyokarbon	Zubakov ve ark., 2016
	Göz lens nitrojen içeriği	Raines ve ark., 2008
<b>Fiziki</b>	Dentisyon Yağsız et rengi Vertebral osifikasyon Göz lens ağırlığı	Raines ve ark., 2008

Adli yaş tahmininde kullanılan moleküler yöntemler, morfolojik yaş özellikleri içermeyen hayvan materyallerinin kullanılmasına olanak vermektedir (Zubakov ve ark., 2016). Saç, tüy, dışkı gibi “iz” materyalden dahi yaş tahminine olanak sağlayan moleküler yaş belirteçleri (MYB), bir hayvanın ömrü boyunca DNA’ında meydana gelen değişiklikleri veya RNA miktarını (ifade farklılıklarını) ölçme temeline dayanmaktadır (Jarman ve ark., 2015). Bu bağlamda; hücresel yaşlanmaya yol açan moleküler mekanizmalar üzerine yapılan ilk çalışmalar “telomer”in rolüne odaklanmıştır, fakat “terminal restriksiyon fragment (TRF)” telomer uzunluk testi ile ölçülen telomer uzunluğuyla, kronolojik yaş arasındaki ilişki, taksonomik bir

aralıktaki pek çok türde zayıf bulunmuştur. İnsanlar için de başarısız olan bu biyobelirteç; kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ile ölçüldüğünde (telomer uzunluğu), pek çok hayvan türünde de yaşla ilişkili bulunmamıştır (Jarman ve ark., 2015).

Bir diğer yaşlanma etkeni, Adenosin trifosfat (ATP) üretimi sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS), DNA mutagenезinin doğrudan bir sebebi olmasıdır ve bunların etkilerinin, hücrel ve organizmal yaşlanmanın birincil sebebi olarak kabul edilmesidir. Mitokondrinin, ROS üretim bölgesi ve ROS-kaynaklı DNA delesyonlarını ve nokta mutasyonlarını onarmak için enzimatik mekanizmalardan yoksun olması nedeniyle; ROS hasarı yaygın olarak mitokondriyal DNA'da (mtDNA) ölçülmektedir (Jarman ve ark., 2015). mtDNA'da ROS hasar ölçümü dışında metilasyon (mtDNAm) değişikliklerinde, Mawlood ve ark. (2016), tarafından yapılan çalışma ile, insanlarda yaş ile ilişkisi tespit edilmiş ve iki adet CpGs bölgesi üzerinden  $\pm 9.3$  yıllık bir hata payıyla yaş tayini bu çalışma grubu tarafından yapılmıştır. Ancak mtDNA %2–6 gibi düşük oranda CpG metilasyonu gösterdiğinden, metillenme ölçümünün oldukça hassas testlerle yapılması gerekmektedir. Alandaki tek mtDNAm çalışması bu olduğundan, mtDNAm tabanlı modellerin, genomik biyobelirteçler kullanan modellerin doğruluğuyla uyumlu olup olmayacağı belirsizliğinin korunduğu belirtilmiştir (De Paoli-Iseppi ve ark., 2017). Bunlara ek olarak ROS ile ilişkili olduğu bilinen NF-kB (nükleer faktör-kappa B) sistemi bileşenlerinin de yaş ile korelasyon gösteren seviyelerde olduğu (Jarman ve ark., 2015) bilinmektedir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, artan yaşla birlikte biriken belirli mtDNA mutasyonlarının ölçümü ve aynı şekilde yaşlanmayla kısalan “telomer” tekrar uzunluğu değerlendirilmesi gibi bir kaç DNA tabanlı moleküler yöntem geliştirilmiş fakat; pratik adli uygulamalarda, sınırlı tahmin doğruluğu ve teknik sorunlar nedeniyle mtDNA mutasyonlarının kullanımını kısıtlı olduğu düşünülmektedir ve telomer uzunluklarının yaş tahmin belirteçleri olarak uygunluğu tartışmalıdır (Zubakov ve ark., 2016).

Yaş tahmini için bir diğer belirteç, Zubakov ve ark. (2010), tarafından ortaya konulan, kandaki T-hücreleri spesifik DNA yeniden düzenlenmesi miktarının ölçümüne dayanan basit ve güvenilir DNA testidir. Timustaki T-hücrelerinin üretimi, immünoglobulin genlerini kodlayan lokuslardaki DNA yeniden düzenlemelerini içermekte ve 'signal-joint T-cell recombination excision circles' (sjTREC'ler) üretilmesine eşlik etmektedir (Zubakov ve ark., 2016). Zamanla timus T-hücre üretim yeteneğini kaybetmektedir ama T-hücre popülasyonu mitozla üretilen yavru T-hücreler sonucu sabit kalmaktadır. Bu döngü sjTREC'lerin üretimini sağlamadığı için zamanla azalmaktadırlar. Bu azalış insanların olgunlaşan timusuyla ölçülen "immünolojik yaşı" ile kronolojik yaşı arasında korelasyon göstermesine etken olmaktadır (Jarman ve ark., 2015). Fakat sjTREC belirteçlerinin, güçlü oranda cinsiyet farklılığından etkilendiği yine Zubakov ve ark. (2016), yaptığı çalışmada rapor edilmiştir.

Nematodlar, sinekler, insanlar ve fareler olmak üzere farklı model hayvanlarda özellikle de büyük hayvanlarda yaşa-bağımlı tutarlı değişim gösteren mikro ribonükleik asitlerin (miRNA); spesifik doku ve dolaşımdaki miktarları, lenf veya kan serumundan tahlil edilebilmektedir (Jarman ve ark., 2015). Dolaşımdaki miRNA'lar, organizma yaşlanması (Hooten-Noren ve ark., 2010; Hooten-Noren ve ark., 2013) ve dokuya özgü yaşlanma (Li ve ark., 2011b) haricinde çok çeşitli memeli hastalıkları ve fizyolojik durumları için de biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Eaton ve Link, 2011). Yaş ile ilişkili düzenlenmiş gen ekspresyon seviyeleri, mRNA seviyesinde de bulunmuştur ve bunlardan bazıları MYB'leri geliştirmek için kullanılmıştır (Jarman ve ark., 2015).

Çalışmaların adli verilerde uygulanabilir olup olmadığı düşünüldüğünde; RNA'nın, DNA'dan kimyasal olarak daha az stabil olduğu, dolayısıyla mRNA ve miRNA belirteçleri gibi RNA bazlı MYB'lerin bekletilmiş/arşivlenmiş örneklerde uygulanabilir olmadığı (Jarman ve ark., 2015) unutulmamalıdır. Daha önceki paragraflarda da bahsi geçtiği gibi, telomer kısalması, T-hücre DNA düzenlemeleri, mitokondriyal delesyonlar gibi moleküler parametrelerin yaş tahminlerinde nispeten düşük doğruluk sağladığı vurgulanmaktadır (Eipel ve ark., 2016).



Yaşlanmayla değişim gösteren bir diğer moleküler belirteç epigenetik mekanizmalardır. Gen ekspresyonunu düzenleyen epigenetik mekanizmalar (DNA metilasyonu gibi), birçok organizmayı ve hücrel yaşlanma sürecini yönlendirmektedir (Jarman ve ark., 2015). Omurgalılarda 'epigenetik sapma' ve 'saat tipi' DNA metilasyonu (DNAm) olmak üzere iki tip yaşla ilişkili metillenme mekanizması tespit edilmiştir (De Paoli-Iseppi ve ark., 2017). Yakın zamanda yapılan araştırmalar, "epigenetik saat" olarak adlandırılan, gelişimsel yolların bir parçası olmayan, spesifik memeli genlerinin yaşa-bağlı epigenetik regülasyonunu tanımlamıştır. Düzenlenmiş epigenetik değişimler, tekrar eden mitozlar aracılığıyla DNA metilasyon durumunun kusurlu onarımı ile genom çapında üretilmiş demetilasyon genellemesinden farklıdır. Bu olay, "epigenetik sapma" olarak adlandırılmaktadır ve genom boyunca rasgele hareket ettiği düşünülmektedir. "Epigenetik saat" tipi düzenlemeyi gösteren birkaç gen, ömür boyunca tutarlı bir oranda DNAm'nu değiştirmektedir (Jarman ve ark., 2015). Omurgalılarda yaş tayini için hem epigenetik sapma hem de saat tipi DNAm değişiklikleri kullanılabilir (De Paoli-Iseppi ve ark., 2017).

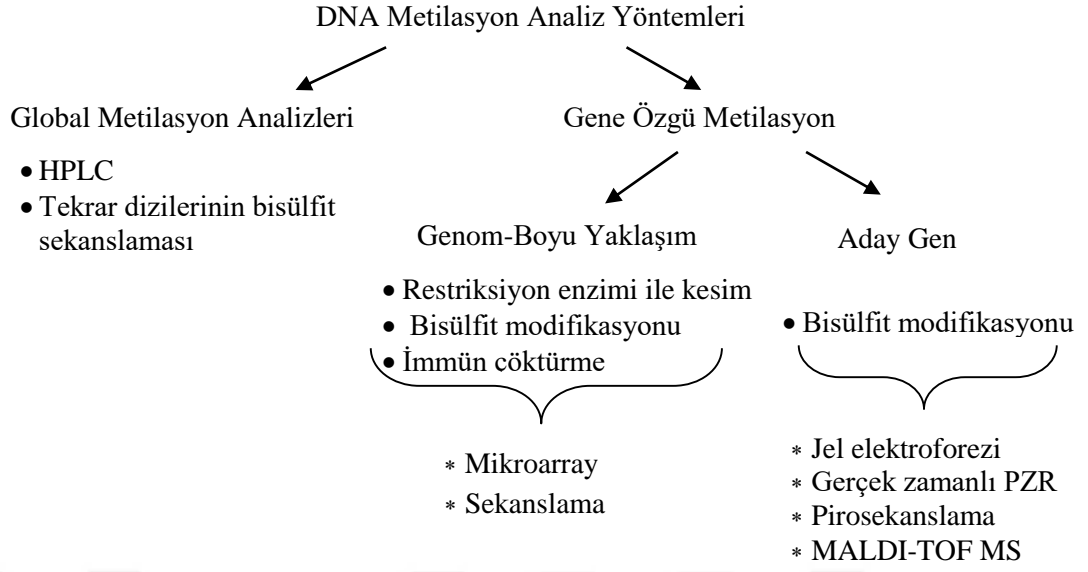
Çalışmaların üzerinde yoğunlaştığı ve bilgi birikiminin arttığı epigenetik mekanizma olan DNAm; kovalent bir modifikasyondur ve sitozin (C) bazının 5. karbonuna bir metil grubu (-CH<sub>3</sub>) takılarak 5-metil sitozin (5m-C) yapısının oluşmasıyla karakterize edilmektedir (Bird, 2002). DNAm, genomdaki guanin (G) ve sitozin (C) çiftlerinin art arda hizalanmasıyla oluşmakta ve CpG dizilerinin yoğunlaştığı alanlarda gerçekleşmektedir. Evrimsel süreçte korunmuş olan bu CpG adacıkları, genlerin çoğunlukla promotor bölgelerinde konumlanmaktadır. Organizmanın sağ kalımı ve gelişimi için, devamlı şekilde ifade edilmesi gereken housekeeping ve düzenleyici genlerdeki CpG adacıkları, DNAm'a karşı dirençli bölgelerdir. Fakat, tekrar dizileri ve transpozonlar gibi heterokromatin bölgelerdeki CpG dizilerinde ise, DNA metilasyon oranı yüksektir (Güler ve Balcı-Peynircioğlu, 2016).

Zubakov ve ark. (2016), insan kan örnekleriyle yaptığı çalışmada DNA metilasyon belirteçlerinin, cinsiyet bağımlı farklılıklar göstermediğini belirtmiştir.

Bununla beraber, birden fazla doku kullanarak, yaşın tahmininde yaygınlanmış birkaç CpG DNAm veri setini bir araya getiren çalışmada, hücre türüne bağımlı olmayan DNAm değişiklikleri tanımlanmıştır (De Paoli-Iseppi ve ark., 2017). DNAm, gelişen genom-boyu metilasyon haritalamaları sayesinde; birden fazla bölgede (transkripsiyon başlama bölgeleri, ekzon ve intron bölgeleri, düzenleyici bölgeler) ve tekrar dizilerinde de ölçülebilmektedir (Jones, 2012). Böylelikle, mikroarray profillemeye kullanılarak yapılan tüm genom DNAm çalışmaları ile, DNAm durumundaki değişimlerin insanın yaşlanma süreciyle derinden bağlantılı olduğu doğrulanmıştır (Zubakov ve ark., 2016). Yine array temelli tarama prosedürleri ile DNA metilasyon analizi, farelerde ve insanlarda hücre yaşlanma ile ilgili bazı anahtar genlerin rollerinin ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Böylelikle DNAm'da yaşa bağlı değişiklikler, insanlar ve bazı hayvanlar için bir dizi MYB geliştirmek için kullanılmıştır (Jarman ve ark., 2015). DNAm analiz yöntemleri Şekil 1.5'te verilmiştir (Güler ve Balcı-Peynircioğlu, 2016).

Farklı genlerin çalışıldığı epigenetik temelli MYB'ler ile deri gibi kolay ulaşılabilen dokulardan yaş tahmini mümkün olabilmekte ve DNAm MYB'leri mutasyon tipleri ya da CpG metilasyon yüzdesinin belli bir alanda kesin ölçümünü sağlamaktadır (Jarman ve ark., 2015).

Farklı tür, doku ve hücre tipi üzerinde yapılan DNAm çalışmalarında kronolojik yaşla güçlü korelasyon gösteren genler ve CpG adaları kolayca görülebilmeleri açısından Çizelge 1.8'de sunulmaktadır.



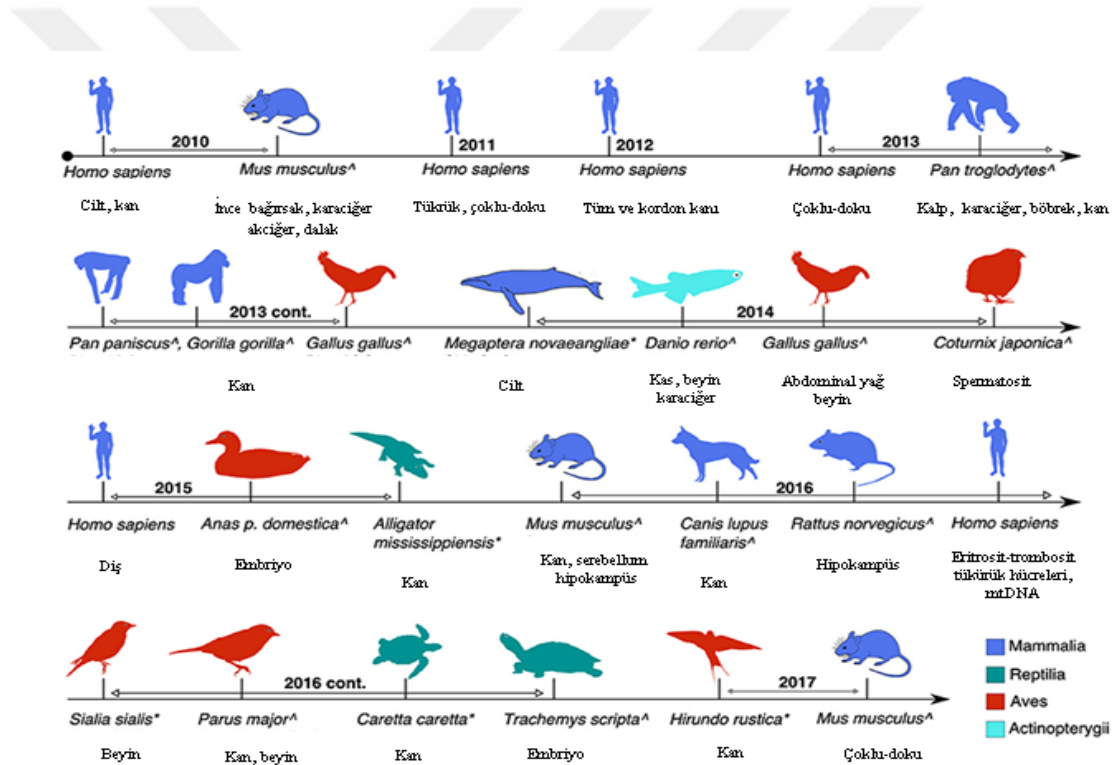
**Şekil 1.5.** DNA metilasyon analiz yöntemlerinin sınıflandırılması.

**Çizelge 1.8.** Farklı tür, doku ve hücre tipi üzerinde yapılan DNA metilasyon çalışmaları, yaşla korelasyon gösteren genler ve çalışılan CpG adaları.

Gen	CpG Adası Adeti	Tür	Doku/Hücre Tipi	Kaynak
<i>ASPA</i> <i>ITGA2B</i> <i>NPTX2</i>	4	İnsan	Kan ve Kan Lekesi	Huang ve ark., 2015
<i>PDE4C</i> <i>ASPA</i> <i>ITGA2B</i>	3	İnsan	Bukkal sürüntü	Eipel ve ark., 2016
<i>SERPINB5</i> <i>CD6</i>	2		Bukkal epitel hücre lökosit	
<i>ELOVL2</i>	8	İnsan	Kan	Zubakov ve ark., 2016
<i>NPTX2</i> <i>TRIM58</i> <i>GRIA2</i> <i>KCNQ1DN</i> <i>BIRC4BP</i>	5	İnsan	Dermis Epidermis CD4 <sup>+</sup> monosit CD4 <sup>+</sup> T-hücre Servikal smear	Koch ve Wagner, 2011
<i>ELOVL2</i> <i>C1orf132</i> <i>TRIM59</i> <i>KLF14</i> <i>FHL2</i>	5	İnsan	Perifer kanı	Zbieć-Piekarska ve ark., 2015
<i>CDH4</i> <i>FBN1</i> <i>GPR37</i> <i>HAND2</i> <i>HOXA11</i> <i>LRRTM1</i> <i>NPTX2</i> <i>P2RX7</i> <i>PCDH10</i> <i>PRDM5</i> <i>TRIP6</i> <i>WT1</i>	-	Fare	Bağırsak	Maegawa ve ark., 2010
<i>TET2</i> <i>CDKN2</i> <i>GRIA2</i>	3	Kambur balina ( <i>Megaptera novaengliae</i> )	Cilt biyopsisi	Polanowski ve ark., 2014
<i>NPTX2</i> <i>EDARADD</i> <i>TOM1L1</i>	3	İnsan	Tükürük	Bocklandt ve ark., 2011
<i>ELOVL2</i> <i>FHL2</i> <i>PENK</i>	3	İnsan	Kordon kanı	Garagnani ve ark., 2012
<i>ASPA</i> , <i>PDE4C</i> <i>ELOVL2</i> <i>EDARADD</i>	4	İnsan	Diş (dentin) Kan	Bekaert ve ark., 2015

(-): Veri yok

DNAm ölçümü ile, 2010'dan 2017'ye kadar olan süre içerisinde yaş belirleme çalışmalarında kullanılan organizma ve doku tiplerini gösteren derleme Şekil 1.6'da sunulmaktadır (De Paoli-Iseppi ve ark., 2017). Adli bilimlerde uzun zamandır biyolojik bulgulardan yaş belirlemeyi kolaylaştıran belirteçlerin arayışındadır (Zbieć-Piekarska ve ark., 2015). Adli uygulamalar için DNAm biyobelirteçlerinin kullanımı; genellikle daha basit analizlerde daha az CpG bölgesini kullanmayı içerir (De Paoli-Iseppi ve ark., 2017). Omurgalılar için şimdiye kadar keşfedilmiş en umut verici MYB'ler çoklu CpG bölgelerini içeren DNA metilasyon analizleridir (Jarman ve ark., 2015) fakat kit bağımlı olması ve tür düzeyinde temininin kısıtlı hem de yüksek maliyetli olması kullanım potansiyelini ciddi ölçüde düşürmektedir.



