T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu

ÇEVRESEL ŞARTLARA MARUZ KALMIŞ KAN LEKELERİNİN MİRNA BİYOBELİRTEÇLERİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG NİLAY LERZAN DALKIRAN

İSTANBUL, 2022

Bu tez projesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 36197

ÖNSÖZ

Yıllar boyunca ciddi bir emek ve özveri ile hazırladığım yüksek lisans tezimi tamamlamanın heyecanı ve gururunu yaşıyorum.

Hem ders dönemimde hem de tez dönemimde üzerimde tarifsiz emeği olan, çıkmaza düştüğümde yol gösteren ve yoluma ışık olan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Emel Hülya YÜKSELOĞLU'na sonsuz teşekkür ediyorum.

Tezimin son şeklini almasında çok büyük emeği olan, her tökezlediğimde elimden tutan kıymetli hocam Dr. Öğretim Üyesi Bahadır ERCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimin istatistiksel analizi için Prof. Dr. Hafize Sezer'e teşekkür ediyorum.

Tezimin şekillenmesinde emeği olan Öğretim Görevlisi Dr. Fatma ÇAVUŞ YONAR'a ve tez dönemim boyunca desteğini her zaman yanımda hissettiğim, özellikle savunma sınavına hazırlanmamda üzerimde emeği olan Öğretim Görevlisi Dr. Ömer KARATAŞ'a teşekkür ediyorum.

Tezimde gönüllü olarak emeği geçen tüm arkadaşlarıma özverileri ve benden desteklerini esirgemedikleri için çok teşekkür ediyorum.

Ve tüm bu süreç boyunca bütün zorlukları birlikte göğüslediğimiz yol arkadaşım Remziye ATALAY'a destekleri için teşekkür ediyor, hayatta başarılarının devamını diliyorum.

Tüm hayatım boyunca yaşadığım zorluklarda ve aldığım tüm kararlarda yanımda olan, aldığım kararları her zaman destekleyen, sadece bu çalışma sürecinde değil tüm hayatım boyunca beni cesaretlendiren ve moral veren aileme; sevgili annem Meral DALKIRAN, sevgili babam Güray DALKIRAN ve kardeşlerim Eray Berk DALKIRAN ve Çağatay DALKIRAN'a sonsuz teşekkür ediyorum.

Biyolog Nilay Lerzan Dalkıran

İÇİNDEKİLER

1. Özet ve Anahtar Kelimeler 1

2. Özet ve Anahtar Kelimeler (İngilizce) 2

3. Giriş ve Amaç 5

4. Genel Bilgiler 7

4.1. Tarihçe 8

4.2. Vücut Sıvılarının Tanımlanmasının Adli Bilimler Açısından Önemi 11

4.3. Temel Vücut Sıvısı Olan Kan Dokusunun Tanımlanması 12

4.4. Kan Lekesinin Geçmişten Günümüze Belirlenme Yöntemleri 14

4.4.1. Kan lekesinin ışık kaynağı ile belirlenmesi 15

4.4.2. Kan lekesinin kimyasal testler ile belirlenmesi 16

4.4.3. Kan lekesinin enzimatik reaksiyonlar ile belirlenmesi 17

4.4.4. Kan lekesinin immunolojik analizler ile belirlenmesi 18

4.5. Vücut Sıvılarından Kanın Tanımlanmasında Güncel Yöntemler 19

4.5.1. mRNA profilleme 19

4.5.2. Epigenetik profilleme 20

4.6. RNA Molekülü 21

4.6.1. mRNA 21

4.6.2.MikroRNA 21

4.6.2.1. *Mikro RNA'ların keşfi* 22

4.6.2.2. *MikroRNA'ların biyogenezi* 22

4.6.2.3. *Mikro RNA'ların fonksiyonu* 24

4.6.2.4.*Vücut sıvılarının tanımlanmasında miRNA*.....24

5. Gereç ve Yöntem.....26

5.1. Sarf ve Kimyasal Malzemeler 27

5.2. Kan Örneklerinden RNA İzolasyonu.....28

5.3. cDNA Eldesi.....29

5.4. Ekspresyon Analizi 30

5.5. Kantitatif Analiz.....30

5.6. İstatistiksel Analiz……...31

6. Bulgular.....32

7. Tartışma ve Sonuç..... 65

8. Kaynaklar..... 71

Ekler…….88

Özgeçmiş……...93

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I: Refere alınan miRNA biyomarkerları ……....30

Tablo II: Kullanılan miRNA Primerleri……..…….31

Tablo III: Örnek Tablosu…….....…32

Tablo IV: Belirlenen miRNA Ekspresyon seviyelerinin ve Ct değerlerinin Karşılaştırılması……34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. A Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri……..……35

Şekil 2. A Grubu Örneklerinin hsa-miR-451 Ct ve ΔCt Seviyeleri…….……..…35

Şekil 3. A1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…....36

Şekil 4: A2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri...….36

Şekil 5: A3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…....37

Şekil 6: A Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……....37

Şekil 7: B Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri……..……..38

Şekil 8: B Grubu Örneklerinin hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri……38

Şekil 9: B1 Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……....39

Şekil 10: B2 Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri ……...39

Şekil 11: B3 Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……40

Şekil 12: B1- B3 Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……....40

Şekil 13: C Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri……...…..…...41

Şekil 14: C Grubu Örneklerinin hsa-miR-451a ΔCt Seviyeleri……...……...……..41

Şekil 15: C1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerler…....42

Şekil 16: C2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri.….42

Şekil 17: C3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…..43

Şekil 18: C1-C2- C3 Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……...43

Şekil 19: C Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri…….44

Şekil 20: D Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri……...44

Şekil 21. D1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……45

Şekil 22. D2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……45

Şekil 23. D3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……46

Şekil 24: D Grubunun hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri …….46

Şekil 25: E Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri……..47

Şekil 26: E Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a ΔCt Seviyeleri…….47

Şekil 27: E1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……48

Şekil 28: E2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……48

Şekil 29: E3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……49

Şekil 30: E Grubunun hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……..49

Şekil 31: F Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p ΔCt Seviyeleri……50

Şekil 32: F Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a ΔCt Seviyeleri…….50

Şekil 33: F1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…….51

Şekil 34: F2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…….51

Şekil 35: F3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…….52

Şekil 36: F Grubunun hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…....52

Şekil 37: W Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri…….53

Şekil 38: W Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri……..53

Şekil 39: W1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…...54

Şekil 40: W2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…...54

Şekil 41. W3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…...55

Şekil 42. W Grubunun hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…….55

Şekil 43. X Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri……..56

Şekil 44: X Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri……...56

Şekil 45: X1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri…....57

Şekil 46: X2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……57

Şekil 47: X3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……58

Şekil 48: X grubu (X1-X2) Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……58

Şekil 49: Y Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri……...59

Şekil 50: Y Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct veΔCt Seviyeleri……59

Şekil 51: Y1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……60

Şekil 52: Y2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……60

Şekil 53: Z Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri……..61

Şekil 54: Z Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri……61

Şekil 55: Z1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……62

Şekil 56: Z2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……62

Şekil 57: Z3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……63

Şekil 58: Z Grubunun hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri……..63

Şekil 59: : Tüm Örneklerde Hsa-Mir-451A Ortalama Δct Karşılaştırılması……..……64

KISALTMALAR

CODIS	Combined DNA Index Sistem
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik Asit
EDTA	Ethilendiamintetra Asetik Asid
FBI	Federal Bureau of Investigation
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms (Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi)
Rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir)
SNP	Single Nükleotid Polimorfizim (Tek Nokta Polimorfizmi)
STR	Short Tandem Repeat (Kısa Tekrar Dizinleri)
Taq	Thermus Aquaticus
UV	Ultraviyole
VNTR	Variable Numbers of Tandem Repeats (Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Dizinleri)

1. Özet

Adli bilimlerde kimliklendirme suçun tanımlanması ve aydınlatılması, olay yerini ve mağduru belirlemede temel kavram denebilecek kadar önemlidir. Bir olay yerinin çevresel koşullarının yeniden canlandırılması ve olayın aydınlanmasına katkıda bulunması açısından kan ve tükürük örneklerinin kimliklendirilmesi önemlidir. Fakat bazı durumlarda kimliklendirme, olay yerindeki örneklerin degrade olması nedeniyle ve/veya örnek miktarının eser miktar denecek kadar az olması sebebi ile mümkün olmamaktadır. DNA, maruz kaldığı olumsuz çevresel koşullar karşısında büyük bir molekül olması sebebiyle daha fazla degrade olmaktadır. Olay yerinde karşılaşılan bazı biyolojik örneklerde nükleer DNA'ya ulaşılamadığı durumlarda RNA üzerinden kimliklendirmeye gidilebilmektedir. RNA molekülü DNA'ya kıyasla daha korunaklı bir molekül olması sebebiyle olay yerinde uzun süre korunmaktadır. Adli bilimler alanında vücut sıvılarının tayini için mRNA belirteçleri yerine çevresel koşullarının stabilitesini daha az etkilediği düşünülen ve dokuya spesifik olarak tanımlanabilen miRNA belirteçlerinin kullanılması üzerine çalışılmalar yapılmaktadır. Ayrıca adli bilimlerde olay yerinden gelen örneğin eser miktarda olması sebebi ile miRNA profillemesi ile DNA profillemesi eş zamanlı olarak yapılabilmesine imkân sağlamakta ve bu sayede örnek israfı olmadan diğer gerekli biyolojik ve kimyasal incelemenin de yapılmasına imkân sağlanmış olmaktadır. Aynı zamanda farklı vücut sıvılarının ekspresyon profillerinin farklı olması nedeniyle aynı materyalde birçok vücut sıvısı eş zamanlı olarak analiz edilebilmektedir. Adli bilimlerde miRNA profillemesinin avantajları olarak miRNA profillemesi ile örnek kaybı önlenirken aynı zamanda birkaç vücut sıvısı analizinin eş zamanlı gerçekleştirilebilmesini ve miRNA'nın degradasyona karşı mRNA'dan daha dayanıklı olması sayılmaktadır. Dünya genelinde yapılan çalışmalar kapsamında miRNA'ların adli bilimler alanına ölüm sonrası geçen zamanı belirleme, biyolojik lekenin yaşını belirleme, monozigot bireyleri birbirinden ayırma gibi katkıları olmaktadır. Bu çalışmanın amacı ise olay yerinden gelen farklı çevresel koşullara maruz kalmış ve ileri

derecede degrade olmuş kan lekelerinin hsa-miR-203a-3p ve hsa-miR-451a miRNA biyobelirteçleri ile tanımlanmasıdır. Modelleme yöntemi ile olası olay yeri çevresel şartları yaratılarak örnekler bu koşullarda 45 gün bekletilmişve bu biyolojik örneklerden miRNA biyobelirteçleri ile tanımlanarak adli bilimlere katkısı araştırılmıştır. Analiz için RNA İzolasyonu; Purezol İzolasyon Reaktifi ile, cDNA Eldesi; The Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit ile ikiside manuele uygun gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon Analizi; kit prosedürlerine uygun olarak (Denatürasyon 95°C'de 10 sn; qPCR x 40 döngü 95°C'de 5 sn, 60°C'de 20 sn; Ayrışma Eğrisi 95°C'de 60 sn, 55°C'de 30 sn, 95°C'de 30 sn) parametreler ile gerçekleştirilmiştir. Kantitatif analiz için snRNA U6 geni referans gen olarak kullanılmıştır. Delta Ct (Cycle threshold) yöntemi (ΔCt) miRNA ifadesinin niceliğini ölçmek için kullanılmıştır. [$\Delta Ct = Ct\ (U6) - Ct\ (miRNA)$]. İstatistiksel analiz olarak ANOVA SPSS analizi yapılmıştır. +4 derecede bekletilmiş gruba göre diğer gruplar farklı bulunmuştur ($p<0.01$)