**Şekil 1.6.** Hedef DNA ya da global DNA üzerine yapılan metillenme analizlerinin yapıldığı canlı grupları ve doku tipleri.

Fiziki yaş belirteçleri; araştırmacılar göz lens gelişiminin yaşam boyunca sürekli geliştiğini ve bu gelişimin tüm hayvanlarda benzer yapı gösterdiğini ortaya koymuştur (Raines ve ark., 2008). Bu bilgi ışığında; Augusteyn ve ark. (2003), “lens ağırlığının” kullanım ve saklama koşullarından etkilenebileceği için, yaş tahmin denklemi kurmakta “lens nitrojen içeriğini” kullanmıştır; nitrojen içeriğinin

ölçümünün gelişim ve yaşın daha doğru ölçümü olacağına inanmışlardır. Aynı şekilde, Raines ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada göz lens özelliklerinin kronolojik yaş için iyi bir belirteç olduğunu ortaya koymuşlardır. Bunun yanında, bazı hayvanlarda cinsiyete göre lens ağırlığının azda olsa farklılık gösterdiği de rapor edilmiştir (Raines ve ark., 2008).

Kimyasal yaş biyobelirteçleri; zamanla post-mitotik dokularda bazı bileşiklerin birikmesine neden olan makro moleküllere verilen zararın ölçümüne dayanmaktadır. En yaygın kullanılan iki kimyasal biyobelirteç; “amino asit rasemizasyonu” (AAR) değerlendirilmesi (Eipel ve ark., 2016; Jarman ve ark., 2015) ve “lipofuskin” birikiminin ölçümüdür (Jarman ve ark., 2015). AAR’ye örnek; aspartik asit rasemizasyonunun diş dentininden analizidir (Eipel ve ark., 2016). Ölü hayvanlardaki tüm proteinler aynı oranda (sabit nem ve sıcaklıkta) AAR’ye maruz kalmaktadır. Dolayısıyla post-mitotik dokuların yaş tahmininde ya da ölüm zamanı belirlemede kullanılabilir (Jarman ve ark., 2015).

#### **1.2.2.1. Lipofuskin; “Yaş Pigmenti”**

Kalan yaşam süresi ile negatif korelasyon gösteren, yaşlanma sırasında hücre ve dokularda neredeyse doğrusal bir birikim gösterdiği için bazen “yaşlanma pigmenti” olarak da anılan (Jung ve ark., 2010; Ottis ve ark., 2012) “lipofuskin”, ilk olarak Hannover (1842), tarafından sarı-kahve rengi pigment olarak nöronlarda tanımlanmıştır. Yaşla birlikte eş zamanlı kademeli birikiminin (hayvan dokularında) tamınlanması ise 1912 yılında olmuştur (Cho ve Hwang, 2011). Devam eden çalışmalar nöronlara ek olarak; kardiyak miyosit, retinal pigment epitel hücreleri gibi post-mitotik hücreler (Ottis ve ark., 2012) veya hepatositler ve adrenal kortikal hücreler gibi yavaş bölünen hücrelerdeki varlığını da ortaya koymuştur (Dolman ve Macleod, 1981). Özellikle kalp, çene ve diyafram kasında görülen lipofuskin granüllerinin, diğer iskelet kaslarında da mevcut olduğu bilinmektedir (Jolly ve ark., 1995).

Yaşlanma pigmenti olarak anılan bu madde; literatürde bazen “seroid”, “yaş florofor” (Jolly ve ark., 1995), “yaş pigmenti” olarak da isimlendirilmektedir. Veteriner Hekimliği alanında ise “aşınma pigmenti” (wear-and-tear pigment) (Jolly ve ark., 1995; Terman ve Brunk, 1998) veya “atrofi pigmenti” olarak geçmektedir (Jolly ve ark., 1995).

Hücre ya da dokular lipofuskin dışında yaşla ilişkili maddeler yahut floresans veren farklı moleküller de içermektedir. Yapılacak çalışmalarda bu moleküllerin floresans özellikleri göz önünde bulundurularak ayrımları gerçekleştirilebilir. Örneğin; yaşla ilişkili olarak hücrelerde görülen “flavin” bileşiği, lipofuskinden yeşil dalga boyunda otofloresans vermesiyle ayırt edilebilir (LF, en kuvvetli, mavi dalga boyunda floresans verir) (Pincus ve ark., 2011). Normal hücresel bileşenlerden lipofuskin floresansının tespitini bozan, floresans yayan maddeler ve emisyonları; triptofan 340 nanometre (nm); piridoksin 390nm; flavin ve riboflavinler 550nm; NAD (Nikotinamid Adenin Dinükleotid) ve NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat) 470nm; porfirinler 630/690nm ve bu molekülleri içeren proteinler (Cho ve Hwang, 2011) olarak sıralanabilir. Bunlara ek olarak, lipofuskin benzeri madde olan “seroidlerin” yaşla ilişkili olmadığı ve genetik mutasyon hastalıklarının sonucu olarak erken dönemde oluştuğu (Ottis ve ark., 2012) göz önünde tutulmalıdır. Lipofuskine kimyasal olarak benzer olan bu maddenin 360nm ve 430nm arasında floresans vermesi (Cho ve Hwang, 2011) mikroskopik çalışmalarda ayırt edici özellik olarak kullanılabilir. Son olarak, eksojen floroforlar (fenol kırmızısı (pH indikatörü) ve floresans problemlerinin foto ağartmaya sebep olarak lipofuskin floresansı için uygun veri toplanmasını bozabileceği (Cho ve Hwang, 2011) bildirilmiştir.

Artan şekilde, post-mitotik dokuların ikincil lizozomlarında, hücresel metabolizmanın bir sonucu olarak biriken bu otofloresans lipopigmentin (Gordillo, 2005) otofloresans özellik taşıması, elektronca yoğun materyal içermesine ve karakteristik spektral özelliğine dayanmaktadır. Bu spektral özellik; 320-480nm arası dalga boyunda uyarıldıklarında, 460-620nm dalga boyu aralığında emisyon göstermeleridir (Ottis ve ark. 2012). LF; lipidlerin, proteinlerin (Jolly ve ark., 1995) hatta sakkaridlerin, çapraz kovalent bağlarının güçlü okside olmuş materyal yapısıdır

(Jung ve ark., 2010). Bu oksitlenme zamanla aşamalı olarak gerçekleşmektedir (Brown ve ark., 2017). LF, lizozomal hidrolazlar tarafından parçalanmaz veya ekzositoz olmaz (Feng ve ark., 2015). Dolayısıyla kimyasal ve morfolojik olarak polimorf görünen LF “atık materyal” olarak kabul edilmektedir (Ottis ve ark., 2012).

Proteinlerle kompleks halinde doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile üretilen LF’de metaller de (civa, aliminyum, demir, bakır, çinko) mevcuttur ve peroksidasyon reaksiyonunu başlatarak, demirin özellikle lipofuskin oluşumunda aktif olarak yer aldığı bilinmektedir (Cho ve Hwang, 2011). LF oluşum süreci esnasında, aşırı oksidasyon ve çapraz bağlanmalar kaçınılmaz bir ürün oluşturur. Sonuç olarak lizozomda yıkılan birçok makromolekül demir içerir ve lizozomun asidik ortamına bu demir salınır. Salınım sonrası aşırı miktarda ROS oluşabilir. Bu nedenle LF yaşlanmanın bir işareti olarak kabul edilmektedir (Feng ve ark., 2015). Bu moleküller, fizyolojik yaşın fonksiyonu olarak birikmesine rağmen kronolojik yaşın tahmininde kullanılabilirler (Doubleday ve Semmens, 2011). Hatta LF birikimi yaşlanmanın en iyi bilinen biyobelirteci olarak kabul edilmektedir (Sitte ve ark., 2001). Bu kabulü, otofloresans pigment (LF) araştırma çalışmaları, nöronal dokularda pigment yoğunluğunun direkt olarak gerçek yaşla ilişkili olduğunu öne sürerek desteklemektedir. Bununla beraber lipofuskin yoğunluk analizinin birçok Crustaceae türünde geleneksel yaş belirleme yöntemlerinden daha etkili olduğu da kanıtlanmıştır (Bosley, 2008). Daha önceki LF birikim analiz çalışmalarına örnekler Çizelge 1.9’da özetlenmiştir. Yaşla pozitif korelasyon gösterdiği kanıtlanmış olan LF’nin, cinsiyet bağımlı olmadığı sonucuna da, Feng ve ark. (2015), tarafından tükrük ve plazma lipofuskin seviyelerinin incelendiği çalışmada varılmıştır.

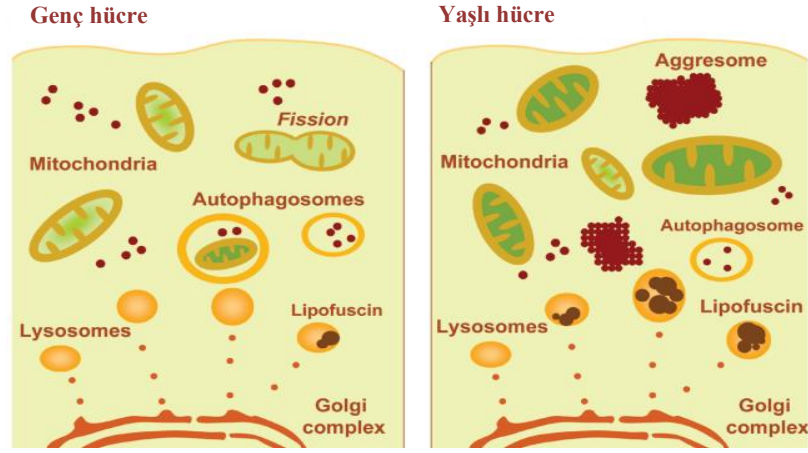


**Çizelge 1.9.** Lipofuskin analizinde kullanılan canlı, doku ve yöntem bilgileri.

<b>Canlı</b>	<b>Doku</b>	<b>Yöntem</b>	<b>Kaynak</b>
Fare	Dorsal ganglion Omurilik	Işık/Elektron mikroskobu	Samorajski ve ark., 1965
<i>Caenorhabditis elegans</i>	İntestin	Epifloresans mikroskobu	Clokey ve Jacobson, 1986
İnsan Sığır	Retinal pigment epiteli	Time-resolved floresans spektroskopisi	Docchio ve ark., 1991
Sığır	Kalp, diyafram Çene kası Beyin	Floresan ve elektron mikroskobu	Jolly ve ark., 1995
<i>Caenorhabditis elegans</i>	İntestin	Nomarski mikroskobu	Garigan ve ark., 2002
Fare	Kan	-	Wu ve Wei, 2006
Fare Sığır	Beyin, omurilik Kalp, yağ İskelet kası, Böbrek Akciğer Dalak Periferik sinir	SPEX Fluoromax-2 spektrofotometre	Adhikary ve ark., 2009
Krustase Bivalvia Nematod	Nöron	-	Jarman ve ark., 2015
İnsan	Tükrük Plazma	ELISA	Feng ve ark., 2015
Köpek	Karaciğer	Schmorl Boyası/Mikroskopik	Brown ve ark., 2017

(-): Veri yok.

Yaşlı arılar genç arılardan; yaşlı köpekler yavru köpeklerden; yaşlı kabuklu deniz canlıları larvalarından; yaşlı insanlar bebeklerden daha fazla lipofuskinine sahiptir (Dolman ve Macleod, 1981). Bu veriden temelle yaşlı dokularda lipofuskinin birikiminin genç dokulara kıyasla nasıl seyrettiğine dair illüstrasyon Şekil 1.7’de gösterilmektedir (Cuervo ve ark., 2005).



**Şekil 1.7.** Genç ve yaşlı hücre içerisinde şematik olarak lipofuskin birikim karşılaştırması.

Dokularda/hücrelerde lipofuskinin görüntülenmesi/belirlenmesi; özellikle lipofuskinin 'otofloresans' özelliği sayesinde, antikor gerektirmeden sadece floresans mikroskobu kullanılarak yapılabilmektedir. LF otofloresansı her türlü hayvan hücresinde, özellikle post-mitotik duruma ulaşmış hücrelerde ortaya çıkarılabilmektedir (Jung ve ark., 2010). Otofloresans özellik, ölçüm ve analizleri kolaylaştırmaktadır fakat tam yaş değerlendirmesini elde etmek için lipofuskin birikim oranı, yaşı bilinen hayvanlar ile karşılaştırılarak kalibre edilmelidir (Doubleday ve Semmens, 2011). Otofloresans özelliği hedeflenerek lipofuskin tespiti; floresans spektrofotometresi, akım sitometri ile de yapılabilmektedir (Jung ve ark., 2010). Bunun yanında lipofuskin, in-sitü olarak histokimyasal analizler kullanılarak veya biyokimyasal ya da solvent (çözücü) metodlarıyla da ölçülebilmektedir (Doubleday ve Semmens, 2011). Otofloresans özelliğinin yanı sıra; lipid boyama ve lipofil ajanlar gibi histokimyasal yöntemler de (Sudan siyahı, berlin mavisi, nil mavisi, Fontana-Masson, ozmik asit, hematoksilen, demir ferrosiyandır, Ziehl-Neelsen ya da eozin) LF belirlenmesi için mevcuttur (Jung ve ark., 2010). Histokimyasal olarak Sudan siyahı ve PAS (periodik asit schiff boyama) pozitif olması lipidlerin ve karbonhidratların varlığını göstermektedir (Terman ve Brunk, 1998).

Kronolojik yaşla pozitif ilişki gösteren lipofuskinin miktarını belirlemek için yukarıda bahsedildiği gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Ancak floresans

mikroskobu ve ekstraksiyon spektrofotometrik tabanlı yöntemler diğerlerine göre sıklıkla kullanılmaktadır. Bu iki yöntem arasında da, ekstre edilen floresans bileşimi tam olarak tanımlanmadığı için, ekstraksiyon spektrofotometrik yöntemin tartışmalı yönleri bulunduğu (Puckett ve ark., 2008) çalışma yöntemi belirlenirken, göz ardı edilmemesi gereken bir bilgidir.

Çalışmamız ile literatürlerden referans alınarak seçilen ve yaş biyobelirteci olarak kabul edilen lipofuskin granüllerinin, floresans mikroskobu aracılığıyla parça ette birikimi belirlenerek yaş tayininin yapılabilişliği araştırılmış; X ve Y kromozomlarına özgü amelogenin (*AMELX/AMELY*) geni dizilerinin incelenmesine dayanan cinsiyet tayini ile beraber bu iki metodun et kalite sınıflandırma ve derecelendirmesi için kullanım potansiyeli ortaya konulmuştur. Aynı zamanda tüketiciye et kalite bilgilerinin (yaş ve cinsiyet) etiket bilgisine yansıtılmadığı bu çalışma süresince bir kez daha görülmüştür.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

Floresans mikroskobu ile yapılacak lipofuskin birikim incelemesi için, Ankara Ticaret Borsası Et Kombinası'nda karkastan kesim sonrasında, karkastan alınan numuneler (iki farklı kas bölgesinden; yaklaşık 10'ar gram) %10 formol çözeltisi bulunan falkonlara alınarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Numune alınan, kas bölgelerinin karkas üzerindeki yeri; Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Yaşla lipofuskin değişim değerlendirilmesi için kombinada kesimi yapılan 67 sığır karkasının *Musculus longissimus dorsi* ve *Musculus biceps femoris* kasları örneklenmiştir (30 erkek, 37 dişi; 134 numune). Yapılan çalışma sürecinde doku incelemesinde otolizin olumsuz etkisinin ortaya konması üzerine, çalışmaya farklı zamanlarda satın alınan 5'erli gruplar halinde 15 adet iskelet kasına ait kuşbaşı et parçasının da incelenmesi dahil edilmiştir. Bu 15 örneğin 5'inin etanolü (EtOH), 10'unun (5'i eski 5'i yeni satın alınan) formollü falkonlara konulmasıyla 3 ayrı grup oluşturulmuştur. Toplamda 15 adet olan bu numunelerde; saklama solüsyonları arasında lipofuskin gözlem farklılıklarının ve formol içinde kalma süresininin ayrı ayrı lipofuskin incelenmesine ne yönde etkisinin olacağı ortaya konması amaçlanmıştır.



Şekil 2.1. Karkas üzerinde numune alınan kas bölgelerinin gösterimi.

Kasap ve et reyonu bulunan marketlerden satın alınan cinsiyet belirlemede kullanılacak olan numuneler (48 adet) %70 EtOH çözeltilisi içinde +4°C’de DNA izolasyon işlemi yapılanaya kadar muhafaza edilmiştir. Ayrıca bu numunelerden %10’luk formol içerisine örnekler alınmıştır.

Kombinalardan alınan etlerin yaş, cinsiyet ve alındığı bölgenin bilgileri, numune kodları Çizelge 2.1’de gösterdiği gibidir.

**Çizelge 2.1.** *M. longissimus dorsi* ve *M. biceps femoris* kas dokularının alındığı karkaslara ait bilgiler.

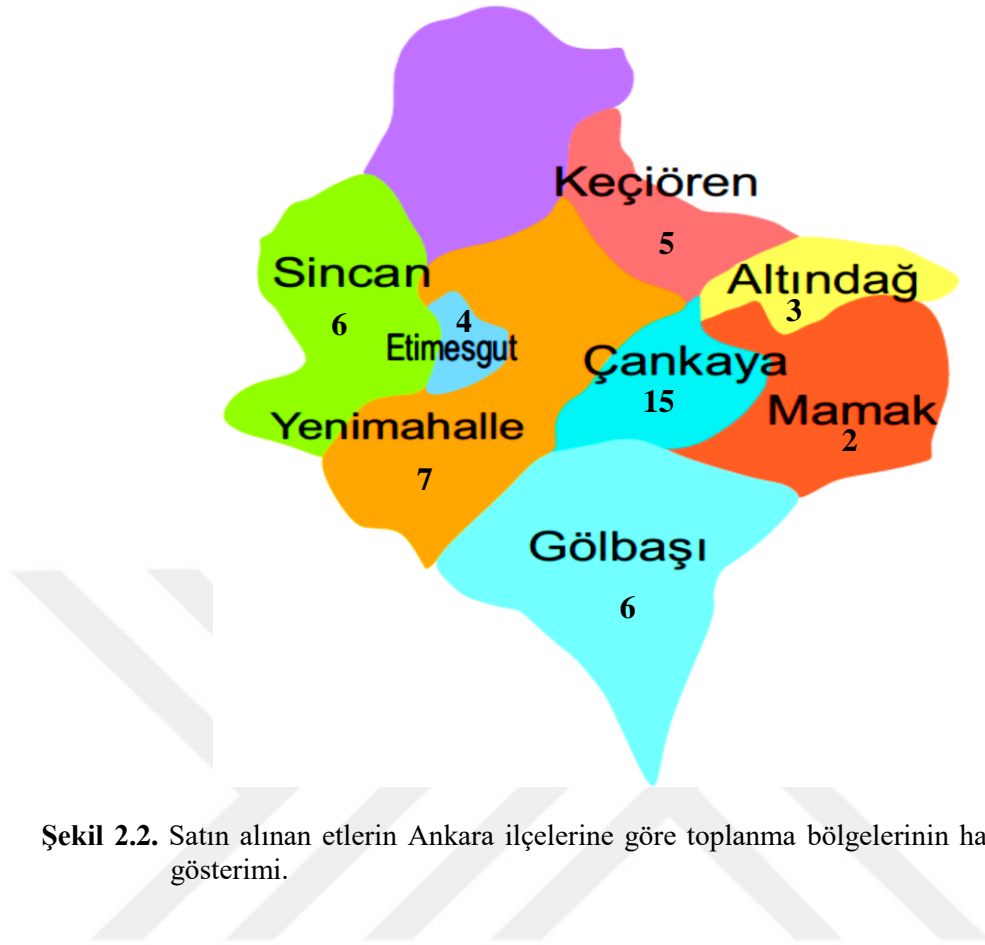
Kod	Yaş/Ay/Doğum Yılı	Sayı	Cinsiyet
Ak.	17-18 (ay)	10	Erkek
A	18-19 (ay)	10	Erkek
D	25-26 (ay)	10	Erkek
B	3-4 yaş 2013 2014 2016 2008 2015	7	Dişi
C	2009-10-11-13-14 doğumlu	10	Dişi
E	3-12 yaş	20	Dişi

Cinsiyet analiz çalışması için Ankara genelinden satışı sunulmuş iskelet kasına ait kuşbaşı etlerden alınan numunelerin toplandığı ilçeler ve kodları Çizelge 2.2’de verilmektedir. Satın alınan etlerin bölgelere göre dağılımı Ankara il haritasında toplanan adet sayısı ile beraber gösterilmektedir (Şekil 2.2).