Elde edilen bulgular incelendiğinde; -20°C ve +4 °C'de ve ağzı kapalı poşette bekletilmiş örnek grubunda hsa-miR-203a-3p ifadesi görülmemiştir, fakat hsa-miR-451a ifadesi görülmektedir ($p<0.01$). Toprakta bekletilmiş, göl suyunda ve deniz suyunda bekletilmiş örnek gruplarında hsa-miR-203a-3p ve hsa-miR-451a ifadesi elde edilememiştir. Tam konsantre çamaşır suyunda, 1/10 oranında seyreltilmiş çamaşır suyunda bekletme ve Çamaşır makinesinde sıcak ayarda (60°C), çamaşır makinesinde soğuk ayarda (20°C) yıkama + 24 saat oda sıcaklığında kurutulan örnek gruplarında hsa-miR-203a-3p ve hsa-miR-451a gen ifadeleri ortam genetik materyale zarar verdiğinden çalışılamamıştır. Sonuç olarak, suç mahallinde -20°C ve +4 °C'de ve ağzı kapalı poşette muhafaza edilmiş üzerinde kana benzeyen bir leke gözlemlenen kot kumaşı bulunduğunda lekenin kan olup olmadığının ayrımı hsa-miR-451a miRNA ifadesi ile yapılabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: miRNA , Kimliklendirme, Kan , Vücut Sıvılarının Tanımlanması , Adli Bilimler, Degredasyon , Çevresel Şartlar , Kimyasal Maruziyeti

2. Summary

Identification in forensic sciences is so important that it can be called a basic concept in defining and clarifying the crime, determining the crime scene and the victim. Identification of blood and saliva samples is important in terms of recreating the environmental conditions of a crime scene and contributing to the clarification of the event. However, in some cases, identification is not possible because the samples found at the crime scene are excessively degraded and/or because the sample amount is so small that it can be called a trace amount. Since DNA is a large molecule in the face of adverse environmental conditions it is exposed to, it degrades more. In some biological samples encountered at the crime scene, in cases where nuclear DNA cannot be reached, identification can be made via RNA. Since the RNA molecule is a more protected molecule compared to DNA, it is preserved for a long time at the crime scene. In the field of forensic sciences, instead of mRNA markers for the determination of body fluids, studies are carried out on the use of miRNA markers, which are thought to affect the stability of environmental conditions less and can be defined specifically for tissue. In addition, due to the trace amount of the sample from the crime scene in forensic sciences, it allows miRNA profiling and DNA profiling to be performed simultaneously, and thus, other necessary biological and chemical examinations are provided without wasting samples. At the same time, due to the different expression profiles of different body fluids, many body fluids can be analyzed simultaneously in the same material. The advantages of miRNA profiling in forensic sciences are that while miRNA profiling prevents sample loss, several body fluid analyzes can be performed simultaneously and miRNA is more resistant to degradation than mRNA. Within the scope of studies conducted around the world, miRNAs contribute to the field of forensic sciences such as determining the time passed after death, using them as a biomarker for body fluids, determining the age of biological stains, and distinguishing monozygotic individuals from each other. The aim of this study is to profiling highly degraded blood stains from the

crime scene, exposed to different environmental conditions, with hsa-miR-451a and hsa-miR-203a-3p miRNA biomarkers. With the modeling method, possible crime scene environmental conditions will be created and the samples will be exposed to these conditions, and these biological samples will be profiling with miRNA biomarkers. For analysis, RNA Isolation; Purezol Isolation Reagent; Obtaining cDNA with The Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit.both were performed manually. Expression Analysis; in accordance with kit procedures (Denaturation 10 sec at 95°C; qPCR x 40 cycles 5 sec at 95°C, 20 sec at 60°C; Dissociation Curve 60 sec at 95°C, 30 sec at 55°C sec, 30 sec at 95°C). The snRNA U6 gene was used as a reference gene for quantitative analysis. The Delta Ct (Cycle threshold) method (ΔCt) was used to quantify miRNA expression. [ΔCt = Ct (U6) − Ct (miRNA)]. Anova spss analysis was performed as statistical analysis. Other groups were found to be different compared to the group kept at +4 degrees. ($p<0.01$).

When the findings are examined; Hsa-miR-203a-3p expression was not observed in the sample group kept at -20°C and +4 °C and in a sealed bag, but hsa-miR-451a expression was observed ($p<0.01$). The expression of hsa-miR-203a-3p and hsa-miR-451a could not be obtained in the sample groups kept in soil, lake water and sea water. Hsa-miR-203a-3p and hsa-miR-451a gene expressions in fully concentrated bleach, soaking in bleach diluted 1/10 and washing in the washing machine at hot setting (60°C), washing machine at cold setting (20°C) + drying at room temperature for 24 hours, could not be studied because the environment damages the genetic material. As a result, when there is a denim fabric on which a blood-like stain is observed, stored at -20°C and +4°C and in a sealed bag at the crime scene, it is possible to distinguish whether the stain is blood or not by expression of hsa-miR-451a miRNA ($p<0.01$).

Keywords: miRNA , identification , blood , body fluid identification , forensic science, degradation, environmental conditions, chemical exposure

3. Giriş ve Amaç

Suç mahallinde elde edilen vücut sıvısı örneklerinden kimlik tanımlama, adli tıp için çok değerlidir (1). Suçun, suçlunun, mağdurun ve olay yerinin belirlenmesi sanık ifadelerinin doğrulanması ve tüm bunlar arasındaki bağlantının kurulmasında DNA profillemesi kritik rol almaktadır. Güncel olarak kullanılan biyolojik vücut sıvısı belirleme testleri kimyasal, enzimatik ve immünolojik testlerdir. Bu testlerin hassasiyetlerinin olmasına rağmen özgünlüğü sınırlıdır. Çalışılan örnek, diğer biyolojik vücut sıvısı örnekleri ile çarpraz reaksiyon vererek yanlış pozitif sonuç verebilmektedir. Bu çeşitli tanı ve doğrulama testleri kullanılırken örnek zaiyatı yaşanmaktadır. Her test için ayrı örnek kullanılması ve DNA kimliklendirmesi için gereken DNA miktarı düşünüldüğünde bu olay yerinden gelen eser miktarda örnek için mümkün olmamaktadır. Adli bilimlerde olay yerinden gelen eser miktar örnekler göz önüne alındığında bu çözülmesi gereken bir problemdir. Ayrıca bu yöntem ile menstrual kanın venöz kandan ayrılması ve vajinal sıvının kimliklendirilmesi de mümkün olmamaktadır (2). Yeterli duyarlılığı ve yüksek ayrım gücü sebebiyle, gen bölgelerindeki çeşitli sayılardaki otomozal kısa ardışık tekrarların (STR) çoklu (multiplex) PCR yöntemi ile çoğaltılması esasına dayanan DNA tiplendirmesi adli bilimler laboratuvarlarında kullanılır. (3-4). Günümüzde Ocak 2017 itibariyle Amerika Birleşik Devletleri'nde FBI, CODIS ((Combine DNA Index System)) tarafından belirlenmiş 20 STR lokusu ve cinsiyet belirlemeye yarayan Amelogenin gen gölgesini tek bir PCR reaksiyonu ile çoğaltılmakta ve DNA profillemesini gerçekleştirmektedir (5-7). Degrade DNA ile çalışırken otozomal DNA ile otozomal STR profilleme sisteminin ihtiyaç duyduğu DNA miktarının olay yerinden gelen örnekte yeteri kadar bulunmaması sebebiyle söz konusu STR sistemi zaman zaman yetersiz kalmaya başlamıştır (5). Multiplex STR analizinin kitlerindeki en büyük sıkıntı degrade örneklerden DNA kimliklendirmesi yapılırken alınan sonucun yetersiz olması veya hiç sonuç alınamamasıdır (8). STR analizinin yetersiz kaldığı durumlarda yani, kriminal olaylarda karşılaştırma yapacak şüphelinin olmadığı, DNA'nın

degredasyona uğradığı ya da yakın akrabalık tayini durumlarında, DNA dizisinde meydana gelen tek nükleotit polimorfizmi SNP analizi yapılmaktadır. SNP'lerin ayrım gücü DNA dizisinde milyonlarca SNP bulunması sebebi ile STR analizinden yüksektir. Küçük boyutları ve restriksiyon enzimleri ile parçalanmamaları sebebiyle bekleyen, degrade olmuş ve az miktarda örnek ile sonuç verebilmektedir (9). Biyolojik vücut sıvıları için adli biyolojik incelemede çeşitli tanı ve doğrulama testleri kullanılmasına rağmen bu testler her vücut sıvısına özgü olarak ayrı yapıldığı için fazla miktarda örneğe ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle tüm dünya adli laboratuvarlarda mevcut DNA profilleme yöntemine entegre ederek kullanılacak standardize edilmiş ve aynı anda birçok vücut sıvısı analizi yapılabilen bir yöntem geliştirmek oldukça önemlidir (2). Yeni bir yöntem geliştirmek için ise ilk olarak küçük boyutlarından dolayı degredasyona karşı DNA'dan daha dirençli olduğu bilinen bir RNA çeşidi olan mesajcı RNA (mRNA) düşünülmüştür (2,10). Fakat mRNA'ların zorlu çevresel şartlara karşı dayanıklı olmadığı çalışmalarla ortaya çıkmıştır (11-15). Daha sonraki çalışmalarda miRNA'ların küçük boyutları sebebi ile benzer moleküllerinden daha sağlam yapıda olduğu ortaya çıkmıştır (16-18). Yapılan biyomedikal kanser çalışmaları ışığında miRNA'ların doku spesifik olduğu ortaya çıkmıştır (2, 10, 12, 13, 19-24) (10). Bu sayede adli bilimlerde doku orjini amaçlı kullanılabileceği fikri ortaya atılmıştır. Güncel vücut sıvısına özgü miRNA profilleme çalışmaları incelendiğinde kan için birçok farklı miRNA çalışılmıştır. Bu tez çalışmasının amacı birçok çalışmada taze kandaki ifadesinin yüksek olduğu bilinen hsa-miR-451a ile kandaki ifadesinin az olduğu bilinen hsa-miR-203a-3p miRNA biyobelirteçlerinin, kot kumaşına emdirilmiş kan örneklerinin çeşitli çevresel şartlar altında 45 gün bekletildikten sonra bu biyobelirteçlerin ifadelerinin tanımlanmasıdır.

4. Genel Bilgiler

Olay yerinden gelen örnekler eser miktarda olduğundan DNA kimliklendirmesinden sonra varsa yapılacak diğer analizler için elde örnek kalmaması oldukça sık karşılaşılan bir durumdur. İçinde DNA ve RNA bileşenini birlikte barındıran toplam nükleik asit bileşeni kullanılarak DNA profilleme ve RNA ile biyolojik vücut sıvısı belirlenebilmesi paralel olarak gerçekleştirilebilmektedir (24, 26-30). Ayrıca adli laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan yöntem ve kitler ile DNA ekstratından direkt miRNA tespit edilebilmektedir. Bu da laboratuvar rutini değiştirilmeden rutine dahil edilebileceğini göstermektedir. Faili meçhul davalarda yani delil kaynağına ulaşılamadığı, sadece DNA ekstraktına ulaşılabildiği durumlarda da miRNA tanımlanması yapılabilmektedir (2). Yapılan çalışmalar sonucunda farklı biyolojik sıvılar için ortak biyobelirteçler ortaya atılmıştır. Bu alanda yapılan çalışmalar devam etmektedir. Güncel olarak adli laboratuvarlarda miRNA ile kimliklendirme kullanılmamaktadır. Bunun sebebi akredite edilmiş global bir örnek miktarı ve konsantrasyonundan başlayarak, uygun ekstaksiyon yöntemi, kantitatif analiz, yöntem ve metod ve son olarak istatistiksel analiz yöntemi belirlenememiştir (2). Son dönemlerde NGS (Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)) gibi yeni nesil teknolojiler kullanılarak, STR, SNP, cinsiyet kromozomları, mitokondriyal DNA gibi bilgilerin yanı sıra epigenetik bilgiler de olay yerinden gelen biyolojik örnekte tek seferde çalışılabilmektedir (31).

Bu çalışmada çeşitli çevresel şartlara maruz kalmış kan ile lekelendirilmiş kumaşlar çalışılmış ve kana üzgü miRNA biyobelirteçlerini belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu vücut sıvısı tanımlama alanında yapılan çalışmalar, DNA kimliklendirmesi ile birlikte veya tek başına adli bilimler açısından oldukça önemlidir.