**Çizelge 2.2.** Satın alınan etlerin bilgileri.

	<b>Toplama Tarihi</b>	<b>İlçe</b>	<b>Numune Kodu (sk)</b>
1	19.10.18	Çankaya	ÇNK 1 (1/2)
2		Yenimahalle	YNM 1 (1/2)
3			YNM 2 (1/2)
4	22.10.18	Çankaya	ÇNK 2 (1/2)
5	23.10.18	Altındağ	ATD 1 (1/2)
6	31.10.18		ATD 2 (1/2)
7	6.11.18		Sincan
8		SNC 1 (1/2)	
9		9.11.18	Çankaya
10	ÇNK 4 (1/2)		
11	ÇNK 5 (1/2)		
12	ÇNK 6 (1/2)		
13	11.11.18	Mamak	ÇNK 7 (1/2)
14			ÇNK 8 (1/2)
15			MAM 1 (1/2)
16			MAM 2 (1/2)
17	3.08.19	Gölbaşı	GLB 1 (2)
18			GLB 2 (2)
19			GLB 3 (2)
20			GLB 4 (2)
21			GLB 5 (2)
22			GLB 6 (2)
23	4.09.19	Keçiören	KÇR 1 (1/2)
24			KÇR 2 (1/2)
25			KÇR 3 (1/2)
26			KÇR 4 (1/2)
27			KÇR 5 (1/2)
28	13.10.19	Etimesgut	ETM 1 (2)
29			ETM 2 (2)
30			ETM 3 (2)
31			ETM 4 (2)
32	10.11.19	Sincan	SNC 2 (2)
33			SNC 3 (1/2)
34			SNC 4 (1/2)
35		SNC 5 (2)	
36		SNC 6 (2)	
37		Yenimahalle	Yenimahalle
38	YNM 4 (2)		
39	YNM 5 (2)		
40	YNM 6 (1/2)		
41	Çankaya	Çankaya	YNM 7 (2)
42			ÇNK 9 (2)
43			ÇNK 10 (1/2)
44			ÇNK 11 (1/2)
45			ÇNK 12 (2)
46	ÇNK 13 (2)		
47	ÇNK 14 (2)		
48	ÇNK 15 (2)		

sk: Solüsyon kodu; 1: % 10 formol, 2: % 70 EtOH.



Şekil 2.2. Satın alınan etlerin Ankara ilçelerine göre toplanma bölgelerinin harita üzerinde gösterimi.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Genetik Analizler

#### 2.2.1.1. Cinsiyet Analizi İçin DNA Eldesi

Cinsiyet tayini çalışması için toplanan numunelerden ticari bir DNA izolasyon kiti kullanılarak, kontaminasyona dikkat edilerek Ek-1'de (sayfa 83) verilen protokole göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, %70 EtOH'de muhafaza edilen numuneler, izolasyon protokolüne tabi tutulmadan önce alkolün uzaklaştırılması amacıyla 1 saat distile su içerisinde bekletilmiştir.

DNA izolasyonu elde edilmesinde kullanılan kit ve cihaz bilgileri aşağıda verilmiştir;

İzolasyon kiti : QuikGene DNA tissue kit S, Life Science (FUJİFİLM)  
Sistem : QuikGene-Mini80 (FUJİFİLM)  
Santrifüj : Cencom I, 7002239 (J.P.SELECTA)

### 2.2.1.2. DNA Saflık, Yoğunluk ve Bütünlük Kontrolü

DNA yoğunluğu ve saflığı spektrofotometrik yöntem ile, bütünlüğünün kontrolü ise jel elektroforezi ile yapılmıştır. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik A.D. DNA laboratuvarında bulunan ve bu değerlendirmelerde kullanılan cihaz bilgileri aşağıdaki gibidir;

Spektrofotometre : NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)  
Görüntüleme : Gel Logic 200, (Kodak Imaging System)  
Güç kaynağı : Standard Power Pack P25 (Biometra)  
Akım : 80-90 mA/volt

DNA yoğunluk ve saflığı 260nm’de elde edilen değerlerin 280nm’de elde edilen değere oranı ( $A_{260}/A_{280}$ ) ve 260nm’de elde edilen değerlerin 230nm’de elde edilen değere oranı ( $A_{260}/A_{230}$ ) ile belirlenmiştir.  $A_{260}/A_{280}$  değerinin 1,8’in altında olması protein kontaminasyonu, 2’nin üzerinde olması RNA kontaminasyonunu işaret etmektedir.

DNA’ların degrade olup olmadığının kontrolü %1’lik agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır. Bunun için; mikrodalga fırında, 1g agaroz tartılarak 100ml 1X TBE (Tris-Borate-EDTA) içinde homojen bir görünüm elde edilene dek eritilmiştir. Agaroz jel karışımına 10µl boyar madde (safe view) eklenmiş ve köpürmemesine dikkat edilerek karıştırılmıştır. Agaroz jel karışımı, jel kasedine dökülerek, taraklar yerleştirilmiştir. Donması beklenilmiş ve donduğu zaman taraklar sökülerek; jel, 1X TBE konulmuş olan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.



DNA'ların görüntülenmesi için, 10µl DNA, 3µl 2X yükleme boyası ile karıştırılmış ve jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 90V'da 20-25 dakika uygulanmıştır.

PZR'da yükseltgenilecek DNA'lar, yaklaşık 50ng/µl olacak şekilde uygun oranlarda dH<sub>2</sub>O (distile) ile sulandırılmış ve +4°C'de bekletilmiştir. PZR için içerisinde 2 µl alındıktan sonra geri kalan DNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

### 2.2.1.3. AMELX/AMELY Bölgesinin Yükseltgenmesi

AMELX/AMELY bölgesi üzerinde cinsiyet ayırımında Y kromozomunda 67 bazlık ve X kromozomunda 130 bazlık bir bölgenin yükseltgenmelerini sağlayacak şekilde Ballin ve Madsen (2007), tarafından tasarlanan primerler (Çizelge 2.3) kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. AMELX/AMELY primer sekansları.

Primerler	Diziler
İleri (AMELX/Y-F)	5'-CAGCCCCAGICCATCCAGC-3'
Geri (AMELX/Y- R)	5'-GGATGGGGTGCACAGGTGG-3'

Kalıp DNA olarak cinsiyeti bilinen (erkek, ♂) sığır DNA'sı kullanılarak, PZR ile yükseltgenme için reaksiyon başına kullanılacak kalıp DNA miktarı, MgCl<sub>2</sub>, primer ve dNTP konsantrasyonları ile optimum primer bağlanma sıcaklığının saptanması için gradient PZR kurularak optimizasyon yapılmıştır. İşlem sonrasında elde edilen PZR ürünleri %3'lük agaroz jelde 120V akımda 20 dakika elektroforez yapılarak kontrol edilmiştir.

PZR amplifikasyonları 25µl total hacimde, hem 1,5mM hem de 2,5mM MgCl<sub>2</sub> yoğunluğunda DMSO'lu (Dimetil sülfoksit) (1 µl) ve DMSO'suz, kalıp DNA'dan 50ng (2µl), her bir primerden 0,5µl (10pmol/µl), her bir deoksiribonükleotit trifosfattan (dNTP'ler) 0,5µM, 0,2U Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas) ve 1X PZR buffer (10mM Tris-HCl, pH 9,0; 50mM KCl) olacak şekilde, termal döngü cihazında (BIO-RAD, C1000) yapılmıştır. 94°C'de 4 dakikalık (dk) ilk denatürasyonun ardından 95°C'de 30 saniye (s) denatürasyon, 60–70°C aralığında değişen (gradient) bağlanma sıcaklığında 30s ve 72°C'de 30s uzama aşamalarını içeren 38 döngüyü takiben 72°C'de 5dk son uzama yaptırılarak tamamlanmıştır. *AMELX* ve *AMELY* primerleri ile ilgili olarak en uygun kimyasal miktarları Çizelge 2.4'te ve en uygun yükseltgenme koşulları Çizelge 2.5'te sunulmuştur.

**Çizelge 2.4.** *AMELX* ve *AMELY* primer bölgeleri PZR reaksiyonu kimyasal yoğunlukları.

Kimyasallar	Stok konsantrasyon	Final Konsantrasyon	Miktar (µl)
dd H <sub>2</sub> O	-	-	17,3
1X Buffer	10X	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1,5mM	1,5
dNTP	10mM	0,2mM	0,5
İleri primer	10pmol/ µl	200µM	0,5
Geri primer	10pmol/ µl	200µM	0,5
Taq polimeraz	5IU	1U	0,2
DNA	50ng/µl	100ng	2
Total			25µl

**Çizelge 2.5.** *AMELX* ve *AMELY* primer bölgeleri PZR reaksiyonu yükseltgenme koşulları.

Aşama	Sıcaklık °C	Süre	X38 döngü
Denatürasyon	94	4dk	
	95	30s	
Bağlanma	66.4	30s	
Uzama	72	30s	
	72	5dk	

Primer optimizasyonundan sonra, dişi ve erkek sığır DNA'larından pozitif kontroller oluşturularak, satın alınan etlerden izole edilen sığır DNA numuneleri dişi

ve erkek amelogenin allellere uygun (*AMELX* ve *AMELY*) primerleri (Çizelge 2.3) kullanılarak BioRad C100 Isıl Döngü cihazında yükseltgenmiştir.

*Bos taurus* *AMELX* (GenBank No: AB091789.1) ve *AMELY* amelogenin geni (GenBank No: AB091790.1) üzerinde primerlerin yükseltgendiği bölgelerin baz dizilimi sırasıyla Şekil 2.3'te verilmiştir.

*AMELX*  
AACCCAACACCACCA GCCAAACCTCCCTCTGCCC GCCCAGCAGCCCTTC **CAGC**  
**CCCAGTCCATCCAGC** CGCAGCCTCACCAGCCCCTGCAGCCTCACCAGCCCCTGC  
AGCCCATGCAGCCCATGCAGCCCTTGCAGCCCCTGCAGCCCCTGCAGCCCCAG  
**CCACCTGTGCACCCCATCC** AGCCCTTGCC

*AMELY*  
CAGTCCTTC **CAGCCCCAGCCCATCCAGC** CACAGCCTCAC.....  
.....CAACCCCTGCAGCCCCAG **CCACCTGTGCACCCCATCC** AGCGCTTGCC  
A

Şekil 2.3. Amelogenin X ve Y gen bölgeleri üzerinde primerlerin yerleşim yerleri.

Geneious® 11.1.5 programı kullanılarak *AMELX/AMELY* gen dizileri hizalanarak, primerlerin bağlanma bölgelerini içine alan diziler ile 63 bazlık delesyon Şekil 2.4'te gösterilmektedir.



Şekil 2.4. *AMELX/AMELY* üzerinde primer bağlanma bölgelerini içine alan baz dizilim karşılaştırması (Y kromozomu üzerinde X'e kıyasla 63 adet bazın eksik olduğu yer nokta ile gösterilmektedir).

PZR ürünleri (10 µl DNA, 3 µl 2X yükleme boyası olacak şekilde) 1X TBE buferda 8 µl safe view eklenen %3'lük agoroz jel kuyucuklarına yüklenerek yürütüldükten sonra (25-30 dk), Kodak Gel logic görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

## 2.2.2. Histokimyasal Analizler

Doku preparatlarının hazırlanması Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji A.D. Doku Bilimleri Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

### 2.2.2.1. Doku Preparatının Hazırlanması ve Boyanması

%10'luk formolde tespit edilen numuneler doku takip işleminden önce enine ve boyuna olmak üzere tüm etten parçalar alınarak küçültme işlemi yapılarak formolün uzaklaştırılması için 3 saat suda bekletilmiştir.

Formolü uzaklaştırılan numunelerin doku takip işlemi; Leica TP1020 otomatik cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Takip işlemi tamamlanan numuneler parafin emdirilerek Leica EG 1150C cihazının soğuk bloğu üzerinde donmaya bırakılmıştır.

Parafine gömülen numunelerden Rotary mikrotom cihazında (Thermo Electron Corporation) 5 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) kalınlığında seri kesitler alınmıştır. Lam üzerine alınan doku kesitinin boyanabilmesi için, ilk olarak doku sabitleme ve ardından deparafinizasyon işlemi aşağıdaki gibi yapılmıştır;

- ❖ Preparat kutusuna yerleştirilen lamlar  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de etüve 1 gün süre ile bırakılmıştır. Bu işlem ile doku kesitlerinin kuruması ve lama daha iyi tutunmaları, doku çevresindeki parafininin ve dokuya nüfus etmiş parafinin de eriyerek uzaklaşması sağlanmıştır.
- ❖ Doku kesitleri ısı işleminden sonra üç ayrı kaptaki organik eritici özellikteki ksilolde üçer dk bekletilip, sırasıyla dereceli alkollerin (%70, 80, 90, 96 etil alkolde) her birinde birer dk bekletilmiştir. Bu işlem sonunda lamdaki ve dokulardaki parafinler uzaklaştırılarak, dokuların şeffaflaşması sağlanmıştır.
- ❖ Doku kesitleri  $\text{dH}_2\text{O}$ 'da 1 dk bekletilerek dokuların kaybettiği su tekrar kazandırılarak (rehidratasyon) deparafinizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Boyama aşamasında kesitler; hemotoksilende 4 dk, akan çeşme suyu altında 1 dk, eozin 40 saniye (sn), sırası ile dereceli alkollerde 30 sn, ksilolde (3 ayrı) (2'şer dk) bekletilerek boyama işlemi tamamlanmıştır.

Boyama işleminden sonra, kurumamasını önlemek için ksilol içerisinde bekletilen preparatlar, entellan (13073-00, MERC) kullanılarak 45° açı ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamel kapatılarak sabitlenmiştir.

### **2.2.2.2. Floresans Mikroskop Çalışması**

#### **2.2.2.2.1. Preparatların Floresans Mikroskopunda İncelenmesi**

İki farklı kas tipine ait preparatların fotoğraflanması, 10× büyütme ile floresans emisyon görüntüsünü gösteren mikroskop bağlantılı Leica DFC425 C fotoğraf makinesi ile LEICA DM500 B mikroskopunda, Kırıkkale Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Skorlama yapılırken değerlendirmede 10x büyütme kullanılmıştır. 20x büyütmede floresans görüntü skor derecelendirmesinde yanığı oluşturabilmektedir Örnekler floresans mikroskobu ile 390nm dalga boyunda ( $\lambda$ ) uyarılarak emisyonları gözlenmiştir. Preparat üzerinde enine ve boyuna kesitleri alınan örneklerden lipofuskin birikim analizinin en uygun gözlemlendiği kesit yönü (enine-boyuna kesit) saptanmıştır. Aynı zamanda preparatlardan alınan ışımaların doğruluğu (floresans ışımının doku katlanması, kesit kalınlığı, parazit varlığı, otoliz ve benzeri durumdan kaynaklanmadığı tespit edilerek) ışık mikroskobuyla da teyit edilerek lipofuskin varlığı doğrulanmış ve farklı durumlar ışık mikroskopunda da fotoğraflanmıştır. Yaşları 17 aylıkla 12 yaşa kadar değişen farklı yaş aralıklarındaki hayvanlardan alınan etlerin preparatları üzerinde en az 5 bölge taranarak skorlama lipofuskin boyanma yaygınlığı ve şiddeti, Allred skorlama metoduna göre (Choudhury ve ark., 2010; Hameed ve ark., 2015) (sırasıyla; Şekil 2.5 ve Çizelge 2.6) Prof. Dr. Oğuz Kul ve Büşra Cumhur tarafından değerlendirilmiştir. İki ayrı kas

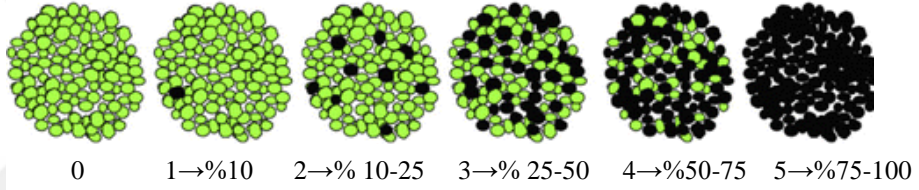
bölgesindeki lipofuskin birikimine yansıyan farklar ve benzerlikler ortaya konulmuştur.

**Çizelge 2.6.** Allred skorlama metodu.

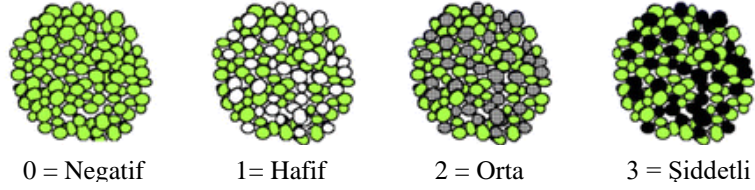
Boyama Yaygınlığı (%)	MS	Boyama Şiddeti	YS
10	0		0
10-25	1	Hafif	1
25-50	2	Orta	2
50-75	3	Şiddetli	3
75-100	4	Allred skoru= MS+YS	
	5		

MS: Miktar Skoru  
YS: Yoğunluk Skoru

A Miktar Skoru (MS)



B Yoğunluk Skoru (YS)

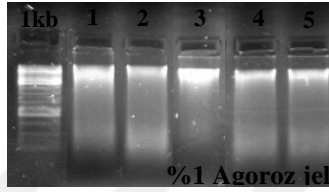


**Şekil 2.5.** Allred skorlama metodu.

### 3. BULGULAR

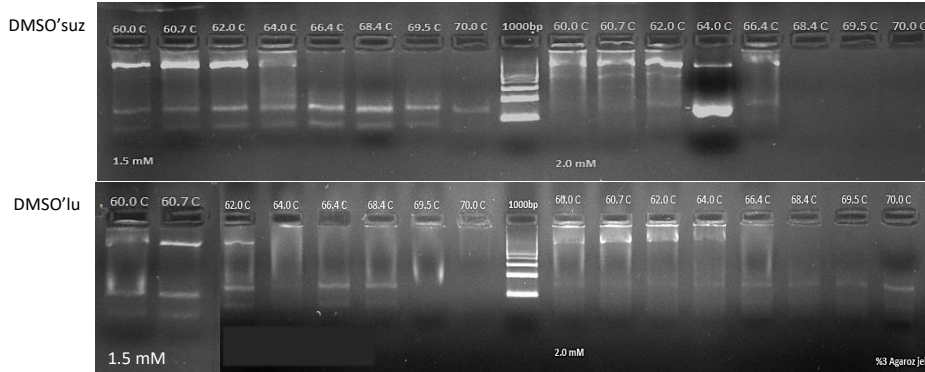
#### 3.1. Genetik Bulgular

DNA bantlarının varlığı ve bütünlüğü, görüntüleme sistemi yardımıyla kontrol edilerek Şekil 3.1'deki görüntü elde edilmiştir.