4.1. Tarihçe

Adli vaka incelemelerinde olay yerinden toplanan delillerin aydınlatılması oldukça önem taşımaktadır. Olay yerinin belirlenmesi, adli vaka ile ilişkili kişi veya kişilerin kıyafetleri ve bu kişilerin vücutlarından elde edilen delillerin olası şüpheliler ile karşılaştırılması; kriminal nedenli ölümler ile doğal nedenlerle gerçekleşen ölümlerin ayırt edilmesi, afet sonrası kimliği belirsiz kişilerin kimliklendirilmesine kadar geniş bir yelpazede yargı makamlarına yardım etmektedir. Zamanla suçlama ve aklamaların temel unsuru haline gelmiştir (32). Adli bilimlerde genetik kimliklendirme, suçun ve suçlunun ortaya çıkarılması, suç araçlarının araştırılmasını, suçlunun kimliğinin belirlenmesi, şüpheli ile olay yerinden gelen DNA örneklerini karşılaştırılması, akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi, annelik-babalık davaları alanlarında hukuki süreçleri yönlendirmektedir (33). Geçmişte kimliklendirmede immünolojik ve serolojik testler gibi çeşitli yöntemler ile güvenilir sonuçlara ulaşmak mümkün değildi. Alec Jeffreys'in 1985 yılında DNA molekülündeki minisatellit polimorfizmini keşfetmesi ile adli bilimlerde daha hassas, ayrım gücü yüksek ve daha güvenilir bir kimliklendirme yöntemine geçilmiştir (33). Moleküler alanında teknolojik gelişmeler ışığında polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) keşfi ile moleküler kimliklendirme de gelişmeler yaşanmıştır (4). Zamanla gelişen teknoloji ile yıllar boyunca yeni polimorfizimler çalışılmıştır. Dünya genelinde son yirmi beş yıldır adli kimliklendirmede kısa tekrar dizileri (STR) kullanılmaktadır. Fakat STR lokuslarının adli bilimlerde oldukça karşılaşılan degrade olmuş örnekler ile kimliklendirmede sorunlar yaşandığı belirlenmiştir. Eski ve degrade olmuş örneklerde daha sonra keşfedilen tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) kullanılmaya başlanmıştır. SNP, gen dizisindeki tek nükleotit polimorfizmi olduğundan ve restriksiyon enzimlerinden etkilenmediğinden degrade örneklerde oldukça güvenilir sonuçlar vermektedir (34). Olay yerinde karşılaşılan birçok örnek içerisinde adli bilimlerde kullanımı açısından en özelleşmiş DNA temelli kimliklendirmede geleneksel tek nükleotid polimorfizmi ve kısa ardışık tekrar dizileri kullanılmaktadır. Moleküler

teknolojilerin gelişmesi, olay yerinden elde edilen eser miktarda örneklerden daha çok bilgi edinmeye olanak sağlamaktadır (1,35). Multipleks PCR ile güvenilir sonuç veren STR lokusları ile ticati kitler üretilmiş ve kullanılmaktadır. Bu alandaki akademik çalışmalar bu kitlere yeni lokusların yeni teknolojilerin eklenmesi için oldukça önemlidir (36). Günümüzde dünyada ve ülkemizde adli bilimler laboratuvarında genetik analiz için rutin 16 STR lokusu çalışılırken, tek mültiplekste çalışabilecek 24 STR bölgesinin çalışabileceği kitler üretilmiştir. Tüm dünyada ve ülkemizde adli laboratuvarlarda (Adli Tıp Kurumu, Emniyet Kriminal Laboratuvarları, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü ve çeşitli özel laboratuvarlar) kullanılan STR lokusları D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818 ve FGA'dır (33). Bu STR lokusları FBI için standardize hale getirilerek Applied Biosystem tarafından AmpFlSTR Profiler® adı altında üretilmiş tüm ve tüm Dünya'da yaygın olarak kullanılmıştır. Daha sonra FBI'ın ilk 1977 yılında kullanmaya başladığı CODIS veri tabanı verilerine dayanarak 13 STR lokusuna ek olarak D19S433 ve D2S1338 STR lokuslarını da ekleyerek sayı 16 ya çıkarılmıştır (Promega). Ocak 2017 itibari ile CODIS tarafından mevcut 13 STR lokusuna yeni 7 STR lokusu eklenerek oluşturulan 20 STR bölgesi kimliklendime açısından oldukça güçlü bir ayrıma sahiptir. Fakat yapılan çalışmalar ışığında DNA'nın boyutunun büyük olması sebebiyle ve maruz kaldığı çevresel koşullara karşı degradasyon oranı yüksek olması sebebi ile güvenilirliğinde sorun yaşanabileceği ortaya atılmıştır. Yaşanabilecek güvenilirlik sorunu sebebi ile farklı yöntemler ile alternatif kimliklendirme yöntemleri araştırılmıştır (37). Güncel yöntemlerin yanında günümüzde kimliklendirme için RNA profillemeye ilgi günümüzde ivme kazanmıştır. RNA'lar vücudumuzdaki fizyolojik olayları düzenleyen genlerdir. mRNA'nın degredasyona karşı hassas olması sebebi ile adli bilimlerde kullanıma uygun olmadığı bilinmektedir. İlk miRNA Lee ve ark. Tarafından 1993'te keşfedilmiştir. Bu çalışmada miRNA'nın RNA'nın kodlama yapmayan junk genetik materyal olduğu, özel bir amacı olmayan evrimsel süreçten kalan artık bir genetik

materyal olduğu ortaya atılmıştır. Sonraki çalışmalar ile miRNA'ların fizyolojik süreçleri düzenleyici rolleri olduğu belirtilmiştir (10). Düzenleyici olmaları sebebi ile biyomedikal araştırmalarda özellikle miRNA'lar vücut sıvıları, dokular ve hastalıklar için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (1,2,10,35). miRNA'ların adli bilimlerde kullanılması ise olay yerinde çoğunlukla karşılaşılan biyolojik materyaller olan vücut sıvılarının kişiye ve vücut sıvısına özgü belirteçler olduğu bilinmektedir (10, 36). Adli bilimlerde kimliklendime amaçlı miRNA kullanılmasının çeşitli avantajları ve dezavantajları vardır. miRNA çevresel koşullara daha dayanıklı bir moleküldür, çok küçük miktarlardaki örneklerde de sonuç vermektedir ve aynı anda farklı moleküler belirteçlerin belirlenmesi mümkündür (36). Bu nedenle zaten olay yerinden eser miktarda gelen biyolojik örneğin israf edilmesinin önüne geçilmektedir (10, 38). miRNA biyobelirteçleri ile monozigotik ikizlerin kimliklendirilmesi (25), biyomedikal alanda hastalık belirteci olarak kullanılması (1,10) ve son olarak da adli bilimlerde dokuların tanımlanmasında kullanılabilmektedir (2). Çeşitli vücut sıvıları (venöz kan, mentural kan, semen, tükürük, vajinal sıvı) ile yapılan çalışmalar sonucunda araştırmacılar bazı miRNA'ların potansiyel biyobelirteç olarak kullanılmasında birbirini destekleyen sonuçlara ulaşmışlardır (36), fakat hala tek bir vücut sıvısı için spesifik olarak bir miRNA belirlenememiştir (10). miRNA Kullanılan real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) gibi geleneksel miRNA tespit yöntemleri vücut sıvısı kimliklendirmesinde kullanılır. Fakat MPS (Massive Parallel Sequensing) yöntemi ile daha duyarlı belirleme yapmak mümkündür (1, 39-41). Yapılan çalışmalar incelendiğinde, başta kan ve tükürük olmak üzere birçok farklı vücut sıvısı çeşitli kimyasallara belirli süreler boyunca maruz bırakılarak araştırma yapılmıştır (42). Yine benzer olarak iki farklı parametrenin incelendiği bir çalışmada, kan ve semen örnekleri kumaşa lekelendirilerek, belirli koşullarda belirli süreler boyunca bekletilerek incelenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada lekelendirilen kumaşlar belirlenen koşullarda çamaşır makinesinde yıkandıktan sonra örnekler laboratuvarda çalışılmıştır (43). Adli bilimler laboratuvarında olay yerinden

gelen eser miktarda örnekler çalışıldığından DNA kimliklendirme testinden sonra, miRNA profillemesi için yeterli örnek kalmamaktadır. Bu nedenle tek ekstraksiyon ile iki fraksiyon içeriği DNA ve toplam RNA bileşeni ayrı olarak elde edilebilir. Bu sayede tek örnekten paralel olarak DNA kimliklendirmesi ve örnekten biyolojik vücut sıvısı biyobelirteçleri ayrı olarak çalışılabilmektedir (26-30, 44). Buna ek olarak yapılan son çalışmalarda, güncel olarak kullanılan Adli bilimlerde DNA ekstraksiyon yöntemleri ile protokolde herhangi bir değişiklik yapmadan DNA içerisindeki miRNA'lar belirlenebilmektedir (45). Bu da miRNA profillesinin mevcut adli laboratuvarların iş akışına uygulanmasının kolay olacağını öne sürmektedir. Orijinal kanıttan geriye sadece DNA ekstraksiyonun kaldığı faili meçhul suç davalarda miRNA profillemesi çözüm için potansiyel oluşturmaktadır (10, 36, 41, 46-52). RNA'lar kuru leke formunda daha stabildir (42). miRNA'lar küçük olması sebebiyle degredasyona karşı daha stabildir (53, 54). İki veya daha fazla çalışmada dokuya spesifik dört miRNA belirlenmiştir. Kan için miR-16 ve miR-451 (46, 49), semen için miR-891a (47, 49), tükürük için miR-205 belirlenmiştir. (41, 46- 49). Araşırma konusu olan bir miRNA'yı doku spesifik biyobelirteç olarak belirlemek için birden fazla çalışma ile belirtilmiş olması gerekir (2).

4.2. Vücut Sıvılarının Tanımlanmasının Adli Bilimler Açısından Önemi

1980'li yıllardan itibaren DNA teknolojisinden yararlanılması ile birlikte adli bilimler laboratuarlarına giriş yaptıktan sonra olay yeri incelemelerinden elde edilen biyolojik örneklerde DNA analizi yapılarak şüphelinin veya mağdurun kimliği ortaya konulmaktadır. DNA analizi tek yumurta ikizleri hariç ikiz bireyleri ayırmak hariç adli bilimlerde özellikle kimliklendirmenin yapılabilmesinde çok büyük bir öneme sahiptir (55). Ancak olay mahallinde bir kişinin DNA'sının bulunması, DNA'nın kaynağı hakkında bilgi vermemektedir. Olay yerinde bulunan bir vücut sıvısının tipinin ve kaynağının belirlenmesi, olay yerinin tekrar canlandırılabilmesi örnek donörü ve olay örgüsünün doğru ilişkilendirilmesinde önemlidir (56 ,57) DNA'nın kaynağı cilt, kan, tükürük veya meni vb. biyolojik örnekler olabilir.

Olay yerinde bir vücut sıvısı ile karşılaşıldığında, lekenin görünür hale getirilmesi için bazı ışık ve kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Güncel olarak vücut sıvılarının belirlenmesi için kullanılan kimyasal testler, immünolojik testler, protein katalitik aktivite testleri, spektroskopik testler ve mikroskop analizleridir. Örneğin kan için Luminol ve Kastle-Mayer öntanı testleri ile örneğin vücut sıvısı olup olmadığı belirlenmektedir. Kaynağı bilinmeyen bir delilin varlığı olayın aydınlatılmasına büyük katkı sunmakla birlikte, bazı soruları yanıtsız bırakmaktadır. Bir yerde bir kişinin sadece DNA'sının bulunmasının vaka ile alakası olup olmadığı sorusuna cevap vermemektedir (55). Olay yerlerinde bulunan biyolojik örneklerin türünün ve kaynağının belirlenmesi, şüpheli ile işlenen suç arasındaki bağlantıyı destekleyerek olay yerinin yeniden canlandırılmasında önemli ipuçları sağlayabilir (56, 57). Örneğin; olay yerinden elde edilen kan lekesinin ne zaman oluştuğu, lekenin insan veya hayvan kaynaklı olup olmadığı, venöz kan mı menstural kan mı olduğu konusunda ayrımın yapılabilmesi adli olayın sağlıklı bir şekilde çözümlenmesine aracı olacaktır.

Günümüzde dokuya özgü vücut sıvıları mRNA ve miRNA ekspresyon seviyeleri ile belirlenebildiği bilinmektedir. RNA'nın, DNA'ya kıyasla çevresel şartlara daha dayanıklı olduğu bilinmektedir (55).