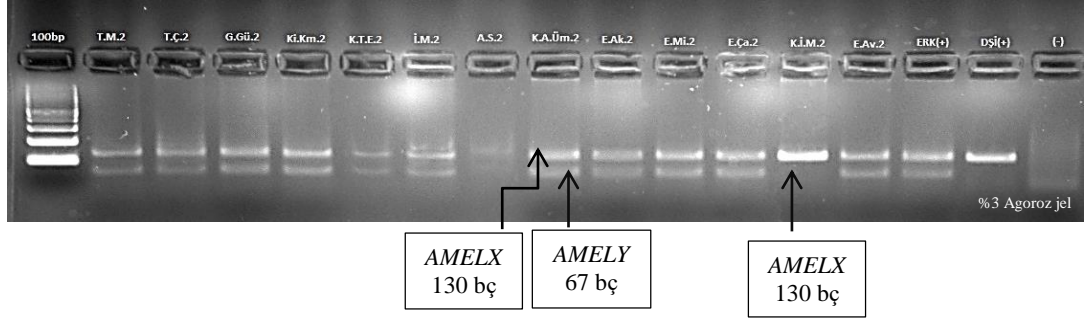
Şekil 3.1. İzole edilen sığır DNA'larının jel elektroforez görüntüsü.

Optimum primer bağlanma sıcaklığının saptanması için cinsiyetini bildiğimiz (♂) sığır DNA'sı kullanılarak kurulan gradient PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüleri Şekil 3.2'deki gibidir.



Şekil 3.2. *AMELX/AMELY* genlerinin (♂, sığır) gradient PZR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü.

Satın alınan etlerden (48 farklı numune) izole edilen DNA'ların, optimizasyondan elde ettiğimiz sıcaklık (66,4°C) ve MgCl<sub>2</sub> yoğunluğu (1,5mM) ile kurulan PZR'dan elde edilen ürünlerin elektroforez görüntülerinin bir kısmı örnek olarak Şekil 3.3'te verilmiştir.



**Şekil 3.3.** AMELX/Y-F ve AMELX/Y-R primerleri kullanılan sığır eti DNA'sı PZR ürünlerinin jel elektroforezi. Çift bantlar erkek; tek bantlar dişi cinsiyeti göstermektedir.

Keçiören bölgesinde kasaptan alınan örnek (dişi) hariç, tüm numunelerin iki bant göstermesi üzerine cinsiyetlerinin erkek olduğu belirlenmiştir. Kesimhanede dokuların alındığı karkasların cinsiyet dağılımı; 67 örnek içinde 30'u erkek, 37'si dişi şeklinde idi. Satın alınan etlerin kaynaklarını market ve kasap olarak ayırarak cinsiyet dağılımı yapıldığında ise (Çizelge 3.1) 14 adet kasaptan alınan et içerisinde 1 adet dişi olduğu belirlenmiştir. Marketten alınan örneklerin hepsinin, erkek oldukları ortaya konulmuştur.

**Çizelge 3.1.** Satın alınan etlerde genetik çalışma sonucu belirlenen cinsiyetin market ve kasaplara göre dağılımı.

	<b>Market</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Kasap</b>	<b>Cinsiyet</b>
1	ÇNK 1	E	ÇNK 7	E
2	YNM 1	E	GLB 1	E
3	YNM 2	E	GLB 6	E
4	ÇNK 2	E	KÇR 1	D
5	ATD 1	E	KÇR 5	E
6	ATD 2	E	YNM 3	E
7	ATD 3	E	ÇNK 12	E
8	SNC 1	E	ÇNK 14	E
9	ÇNK 3	E	SNC 3	E
10	ÇNK 4	E	ETM 1	E
11	ÇNK 5	E	KÇR 3	E
12	ÇNK 6	E	KÇR 4	E
13	MAM 1	E	ÇNK 11	E
14	MAM 2	E	ÇNK 9	E
15	ÇNK 8	E		
16	GLB 2	E		
17	GLB 3	E		



**Çizelge 3.1.** Devam.

	<b>Market</b>	<b>Cinsiyet</b>
18	GLB 4	E
19	GLB 5	E
20	KÇR 2	E
21	ETM 4	E
22	ETM 3	E
23	ETM 2	E
24	SNC 2	E
25	SNC 4	E
26	SNC 5	E
27	SNC 6	E
28	ÇNK 10	E
29	ÇNK 13	E
30	ÇNK 15	E
31	YNM 4	E
32	YNM 5	E
33	YNM 6	E
34	YNM 7	E

**E:** Erkek; **D:** Dişi.

### **3.2. Histokimyasal Bulgular**

#### **3.2.1. *Musculus biceps femoris* (but) Preparatlarında Lipofuskin Birikimi**

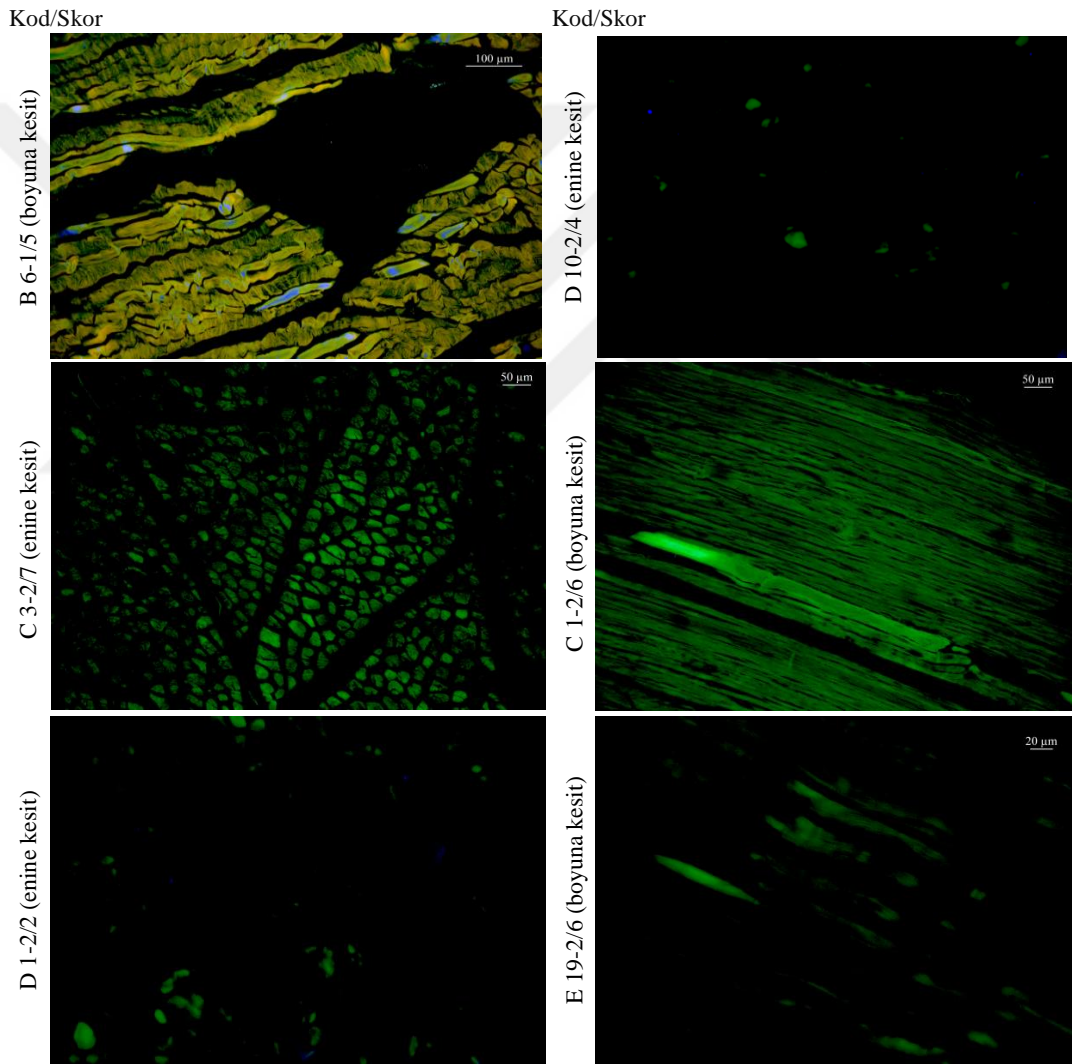
Tüm yaş gruplarından örneklerin enine kesitlerinde lipofuskin birikim görüntüleri değerlendirildiğinde, 1 yaş ile 3 yaş (hariç) arası hayvanlardan alınan kas doku preparatları, bu yaş guruplarında ışımaya olmayışı nedeniyle, skorlamada 0-2 aralığında değer almıştır. Tüm örneklerin skorlama listesi Ek-2’de (Sayfa 84) verilmiştir.

25-26 aylık hayvanlardan alınan doku preparatlarında floresans ışımının olmayışı D 8-2 kodlu preparat üzerinde; Şekil 3.4’te gösterilmektedir.

3-4 yaş ve üzeri hayvanlarda lipofuskin birikim değişimi belirgin şekilde artarak 12 yaşa kadar yükselen fark göstermektedir. Farklı skorlamalara sahip preparatların floresans ışımaya görüntüleri Şekil 3.5’te sergilenmektedir.

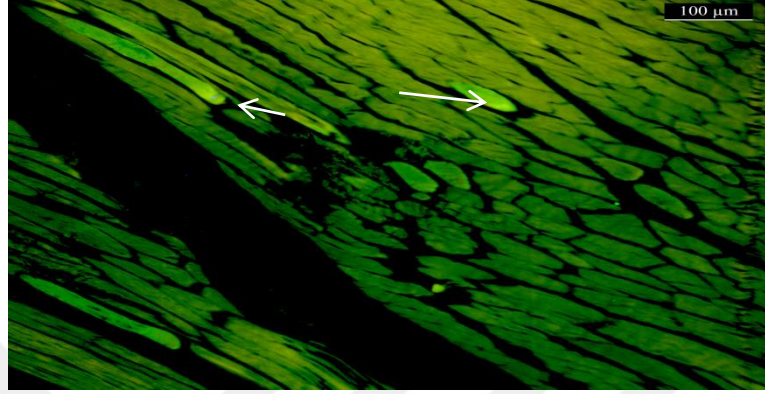


Şekil 3.4. *Musculus biceps femoris* enine kesiti floresans mikroskop görüntüsü.



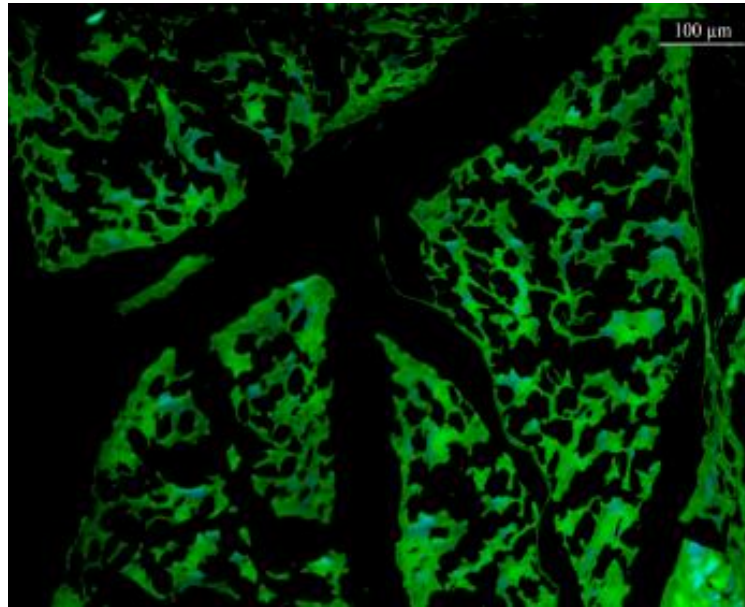
Şekil 3.5. Farklı skorlamalara sahip preparatlarda floresans mikroskop görüntüleri.

3 ve 12 yaş aralığında hayvanlara ait kas doku numuneleri arasından E 13-2 kodlu preparatta (enine kesit) lipofuskin ışması şiddeti görüntüsü Şekil 3.6'da verilmiştir.



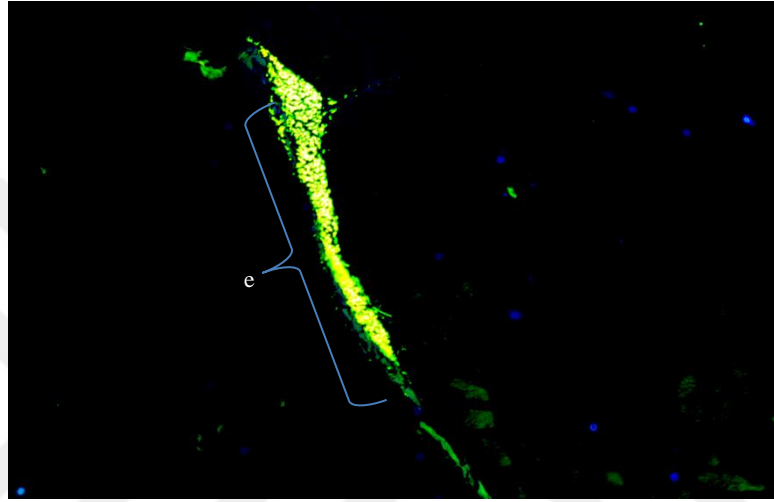
Şekil 3.6. *Musculus biceps femoris* enine kesiti lipofuskin ışma şiddeti görüntüsü.

Otolitik kas gruplarının yüksek oranda floresans ışması yaptığı dikkat çekmektedir. Şekil 3.7'de 17-18 aylık (Ak 1-1 kodlu numune) olan bir hayvanın doku preparatında otoliz kaynaklı floresans ışma varlığı görülmektedir.



Şekil 3.7. Otolitik doku enine kesit floresans mikroskop görüntüsü.

Otolizli preparatların floresans ışık altında ayırımı, normal kas doku preparatında eritrosit ışımaya verirken, bu preparatlarda eritrosit yıkımından dolayı herhangi bir ışıldama olmayışından yapılabilmektedir. Bu iki durum arasındaki ayırım iki ayrı ışık spektromunda (floresans ve görünür ışık) preparatın incelenmesiyle ortaya konulabilmektedir. Eritrositlerin floresans ışımalarını göstermek amaçlı D 6-2 kodlu preparat (enine kesit) görüntüsü Şekil 3.8’de verilmiştir.

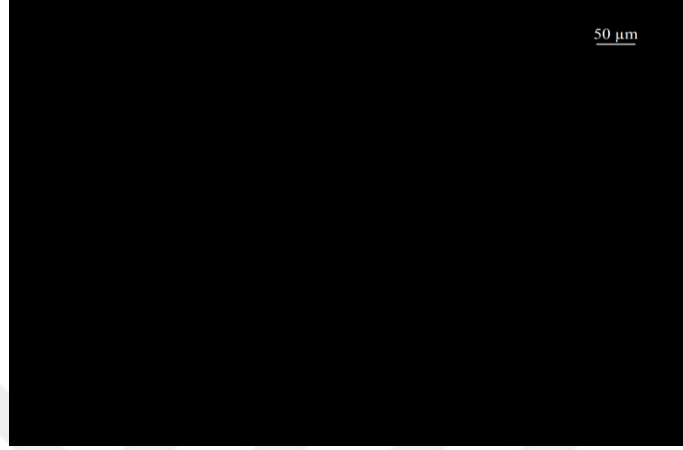


Şekil 3.8. *Musculus biceps femoris* enine kesiti floresans mikroskop görüntüsü; e: eritrosit.

### 3.2.2. *Musculus longissimus dorsi* (kol) Preparatlarında Lipofuskin Birikimi

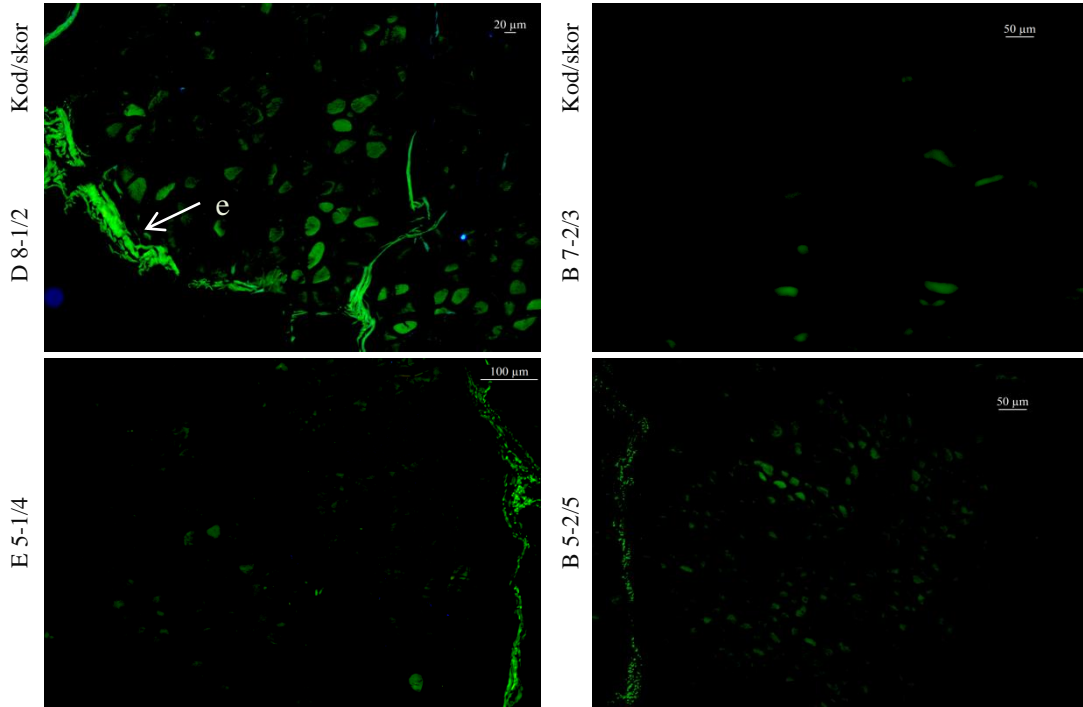
Floresans ışımaya ayırt edicilik oranı *Musculus biceps femoris* (but) preparatlarına kıyasla *Musculus Longissimus dorsi* preparatlarında daha kolay izlenebilir olduğu ve lipofuskin birikimi bakımından *L. dorsi* preparatların skor değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenildi. Dokulardaki hiyalin dejenerasyonunun da floresans ışımaya verdiği ve lipofuskin ışımalarından ayırımı için görünür ışık mikroskobu kullanıldı. Aynı şekilde parazitlerin oluşturduğu cepcikler floresans ışımaya vermekte olup ayırt edici olabilmesi adına preparatlar görünür ışık ve floresans ışıkta kontrol edilerek fotoğraflandı.

17-26 ay'lık hayvanların doku preparatlarında floresans ışımaya skor değeri 0 ve 2 olarak belirlendi. Preparatların floresans mikroskop görüntüleri hiç ışımamanın olmamasıyla ayırt edicidir (A 6-2 kodlu numune; Şekil 3.9).

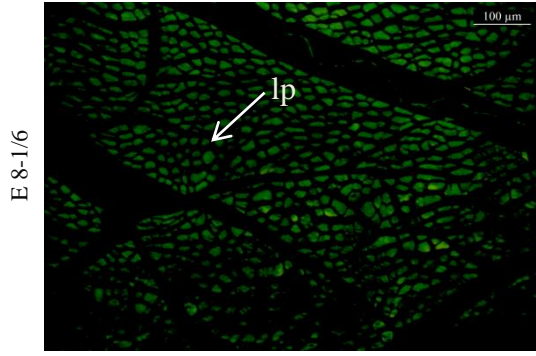


Şekil 3.9. *M. longissimus dorsi* floresans mikroskop görüntüsü.

Lipofuskin skorlamasında farklı değerler almış kas doku preparatlarında floresans ışımaya farklılıkları seçili numunelerde Şekil 3.10'da sergilenmektedir.

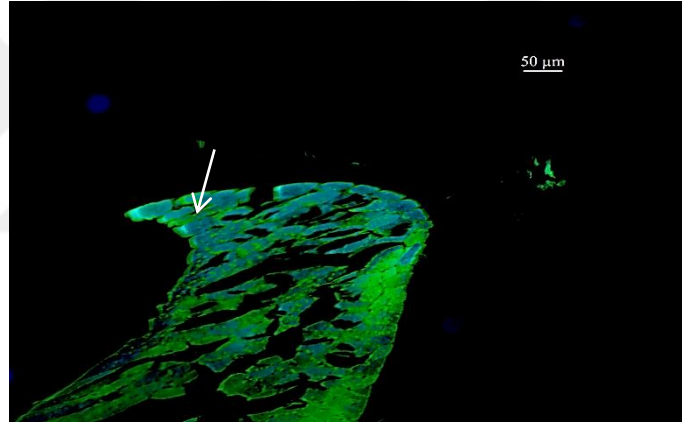


Şekil 3.10. Farklı skor değerlerine sahip doku preparatları floresans mikroskop görüntüleri; lp: lipofuskin, e: eritrosit.



Şekil 3.10. Devam.

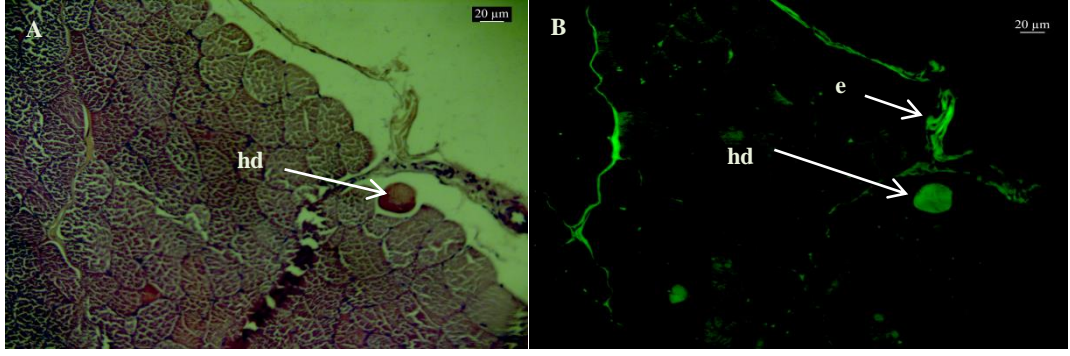
Bir önceki kas grubunda da belirlendiği gibi, otolitik kas doku preparatlarında floresans ışımaya şiddeti yoğun şekilde görülmektedir (Ak 9-2 kodlu numune; Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Otolitik kas doku floresans mikroskop görüntüsü.

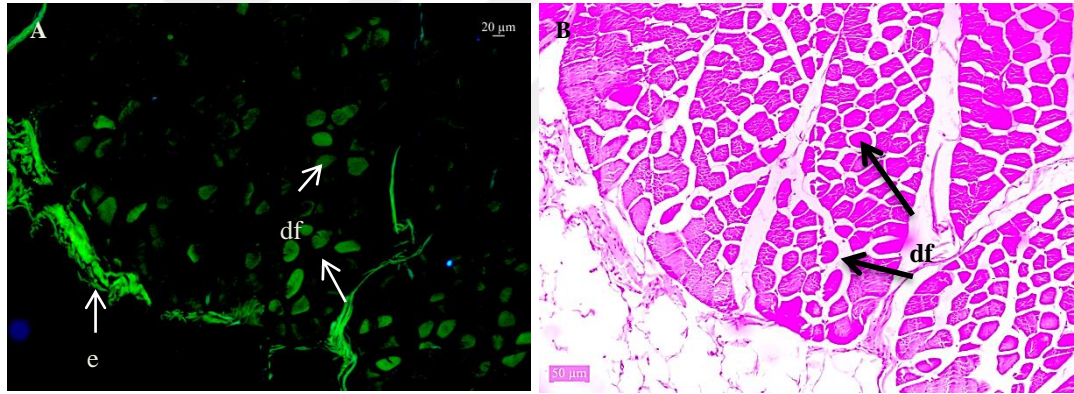
Hiyalin dejenerasyonunun yaymış olduğu floresans ışımaya enine kesit preparatlarında lipofuskin benzeri ışımalar göstererek yanılığa sebep olabilmektedir. Bu oluşumunun floresans mikroskobu ve ışık mikroskobu ile fotoğrafları çekilerek lipofuskin olmadıkları ayırt edilebilmiştir (Şekil 3.12).





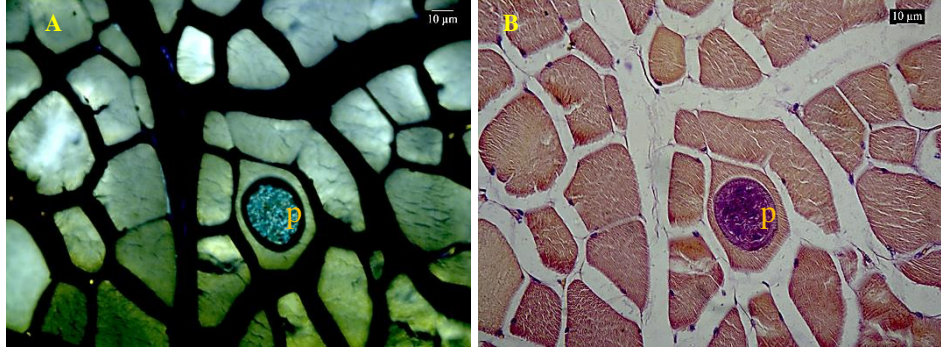
**Şekil 3.12.** Enine kesit preparatta hiyalin dejenerasyon görüntüsü. A: Işık mikroskobu görüntüsü; **hd**: hiyalin dejenerasyonu, B: floresans mikroskobu görüntüsü; **e**: eritrosit.

Dejeneratif kas fibrillerinin de floresans ışık yaydığı belirlendi. Yine aynı şekilde ışık mikroskobunda görüntüleme ile bu yapılar ayırt edilebilmiştir. Floresans ve ışık mikroskop görüntüleri Şekil 3.13'te verildiği gibidir.



**Şekil 3.13.** Aynı preparat üzerinde görünür ışık ve floresans ışık altında çekilmiş fotoğraflar. A: floresans mikroskobu; **e**: eritrosit, **df**: dejenere kas fibrili, B: ışık mikroskobu; **df**: dejenere kas fibrili.

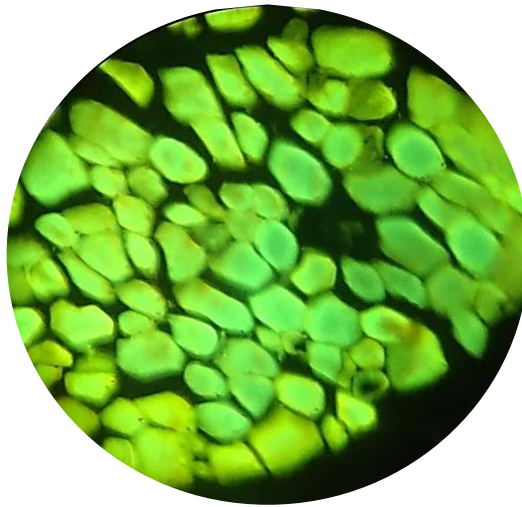
Kas doku preparatlarında floresans ışığa veren parazitlerin varlığı da ortaya konulmuştur. Preparat görüntüsünde parazitlerin görünür ışık ve floresans ışık altında görüntüleri kaydedilmiştir (Şekil 3.14).



**Şekil 3.14.** Aynı preparat üzerinde parazit hücrelerinin görünür ışık ve floresans ışık altındaki görüntüleri. A: floresans mikroskobu; B: ışık mikroskobu görüntüsü. **p:** parazit.

### 3.2.3. Satın Alınan Etlerde Yaş Tayini

Satın alınma sonrası EtOH ve formol içerisinde muhafaza edilen numunelerde floresans mikroskobu altında lipofuskin gözleminin yapılabilir olduğu görülmüştür. Yaklaşık 11 ay önce formole alınan dokularda yaş belirleme çalışmasının yapılabilirliğine engel teşkil eden bir duruma rastlanmamıştır. Preparatların skorlanması sonucunda iki numune hariç diğerlerinin genç hayvana ait olduğu sonucuna varılmıştır. Bu iki örneğin de 4 yaş ve üzeri olduğu tahmini yapılmıştır. Otolitik dokuların ayrımı ışık mikroskobunda kontrol edilerek ve eritrosit kontrolüyle yapılmıştır. Doku preparatlarına örnek bir görüntü Şekil 3.15’te verilmektedir.



**Şekil 3.15.** Satın alınan et parçasına ait enine kesit preparatı floresans mikroskobu görüntü örneği.



Preparatları hazırlanan dokuların; kodları, formole ve EtOH'a alınış tarihleri, skor sonuçları Çizelge 3.2'de verilmektedir.

**Çizelge 3.2.** Satın alınan etlerin 15 adetinin floresans mikroskop çalışması skorlama sonuçları.

Numune kodu	Satın alınma tarihi	Takip solüsyonu	Yaygınlık	Boyanma şiddeti	Toplam	Tahmini yaş	
MAM 2	11.11.18	Formol	1	1	2	-	
ÇNK 7			2	1	3	>4	
ÇNK 5			1	1	2	<3	
ATD 2	31.10.18		0	0	0	<3	
ÇNK 6	9.11.18		2	1	3	≥4	
SNC 3	10.11.19		0	0	0	<3	
ÇNK 11			0	0	0	<3	
SNC 4			0	0	0	<3	
ÇNK 10			0	0	0	<3	
YNM 7			1	1	2	-	
SNC 3			EtOH	Tespiti iyi Formollü preparatlarla uyumlu			
ÇNK 11							
SNC 4							
ÇNK 10							
YNM 7							

Bir önceki başlıklarda da belirtildiği gibi; doku preparatlarında, lipofuskin floresansının incelemesinde özellikle dikkat edilmesi gereken konunun otolitik dokuları ayırt etmek olduğu, bu preparatlarda da görülmektedir.

## 4. TARTIŞMA

Cinsiyet belirleme ile ilgili olarak, LC/APCI-MS/MS (Arslan ve ark., 2015), GC-MS, HPLC-MS/MS ve ELISA gibi immünokimyasal metodlar kullanılmaktadır (Arslan ve ark., 2015; Bai ve ark. 2010; Gokulakrishnan ve ark., 2012; Gokulakrishnan ve ark., 2015; Zeleny ve Schimmel, 2002). Fakat hormon analizine dayanan bu metodlar, cinsiyet-spesifik/steroid hormon seviyeleri bireyler arası hatta bireyin kendinde değişim gösterdiği (Gokulakrishnan ve ark., 2015; Zeleny ve Schimmel, 2002) ve aynı zamanda yaş, ergenlik, mevsimsel değişimler ve hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan steroid hormon uygulamaları gibi fizyolojik faktörler de değerleri değiştirdiği (Zeleny ve Schimmel, 2002) için, tek başına hormon analizine dayanan çalışmalar zor olmakta ya da yöntemlerin güvenilirliği düşmektedir. Ayrıca teknik kısıtlamalar veya gerekli olan ekipmanların pahalı olmasından dolayı da cinsiyet belirlemek için rutin kullanıma elverişli görülmemektedirler (Gokulakrishnan ve ark., 2012; Gokulakrishnan ve ark., 2015).

Bahsi geçen metodların dışında cinsiyet belirlemede kullanılan DNA temelli tekniklerin, özellikle de PZR ürünlerinin jel elektroforezinin, cinsiyet belirlemede güvenilir, ekonomik ve hızlı olduğu ortaya konulmuştur (Arslan ve ark., 2015; Gokulakrishnan ve ark., 2015).

Bu çalışmada seçilen Amelogenin genleri; sığır türünün dışında et hayvanı olarak kullanılan koyun, keçi, türünün de X ve Y kromozomunun her ikisinde bulunmaktadır (Gokulakrishnan ve ark., 2015). Cinsiyet analizinde *ZFX/ZFY* (Arslan ve ark., 2015), *TSPY* (Zeleny ve Schimmel, 2002), *SRY* (Gokulakrishnan ve ark., 2015), *BOV97M*, *DEAD3X/DEAD3Y* (Gokulakrishnan ve ark., 2012) *STS* (Morikawa ve ark., 2011) genleri de kullanılmaktadır fakat amelogenin temelli cinsiyet belirleme, adli uygulamalarda en çok kullanılan analizdir (Masuyama ve ark., 2017).

Arslan ve ark. (2015), tarafından Kayseri ilinde kasap ve marketlerden toplanan 30 adet sığır etinde Y kromozomuna özgü iki çift primer setleri kullanılarak

%50 dişi ve %50 erkek cinsiyet dağılımı belirlenmiştir. Sunulan tez çalışmasında *AMELX/AMELY* gen bölgesi kullanarak gerçekleştirilen genetik analiz sonucunda; kombinadan yapılan örnekleme neticesinde, 67 hayvanın %55,2'sinin 3 yaş ve üstü dişi olduğu saptanmış olmasına rağmen, market ve kasap reyonlarından yapılan örneklemede ise 48 örnek içerisinde sadece 1 adet dişi (%2,1) örnek belirlenmiştir. Kombinadan yapılan örnekleminin %55,2'sini oluşturan bu et örneklerinin market ve kasap reyonlarından farklı bir dağılım göstermiş olması, dişi hayvanların ağırlıklı olarak işlenmiş ürün olarak tüketiciye sunulduğunu düşündürmektedir. Bununla beraber, 3 yaş üstü dişi olması sebebiyle, ESK'nun fiyat belirleme listesinde 3. kalite sınıfına (Et Süt Kurumu, 2019) giren bu et ürünlerinin satışında kalite-fiyat farkının gözetilmiş olarak tüketiciye sunulup sunulmadığı bilinmemektedir.

Yapmış olduğumuz çalışma, Türkiye'de adli perspektifte kasaplık sığır etleri ile *AMELX/AMELY* gen bölgesi kullanılarak yapılmış olan ilk genetik çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Bir diğer sınıflandırma ve derecelendirme faktörü olan yaşın analizi kombinadan temin edilen; farklı yaştaki sığır karkaslarının iki farklı kas bölgesi (*M. longissimus dorsi*, *M. biceps femoris*) üzerinde, mikroskopik yöntemle lipofuskin granül birikimi bakımından incelenmiştir.

Bugüne kadar yaş biyobelirteci olarak kullanılmış olan; “telomer uzunluğunun” bir çok türde yaşla ilişkisinin olmadığına ortaya konulması (Jarman ve ark., 2015); mtDNA analizinin hassas testlere dayanmasının yanında,  $\pm 9.3$ 'lük hata payının (De Paoli-Isoppi ve ark., 2017), sığırlarda yaş biyobelirteci olarak kullanılmak istenildiğinde, kullanışsız olması durumu söz konusudur. Aynı zamanda pratik adli uygulamalarda teknik problem ve sınırlı tahmin doğruluğu sebebiyle kullanımının kısıtlı olduğu rapor edilmiştir. Bir diğer MYB olan sTREC'in cinsiyetten etkilenmesi (Zubakov ve ark., 2016) sonuçlarının güvenilirliğini düşürmektedir. Yine aynı şekilde adli veriler için kullanılabilirlik düşünüldüğünde RNA bazlı MYB'ler fenol, alkol, gibi koruyucu sıvılarda arşivlenmiş örneklerde uygulanabilir değildir. Hatta en umut verici MYB olarak görülen DNAm analizlerinin (Jarman ve ark.,

2015) kit bağımlı ve yüksek maliyetli olmasının yanı sıra, daha önceki DNAm analiz çalışmalarında sığır materyalinin kullanılmamış oluşu (De Paoli-Isoppi ve ark., 2017) ve bu nedenle kit bağımlı olan bu analizler için kit temininin sağlanamaması çalışmalar için sorun teşkil etmektedir. Öte yandan kimyasal biyobelirteç olan lipofuskinin, bir çok hayvan türünde yaşla beraber birikimindeki artış kanıtlanmış (Brown ve ark., 2017; Clokey ve Jacobson, 1986; Docchio ve ark., 1991; Feng ve ark., 2015; Jarman ve ark., 2015; Samorajski ve ark., 1965) ve cinsiyetten etkilenmediği ortaya konulmuşken (Feng ve ark., 2015), adli çalışmalarda belirteç olarak kullanılabilirliği yadsınamaz bir gerçektir. Hatta yöntemin ekonomik oluşu lipofuskin birikim analizinin mikroskobik incelemelerle çalışılmasının tercih edilebilirliğini arttırmaktadır.

Daha önce sığırlarla yapılan lipofuskin analiz çalışmalarında; beyin (floresans mikroskobu ile analiz) (De-Biase ve ark., 2017), sinir düğümü (mikroskobik analiz) (Jahns ve Fast, 2014), göz (HPLC ve Multi foton konfokal mikroskobu ile analiz) (Li ve ark., 2013), omurilik, adrenal bez, kemik, kemik iliği, yağ, böbrek, akciğer, karaciğer, iskelet kası, dalak, dorsal kök ganglionu (SPEX Fluoromex-2 analizi) (Schönenbrücher ve ark., 2008), miyokardiyum (elektron mikroskop çalışması) (Tatariunas ve ark., 1987), çene kası (floresans mikroskobu, TLC) (Jolly ve ark. 1995) materyal olarak kullanılmıştır. Lipofuskin granülleri birikiminin doku-bağımlı olmayışı reyonda satışa sunulan ya da paketlenmiş ürünlerde incelenebilirlik sağlamaktadır.

Literatür incelemeleri neticesinde, lipofuskin birikimi incelemesinde kullanılan materyal (*M. longissimus dorsi* ve *M. biceps femoris*) ve metod göz önüne alındığında sunulan tez çalışmamız ilk olma özelliği taşımaktadır.

De-Biase ve ark. (2017), iki gruba ayırdığı hayvanlarda (grup A-yaşlı: 10 yaşından büyük; grup B-geç: 5 yaşına kadar olan sığırlar), yaşlı hayvanların nöronlarında lipofuskin birikiminin yaşla güçlü bir pozitif ilişki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Fakat söz konusu çalışmada içlerinde 3, 4 ve 5 yaşlı olup genç diye gruplandırılan örneklem grubunun nöronlarında lipofuskin belirlenmediği

bildirilmiştir. Ancak, sunulan tez çalışmasında bu yaştaki hayvanların iki kas grubunda da lipofuskin granülleri gözlenebilmiş ve skorlamaya dahil edilebilmiştir.

Tespit solüsyonu olan formolün hücresel bileşenleri (amin kalıntıları) çapraz bağlaması, lipofuskinin ihtiva ettiği protein ve lipid peroksidleri arasındaki kompleks yapıdan sorumlu kimyasal baz olan schiff bazlarının oluşumuna neden olacağı ve lipofuskin benzeri yapay yapıları sentezleyebileceği (Cho ve Hwang, 2011) nedeniyle; kombinada yaşı bilinen hayvanlardan alınan et parçaları ile skorlama yapıldıktan sonra, satın alınan et parçalarından farklı tarihlerde alınmış olan ayrı iki grup (5'er adet 11 ay ara ile formole alınmış farklı numuneler) floresans mikroskobunda incelenmiş ve çalışmaya engel teşkil edecek bir görüntünün oluşmadığı görülmüştür, hatta bu örneklerde yaş tahmini yapılabilmektedir. Tespit solüsyonlarının yanlış seçimi doku üzerinde hücre yapısını bozabileceği ve dokunun boyanmasını da etkilemesi (Gün ve ark., 2011) nedeniyle, tespit solüsyonunun seçimi kritik bir önem taşımaktadır. Ayrıca satın aldığımız 5 iskelet kasına ait kuşbaşı et parçasının EtOH içerisinde de tespiti yapılarak, mikroskobik görüntüsünde boyanmaya yahut hücre yapılarına hasar vermediği görülmüştür. Bu sonuç doğrultusunda çalışmamız rutine taşınmak istenildiğinde genetik materyalin analizi için EtOH içerisine alınan dokulardan yaş belirleme amacıyla mikroskobik çalışmanın da yapılabilecek olması iş yükünün de azalacağı anlamını taşımaktadır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hayvan DNA'sında kimliklendirme testleri hayvanların şüpheli ya da kurban olarak yer aldığı cezai ve hukuki davaların çözümünde, şecereli üretimde saflığın kontrolünde ya da şüpheli babalık/analık durumlarında ebeveyn belirleme gibi olgularda giderek daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu bağlamda evcil hayvanlardan kedi ve köpek; tarımsal değeri olan hayvanlardan sığır, koyun, keçi ve at; yabani hayvanlardan ise ayı, kurt, balık, kuş, geyik türleri adli olaylarda karşımıza çıkmaktadır (Budowle ve ark., 2005). Tarımsal değeri olan hayvanlar söz konusu olduğunda; adli vakaların araştırılmasında değerli birer tıbbi kimliklendirme elemanları olan yaş ve cinsiyetin hayvan numunelerinde belirlenmesi, etin ticari değerinin derecelendirmesi ve sınıflandırılmasında da önemli bir kriterdir. Bunun yanında; adli tıbbın en önemli konularından birini oluşturan kimlik tespitinde; bireyin tıbbi kimliğini oluşturan fiziksel yapıların başlıca bileşenlerinden olan yaş ve cinsiyetin belirlenmesi uçak, gemi, tren otobüs kazaları, deprem, yangın ve savaşlar gibi toplu ölümlerin olduğu kitlesel facialarda da önem taşımaktadır (Zeyfeoglu ve Hancı, 2001). Bir de Türkiye'de yaş tayininde en çok rastlanan uygulamalar (yaşayan bireylerde); göçmenler, sığınmacılar, suçlular, insan kaçakçılığı, çocuk pornografisi sorunlarıdır (Atılğan ve Akkoyun, 2017).