4.3. Temel Vücut Sıvısı Olan Kan Dokusunun Tanımlanması

Kan, plazma içerisnde eritrosit, lökosit, trombosit gibi kan hücrelerinin süspansiyon halinde damar sistemi içerisinde dolaşan ve kalbin pompalaması sayesinde bütün vücudu dolaşan bir temel vücut dokusudur. Vücut ağırlığının % 8'ini oluşturur. Cinsiyete göre vücutta farklı miktarlarda bulunmaktır. Erkeklerde vücut yüzeyi oranı dolayısıyla daha yüksek oranda bulunur. Kan, % 55'ini plazma ve % 45'ini hücrelerden oluşur. Plazmanın % 90'ı su, % 10'unu ise çözünmüş halde bulunan organik ve inorganik maddelerden oluşurlar. Kan hücreleri ise %99 oranında eritrosit, %1 oranında lökosit ve trombositlerden oluşur (58, 59)

Kanda en yüksek oranda bulunan hücreler eritrositlerdir. Bir mililitre kanda yaklaşık 5 milyon eritrosit bulunmaktadır. Eritrositlerin en önemli fonksiyonu kanda oksijen dolaşımını sağlayan hemoglobin molekülünü taşımasıdır. Hemoglobin, yapısında Fe+2 atomu bulunduran dört adet hem grubu taşıyan konjuge bir protein olması ile bilinir. Oksijen, hemoglobin molekülünün hem grubundaki Fe+2 atomuna bağlı olarak taşınır. Eritrositlerin üretim yeri kemik iliğidir. Dolaşıma retikülosit olarak katılırlar. Dolaşımda kaldıkları birkaç gün içerisinde çekirdekleri yok olur ve eritrosit haline gelirler. Çekirdekleri olmadığından eritrositler DNA içermezler. Dolayısıyla kimliklendirme amaçlı kullanılamazlar. Dolaşımdaki ortalama ömürlerinin dört ay olduğu bilinir. (59)

Lökositler; vücudun savunma sisteminde görevli elemanları olup 1 mililitlre kandaki sayıları 4 bin ile 10 bin arasında değişebilir. Lökositler, eritrositlerin aksine çekirdekli hücreler olup çekirdek ve sitoplazma yapılarına bağlı olarak granülositler, monositler ve lenfositler olmak üzere üç grupta incelenirler. Dolaşımda bulunan lökositlerin %50-75'i granülosit, %2-8'i monosit, % 20-40'ı lenfosit olduğu bilinmektedir. Granülositler ve monositler sadece kemik iliğinde üretilirler. Lenfositler ise az oranda kemik iliğinde büyük oranda lenfoid organ ve dokularda yapılmaktadır. Granülositler sitoplazmalarında belirgin granüller içerirler.. Lenfositler granüllerinin ve çekirdeklerinin boyanma özelliklerine göre kendi nötrofiller, eozinofiller, bazofillerden oluşur. Monositler; belirgin granüller içermeyen, böbrek şeklinde ve tek parçalı olan lökositlerdir. Dokular arasında dolaşıp, burada gelişip büyüyerek makrofajları oluştururlar. Lenfositler vücuda yabancı moleküllerle bağlanma özelliği bulunan antikor oluşturur. Vücudu antikor oluşturmaya teşvif eden vücuda yabancı moleküllere antijen adı verilir. Lenfositler kendi içlerinde T ve B olmak üzere iki alt grupta incelenirler. B lenfositleri, antijenlere özel antikor veya immünoglobulin adı verilen özel protein moleküllerini sentezlemekle görevlidir. T lenfositler ise hem B lenfositlerin antikor üretiini regüle ederek hem

de antijenlere direkt saldıran hücrelerdir. Lökositlerin yaşam süreleri vücuttaki fonksiyonlarna göre farklılık gösterir. (60)

Trombositler; kanın pıhtılaşmasında görev alan hücrelerdir. Kemik iliğindeki megakaryosit hücreleri tarafından oluşturulurlar. Megakaryositler parçalanır sistemik dolaşıma girerek, trombosit hücrelerini oluştururlar. Oluşmaları yaklaşık 5 günü alır, yaşam süreleri yaklaşık 10 gün kadardır. İçerisinde çekirdek bulundurmayan hücrelerdir. Damar yaralanmalarında, kanamanın durmasında (hemostaz) ve pıhtı oluşmasında görev almasıyla bilinir. (59, 60)

4.4. Kan Lekesinin Geçmişten Günümüze Belirlenme Yöntemleri

Olay yerlerinde kan en sık rastlanan vücut sıvısıdır. Ancak kırmızı mürekkep, meyve suları gibi kana doku ve renk olarak benzeyen birçok madde kan ile karıştırılabilmektedir. Bu sebeple olay yerinde kana benzer bir leke gözlemlendiğinde yapılacak ilk işlem lekenin kan lekesi olup olmadığının tespit edilmesidir (58, 61, 62) Adli analizlerde kan lekesinin tanımlanması için ışıma oluşturarak görünür hale getirme yöntemleri, kimyasal yöntemler ve immunolojik yöntemler kullanılmaktadır (62, 63). 1990'lı yıllarda yapılan çalışmalarda kanın yaklaşık 400 nm'de spektrumunun olduğunun belirlenmesinin ardından adli bilimler rutininde vücut sıvılarının ayırt edilmesinde kullanımına başlanmıştır (64). Alternatif ışık kaynağının kan inceleme açısından kullanılmasının bilinen iki dezavantajı vardır. Birinci olarak mürekkep vb. maddelerle kanın ayırt edilememesi, ikincisi ise dilüe kan lekelerini gösterememesidir. Avantajlı tarafı ise üzeri kapatılmış lekelerde bile doğru sonuç verebiliyor olmasıdır. Alternatif ışık kaynaklarının kullanılmasının asıl amacı lekenin öntanısını yapmaktır. Lekenin tanımlanmasında ise diğer tanı yöntemleri kullanılmalıdır (65). Kan lekesi tayininde kullanılan diğer yöntemler öntanı testlerinden sonra tanımlama testleri iki aşamada sınıflandırabilir. İlk spesifik olmayan ön tanı testleridir. Ön tanı testlerinin kolay kullanılan, hızlı çözümler sunan testler olması önemlidir. Ön tanı testlerinin, genellikle sensivitesi bir diğer deyişle pozitif sonuç verme eğilimi yüksektir. Yani yanlış negatif diye bir kavram yoktur. Pozitif sonuç verenlerin

bazıları yalancı pozitif olabilmektedir. Bu tanı testlerin DNA'yı olumsuz etkilememesi önemlidir. İkinci basamakta ise doğrulama testleri kullanılır. Ön tanı sonucunda pozitif çıkan madde daha spesifik testle ile teyit edilmelidir. (62, 66). Doğrulama testleri, sonuç alınabilmesi için oldukça fazla miktarda örnek olması şarttır ve genellikle olay yerinde değil laboratuvarda kullanılır. Çünkü, daha kontrollü koşullar ve ön tanı testlerine göre daha fazla komplikasyon içerir ve daha fazla ekipman gerektirir. Doğrulama testlerinin spesifikliği yüksek olup, yalancı pozitiflik eğilimi düşüktür. Bu testlerin negatif sonuç verme eğilimi daha yüksektir. Bu şekilde pozitif sonuç verenler daha kesin bir şekilde pozitif olarak ayrılırlar (65). Ön tarama/Doğrulama testleri, maliyete uygun bir yaklaşımla leke kan değilse gereksiz DNA testlerine gidilmesinin önlenmesinde önemlidir. Bu testler olay yerinden elde edilen delillerin arasından DNA testi yapılacak olanların ayırt edilmesine olanak sağlar. Bu şekilde adli laboratuvarların daha efektif, amaca yönelik çalışması ve delillerin daha etkin incelenmesi sağlanmış olur (66).

4.4.1. Kan lekesinin ışık kaynağı ile belirlenmesi

Çıplak gözle görülmeyen vücut sıvısı lekelerini belirlemek için en basit yol ultraviyole ışını gibi alternatif ışık kaynaklarıdır. Örnek vermek gerekirse Wood's Lamp 320-400 nm dalga boyunda çalışmaktadır. Bu cihaz oldukça güvenli ve portatif kullanımı ile kolaylık sağlamaktadır fakat sadece semen lekelerinde güvenilir sonuçlar verdiği diğer vücut sıvılarında yanlış pozitiflik verebilmektedir. Bu ışık kaynakları ile semen ve bazı ışık dalga boylarında ise salya belirlenebilmektedir (67, 68) Tam kan iki temel fraksiyondan oluşur, yaklaşık %45'ini oluşturan hücre kısmı ve yaklaşık %55'ini oluşturan sıvı kısmı. Plazma kanın protein açısından zengin olan kısmıdır. Yaralanma anında kan koagülasyonunda görevli enzimler kademeli olarak görev alırlar. Tam kandan serum ayrıldıktan sonra kalan plazma pıhtılaşma faktörleri ve fibrinojenleri içeren kısımdır (69). Kanın pıhtılaşma ve kuruma zamanını etkileyen kanın hacmi, ortamın nemi,ortamın sıcaklığı ve kanın temas ettiği yüzeyin türü gibi bazı çevresel

etkenler vardır (70), polilight, özellikle boya ise gizlenmiş olan kan lekelerinin tespitinde 415 nm'de oldukça etkilidir. (64, 66). Springer ve ark. 266 nm gibi daha düşük dalga boylarında da kan lekesi tespit edilebildiğini bildirmişlerdir (71).

Floresin de bir diğer kan lekesini belirlemede kullanılan yöntemdir. Luminol mantığı gibi işler fakat luminol gibi kimyasal değil floresan ışıma saçar. Floresin maddesinin ışıması, gün ışığında alternatif ışık kaynağı varlığında daha uzun süre gözlemlenebilmektedir (66, 72).

4.4.2. Kan lekesinin kimyasal testler ile belirlenmesi

Kimyasal reaksiyonlar, ilgili reaktifin hedef substrat ile etkileşime girmesiyle substratta renk değişimi veya kristal formların oluşarak lekenin görünür hale gelmesi veya öntanı testi olarak kullanılması temeline dayanmaktadır. (73, 74)

Ön tarama testi olarak bir amin türevi olan luminol, kemiluminesans dediğimiz olay gerçekleşir ve ortama belli dalga boyunda ışık yayılır. Luminol hidrojen peroksit varlığında analiz edilen şüpheli örnek kan ise kandaki hemoglobin yapısındaki Fe+2 iyonları ile tepkimeye girerek aminofitalatı oluşturur. Bu tepkime sırasında oluşan yüksek enerji ile ortama mavi-yeşil lüminens ışıma oluşur. Luminol örnekte eser miktarda kan bulunsa dahi sonuç vermektedir. (75,76). Kan eser miktarda ve iyice temizlenmiş gibi gözükse bile hemoglobinde bulunan demir ile gerekleşen luminol oksidasyonu sonucunda belirli bir süre mavi-yeşil kemilüminosans ile tespit edilebilir. (36). Bunu yanı sıra luminolün içerisinde bakır bulunan bazı ağartıcılar, tükürük ve çeşitli proteinlerle de tepkimeye girdiği bilinmektedir. Luminol testi diğer tarama testlerinin arasında yüksek duyarlılık ve özgüllüğü sebebi ile öne çıkmaktadır. Fakat sadece karanlık ortamlarda gözlemlenebilmesi, aydınlatma süresinin yaklaşık 30 sn olması ve DNA üzerindeki olumsuz etkileri gibi dezavantajları vardır (77).

Kastle-Meyer testi, kandaki hemoglobin varlığında pembe renk üretmesiyle bilinen ve fotoğraflanabilen renk değişimi ile belgelenebilen bir reaksiyon oluşturur (73). Örneğe önce

renksiz fenolfitalein sıvısı sonra hidrojen peroksit damlatılır. Örnek pembeye dönüşüyor ise bu örnekte kan bulunduğu anlamına gelmektedir. Eğer örnek hidrojen peroksit damlatmadan önce örnekte renk değişimi olursa ortamda hidrojen peroksit benzeri madde olduğu yani örneğin kan içermeği anlamına gelmektedir. Yüksek özgüllük içeren bir testtir. Oldukça eski örneklerde bile doğru sonuç verebilmektedir. Saniyeler içinde renk değişimi gerçekleşir. (78, 79).

Teichmann testi, reaksiyon sonucunda kristal üretilmesi ile diğer testlerden ayrılır. Kandaki hemoglobin molekülü ve Teichman reaktifi, ortamda potasyum bromid, potasyon klorid, potasyum iodine ve glasiyel asetik asit varlığında gerçekleşen reaksiyon sonucu kristal form oluşmaktadır. Ortamda dış kaynaklı bir peroksidaz varlığında yanlış pozitiflik gösterebilmektedir. Ayrıca örnek miktarına bağlı olarak oluşan kristal miktarı değişeceğinden eser miktarda olan örneklerde sonuç alınamayabilmektedir (80).