Adli perspektiften bakıldığında, parça etlerde cinsiyet ve yaş analizleri, tüketiciye sunulan mal ve hizmetin fiyat/kalite uyumu açısından birçok ülkede önem arz etmekte ve Türkiye'de de giderek önem kazandığı görülmektedir. Sunulan tez çalışması Ankara ilinde kombinalardan, kasap reyonu bulunan marketlerden ve mahalle kasaplarından temin edilen et ürünleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Satın alınan iskelet kası kuşbaşı etlerden izole edilen DNA'larda X ve Y kromozomuna özgü, sırasıyla *AMELX* ve *AMELY* gen bölgesi için kullanılan primer çifti ile PZR yükseltgenmesi yapılarak dişi ve erkek hayvan ayrımı gerçekleştirilmiştir.

Reyonda satışa sunulan parça etlerden izole edilen DNA'larla, *AMELX/AMELY* gen bölgesine uygun primer çifti kullanılarak kurulan PZR ürünleri ile %3'lik agaroz

jel elektroforezinde kaliteli ve ayırım sağlayabilecek çözünürlükte başarılı görüntü alınmıştır. AMELX/Y-F ve AMELX/Y-R primerlerinin, yükseltgenme ürün boyunun kısa olması ve 5mg numune miktarı ile başarılı sonuç vermesi nedeniyle; sıklıkla az miktarda tespit edilebilen ve degradasyona bağlı olarak yükseltgenme problemleri yaşanan adli numunelerle çalışılmasında uygun olacağı neticesine varılmıştır. Doğrudan halkın tüketimine sunulan reyonlardan satın alınan 48 et numunesinden 1 adedinin dişi, geri kalanının erkek hayvana ait olduğu belirlenmiştir. Ancak Ankara’da satışa sunulan etlerin cinsiyet dağılımı satın alınan ve kombinadan temin edilen tüm örnekler değerlendirildiğinde, 115 örnek içerisinde 38 dişi hayvan, 77 erkek hayvan olduğu verisi, genel tabloda dişilerin de tüketime sunulduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

ESK’nın belirlediği kalite/fiyat derecelendirmesine bakıldığında (Et Süt Kurumu, 2019) sunulan çalışma ile kombinalarda kesimi yapıldığı belirlenen 3 yaş ve üzerindeki dişi hayvanların, doğrudan halkın tüketimine sunulması durumunda reyonlarda kalite ayırımına göre fiyatlandırılmamasına bağlı olarak, satıcının kg başına yaklaşık 7tl değerinde haksız kazanç elde edeceği ve tüketicinin aynı oranda zarar edeceği açıktır.

Çalışmamıza ek olarak, paketlenmiş etlerde de cinsiyet belirleme çalışmasının gerçekleştirilmesi, hatta Ankara genelinde, örneklem yapılan bölgelerin sayısının artırılması, son zamanlarda sosyoekonomik nedenlerle kesimde sayısı artan dişi hayvanların reyonlarda ne şekilde ve ne oranda yer aldığını, daha net ortaya koyacağını düşünmekteyiz.

Floresans mikroskopunda incelenen numune preparatları, lipofuskin birikim farklılığı sayesinde 0-3 yaş ile 3’ten büyük yaştaki hayvanların ayırt edilebileceği sonucunu bize vermektedir (Ek-2). Kol kasından (*M. longissimus dorsi*) hazırlanan preparatlarda yaşla birlikte artış gösteren lipofuskin granüllerine rastlanmıştır ancak bu birikim değerinin but kasından hazırlanan preparatlardan yüksek olduğu belirlenmiştir. Skrolama sonucunda buttan (*M. biceps femoris*) alınan preparatlarda lipofuskin birikiminin daha az olduğu, fakat iki kasta da yaşla ilişkili artışın mevcut

olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmada ele alınan iki farklı kas gurubunun her ikisinin de lipofuskin incelemesi için elverişli olduğu belirlenmiştir. Bu durumda lipofuskinin yaş için biyobelirteç olarak iskelet kasında kullanılabilir olduğu ve çalışma metodumuzun adli incelemeler için uygunluğu sonucuna varılmıştır.

*M. longissimus dorsi* ya da *M. biceps femoris* kasının lipofuskin birikim analizi, amelogenin gen bölgesine spesifik AMELX/Y-F ve AMELX/Y-R primerleri kullanılarak yapılan PZR analizi ile birlikte kullanıldığında, ESK'nun belirlediği sığır eti kalite sınıflarının (Kalite 1, 2 ve 3) ayırımında kullanılabilir oldukları ortaya konmuştur.

Floresans mikroskobu ile yapılan lipofuskin incelemesinde, elde edilen görüntülerde, otolitik kas dokularının da floresans ışık verdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla doku preparatları incelenirken bu durum göz ardı edilmemesi gereken bir konudur. Otolitik floresans yanılığı dokudaki eritrosit varlığı ile ayırt edilebilmektedir. Doku preparatlarında lipofuskin dışında floresans ışıma gösteren diğer yapıların (parazitler ve hiyalin dejenerasyonu) olduğu belirlenmiştir. Bu ışımaların ayırt edilmesi için, preparatların floresans ışık altındaki görüntüsü ile görünür ışık altındaki görüntüsü mutlaka kıyaslanmalıdır. Bunlara ek olarak enine ve boyuna kesitlerin lipofuskin birikimi bakımından farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu bakımdan dokulardan alınacak enine kesitlerin daha geniş kas kitlelerini değerlendirmek için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Doku preparatı hazırlamanın ilk aşaması olan doku küçültme işlemi sırasında bu hususa dikkat edilmesi sonucu çıkmaktadır.

Yaş tahmininde kullanılmak üzere yaklaşık 11 ay ara ile formole alınmış iki grup üzerinde lipofuskin birikimi ile yaklaşık yaşlar belirlenmiştir ve böylelikle formolde kalma süresinin dokular üzerinde sonuç almayı engelleyecek kadar olumsuz etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ancak, bu numunelerde otolitik floresans ışımının olmadığı yaşlı hayvan preparatların rahatlıkla analizi yapılabildiği görülmüştür. Moleküler analizlerde kullanılacak biyolojik numunelerin saklama



solüsyonu olan EtOH, mikroskop çalışması numunelerinin tespiti için de uygunluk göstermiştir.

Optimize edilen metodun market ve kasap reyonlarından satın alınan örnekler üzerinde kontrolü için, erkek hayvanlar arasından rastgele seçilen 10 adet numunenin yaş tahmini sonucunda 2 adedi 4 yaş ve üstü 6 adedi ise 3 yaşından küçük hayvanlara ait olduğu belirlenmiştir. ESK'nın kalite sınıflandırmasında bu hayvanların farklı kalite sınıflarına girmesi ve buna göre fiyatlandırılması gerekmektedir. Bu durumda reyonda bu etlerin fiyat farklılığına gidilerek satılmasının uygun olacağı, derecelendirme ve sınıflandırma sisteminin gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Yaş aralıklarının ayırımında kesinliğin artırılması için örneklem guruplarının, yaşlarının daha net bilindiği bir devam çalışması ve her yaştan örnek hayvan sayısının artırılması önerilmektedir. Ayrıca, market ve kasap reyonlarından satın alınan etlerin reyonda bekleme sürelerinin lipofuskin analizi üzerinde ne tür etkisi olacağının görülebilmesi için formol içerisinde farklı bekleme sürelerinde tutularak hazırlanan preparatlardan analiz yapılması ve doğrulanması metodun sahada kullanımı açısından önemlidir.

Normal şartlarda damızlık özelliği olmayan, süt verimi düşük veya yaşlı olan dişi hayvanların kesimi uygunken (Türkiye Tohumcular Birliği, 2018), Türkiye'de çiğ süt fiyatlarının düşük olması ile damızlık değeri olan sütçü hayvanların kesimi söz konusu olmaktadır. Dolayısıyla süt ürünleri ithalatının artmasına (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2018) ve ülkedeki hayvan sayısının düşmesi sebebiyle ithal hayvan alımının artmasına neden olmaktadır. TÜİK raporlarında da (Türkiye İstatistik Kurumu, 2019) görüldüğü gibi kırmızı et üretimindeki artışın, süt sığırlarının da üreticinin içinde olduğu zor durumla beraber hayvanlarını kesimhaneye getirmesinden kaynaklı bir atış olduğu (Gündoğdu, 2019; Uğur, 2018; Yıldırım, 2016), bu durumun sonucu olarak ilerleyen tarihlerde reyonlarda satışa sunulan dişi etlerine rastlama olasılığımızda artışın olacağı, üreticinin etiket bilgilendirmesinin de uygulanmadığı Türkiye'de haksız kazanç elde etme ve dolayısıyla tüketicinin kandırılma riskinin oluşacağı ya da artacağı yaklaşan bir sorun

olarak öngörülmektedir. Aynı zamanda Türkiye'nin hayvancılık sektöründeki son zamanlardaki girişimleri ve amaçları yorumlandığında; derecelendirme ve sınıflandırma sistemine geçme sürecinde olan Türkiye'de, cinsiyet ve yaşın hızlı ve ekonomik bir metodla belirlenebilir olmasının giderek artan bir ihtiyaç olacağı açıktır. Sunulan tez çalışması bu yönüyle de güncel ekonomik bir metod sunmaktadır.



## ÖZET

### Tüketici Haklarının Gözetilmesi Açısından, Ankara İli Kasaplık Sığır Etlerinde Cinsiyet ve Yaşın Biyolojik Analizlerle Değerlendirilmesi

Hayvan DNA'sında kimliklendirme testleri hayvanların şüpheli ya da kurban olarak yer aldığı cezai ve hukuki davaların çözümünde, seçereli üretimde saflığın kontrolünde ya da şüpheli babalık/analık durumlarında ebeveyn belirleme gibi olgularda giderek daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tarımsal üretim değeri olan hayvanlar söz konusu olduğunda; adli vakaların araştırılmasında değerli birer kimliklendirme bileşeni olan yaş ve cinsiyetin belirlenmesi, etin ticari değerinin derecelendirmesi ve sınıflandırılmasında da önemli bir kriterdir. Bu nedenle sunulan tez çalışmasında sığır türüne ilişkin adli olaylarda cinsiyet ve yaş belirlemede kullanılacak ekonomik ve güvenilir bir metodoloji oluşturulması ve tüketici haklarının gözetilmesi açısından, Ankara ili kasaplık sığır etlerinde doğrulamanın yapılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, kombinadan temin edilen yaşı ve cinsiyeti bilinen sığır etlerinde (n=67) iki farklı kas grubunda (*M. longissimus dorsi* ve *M. biceps femoris*) floresans mikroskobu aracılığıyla lipofuskin birikimine dayanan yaş tahmininin yapılabirliği ortaya konulmuştur. Ayrıca Ankara'nın 8 ilçesinde market ve kasaplardan doğrudan halkın tüketimine sunulan sığır etlerinde (n=48) ise *AMELX/AMELY* gen bölgesi ile PZR temelli cinsiyet belirlenmesi yapılmıştır. Rastgele seçilen 10 örneğin yaşı da lipofuskin derecelendirme metodu kullanılarak analiz edilmiştir. Kombinadan yapılan örneklemede, 67 hayvandan 37'sinin (%55,2) 3 yaş ve üstü dişi olduğu saptanmış olmasına rağmen, market ve kasap reyonlarından yapılan örneklemede 48 örnekten sadece 1 adet dişi (%2,1) belirlenmiştir. *AMELX/AMELY* gen bölgesi yükseltgenme ürününün kısa olması ve düşük numune miktarı (~ 5mg) ile dahi başarılı sonuç vermesi nedeniyle; genellikle az miktarda tespit edilebilen ve degradasyona bağlı yükseltgenme problemleri yaşanan adli numunelerde kullanılmalarının uygun olacağı düşünülmektedir. Yaş belirlemede iki kas grubu arasında yoğunluk farkı olmasına rağmen lipofuskin derecelendirmesinde her ikisinin de kullanılabilir olduğu belirlenmiştir. Enine kesitler, boyuna kesite oranla daha informatif bulunmuştur. Bununla beraber kas dokuda floresans ışına veren diğer yapıların (hiyalin dejenerasyonu, otolitik kas grupları vb.) ayırımında görünür ışık altında mikroskop incelenmesine gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca 11 ay formolde bekletilen dokuların lipofuskin derecelendirmesinde kullanılabilceği belirlenmiştir. Market ve kasap reyonlarından yapılan örneklemede dişi hayvan yüzdesinin kombinadan farklı olması, Et ve Süt Kurumu'nun fiyat listesinde 3. kalite sınıfına giren 3 yaş ve üstü dişi hayvanların ağırlıklı olarak işlenmiş ürün olarak tüketiciye sunulduğunu düşündürmektedir. Ayrıca bu etlerin doğrudan halkın tüketimine sunulması durumunda kaliteye göre fiyatlandırılmamasına bağlı olarak, satıcının haksız kazanç elde edeceği ve tüketicinin aynı oranda zarar edeceği anlaşılmaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Adli genetik, *AMELX/AMELY*, Cinsiyet belirleme, Floresans mikroskobu, Lipofuskin, Sığır, Yaş tahmini.

## SUMMARY

### **The Evaluation of Sex and Age of Beef Meat from Ankara Province by Biological Analysis in term of Consumer Right Protection**

Identification tests through DNA analysis are increasingly being used in the criminal and legal cases involving animals which are suspects or victims, control of purity of pedigree breeding, or in the cases of parental identification. Taking into consideration animals that have agricultural production value, the determination of age and sex, which are valuable identification components in the investigation of forensic cases, is an important criterion of the grading and classification of the commercial value of meat. Therefore, the aim of the present thesis is to establish an economic and reliable methodology to be used for identifying age and sex in forensic cases related to bovine species. Moreover, in order to protect consumer rights, it was also aimed to verify the beef meat in Ankara province. In this context, it has been demonstrated that age estimation based on lipofuscin accumulation by fluorescence microscopy investigating at two different muscle groups (*M. longissimus dorsi* and *M. biceps femoris*) in bovine meat (n=67) which were obtained from the slaughterhouse. In addition, the sex was determined by *AMELX / AMELY* gene region-based PCR in beef meats (n = 48) which were offered to public consumption directly from markets and butchers in 8 districts of Ankara. The ages of 10 randomly selected samples were also analysed using the lipofuscin grading method. Although it was determined that 37 out of 67 animals (55.2%) were 3 years old and older female, in the sampling from market and butcher sections the only 1female was determined out of 48 samples (2.1%). Because *the AMELX / AMELY* gene region amplification products are short and give a successful result even with a low sample amount (~5mg); It is thought to be suitable for forensic samples which are generally detected in small amounts and experienced amplification problems due to degradation. Although there was a difference in density between the two muscle groups in age determination, both were found to be usable in lipofuscin grading. The cross sections were more informative than the longitudinal sections. However, microscopic examination under visible light is needed to differentiate other structures (hyaline degeneration, autolytic muscle groups etc.) that emit fluorescent radiation in muscle tissue. In addition, it was determined that the tissues that were stored in formaldehyde for 11 months could be used in lipofuscin grading. The fact that the percentage of female animals determined from the meat sales departments showed a different distribution from the slaughterhouse suggests that the female animals of the age of 3 and older, which are in the third quality class in the price list of the Meat and Milk Board, are mainly offered to the consumer as processed products. Furthermore, if they are offered directly to public consumption, it is understood that the seller will gain unfair profit and the consumer will suffer at the same rate, since these meats are not priced according to quality.

**Keywords:** Age estimation, *AMELX/AMELY*, Bovine, Fluorescence microscopy, Forensic genetics, Lipofuscin, Sex determination.

## KAYNAKLAR

- ADHIKARY R, SCHONENBRUCHER H, RASMUSSEN MA, CASEY TA, HAMIR AN, KEHRLI ME, RICHT JA, PETRICH JW (2009). A comparison of the fluorescence spectra of murine and bovine central nervous system and other tissues. *Photochem Photobiol*, **85**: 1322-6.
- Ağrı İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü (29 Mart 2018). “İl Müdürümüz Kenan ENGİN Dişi Hayvan Kesimi Yasağı Hakkında Basın Açıklaması Yaptı”.  
Erişim: [<https://agri.tarim.gov.tr/Haber/336/II-Mudurumuz-Kenan-Engin-Disi-Hayvan-Kesimi-Yasagi-Hakkinda-Basin-Aciklamasi-Yapti>]  
Erişim Tarihi: 14.09.2019
- AKBABA A (2017). Antik DNA (aDNA) çalışmalarından elde edilen bilgiler. *Türkiye Klinikleri J Foren Med-Special Topics*, **3**: 99-107.
- AKÇAY Y, VATANSEVER Ö (2013). Kırmızı et tüketimi üzerine bir araştırma: Kocaeli ili kentsel alan örneği. *Çankırı Karatekin Üniversitesi SBE Dergisi*, **4**: 043-060.
- ARSLAN K, AKYÜZ B, İLGAR EG (2015). Kayseri şehir merkezinde kasap ve marketlerde satışı sunulan sığır etlerinde PCR yöntemi ile cinsiyet tayini. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **12**: 75-79.
- ATILGAN M, AKKOYUN M (2017). Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalından yaş tayini istenen olguların değerlendirilmesi. *Adli Tıp Bülteni*, **22**: 34-39.
- AUGUSTEYN RC, COULSON G, LANDMAN KA (2003). Determining kangaroo age from lens protein content. *Aust. J. Zoology*, **51**: 485-494.
- BALLIN NZ, MADSEN KG (2007). Sex determination in beef by melting curve analysis of PCR amplicons from the amelogenin locus. *Meat Sci.*, **77**: 384-8.
- BAI WL, YIN RH, ZHAO SJ, LI C, MAE ZJ, YIN RL, LUO GB, ZHAO ZH (2010). A PCR assay for sex determination of yak (*Bos grunniens*) meat by amplification of the male-specific *SRY* gene. *Food Control*, **21**: 726-731.
- BASS PD, ENGLE TE, BELK KE, CHAPMAN PL, ARCHIBEQUE SL, SMITH GC, TATUM JD (2010). Effects of sex and short-term magnesium supplementation on stress responses and longissimus muscle quality characteristics of crossbred cattle. *J. Anim. Sci.*, **88**: 349-360.
- BEKAERT B, KAMALANDUA A, ZAPICO SC, VAN DE VOORDE W, DECORTE R (2015). Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*, **10**: 922-930.
- BIRD A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, **16**: 6-21.
- BOCKLANDT S, LIN W, SEHL ME, SANCHEZ FJ, SINSHEIMER JS, HORVATH S, VILAIN E (2011). Epigenetic predictor of age. *PLoS One*, **6**: e14821.
- BOSLEY KM (2008). Use of Extractable Lipofuscin as an Age Biomarker to Determine Age Structure of Ghost Shrimp (*Neotrypaea californiensis*) Populations in West Coast Estuaries. Thesis Oregon State University. **p.:** 92.
- BROWN DL, VAN WETTERE AJ, CULLEN JM (2017). Hepatobiliary System and Exocrine Pancreas. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. (6th Ed.). Ed.: Zachary JF. Chapter 8.

- BUDOWLE B, GAROFANO P, HELLMAN A, KETCHUM M, KANTHASWAMY S, PARSON W, VAN HAERINGEN W, FAIN S, BROAD T (2005). Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *Int J Legal Med*, **119**: 295-302.
- BUREŠ D, BARTOŇ L (2012). Growth performance, carcass traits and meat quality of bulls and heifers slaughtered at different ages. *Czech J. Anim. Sci.*, **57**: 34-43.
- BUSKIRK D, SCHWEIHOFFER J (2013). Quality, tenderness, and value of beef from heifers versus steers. *MSU Extension*.
- CHECA ML, DUNNER S, CANON J (2002). Prediction of X and Y chromosome content in bovine sperm by using DNA pools through capillary electrophoresis. *Theriogenology*, **58**: 1579-86.
- CHO S, HWANG ES (2011). Fluorescence-Based Detection and Quantification of Features of Cellular Senescence. *Methods Cell Biology* (Volume: 103). Ed.: Z Darzynkiewicz, E Holden, A Orfao, W Telford, D Wlodkowic. Chapter 7.
- CHOI BH, AHN BJ, KOOK K, SUN SS, MYUNG KH, MOON SJ, KIM JH (2002). Effects of feeding patterns and sexes on growth rate, carcass trait and grade in Korean native cattle. *Asian Austral J. Anim., Sci.*, **15**: 838-843.
- CHOUDHURY KR, YAGLE KJ, SWANSON PE, KROHN KA, RAJENDRAN JG (2010). A Robust Automated Measure of Average Antibody Staining in Immunohistochemistry Images. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, **58**: 95-107.
- CLOKEY GV, JACOBSON LA (1986). The autofluorescent "lipofuscin granules" in the intestinal cells of *Caenorhabditis elegans* are secondary lysosomes. *Mech Ageing Dev.*, **35**: 79-94.
- CRAIGIE CR (2012). An Investigation Into The Use of Video Image Analysis (VIA) and Visible-Near Infrared (NIR) Spectroscopy For Carcase Evaluation. PhD Thesis. Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- CUERVO AM, BERGAMINI E, BRUNK UT, DROGE W, FFRENCH M, TERMAN A (2005). Autophagy and aging: The importance of maintaining "Clean" cells. *Autophagy*, **1**: 131-140.
- CURI RA, MOTA LSL, AMARANTE MRV, LOPES CR (2002). Bovine carcass sexing by PCR method. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, **39**: 147-148.
- DAZA A, REY AI, LOPEZ-CARRASCO C, LOPEZ-BOTE CJ (2014). Effect of gender on growth performance, carcass characteristics and meat and fat quality of calves of Avileña-Negra Ibérica breed fattened under free-range conditions. *Span J Agric Res*, **12**: 683-693.
- DE-BIASE D, COSTAGLIOLA A, PAGANO TB, PIEGARI G, WOJCIK S, DZIEWIATKOWSKI J, GRIECO E, MATTACE RASO G, RUSSO V, PAPPARELLA S, PACIELLO O (2017). Amyloid precursor protein, lipofuscin accumulation and expression of autophagy markers in aged bovine brain. *BMC Vet Res.*, **13**: 102.
- DE PAOLI-ISEPPI R, DEAGLE BE, MCMAHON CR, HINDELL MA, DICKINSON JL, JARMAN SN (2017). Measuring animal age with dna methylation: from humans to wild animals. *Front. Genet.*, **8**: 106.
- Department of Agriculture, Food and the Marine (2019a). EU Beef Carcass Classification Scheme. Erişim: [<https://www.agriculture.gov.ie/farmingsectors/beef/eubeefcarcassclassification/scheme/>]  
Erişim Tarihi: 13.09.2019

- Department of Agriculture, Food and the Marine (2019b). Labelling of Beef.  
Erişim: [<https://www.agriculture.gov.ie/farmingsectors/beef/labellingofbeef/>]  
Erişim Tarihi: 06.08.2019
- DOCCHIO F, BOULTON M, CUBEDDU R, RAMPONI R, BARKER PD (1991). Age-related changes in the fluorescence of melanin and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium: a time-resolved fluorescence spectroscopy study. *Photochem Photobiol.*, **54**: 247-53.
- DOLMAN CL, MACLEOD PM (1981). Lipofuscin and Its Relation to Aging. *Advances in Cellular Neurobiology* (Volume 2). Ed.: Fedoroff S, Hertz L. Section 2.
- DOUBLEDAY ZA, SEMMENS JM (2011). Quantification of the age-pigment lipofuscin in known-age octopus (*Octopus pallidus*): A potential tool for age determination. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **397**: 8-12.
- EATON MJ, LINK WA (2011). Estimating age from recapture data: integrating incremental growth measures with ancillary data to infer age-at-length. *Ecological Applications*, **21**: 2487-2497.
- EIPEL M, MAYER F, ARENT T, FERREIRA MRP, BIRKHOFFER C, GERSTENMAIER U, COSTA IG, RITZ-TIMME S, WAGNER W (2016). Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures. *AGING*, **8**: 1034-48.
- ENNIS S, GALLAGHER TF (1994). PCR-based sexdetermination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics*, **25**: 425-427.
- ERGÜN A, TUNCER ŞD, ÇOLPAN İ, GÜLTEKİN Y, KÜÇÜKERSAN S, SAÇAKLI P, TUNCER DŞ, YALÇIN S, KÜÇÜKERSAN MK, ŞEHU A (2011). Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. 5. Baskı. s.: 1-755.
- Et ve Süt Kurumu (29 Temmuz 2019). “Hayvan Alım Fiyat Listesi”.  
Erişim: [<https://www.esk.gov.tr/tr/11931/Alim-Fiyatları>]  
Erişim Tarihi:14.09.2019
- European Commission (2002). Commission regulation on the collection of samples and the adoption of certain detailed rules in connection with physical checks on boneless beef cuts qualifying for export refunds. *Official Journal of the European Communities*, **765(L117)**: 6-9.
- FENG FK, E LL, KONG XP, WANG DS, LIU HC (2015). Lipofuscin in saliva and plasma and its association with age in healthy adults. *Aging Clin Exp Res.*, **27**: 573-80.
- FONTANESI L, SCOTTI E, RUSSO V (2008). Differences of the porcine amelogenin X and chromosome genes (*AMELX* and *AMELY*) and their application for sex determination in pigs. *Mol Reprod Dev*; **75**: 1662-8.
- FRICKH JJ, STEINWIDDER A, BAUMUNG R (2002). Effect of ration, sex and slaughter weight on meat quality of Simmental cattle. *Zuchtungskunde*, **74**: 362-375.
- FRICKH JJ, STEINWIDDER A, BAUMUNG R (2003). Effect of ration, sex and slaughter weight on meat quality of Simmental cattle. *Zuchtungskunde*, **75**: 16-30.
- GARAGNANI P, BACALINI MG, PIRAZZINI C, GORI D, GIULIANI C, MARI D, DI BLASIO AM, GENTILINI D, VITALE G, COLLINO S, REZZI S, CASTELLANI G, CAPRI M, SALVIOLI S, FRANCESCHI C (2012). Methylation of *ELOVL2* gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell*, **11**: 1132-1134.

- GARIGAN D, HSU A-L, FRASER AG, KAMATH RS, AHRINGER J, KENYON C (2002). Genetic Analysis of Tissue Aging in *Caenorhabditis elegans*: A Role for Heat-Shock Factor and Bacterial Proliferation. *Genetics*, **161**: 1101-1112.
- GENEIOUS (2018). Geneious® 11.1.5 (Restricted). Java Version 1.8.0\_162-b12 (64 bit). Biomatters, Ltd.
- GOKULAKRISHNAN P, KUMAR RR, SHARMA BD, MENDIRATTA SK, SHARMA D (2012). Sex determination of cattle meat by polymerase chain reaction amplification of the DEAD box protein (*DDX3X/DDX3Y*) Gene. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, **25**: 733-737.
- GOKULAKRISHNAN P, KUMAR RR, SHARMA BD, MENDIRATTA SK, MALAV O, SHARMA D (2015). Determination of sex origin of meat and meat products on the DNA basis: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **55**: 1303-1314.
- GORDILLO VY (2005). Quantitative study of lipofuscin in brains of penaeid crustaceans by fluorescence microscopy: application to age determination in wild animals *Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846) and *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) and cultured animals *Marsupenaeus japonicus* (Bate, 1888). Tesis Doctorales - Instituto Español de Oceanografía (España).
- GÜLER C, BALCI-PEYNİRCİOĞLU B (2016). DNA metilasyonu ve hastalıklarla ilişkisi. *ACU Sağlık Bil Derg.*, **2**: 61-68.
- Gümüşhane İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü (24 Mart 2014). “Damızlık Hayvan Kesimi”  
Erişim: [<https://gumushane.tarim.gov.tr/Haber/9/damizlik-hayvan-kesimi>]  
Erişim Tarihi: 05.04.2018
- GÜN H, DEMİRBAĞ E, ÇINAR K (2011). Farklı fiksatiflerin bazı dokular için uygunluğunun belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **15**: 75-79.
- GÜNDOĞDU O (12.11.2019). Yem fiyatı uçuyor, süt para etmiyor, borç gırtlakta: İnekler kesimhanede.  
Erişim: [<https://www.birgun.net/haber/yem-fiyati-ucuyor-sut-para-etmiyor-borc-girtlakta-inekler-kesimhanede-276124>]  
Erişim Tarihi: 28.11.2019
- HAMEED KA, BANUMATHI A, ULAGANATHAN G (2015). Performance evaluation of maximal separation techniques in immunohistochemical scoring of tissue images. *Micron*, **79**: 29-35.
- HANNOVER A (1842). Mikroskopiske undersogelser af nervesystemet. *Kgl. Danske Vidensk. Kabernes Selskobs Naturv. Math. Afh. (Copenhagen)*, **10**: 1-112.
- HANZELKOVÁ Š, SIMEONOVÁ J, HAMPEL D, DUFEK A, ŠUBRT J (2011). The effect of breed, sex and aging time on tenderness of beef meat. *Acta Vet. Brno*, **80**: 191-196.
- HOOTEN-NOREN N, ABDELMOHSEN K, GOROSPE M, EJOGU N, ZONDERMAN AB, EVANS MK (2010). microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS ONE*, **5**: e10724.
- HOOTEN-NOREN N, FITZPATRICK M, WOOD WH RD, DE S, EJOGU N, ZHANG Y, MATTISON JA, BECKER KG, ZONDERMAN AB, EVANS MK (2013). Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging*, **5**: 725-740.
- HUANG Y, YAN J, HOU J, FU X, LI L, HOU Y (2015). Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. *Forensic Sci Int Genet.*, **17**: 129-136.



- JAHNS H, FAST C (2014). A histopathological study of bovine ganglia. *J. Comp. Path.*, **150**: 234e244.
- JARMAN SN, POLANOWSKI AM, FAUX CE, ROBBINS J, DE PAOLI-ISEPPI R, BRAVINGTON M, DEAGLE BE (2015). Molecular biomarkers for chronological age in animal ecology. *Molecular Ecology*, **24**: 4826-4847.
- JONES PA (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, **13**: 484-92.
- JOLLY RD, DOUGLAS BV, DAVEY PM, ROIRI JE (1995). Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment. *Gerontology*, **41**: 283-96.
- JUNG T, HOHN A, GRUNE T (2010). Lipofuscin: Detection and Quantification by Microscopic Techniques. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*. (Volume 594). Ed.: Armstrong D. **p.**: 173-193.
- KALLEM B (2015). Bir Kesimhanede Kesimi Yapılan Kasaplık Büyük Baş (Sığır) Hayvanların Temizlikleri İle Karkasların Mikrobiyel Kontaminasyon Düzeyleri Arasındaki Etkileşimin Belirlenmesi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Yüksek Lisans Tezi. **s.**: 6.
- KARADAYI B, KAYA A, KOÇ H, VARLIK E, OZASLAN A (2014). Sex determination by using hand and wrist measurements in Turkish population. *J For Med*, **28**: 132-40.
- KARAKUŞ K (2011). Türkiye'nin canlı hayvan ve kırmızı et ithaline genel bir bakış. *Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.*, **1**: 75-79.
- KING I (2011). Hand Book of Australian Meat (İntrnational Red Meat Manual), Industry programs (7th Ed.). Australia: AUSMEAT limited. **p.**: 14.
- KIRKPATRICK BW, MONSON RL (1993). Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *Reproduction*, **98**: 335-340.
- KOCH CM, WAGNER W (2011). Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging (Albany NY)*, **3**: 1018-1027.
- KOPUZLU S, ESENBUGA N, ONENC A, MACİT M, YANAR M, YUKSEL S, OZLUTURK A, UNLU N (2108). Effects of slaughter age and muscle type on meat quality characteristics of Eastern Anatolian Red bulls. *Arch. Anim. Breed.*, **61**: 497-504.
- LANGEN M, PETERS U, KORNER U, GISSEL C, STANISLAWSKI D, KLEIN G (2010). Semiquantitative detection of male pork tissue in meat and meat products by PCR. *Meat Science*, **86**: 821-824.
- LAZZARONI C, BIAGINI D (2008). Effect of pre- and post-pubertal castration on Piemontese male cattle. II: Carcass measures and meat yield. *Meat Sci.*, **80**: 422-448.
- LI J, YAO K, YU X, DONG X, GAN L, LUO C, WU Y (2013) Identification of a novel lipofuscin pigment (iisoA2E) in retina and its effects in the retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem.*, **288**: 35671-82.
- LI L, TIAN W, ZAN L (2011a). Effects of age on quality of beef from Qinchuan cattle carcass. *Agricultural Sciences in China*, **10**: 1765-1771.
- LI X, KHANNA A, LI N, WANG E (2011b). Circulatory miR-34a as an RNA-based, noninvasive biomarker for brain aging. *Aging*, **3**: 985-1002.

- LITWINCZUK Z, FLOREK M, PIETRASZEK K (2006). Physico-chemical quality of meat from heifers and young bulls of the Black-and-White (BW) variety of Polish Holstein-Friesian breed, and commercial BW crossbreds sired by Limousine and Charolaise bulls. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, **24**: 179-186.
- LIU X, YANG YY, WANG XM, LIU ZS, WANG ZH, DING YZ (2015). Sex identification based on AMEL gene PCR amplification from blue sheep (*Pseudois nayaur*) fecal DNA samples. *Genet. Mol. Res.*, **14**: 9045-9052.
- MAEGAWA S, HINKAL G, KIM HS, SHEN L, ZHANG L, ZHANG J, ZHANG N, LIANG S, DONEHOWER LA, ISSA JP (2010). Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res.*, **20**: 332-40.
- Malatya İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü (26 Aralık 2017). “Damızlık Dişi Hayvan Kesim Yasağı Bilgilendirme Toplantısı”.  
Erişim:[<https://malatya.tarim.gov.tr/Haber/434/Damizlik-Disi-Hayvan-Kesim-Yasagi-Bilgilen-dirme-Toplantisi>]  
Erişim Tarihi: 05.04.2018
- MASUYAMA K, SHOJO H, NAKANISHI H, INOKUCHI S, ADACHI N (2017). Sex Determination from fragmented and degenerated dna by amplified product-length polymorphism bidirectional SNP analysis of Amelogenin and SRY genes. *PLoS ONE*, **12**: e0169348.
- MAWLOOD SK, DENNANY L, WATSON N, DEMPSTER J, PICKARD BS (2016). Quantification of global mitochondrial DNA methylation levels and inverse correlation with age at two CpG sites. *Aging (Albany NY)*, **8**: 636-41.
- MCLNTYRE BL, TUDOR GD, READ D, SMART W, DELLA-BOSCA TJ, SPEIJER EJ, ORCHARD B (2009). Effects of growth path, sire type, calving time and sex on growth and carcass characteristics of beef cattle in the agricultural area of Western Australia. *Anim. Repord. Sci.*, **49**: 504-514.
- MONALI C, PRITAM P, TAPAN M, KAJAL D (2011). Gender determination: a view of forensic odontologist. *Indian Journal of Forensic Medicine and Pathology*, **4**: 147-151.
- MORIKAWA T, YAMAMOTOA Y, MIYAISHI S (2011). A new method for sex determination based on detection of SRY, STS and Amelogenin gene regions with simultaneous amplification of their homologous sequences by a multiplex PCR. *Acta Med. Okayama*, **65**: 113-122.
- MOSS B, FEARON A, WHITWORTH M, CHAU A, TOLLAND E, TOLLERTON E, DEVLIN D, GORDON A, MATTHEWS K (2013). Meat quality of bulls, heifers and steers sampled at a commercial abattoir. BSAS.  
Erişim: [<https://old.bsas.org.uk/articles/animal-bytes/meat-quality-from-bulls-steers-and-heifers>]  
Erişim Tarihi: 03.09.2019
- NAGARE SP, CHAUDHARI RS, BIRANGANE RS, PARKARW PC (2018). Sex determination in forensic identification, a review. *J Forensic Dent Sci.*, **10**: 61-66.
- NAKANISHI H, SHOJO H, OHMORI T, HARA M, TAKADA A, ADACHI N, SAITO K (2015). A novel method for sex determination by detecting the number of X chromosomes. *Int J Legal Med.*, **129**: 23-29.