4.4.3. Kan lekesinin enzimatik reaksiyonlar ile belirlenmesi

Enzimatik yöntemler, çıplak gözle görülebilir renk değişikliği meydana getirmek için belirli substratların reaksiyonunu katalize eden yöntemlerdir. Yaygın olarak kullanılan öntanı testlerinde peroksidaz benzeri aktivite gösteren hem grubuna temellendirilmiştir (81). Hemoglobinin hem grubunun peroksidaz benzeri etki gösterip, hidrojen peroksite katalizlenmektedir. Bu reaksiyon ile oluşan oksitleyiciler uygun substrat ile renk değişikliği meydana gelir (82). Enzimatik testler içinde en yaygın kullanılanı, kan varlığını mavı renkle gösteren benzidin testidir. Fakat meyve ve sebze peroksidazları gibi bazı kimyasal oksidanlarla yanlış pozitiflik oluşturabilmektedir. Örneğin teste tabi tutulabilmesi için leke küçük parçalara kesilip, serum fizyolojik damlatılarak kanın serum fizyolojiye geçmesi sağlanır. Daha sonra benzidin ve dehidrojen peroksit damlatılarak yaklaşık 10 dk sonra mavi renk meydana gelmesi ile örnekte kan varlığını gösterir. (83, 84)

Lökomalaşit Yeşili, benzidin benzeri bir reaksiyon gösterir fakat sprey olarak püskürtülür. Örnek kan içeriyor ise sprey uygulandıktan sonra birkaç dakika sonra mavi-yeşil renk meydana gelir, yaklaşık 10 dakika sonra yeşil renge döner (85, 86, 87).

Benzidin'in kanserojen olarak belirlenmesinden sonra testlerde yerini fenolfitalein/hidrojen almıştır. Bu test Kastle-Meyer öntanı testi olarak bilinir. Şüpheli örnek swab veya filtre kağıdı ile toplandıktan sonra fenolfitalein reajanı ve hidrojen perokside uygulandıktan sonra örnekteki hemoglobin ile pembe renk vermektedir. Ayrıca bu test DNA yapısına zarar vermediği için örnek gelecek testler için saklanabilir. (55).

Takayama testi (hemokromojen testi), hemoglobine özgü bir testtir. Öntanı testi yapılmış örnek ısıya maruz bırakılır. Takayama reaktifi örneğe çok az miktarda damlatılır, mikroskop altında pembe renk görülür (87, 88, 89).

4.4.4. Kan lekesinin immunolojik analizler ile belirlenmesi

İmmünoanalizler, antikor-antijen bağlama olaylarını uygulayan analitik yöntemlerdir. Belirli bir moleküle yanıt üretmek için düzgün ve kapsamlı bir şekilde karakterize edildiğinde, hemen hemen her hedef için oldukça spesifik ve hassas olan antikorları izole etmek genellikle mümkündür. Adli seroloji ile ilgili olarak antikor, hedef molekülü belirli bir vücut sıvısına özgü hedeflemeyi amaçlayacaktır. Ön tanı testlerinde genelikle laboratuvarlarda antijenler ve bunlara karşılık gelen antikor onların arasındaki bir çökelme reaksiyonunun görselleştirilmesine dayanır. Ouchterlony çift difüzyon yöntemini kullanarak, bir dizi kuyu ve çevrili ek kuyucuklardan oluşan merkezi bir kuyuya sahip bir agaroz jeli içine enjekte edşlmiştir. Spesifik proteine özgü antijen içeren solüsyon merkez kuyuya uygulanır. Kontol ve kaynağı bilinmeyen örneği içeren solüsyon da yan kuyulara uygulanır.

Spesifik bir proteine karşı antikor içeren çözelti, merkezi kuyuya yerleştirilir. Antijen ile antikorun difüzyonu ile meydana gelen çökelme çizgisi varlığında örnekten pozitif sonuç çıktığı sonucuna varılabilmektedir (90, 91).

İmmunolojik analizler duyarlı ve kullanımı kolay olsa da, antikorların kanıtlayıcılıklarını sınırlayan bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Birincil sorun, protein antijen-antikor bağlanmasının %100 spesifik olamamasıdır, bu nedenle yanlış pozitif sonuçlar mümkündür. Bu durum, birkaç sebepten kaynaklanır. İlk olarak, proteinler genetik değişkenlikten kaynaklanan polimorfizmler translasyon sonrası değişimler nedeniyle yapı olarak değişkenliğe sahip oldukları bilinmektedir (92). Çünkü immünolojik testler antijen molekülünün belirli bir hedef proteine bağlanması ile meydana gelir. Hedef proteinin yapısındaki herhangi bir değişiklik, yanlış bir negatif sonuçla sonuçlanabilir. Tek proteinin değişkenliği ile birlikte, hedef olmayan moleküller için bir yanlış pozitif sonuçlar üretmesini mümkün kılmaktadır. Son olarak, antikorların hedef antijeni aşırı doygun hale getirmesi ve böylece immobilize test hattındaki antikorların serbest antijeni bağlama olasılığı, antijen kompleksli mobil faz antikorlarından daha fazla olacaktır. "Kanca etkisi" olarak adlandırılan bu, yanlış negatif veya yanlış sonuç verebilir. Aslında tam tersi doğru olduğunda hedef vücut sıvısının çok düşük miktarlarını gösterir (92, 93).

4.5. Vücut Sıvılarından Kanın Tanımlanmasında Güncel Yöntemler

4.5.1. mRNA profilleme

Mesajcı ribonükleik asit (mRNA) DNA'da depolanan genetik bilgiyi hücrelere transfer eden aracı moleküldür (94). mRNA'ların adli laboratuvarlar kullanılabilmesi için mRNA belirtecinin dokuya özgü olması, olay yerinde degradasyona uğramaması ve ekspresyon seviyelerinin çevresel koşullardan etkilenmemesi gerekmektedir (94). Bu nedenle mRNA ekpresyon analizinin etkinliğini ortaya koymak için yapılan ön çalışmalar belirlenen mRNA tiplerinin bu

alanda kullanıma aday olduğunu göstermektedir (95, 96). RNA molekülünün çeşitli çevresel şartlara maruz bırakılması üzeride yapılan derin analizler sonucunda örnekten 547 gün sonra bile stabil ve analiz edilebilir halde mRNA elde edilebildiği bilinmektedir. (12)

Haas ve ark. geçmiş çalışmalarında belirlenen mRNA belirteçlerini kullanarak kan, tükürük, semen, menstrual kan ve vajinal sıvının tanımlanmasında mRNA tanımlanmasının geleneksel yöntemlere kıyasla etkili bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir (97).

Vücut sıvısı tanımlaması amacıyla mRNA biyobelirteçlerinin kullanımı belirli avantajlara sahiptir. Yeni yöntemleri laboratuvar düzenine adapte etmek oldukça masraflı ve çalışanlar için bir eğitim süreci gerekeceğinden, adli laboratuvar çalışanlarının bilinen nükleik asitleri içeren çalışma için temel örnek hazırlama yöntemlerini kullanmalarını sağlamaktır. İkinci olarak ise DNA ve RNA'nın tek ekstraksiyonda hem mRNA hem de STR profillemesinin yapılabilmesine olanak sağlanmmıştır (26).

4.5.2. Epigenetik profilleme

Epigenetik, DNA ekspresyonunda meydana gelen fakat DNA sekansını etkilemeyen geri alınabilir değişikliklerdir (98). DNA metilasyonu genellikle sitozin kalıntılarını hedefleyerek promotör bölgenin yukarısındaki CpG adalarında lokalize olduğu bilinmektedir ve gen susturulması ile gerçekleşir (63). Epigenetik analizindeki son gelişmeler, tDMR'ler (dokuya özgü diferansiyel olarak metillenmiş bölgeler) adı verilen kromozom parçalarının, hücre veya doku tipine göre farklı DNA metilasyon profilleri barındığını göstermektedir. Bu nedenle, tDMR'lerin belirli bir CpG bölgesinde DNA metilasyon durumunun tespiti, DNA numunelerinin doku veya hücre tipinin tanımlanmasına izin verecektir (99, 100). Ancak bu metodun adli laboratuarların rutinine dahil edilebilmesi için daha fazla marker içeren daha fazla doğrulama araştırmaları yapılmalıdır. (55).

4.6. RNA Molekülü

RNA molekülü, nükleotidlerin fosfodiester ile bağlanmasından oluşan bir zincirdir. Genetik dizinin proteinlere dönüştürülmesi ve tüm sürecin düzenlenmesini sağlarlar. Yapısında bir trifosfat grubu, beş karbonlu riboz şeker ve adenin, guanin, sitozin veya urasil bazlarından biri bulunur. Riboz şekerler birbirlerine fosfodiester bağı ile bağlanırlar. Şekerler bazlara ise glikozit bağı ile bağlanırlar. Her RNA molekülü DNA üzerinde gen adı verilen belirli bir bölge ile konjugedir. RNA molekülü, DNA'dan farklı olarak tek zincirli ve Timin bazı yerine Urasil barındırır. (101, 102). RNA'lar protein kodlayan (coding) ve kodlamayan (noncoding, nc) olarak iki gruba ayrılır. Kodlamayan RNA'ların işlevleri yapısal ve düzenleyicidir. Yapısal olarak tanımlanan kodlamayan RNA'lar hücrenin temel işlevleri için temel olup rRNA ve tRNA'larını içermektedir. Düzenleyici RNA'lar ise hücre içindeki genetik bilgi akışını düzenleme görevinde olan RNA'lar miRNA'lardır (102). Adli bilimlerde kimliklendirme amacıyla rRNA ve tRNA kullanılmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın konusu değildir.

4.6.1. mRNA

mRNA'lar DNA'daki genetik zincirdeki bilgnin proteine çevrilmesini sağlamakla görevlidir (93). mRNA sentezinde DNA çift sarmalı çözülür ve kalıp görevi gören DNA zincirinin karşısına RNA polimeraz enzimi yardımıyla mRNA molekülü işlenir. Bu şekilde DNA'daki genetik bilgiyi okuyan mRNA bunu ribozomlara taşır. Ribozomlar mRNA'daki bilgiye göre sentezlenecek proteinin amino asit sırasını belirler. mRNA'lar toplam RNA'nın %5'ini oluşturmaktadır. Adli bilimlerde kimliklendirme amaçlı kullanılması için yapılan araştırmalar sonucunda mRNA'ların analiz sonucunda profil sonucu verdiği belirlenmiştir (103, 104).

4.6.2. Mikro RNA (miRNA)

MikroRNA'lar yaklaşık 22-25 nükleotid uzunluğunda, endojen, küçük, tek iplikli, DNA transkripsiyonu olan protein çevirisi olmayan RNA'lardır (105). mRNA'ya tutunarak

posttranskripsiyonel gen ekspresyonunu inhibe ederler ve böylece proteinlere translasyonunun engellenmesine ya da mRNA degredasyonuna yol açarlar (106,107,108). miRNA'ların memelilerde tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'sinin aktivitesini kontrol ettiği tahmin edilmektedir (109). mRNA'lar ile birlikte, miRNA'lar vücut sıvılarının karakterizasyonu için umut verici belirteçler olarak araştırılmıştır (110).

4.6.2.1. Mikro RNA'ların keşfi

İlk kez 1993 yılında Caenorhabditis Elegans'da (C. Elegans) lin-4 adı verilen miRNA'nın keşfi ile başlamıştır (16). Yakın yıllarda Gary Ruvkun ve arkadaşları tarafından C. Elegans üzerinde yapılan çalışmada lin-4 adı verilen miRNA'ların düzenleyici olarak görev aldığı gösterilmiştir. 2000 yılında C. Elegans'ta let-7 adı verilen ikinci miRNA tipini keşfetmiştir. 21 nükleotitten oluşan let-7'nin larva döneminden erişkin döneme geçişi kontrol ettiği gözlenmiştir. Let-7'nin keşfi devrim niteliğinde olup bu kısa kodlanmayan RNA grubunda yer alan ve gen okunmasının düzenlenmesinde görevli RNA'lara mikro RNA (miRNA) adı verilmiştir (112). Bugünlerde ise, binlerce miRNA insanlarda tanımlanmıştır ve miRbase, miRDataBase gibi miRNA online dizi havuzları da oluşturulmuştur (113).