- NOGALSKI Z, POGORZELSKA-PRZYBYŁEK P, SOBCZUK-SZUL M, NOGALSKA A, MODZELEWSKA-KAPITUŁA M, PURWIN C (2018). Carcass characteristics and meat quality of bulls and steers slaughtered at two different ages. *Italian Journal of Animal Science*, **17**: 279-288.
- OKUYAMA MW, SHIMOZURU M, TSUBOTA T (2014). A genetic method for sex identification of raccoons (*Procyon lotor*) with using the ZFX and ZFY Genes. *J. Vet. Med. Sci.*, **76**: 773-775.
- ONOGI A, SASAKI S, KOBAYASHI M, OGINO A, NOZAKI T, KUROGI K, YASUMORI T, TOGASHI K, IWATA H (2017). A genetic analysis of meat compositions in Japanese Black cattle: Genetic parameters and sex influence. *J Anim Breed Genet.*, **134**: 373-382.
- OTTIS P, KOPPE K, ONISKO B, DYNIN I, ARZBERGER T, KRETZSCHMAR H, REQUENA JR, SILVA CJ, HUSTON JP, KORTH C (2012). Human and rat brain lipofuscin proteome. *Proteomics*, **12**: 2445-2454.
- PANJONO-KANG SM, LEE IS, LEE SK (2009). Carcass characteristics of Hanwoo (Korean cattle) from different sex conditions, raising altitudes and slaughter seasons. *Livest. Sci.*, **123**: 283-287.
- PARATI K, BONGIONI G, ALEANDRI R, GALLI A (2006). Sex ratio determination in bovine semen: a new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology*, **66**: 2202-9.
- PEACHEY BM, PURCHAS RW, DUIZER LM (2002). Relationships between sensory and objective measures of meat tenderness of beef *M. longissimus* thoracis from bulls and steers. *Meat Sci.*, **60**: 211-218.
- PESONEN M, HUUSKONEN A (2015). Production, carcass characteristics and valuable cuts of beef breed bulls and heifers in Finnish beef cattle population. *Agricultural and food science*, **24**: 164-172.
- PINCUS Z, SMITH-VIKOS T, SLACK FJ (2011). MicroRNA predictors of longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*, **7**: e1002306.
- POLANOWSKI AM, ROBBINS J, CHANDLER D, JARMAN SN (2014). Epigenetic estimation of age in humpback whales. *Molecular Ecology Resources*, **14**: 976-987.
- POLKINGHORNE RJ, THOMPSON JM (2010). Meat standards and grading a world view. *Meat Science*, **86**: 227-235.
- PUCKETT BJ, SECOR DH, JU S-J (2008). Validation and application of lipofuscin-based age determination for Chesapeake Bay Blue Crabs *Callinectes sapidus*. *Transactions of the American Fisheries Society*, **137**: 1637-1649.
- PURCHAS RW, BURNHAM DL, MORRIS ST (2002). Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers. *J. Anim. Sci.*, **80**: 3211-3221.
- RAINES CR, DIKEMAN ME, UNRUH JA, HUNT MC, KNOCK RC (2008). Predicting cattle age from eye lens weight and nitrogen content, dentition, and United States Department of Agriculture maturity score. *J. Anim. Sci.*, **86**: 3557-3567.
- Resmî Gazete (29 Aralık 2011). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Türk Gıda Kodeksi Etiketleme Yönetmeliği.  
Erişim: [<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-7.htm>]  
Erişim Tarihi: 14.09.2019

- Resmî Gazete (21 Haziran 2017). Başbakanlık (Diyanet İşleri Başkanlığı). “2017 Yılı Kurban Hizmetlerinin Uygulanmasına Dair Tebliğ”.  
Erişim: [<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2017/06/20170621-11.htm>]  
Erişim Tarihi: 14.09.2019
- Resmî Gazete (19 Haziran 2018). Başbakanlık (Diyanet İşleri Başkanlığı). “2018 Yılı Kurban Hizmetlerinin Uygulanmasına Dair Tebliğ”.  
Erişim: [<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2018/06/20180619-3.htm>].  
Erişim Tarihi: 15.09.2019
- Resmî Gazete (29 Ocak 2019). Tarım ve Orman Bakanlığı. Türk Gıda Kodeksi Et, Hazırlanmış Et Karışımları ve Et Ürünleri Tebliği (Tebliğ No: 2018/52).  
Erişim: [<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/01/20190129-4.htm>]  
Erişim Tarihi: 14.09.2019
- RITCHIE H (2019). En çok hangi ülkelerde et yeniyor?. BBC News.  
Erişim: [<https://www.bbc.com/turkce/haberler-dunya-47111856>].  
Erişim Tarihi: 13.09.2019
- RITCHIE H, ROSER M (2019). Meat and Dairy Production. Daily meat consumption per person, 2013.  
Erişim: [<https://ourworldindata.org/grapher/daily-meat-consumption-per-person?tab=chart&time=1961.2013&country=TUR>].  
Erişim Tarihi: 7.11.2019
- SAKARYA E, ÇEVİRİMLİ MB, ARIKAN MS (2014). Rapor (Kasaplık hayvanlarda karkas sınıflandırma ve derecelendirmenin önemi ve gelişimi). *Borsavizyon*, **104**: 34-43.
- SAMORAJSKI T, ORDY JM, KEEFE JR (1965). The fine structure of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice. *The Journal of Cell Biology*, **26**: 779-795.
- SCHONENBRUCHER H, ADHIKARY R, MUKHERJEE P, CASEY TA, RASMUSSEN MA, MAISTROVICH FD, HAMIR AN, KEHRLI ME Jr, RICHT JA, PETRICH JW (2008). Fluorescence-based method, exploiting lipofuscin, for real-time detection of central nervous system tissues on bovine carcasses. *J Agric Food Chem.*, **56**: 6220-6.
- SCHREURS NM, GARCIA F, JURIE C, AGABRIEL J, MICOL D, BAUCHART D, LISTRAT A, PICARD B (2008). Meta-analysis of the effect of animal maturity on muscle characteristics in different muscles, breeds, and sexes of cattle. *J. Anim. Sci.*, **86**: 2872-2887.
- SHACKELL GH, DODDS KG (2008). DNA-Based Traceability of Meat. Meat Biotechnology. (Chapter 3). Ed.: Toldra F, Prague: Springer.
- SHAW CN, WILSON PJ, WHITE BN (2003). A reliable molecular method of gender determination for mammals. *Journal of Mammalogy*, **84**: 123-128.
- STRYDOM PE (2011). Quality related principles of the South African beef classification system in relation to grading and classification systems of the world. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, **41**: 177-193.
- SITTE N, MERKER K, GRUNE T, VON ZGLINICK T (2001). Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts in vitro: an indicator of oxidative stress. *Experimental Gerontology*, **36**: 475-486.
- ŞEKER İ, KÖSEMAN A, ŞEKER P, BAYKALIR Y (2017). Sığır karkaslarının kalite değerlendirmesinde Amerika Birleşik Devletleri’nde kullanılan karkas derecelendirme sistemi. *Akademik Gıda*, **15**: 192-203.

- Tarım ve Orman Bakanlığı-TAGEM (2018). Süt Sektör Politika Belgesi 2018-2022.  
Erişim: [<https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/S%C3%BCt%20Sekt%C3%B6r%20Politika%20Belgesi%202018-2022.pdf>]  
Erişim Tarihi: 01.11.2019
- TATARIUNAS AB, ORLOV NIA, KARNAUKHOV VN (1987). Isolation of lipofuscin from the bovine myocardium. *Biull Eksp Biol Med.*, **103**: 543-6.
- TERMAN A, BRUNK UT (1998). Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS*, **106**: 265-76.
- Türkiye İstatistik Kurumu (2018). “Hayvancılık İstatistikleri”  
Erişim: [<https://biruni.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul>].  
Erişim tarihi:12.04.18
- Türkiye İstatistik Kurumu (2019). “Hayvancılık İstatistikleri”  
Erişim: [<https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=79&locale=tr>].  
Erişim Tarihi:15.11.2019
- Türkiye Tohum Birliği (2018). Dişi hayvan kesimi azaldı.  
Erişim: [<https://www.turktob.org.tr/tr/disi-hayvan-kesimleri-azaldi/25309>]  
Erişim Tarihi: 30.11.2019
- UĞUR A (2018). Malatya süt sektörü raporu. *Malatya Ticaret Borsası*, 1-44.
- ÜNLÜTÜRK Ö, İŞCAN MY (2013). Tanınabilir vertebralardan cinsiyet tayini. *Adli Tıp Bülteni*, **18**: 4-13.
- VELİK M, STEINWIDDER A, FRICKH JJ, IBI G, KOLBE-ROMER A (2008). Effect of ration, sex and breed on carcass performance and meat quality of cattle from suckler cow systems. *Zuchtungskunde*, **80**: 378-388.
- VENKATA-REDDY B, SIVAKUMAR AS, JEONG DW, WOO YB, PARK SJ, LEE SY, BYUN JY, KIM CH, CHO SH, HWANG I (2015). Beef quality traits of heifer in comparison with steer, bull and cow at various feeding environments. *Anim Sci J.*, **86**: 1-16.
- WEIKARD R, PITRA C, KUHN C (2006). Amelogenin cross-amplification in the family bovidae and its application for sex determination. *Molecular Reproduction And Development*, **73**: 1333-1337.
- WU CX, WEI XB (2006). Influence of effective parts of zingiber officinale on senium of rats resulting from high fat die. *J Shandong Med Coll*, **3**: 010.
- YILDIRIM AE (02 Mart 2016). Tarım Bakanlığı 'süt ineği kesmeyin' talimatı verdi.  
Erişim: [<https://www.dunya.com/ekonomi/tarim-bakanligi-039sut-inegi-kesmeyin039-talimati-verdi-haberi-309435>]  
Erişim Tarihi: 28.11.2019
- ZBIEĆ-PIEKARSKA R, SPÓLNICKA M, KUPIEC T, PARYS-PROSZEK A, MAKOWSKA Ż, PAŁECZKA A, KUCHARCZYK K, PŁOSKI R, BRANICKI W (2015). Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet.*, **17**: 173-179.
- ZELENY R, SCHIMMEL H (2002). Sexing of beef - a survey of possible methods. *Meat Science*, **60**: 69-75.
- ZEYFEOĞLU Y, HANCI İH (2001). İnsanlarda kimlik tespiti. *STED*, **10**: 375-377.

ZHANG Y-Y, ZAN L-S, WANG H-B, XIN Y-P, ADOLIGBE CM, UJAN JA (2010). Effect of sex on meat quality characteristics of Qinchuan cattle. *African Journal of Biotechnology*, **9**: 4504-4509.

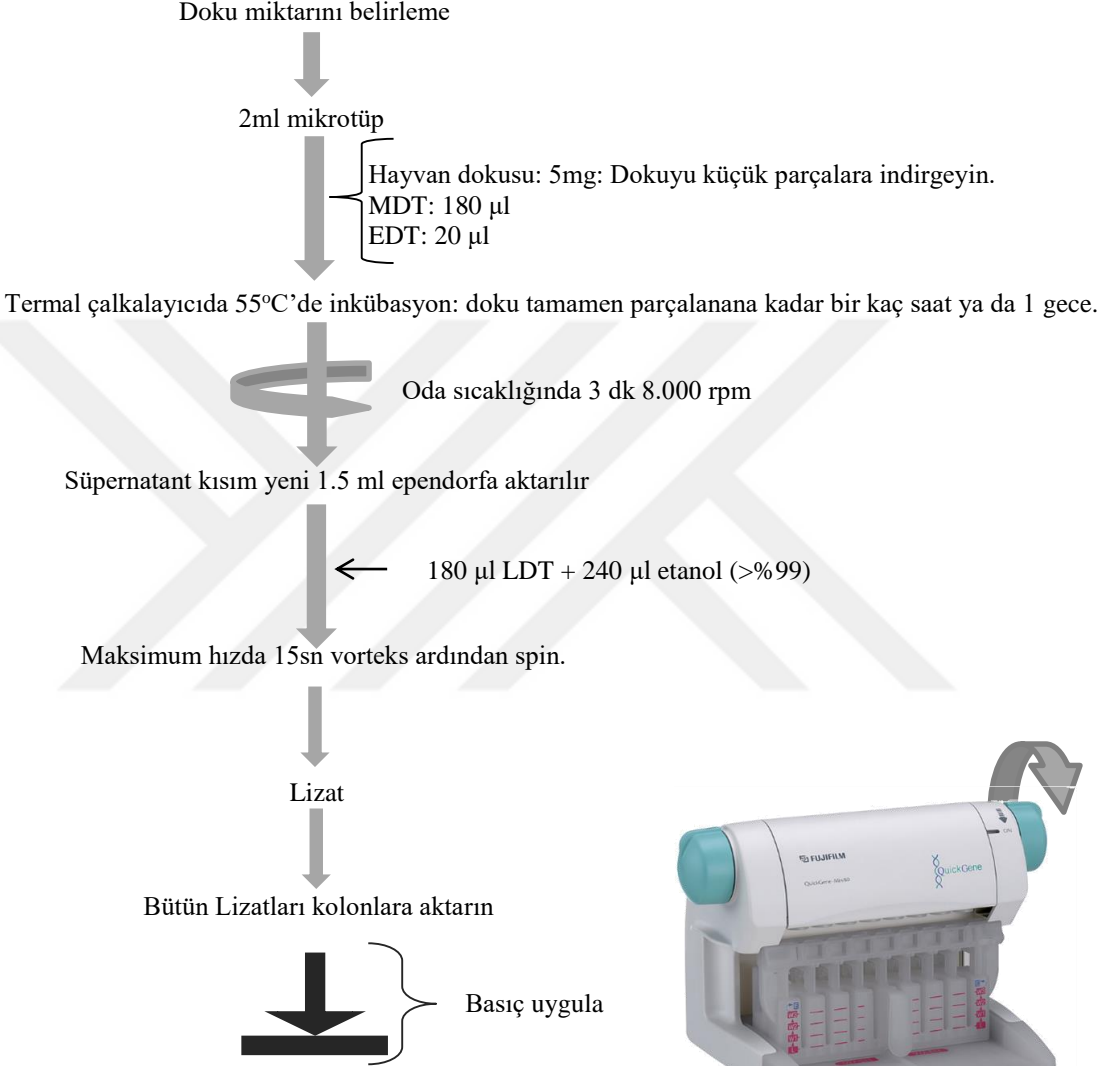
ZUBAKOV D, LIU F, VAN ZELM MC, VERMEULEN J, OOSTRA BA, VAN DUIJN CM, DRIESSEN GJ, VAN DONGEN JJ, KAYSE RM, LANGERAK AW (2010). Estimating human age from T-cell DNA rearrangements. *Curr. Biol.*, **20**: R970-1.

ZUBAKOV D, LIU F, KOKMEIJER I, CHOI Y, VAN MEURS JBJ, VAN IJCKEN WFJ, UITTERLINDEN AG, HOFMAN A, BROER L, VAN DUIJN CM, LEWIN J, KAYSER M (2016). Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Science International: Genetics*, **24**: 33-43.



## EKLER

### Ek-1. DNA İzolasyon Protokolü

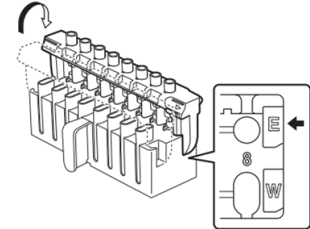


Kolonlara sıralı olarak;

1. 3'er kez WDT (750µl) eklenir, her solüsyon eklemenin ardından basınç uygulanır,

Kolonlar elüsyon pozisyonuna (E) alınır.

2. 50 µl CDT eklenir, oda sıcaklığında 90sn bekletildikten sonra basınç uygulanarak genomik DNA ependorf tüplerine aktarılır ("QuickGene DNA tissue kit S (DT-S) – FUJIFILM" den uyarlanmıştır)



**EK-2. *Musculus longissimus dorsi* ve *Musculus biceps femoris* Enine ve Boyuna Kesitlerini İçeren Lipofuskin Floresans Skorlama Listesi**

Bilinen Yaş	Numune Kodu	Yaygınlık	Boyanma Şiddeti	Toplam	Hayvan Kodu	Yaygınlık	Boyanma Şiddeti	Toplam
17- 18 ay	ak 1-1	0	0	0	ak 1-2	1	1	2
	ak 2-1	1	1	2	ak 2-2	Otoliz		-
	ak 3-1	0	0	0	ak 3-2	1	1	2
	ak 4-1	Otoliz		-	ak 4-2	Otoliz		-
	ak 5-1	0	0	0	ak 5-2	Otoliz		-
	ak 6-1	1	1	2	ak 6-2	Otoliz		-
	ak 7-1	2	2	4	ak 7-2	0	0	0
	ak 8-1	0	0	0	ak 8-2	Otoliz		-
	ak 9-1	0	0	0	ak 9-2	Otoliz		-
	ak 10-1	0	0	0	ak 10-2	Otoliz		-
	18-19 ay	A 1-1	0	0	0	A 1-2	0	0
A 2-1		0	0	0	A 2-2	1	1	2
A 3-1		0	0	0	A 3-2	1	1	2
A 4-1		0	0	0	A 4-2	Otoliz		-
A 5-1		0	0	0	A 5-2	0	0	0
A 6-1		0	0	0	A 6-2	0	0	0
A 7-1		0	0	0	A 7-2	0	0	0
A 8-1		0	0	0	A 8-2	0	0	0
A 9-1		0	0	0	A 9-2	0	0	0
A 10-1		0	0	0	A 10-2	0	0	0
25-26 ay	D 1-2	1	1	2	D 1-1	0	0	0
	D 2-2	0	0	0	D 2-1	0	0	0
	D 3-2	0	0	0	D 3-1	1	1	2
	D 4-2	1	1	2	D 4-1	0	0	0
	D 5-2	0	0	0	D 5-1	1	1	2
	D 6-2	0	0	0	D 6-1	0	0	0
	D 7-2	0	0	0	D 7-1	0	0	0
	D 8-2	0	0	0	D 8-1	1	1	2
	D 9-2	0	0	0	D 9-1	1	1	2
	D 10-2	2	2	4	D 10-1	0	0	0
3-4 yaş	B 1-1	0	0	0	B 1-2	1	1	2
	B 2-1	1	1	2	B 2-2	1	1	2
3 yaş	B 5-1	2	1	3	B 5-2	3	2	5
4 yaş	B 7-1	3	2	5	B 7-2	2	1	3
5 yaş	B 4-1	3	2	5	B 4-2	1	2	3
6 yaş	B 3-1	2	1	3	B 3-2	1	2	3
11 yaş	B 6-1	2	3	5	B 6-2	2	3	5
2009-10-11-13-14 doğum	C 1-2	3	3	6	C 1-1	1	1	2
	C 2-2	1	2	3	C 2-1	0	0	0
	C 3-2	4	3	7	C 3-1	2	1	3
	C 4-2	2	1	3	C 4-1	0	0	0
	C 5-2	1	1	2	C 5-1	0	0	0
	C 6-2	1	1	2	C 6-1	1	1	2
	C 7-2	2	1	3	C 7-1	0	0	0
	C 8-2	3	2	5	C 8-1	0	0	0
	C 9-2	1	3	4	C 9-1	0	0	0
	C 10-2	2	1	3	C 10-1	0	0	0



Ek-2. Devam.

Bilinen Yaş	Numune Kodu	Yaygınlık	Boyanma Şiddeti	Toplam	Hayvan Kodu	Yaygınlık	Boyanma Şiddeti	Toplam
2007-10-11-13-14-15-16 doğum	E 1-2	1	2	3	E 1-1	2	1	3
	E 2-2	3	1	4	E 2-1	3	2	5
	E 3-2	3	2	5	E 3-1	2	1	3
	E 4-2	2	1	3	E 4-1	3	2	5
	E 5-2	2	3	5	E 5-1	2	2	4
	E 6-2	0	0	0	E 6-1	4	2	6
	E 7-2	1	1	2	E 7-1	3	1	4
	E 8-2	1	1	2	E 8-1	4	2	6
	E 9-2	2	1	3	E 9-1	4	1	5
	E 10-2	1	3	4	E 10-1	4	3	7
	E 11-2	3	2	5	E 11-1	3	3	6
	E 12-2	1	2	3	E 12-1	3	2	5
	E 13-2	1	2	3	E 13-1	Otoliz		-
	E 14-2	3	1	4	E 14-1	5	3	8
	E 15-2	2	2	4	E 15-1	4	2	6
	E 16-2	3	2	5	E 16-1	3	3	6
	E 17-2	4	3	7	E 17-1	2	2	4
	E 18-2	1	1	2	E 18-1	3	3	6
	E 19-2	4	2	6	E 19-1	2	1	3
	E 20-2	3	1	4	E 20-1	2	2	4

### Ek-3. Kullanılan Solüsyonların İçerikleri ve Hazırlanışları

<b>5X TBE Buffer:</b>	(500ml)
445mM Tris Base	27gr
445mM Borik Asit	13,7gr
10mM EDTA	10ml

#### **0,5M EDTA ( 1L )**

186.1gr EDTANa<sub>2</sub>  
800ml dH<sub>2</sub>O  
NaOH kullanılarak pH 8,0'e ayarlanır.  
dH<sub>2</sub>O ile 1L'ye tamamlanır.

#### **Tuz/EDTA solusyonu:**

75mM NaCl  
25mM EDTA

# ÖZGEÇMİŞ

## I- Bireysel Bilgiler

Adı	Büşra
Soyadı	CUMHUR
Doğum yeri ve tarihi	Akçakoca 1989
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu	Bekar
İletişim adresi ve telefonu	Ankara 0 532 069 81 86

## II- Eğitimi

Yüksek lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik (Tezli)
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
Lise	Akçakoca Anadolu Lisesi
İlköğretim	Atatürk İlköğretim Okulu

## III- Ünvanları

Uzman Biyolog

## IV- Bilimsel Etkinlikleri

- Çeşitli Fakülte Seminerleri
- Ulusal ve Uluslararası Çeşitli Kongreler Poster Sunumu
- Ulusal ve Uluslararası Çeşitli Sempozyumlar
- Ulusal Çeşitli Toplantılar

## V- Diğer Bilgiler

- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
- Klinik Destek Elemanlığı
- Tübitak-4004-Eğitimi
- Tübitak-2229-Eğitimi
- Adli Eczacılık Eğitimi