4.6.2.2. Mikro RNA biyogenezi

miRNA biyogenezinin ilk basamağı çekirdekte polimeraz II enzimi ile DNA'dan RNA transkripsiyonu ile pri-miRNA oluşumuyla başlar. Sonra çekirdekteki miRNA'nın ön formu olan pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı Drosha ve kofaktörü olan DiGeorge Kritik Sendrom Bölgesi 8 (DGCR8) ikilisi ile oluşan kompleks tarafından pre-miRNA ile yaklaşık 85 nükleotid uzunluğunda RNA moleküllerini oluşturur. Oluşan kompleksdeki DGCR8 tek zincirli RNA yapısını tanırken, katalitik benzeri işlev gören Drosha ise pri-miRNA'yı yaklaşık 11 bp'lik kısımlık bazal birleşme yerinden, yaklaşık 22 bp'lik kısımlık apikal birleşme bölgelerinden kesmektedir. Çekirdekte oluşan bu pre-miRNA,

exportin 5/RanGTP kompleksi tarafından sitoplazmaya taşınmasıyla proses devam eder. Sitoplazmada RNAaz III grubu endonükleaz olan Dicer ve TRBP (trans-activator RNA binding protein) tarafından 21 nükleotidli miRNA iplikçiklerini içeren miRNA dublikelerine ayrılır. Diğer yandan Dicer ana bileşenleri Argonaute proteinleri (Ago) olan RNA-indüklenmiş susturma kompleksine (RISC) oluşumu başlar. Olgun miRNA RISC kompleksine entegre (miRISC) olurken, aracı miRNA parçalanır. RISC kompleksinin içerdiği miRNA'yı hedef mRNA'ya iletilir ve hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonun baskılanmasını düzenlenir (114, 115).

Olgun miRNA'nın mRNA üzerindeki hedef bölgesiye bağlanması tam ve kısmi olmak üzere iki şekilde meydana gelir. miRNA, hedef mRNA'ya kısmi olarak bağlanırsa, mRNA'yı baskılayarak translasyonu düzenler. Bu yöntemi kullanan olgun miRNAlar, hedef mRNA'ya çoğunlukla 3'UTR bölgesinde bağlanır. miRNA, hedef mRNA'ya tamamlanacak şekilde bağlanırsa, mRNA'nın yıkımını gerçekleştirir. Bu yolu kullanan miRNAlar ise, hedef mRNA'ya daha çok kodlama sekansı veya açık okuma çerçevesindeki bölgelerden bağlanırlar. Genel olarak miRNA'lar post transkripsiyonel düzenlenme; translasyonu baskılayanarak veya mRNA hedefler yıkımını sağlayarak yapmaktadır (116, 117). Son yıllarda yapılan araştırmalarda miRNA'ların biyogenezinde farklı yolaklar olduğu belirtilmiştir. Mirtron yolağı bunlardan biridir. Bu yolakta mRNA kodlayan genlerin çok kısa saç tokası yapısındaki intronlarının splayzing yapması ve uçlarının kesilmesi ile Dicer tarafından direkt taşınan ve işlenen, Drosha/DGCR8 sürecinden bağımsız olmak üzere pre-miRNA'lar üretilir. Mirtron'lara ek olarak, pre-miRNA'ların bir başka kaynağı bazı aracı RNA (tRNA) ve küçük nükleolar RNA (snoRNA)'lardır. miRNA'lara işlenmesi süreçleri Dicer'a bağımlı ve Drosha/DGCR8'ye bağımsız şekilde gerçekleşip, RISC kompleksine geçerler. Bir öteki ise Drosha bağımlı Dicer bağımsız yolaktır. Drosha tarafından pre-miRNA üretilir ve Dicer basamağı atlanarak Ago2'ye eklenir (118, 119).

4.6.2.3. Mikro RNA'ların fonksiyonu

MikroRNA'lar işlevlerini kendi nükleotid sıralamalarına tamamlayıcı hedef genleri tanıması sayesinde gerçekleştirir. MikroRNA'nın yapıya eklenmesi ile oluşmakta olan RISC kompleksi baz eşleme özelliği ile mRNA'ya bağlanması ile ilgili genin protein translasyonunun kesilmesine ve/veya mRNA'nın yıkılmasına sebep olmaktadır. MikroRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın okunmasını düzenleyebildiği bilinmektedir. Her bir mRNA'nın birden fazla mikroRNA tarafından okunabildiği bilinmektedir. Bu şekilde birden fazla miRNA gen ifadesinin rol alan mikroRNA'ların protein okuyan genlerin yaklaşık yarısının bu yolla yönettiği düşünülmektedir (120,121). Embriyonik gelişim hücre bölünmesi ve farklılaşması gibi sayıca çok hücresel süreçler gen ekspresyon yolakları varlığında düzenlenir. Herhangi bir patolojik durumda mikroRNA'ların gen ekspresyon seviyelerinde artma olabileceği veya düşüş olabileceği öngörüldüğünden günümüzde birçok hastalığın tanısında, prognozunda ve tedavisinde miRNA'ların kullanımıyla ilgili çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda kanser, nörodejeneratif ve metabolik bozukluk gibi birçok hastalığın varlığının mikroRNA'ların ilişkili olduğu bilinmektedir (122, 123, 124).

4.6.2.4. Vücut sıvılarının tanımlanmasında MiRNA

Adli vücut sıvılarının tayini amacıyla spesifik yeni bir yöntem olarak bazı mRNA belirteçleri önerilmiştir. Daha sonra çevresel koşullarına mRNA stabilitesinin daha yüksek olması nedeniyle miRNA'nın adli kullanıma daha uygun olabileceği düşünülen mikroRNA belirteçleri gündeme gelmiştir (110). MiRNA'lar; yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda kodlamayan RNA molekülleridir ve transkripsiyon ertesi gen ifadesinin düzenlemesinde görev alır. 2009'da yapılan çalışmada bazı miRNA'ların dokuya özel ekspresyon seviyesi gösterdiğini belirtilmiştir. MiRNA'ların boyutlarının mRNA'ya göre küçük olması kendilerini çevresel faktörler tarafından bozunmaya daha dayanıklı yapar. Bu durum vücut sıvılarının tayininde biyobelirteç olarak olay yerinden gelen bozunmuş örneklerin miRNA'ların mRNA'lara karşı

avantajlı olmasını sağlar (108,110). Adli bilimlerde biyolojik sıvılarda miRNA ifadesinin ilk kez çalışıldığı çalışmayı yapan Hanson ve ark. miRNA'nın adli örneklerde tespit edilebileceğini göstermişlerdir. Çalışmalarında qRT-PCR analizini kullanarak periferik kan, tükürük, semen, vajinal sıvı ve menstruel kanda 425 insan miRNA'sını incelemiş farklı vücut sıvılarında farklı ekspresyon seviyesi gösteren dokuz miRNA'nın biyolojik sıvılarının tayininde kullanılabilecek marker olduğunu belirtmişlerdir (111).

Bu yol ile miRNA profillemesiyle vücut sıvısının tanımlanması çeşitli avantajları olduğu bilinmektedir. Bunlardan ilki, aynı lekeden örnekteki biyolojik materyal israf edilmeden miRNA ve DNA'nın eş zamanlı tespitinin mümkün olmasıdır. Bu durum olay yerlerinden elde edilen delil materyalinin genellikle sınırlı olması nedeniyle adli araştırmalarda önemli bir avantaj sağlar. miRNA profillemesinin bir diğer önemli avantajı ise, birden fazla miRNA ekpresyon profilinin aynı anda değerlendirilmesi mümkün olduğundan aynı tüpte birkaç vücut sıvısı analizine olanak sağlanaktadır.. Bu şekilde çok az miktardaki delil materyallerinde örnek kaybı önlenmekte ve bir çalışma ile birden fazla biyobelirtecin aynı zamanda değerlendirilebilmesi yanlış pozitiflik riskini de oldukça azaltacaktır (84).

5. Gereç ve Yöntem

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Moleküler Genetik öğrenci laboratuvarında 2021-2022 yılları içerisinde gerçekleştirildi. Çalışmaya 18 yaş üzeri sağlıklı 12 gönüllü kişi dahil edilmiştir. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Etik Kurulundan onay alınmıştır. Gönüllüler seçilirken analizde kadın ve erkek biyobelirteç farkını ortadan kaldırmak için çalışmaya katılan kadın ve erkek sayılarının eşit olmasına dikkat edilmiştir. Sağlıklı ve bilgilendirilmiş gönüllü onam formunu imzalayan gönüllülerden alınan vücut sıvısı örnekleri; kan periferal venden alınıp EDTA'lı tüpe aktarılma yolu ile örnek toplanması gerçekleştirilmiştir. Örnekler çalışma zamanına kadar laboratuvarda bulunan +4 °C'lik buzdolabında saklanmıştır. Diğer taraftan ev tipi çamaşır makinesinde deterjansız olarak sadece su ile yıkanmış, kurutulmuş ve uygun büyüklükte kesilmiş pamuklu kot kumaşlar hazırlanmıştır. Su ile yıkanmış kot kumaşlarına kan örnekleri lekelendirilerek 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Bu lekelendirilmiş kumaşlar, tam konsantre ev tipi çamaşır suyu (n=3) ve 1:10 seyreltilmiş ev tipi çamaşır suyunda (n=3) konsantrasyonlarında 24 saat boyunca bekletilmiştir. Bir diğer modelleme yöntemi ise lekelendirilen kumaşların ev tipi çamaşır makinesinde ön yıkama programında sıcak (60 °C) (n=3) ve soğuk (20 °C) (n=3) olmak üzere iki farklı derecede aynı sürede aynı sıkma ayarında yıkanmıştır. Çevresel şartlar olarak ise ilk olarak İstanbul il sınırları içerisinden üzerindeki çim tabakası alınarak toplanan toprak 15 cm x 15 cm x 15 cm derinliğinde olacak şekilde ağzı açık plastik bir kaba yerleştirilmiş ve lekelendirilen kumaş (n=3) bu toprak örneğinin tam ortasına yerleştirilerek 45 gün bekletilmiştir. İkinci olarak Marmara Denizi'nden alınan yaklaşık 1 lt tuzlu suyun içerisine lekelendirilen kumaş örneği (n=3) yerleştirilmiş ve ağzı açık olacak şekilde 45 gün bekletilmiştir. Üçüncü çevresel koşul ise Küçükçekmece Gölü'nden alınan yaklaşık 1 lt tatlı suyun içerisine lekelendirilen kumaş örneği (n=3) konulması ve ağzı açık olacak şekilde 45 gün bekletilmiştir. Son olarak bir diğer çevresel koşul olarak, lekelendirilmiş kumaş örnekleri (n=3)

ağzı kapalı plastik poşette hava almayacak şekilde 45 gün bekletilmiştir. Lekelendirilen kumaş örnekleri -20 °C (n=3) ve +4 °C (n=3) buzdolaplarında 45 gün boyunca saklanmıştır.

İnceleme için belirlenen kimyasallara ve çevresel şartlara belirli bir süre boyunca maruz bırakılan biyolojik lekeli kumaşlardaki kan steril swap çubuklarına transfer edilerek izolasyon için kullanılmıştır. İlk olarak örneklerden RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu fenol-kloroform yöntemi kullanılarak yapılmıştır, kolon veya spin içeren yöntemler miRNA boyutu çok küçük olduğundan çevresel şartlara dayanıklı olmasına dayanarak yapılan literatür araştırması çerçevesinde tercih edilmemiştir. İzole edilen total RNA'lardan cDNA oluşturmuştur. İlgili miRNA'lara spesifik primerler kullanılarak miRNA'ların gen ifadeleri RT-qPCR ile analiz edilmiştir. Singlepleks reaksiyonlar için 10 µL total reaksiyon oluşturacak şekilde Mir-X miRNA First-Strand Synthesis and TB Green kitinde belirtilen yöntem kullanılmıştır. PCR döngüsü belirlenen koşullarda (Denatürasyon 95°C'de 10 sn; qPCR x 40 döngü 95°C'de 5 sn, 60°C'de 20 sn; Ayrışma Eğrisi 95°C'de 60 sn, 55°C'de 30 sn, 95°C'de 30 sn) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin kantitatif değerlendirmesi için delta Ct metodu kullanılmıştır.

5.1. Sarf ve Kimyasal Malzemeler

- Labtron Equipment Type B2 Biosafety İzolasyon Kabini (RNA İzolasyonu aşamasında kullanılmıştır)
- Jenway 628501 Fluorşometer Detector Cihazı (İzole edilen RNA'ların kantitasyonu aşamasında kullanılmıştır) ·
- Hettich Mikro 200 R Mikrosantrifüj Cihazı (PCR aşamasında kullanılmıştır)
- Eppendorf Zentrifuge 3200 Santrifüj Cihazı (RNA İzolasyonu aşamasında kullanılmıştır)
- Applied Biosystems ABI 3130 Genetik Analizör Cihazı (PCR ve Eş zamanlı görüntüleme işleminde kullanılmıştır)

- Wiggen WD320 Blok Isıtıcı ve Karıştırıcı (RNA İzolasyonu aşamasında kullanılmıştır)
- Tüp Vortex Karıştırıcı (RNA izolasyonu, RNA miktar ölçümü, PCR ve elektroforez aşamalarında kullanılmıştır)
- Derin Dondurucu (RNA izolatlarının ve PCR ürünlerinin saklanması aşamasında kullanılmıştır)
- Buzdolabı (Toplanan biyolojik örneklerinin saklanması, deneysel süreçte kullanılan kitlerin muhafazası aşamalarında kullanılmıştır)
- Stratagene Mx3000P qPCR Cihazı (cDNA eldesinde kullanılmıştır)
- Purezol Reaktifi, İzopropanol ve Etanol Sıvısı (RNA izolasyonunda kullanılmıştır)
- Otomatik Pipet Seti (RNA izolasyonu, RNA miktar ölçümü, PCR ve elektroforez aşamalarında kullanılmıştır)
- Thermo Electron Corporation HeraSafe İzolasyon Kabini (RNA İzolasyonu aşamasında kullanılmıştır)

5.2. Kan Örneklerinden RNA İzolasyonu

- Önce kumaşa emdirilmiş kan örnekleri transfer yöntemi ile pamuklu swaplara emdirilerek analiz için bu swaplar kullanıldı.
- Tüplere 1 ml purezol eklenerek ve tüpler santrifüj ile 45 saniye en yüksek devirde vorteklendi. Böylece tüpteki boncukların da yardımıyla doku ve sıvı içindeki hücreler homojen olarak parçalandı. Sonra purezol reagent eklenek de pembe bir renk görünümü aldığı gözlenlendi.
- Solüsyon 5 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra tüplere 200 ul kloroform eklenerek 5 dakika daha beklendi.
- Bu aşamadan sonra RNA, DNA ve protein elde edildi.
- Santrifüj cihazında 12.000 g' de +4 C ' de 20 dakika santrifüj yapıldı.

- Santrifüj sonunda 3 faz oluşumu gözlemlendi.
    - 1.FAZ (Sulu faz): RNA içerir. (Renksiz olarak gördüğümüz)
    - 2.FAZ: DNA içerir. (beyaz renkli gördüğümüz)
    - 3.FAZ (Organik faz): Protein içerir. (kırmızı renkte gördüğümüz.)
- RNA izolasyonu için renksiz olan.faz yeni tüpe aktarıldı.
- Yeni tüpe 500 ul izopropanol (RNA' yı DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanılmaktadır) eklenerek oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 12.000 g' de 4 C' de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant atıldı
- Oluşan çökelek üzerine 1 ml %75 Etanol eklendi.
- 7.500 x g' de +4 C'de 5 dakika tekrar santrifüjlendi.
- Santrifüj sonunda süpernatant atılarak 57 C' de Etanol uçuruldu.
- Kalan çökeleğe 50-100 ul RNAse free su eklenerek pipetaj yapıldı.

5.3. cDNA Eldesi

MiRNA'lar çok küçük olduklarından ve poliadenile edilmediğinden, tüm RNA hazırlama yöntemleri ile miRNA'lar elde edilemez. miRNA analizi için cDNA sentezinde polyadenilasyon yapılması gerekmektedir. cDNA kütüphanesi oluşturuldu. Bu analiz Mir-X miRNA First-Strand Synthesis and TB Green qRT-PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Yöntem kısaca şu basamakları içerir;

- Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) için her bir miRNA'ya toplam hacim 10 µl olacak şekilde RNase içermeyen 0.2 ml'lık tüpe 5 µl mRQ Buffer (2x), 3.75µl RNA örneği (0.25–8 µg), 1,25 µl mRQ enzimi eklenmiştir.
- Bir termal döngüleyicide tüp 1 saat 37°C'de inkübe edildi, ardından 85°C'de en az 5 saat.enzimler inaktive etmek için bekletildi.
- Total volüm 100 µl olacak şekilde 90 µl ddH2O eklenerek cDNA hazırlandı.

Tablo I : Refere alınan miRNA biyomarkerları

miRNA	Olgun miRNA dizisi	miRbase kodu
hsa-miR-203a-3p	5’ GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG 3’	MIMAT0000264
hsa-miR-451a	5’ AAACCGUUACCAUUACUGAGUU 3’	MIMAT0001631

5.4.Ekspresyon Analizi

- Toplam volüm 25 µl olacak şekilde 9 µl ddH2O, 12,5 µl TB Green Advantage Premix (2X), 0.5 µl ROX Dye (50X), 0.5 µl miRNA-specific primer (10 µM), 0.5 µl mRQ 3’ Primer (10 µM), 2.0 µl cDNA eklendi.
- Stratagene Mx3000P cihazında denatürasyon için 10 dakika 95 °C
- qPCR x 40 döngü olacak şekilde, 5 dakika 95 °C, 20 dk 60 °C
- Dissosiyasyon eğrisi için, 60 dakika 95 °C, 30 dakika 55 °C, 30 dakika 95 °C

olacak şekilde Real-time PCR analizi gerçekleştirildi.

5.5.Kantitatif Analiz

snRNA U6 geni kontrol olarak kullanılmıştır. Kit protokolüne uygun olarak spesifik miRNA 5’ primeri olarak miRNA’nın kendisi kullanılmıştır. Daha sonra TB Green Premix, ROX boyası, kitten çıkan 3’ primer ve sentezlenen cDNA ile toplam volüm 25 (µl) olacak şekilde reaksiyon hazırlanır. Aşağıdaki tabloda mikroRNA’lar için kullanılan forward primerler verilmiştir. Reverse primerler kit içerisinde universal olarak bulunmaktadır.

Tablo II: Kullanılan Universal miRNA Primerleri

MikroRNA	Primer
miR-203a-3p	-GTGAAATGTTTAGGACCACTAG
miR-451a	-AAACCGTTACCATTACTGAGTT

Aynı reaksiyon U6 için de hazırlanır ve belirlenen kit prosedürüne göre çalışılır.

Delta Ct (Cycle threshold) yöntemi (ΔCt) miRNA ifadesinin niceliğini ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Referans gen (housekeeping gene) olarak U6 geni kullanılmıştır. Bu referans genin amacı verileri normalize etmek ve deneyin doğru gerçekleştiğinden emin olmaktır. Aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\Delta Ct = Ct\ (U6) - Ct\ (miRNA)$$

5.6. İstatistiksel Analiz

Veriler IBM SPSS Statistic Versiyon 25 programı ile analiz edildi. MikroRNA ortalamaları bakımından gruplar arası farklılık miRNA'lar arası korelasyon dikkate alınarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc Tukey testi kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistik anlamlılık düzeyi $p<0.01$ olarak belirlenmiştir. +4 derecede bekletilmiş örnek grubuna kıyasla diğer gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0.01$)

6. Bulgular

Bu tez çalışmasında 6 kadın 6 erkek toplam 12 bireyden gönüllülük esasına göre kan örnekleri toplanmıştır.

Örnekler, yukarıda belirtilen çevresel koşullara belirli sürelerde bekletilmiş ve sonrasında analiz gerçekleştirilmiştir. Gönüllülerden alınan örnekler çalışma gününe kadar 4+ derecede bekletilmiştir. Gönüllülerden alınan kan örnekleri, uygun boyutlarda parçalara ayrılmış, önceden yıkanmış kumaş parçalarına, her kumaş parçasına 2 ml olacak şekilde uygulanmıştır. Daha sonra örnekler 24 saat boyunca oda sıcaklığında temiz bir ortamda kurumaya bırakılmıştır. Kurumaya bırakılan örnekler daha sonra +4 derecede bekletme, -20 derecede bekletme, plastik poşet içerisinde oda sıcaklığımda bekletme, toprağa gömerek bekletme, çamaşır suyunda bekletme, çamaşır makinesinde sıcak ve soğuk ayarda yıkama, tuzlu su (deniz suyunda bekletme), tatlı su (göl suyunda) bekletme gibi olay yeri koşulları düşünülerek hazırlanmış ortamlarda bekletilmiştir.

Tablo III: Örnek Tablosu

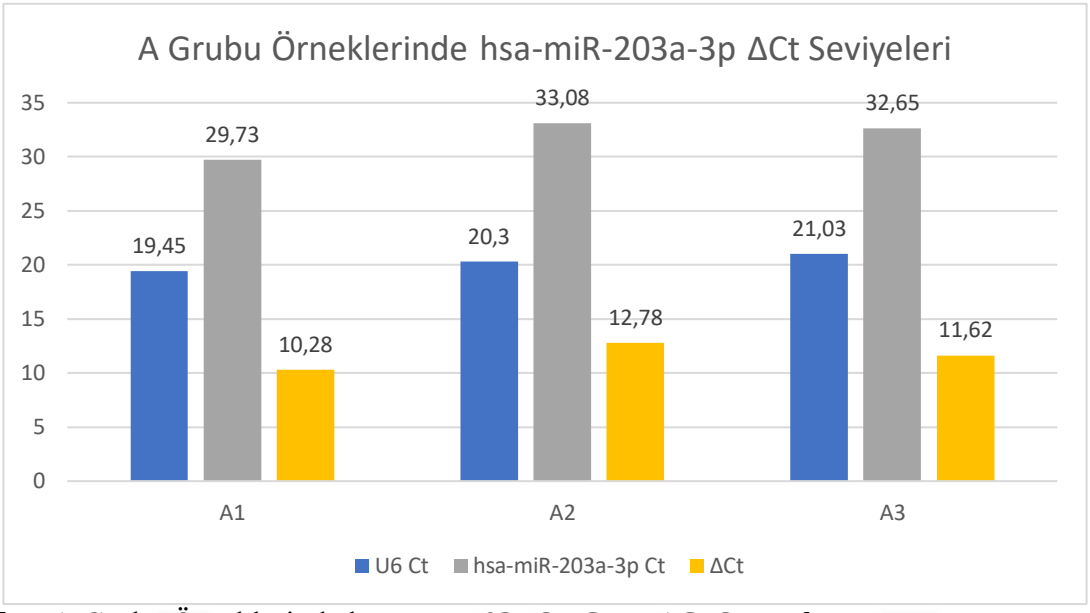
Maruz Bırakılan Çevresel Koşul	Bekletme Süresi	Örnek Kodu
Toprağa Gömme	45 Gün	A (A1, A2, A3)
-20 °C Dolapta Bekletme	45 Gün	B (B1, B2, B3)
+4°C Dolapta Bekletme	45 Gün	C (C1, C2, C3)
Göl Suyunda Bekletme	45 Gün	D (D1, D2, D3)
Deniz Suyunda Bekletme	45 Gün	E (E1, E2, E3)
Ağzı Kapalı Plastik Poşette Bekletme	45 Gün	F (F1, F2, F3)
Çamaşır Makinasında Sıcak Ayarda (60°C) Yıkama + 24 Saat Oda Sıcaklığında Kurutma	N/A	W (W1,W2,W3)

Çamaşır Makinasında Soğuk Ayarda (20 °C) Yıkama + 24 Saat Oda Sıcaklığında Kurutma	N/A	X (X1, X2, X3)
Tam Konsantre Çamaşır Suyunda 24 Saat Bekletme + 24 Saat Oda Sıcaklığında Kurutma	N/A	Y (Y1, Y2, Y3)
1/10 Oranında Dilüe Edilen Çamaşır Suyunda 24 Saat Bekletme + 24 Saat Oda Sıcaklığında Kurutma	N/A	Z (Z1, Z2, Z3)

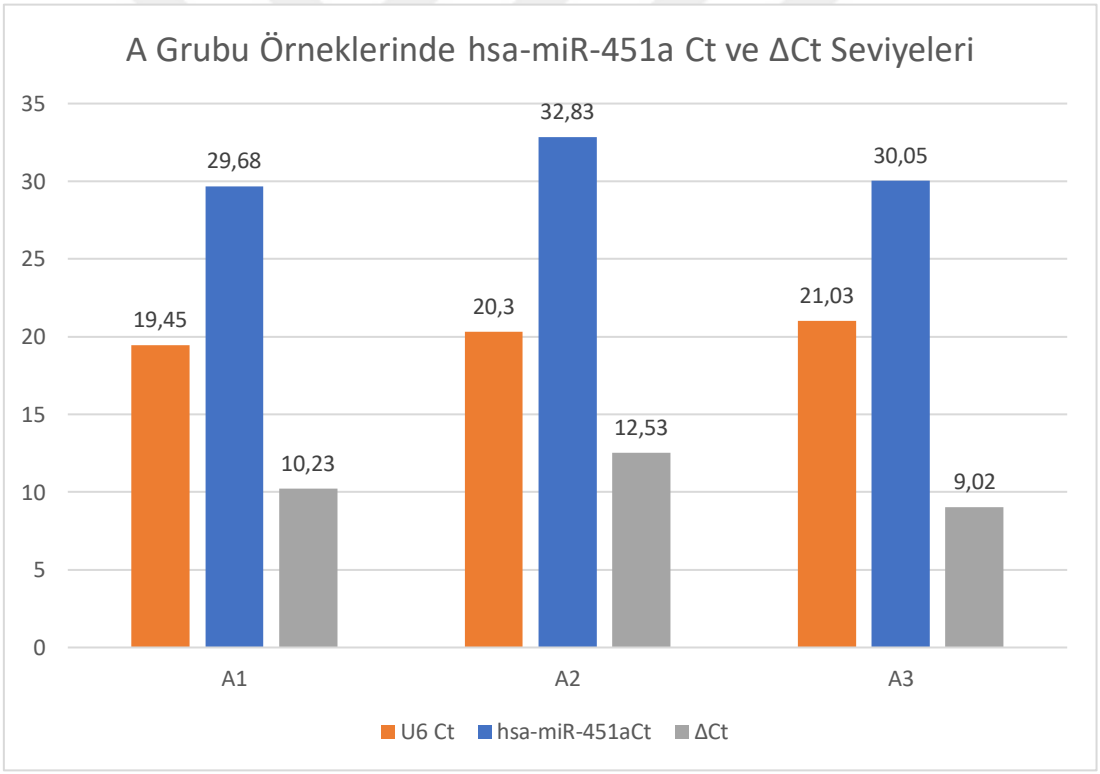
Tablo IV: Belirlenen miRNA Ekspresyon seviyelerinin ve Ct değerlerinin karşılaştırılması

		hsa-miR-203a-3p			hsa-miR-451a		
Bekletilen Çevresel Koşul	**Örnek Kodu**	**Ct**	**ΔCt**	**av ΔCt**	**Ct**	**ΔCt**	**av ΔCt**
Toprağa Gömme (45gün)	A1	29,73	-10,28	-11,56	29,68	-10,23	-10,5933
	A2	33,08	-12,78		32,83	-12,53	
	A3	32,65	-11,62		30,05	-9,02	
-20 °C Dolapta Bekletme (45 Gün)	B1	36,64	-15,78	-18,2033	9,49	11,37	10,28
	B2	35,14	-23,83		4,98	6,33	
	B3	36,36	-15		8,22	13,14	
+4°C Dolapta Bekletme (45 Gün)	C1	35,31	-17,27	-15,9633	8,72	9,32	11,33667
	C2	35,62	-15,36		7,94	12,32	
	C3	35,29	-15,26		7,66	12,37	
Göl Suyunda Bekletme (45 Gün)	D1	32,07	-9,24	-8,86667	34,91	-12,08	-11,83
	D2	31,63	-10,7		34,21	-13,28	
	D3	30,57	-6,66		34,04	-10,13	
Deniz Suyu (45Gün)	E1	30,37	-13,94	-11,8967	33,76	-17,33	-13,3733
	E2	29,32	-13,28		28,28	-12,24	
	E3	30,99	-8,47		33,07	-10,55	
Ağzı Kapalı Plastik Poşette Bekletme (45 Gün)	F1	36,47	-15,28	-14,99	7,35	13,84	13,71333
	F2	36,92	-15,17		7,43	14,32	
	F3	36,59	-14,52		9,09	12,98	
Çamaşır Makinasında Sıcak Ayarda (60°C) Yıkama + 24 Saat Oda Sıcaklığında Kurutma	W1	39,54	-9,97	-10,71	24,9	4,67	3,65
	W2	38,73	-11,42		24,04	3,27	
	W3	39,1	-10,74		25,35	3,01	
Çamaşır Makinasında Soğuk Ayarda (20 °C) Yıkama + 24 Saat Oda Sıcaklığında Kurutma	X1	38,19	-11,25	-10,5833	20,08	6,86	7,723333
	X2	38,09	-11,9		18,59	7,6	
	X3	39,74	-8,6		22,43	8,71	
Tam Konsantre Çamaşır Suyunda 24 Saat Bekletme + 24 Saat Oda Sıcaklığında Kurutma	Y1	38,65	-8,56	-7,89	29,05	1,04	3,15
	Y2	38,86	-7,22		26,38	5,26	
	Y3	N/A	N/A		N/A	N/A	
1/10 Oranında Dilüe Edilen Çamaşır Suyunda 24 Saat Bekletme + 24 Saat Oda Sıcaklığında Kurutma	Z1	37,28	-11,11	-11,3133	20,25	5,92	4,62
	Z2	39,27	-12,52		22,88	3,87	
	Z3	37,96	-10,31		23,58	4,07	

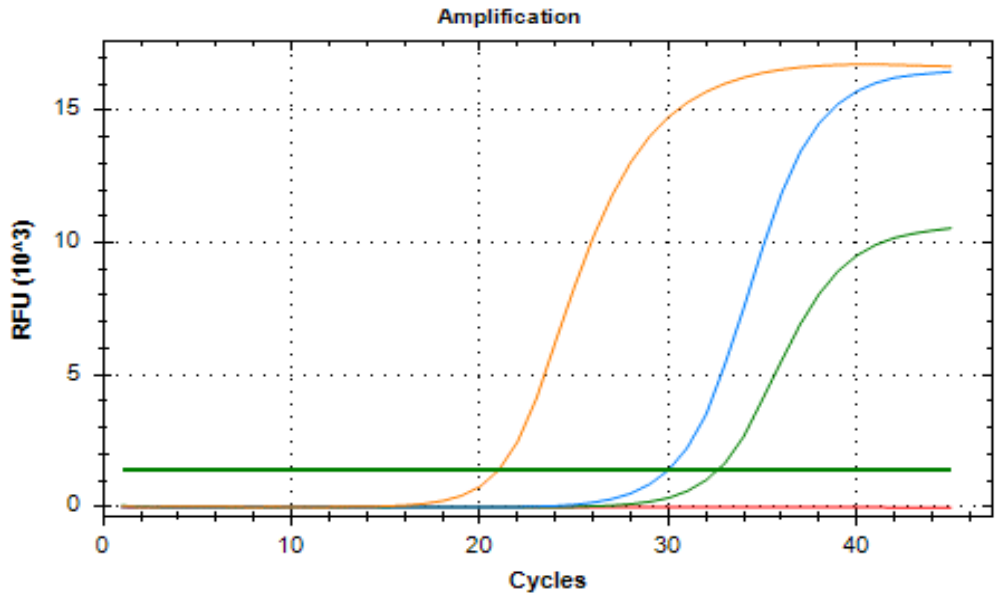
İlgili diğer çalışmalar incelenerek ve kullanılan yönteme dayanarak Ct değeri 25'in üzerinde olan değerleri için gen eksprese olmamış şeklinde yorumlanmıştır (112). Tablo 3'de tüm örneklerin Ct değerlernin belirtildiği üzere hsa-miR-203a-3p geni hiçbir örnek grubunda eksprese olmamıştır. Tartışma bölümünde hsa-miR451a gen ekspresyonu hakkında yorum yapılacaktır.



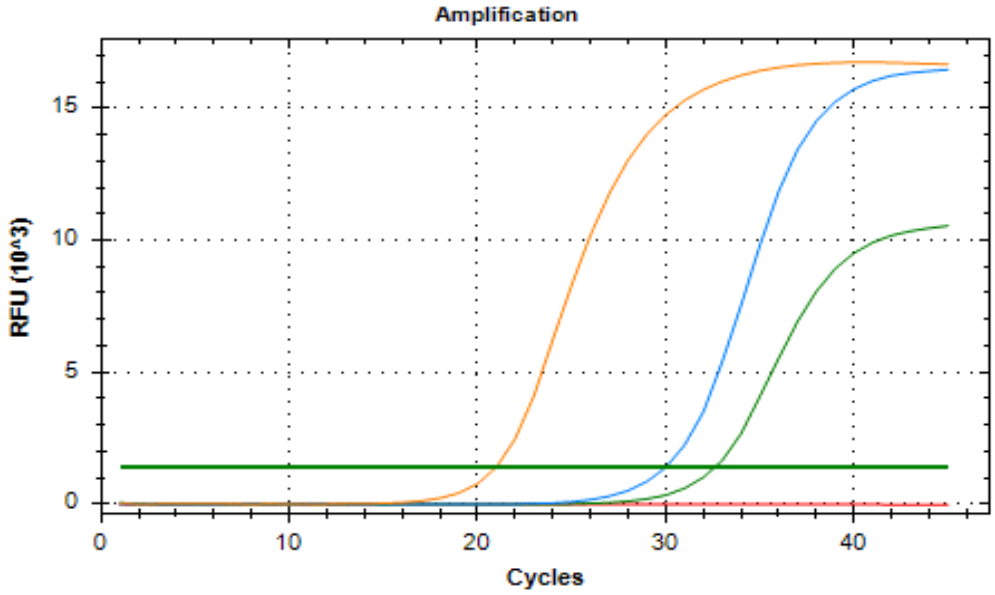
Şekil 1: A Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri



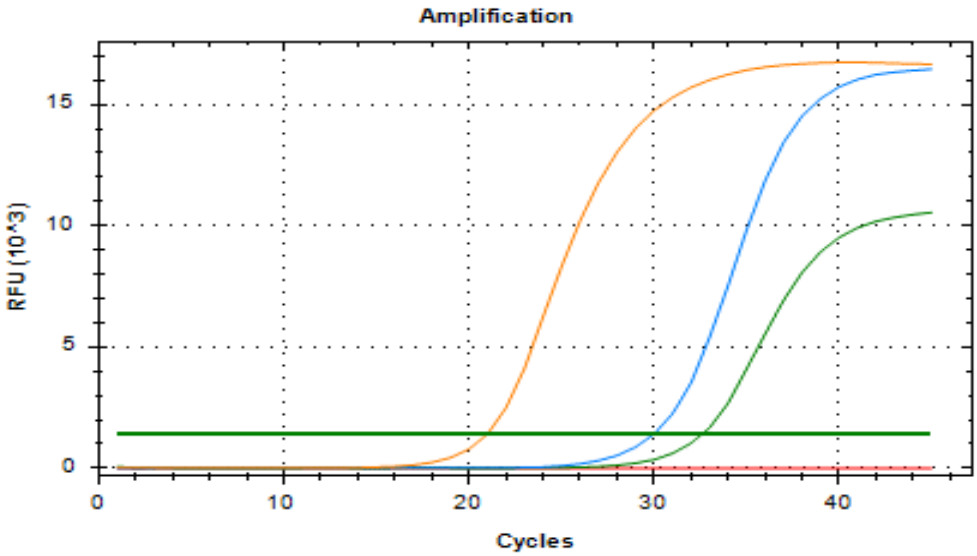
Şekil 2: A Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri



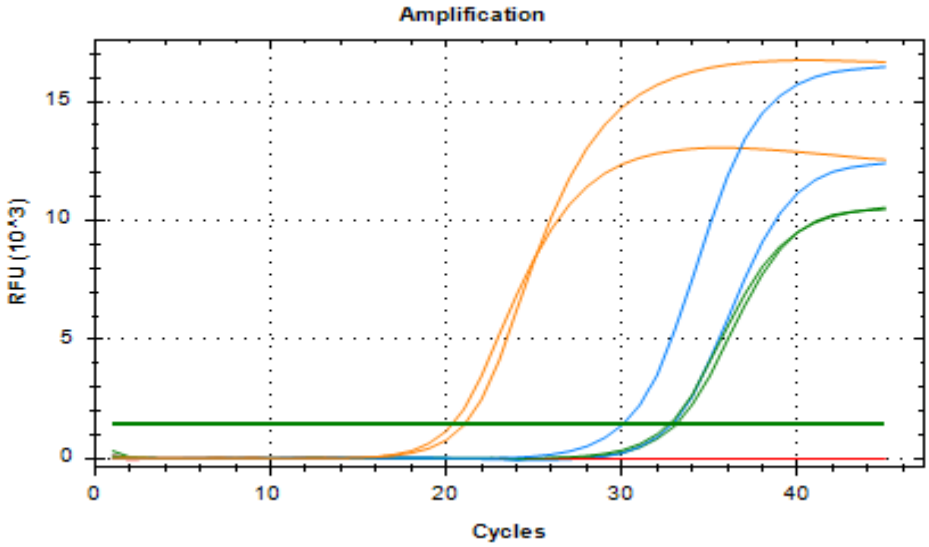
Şekil 3: A1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



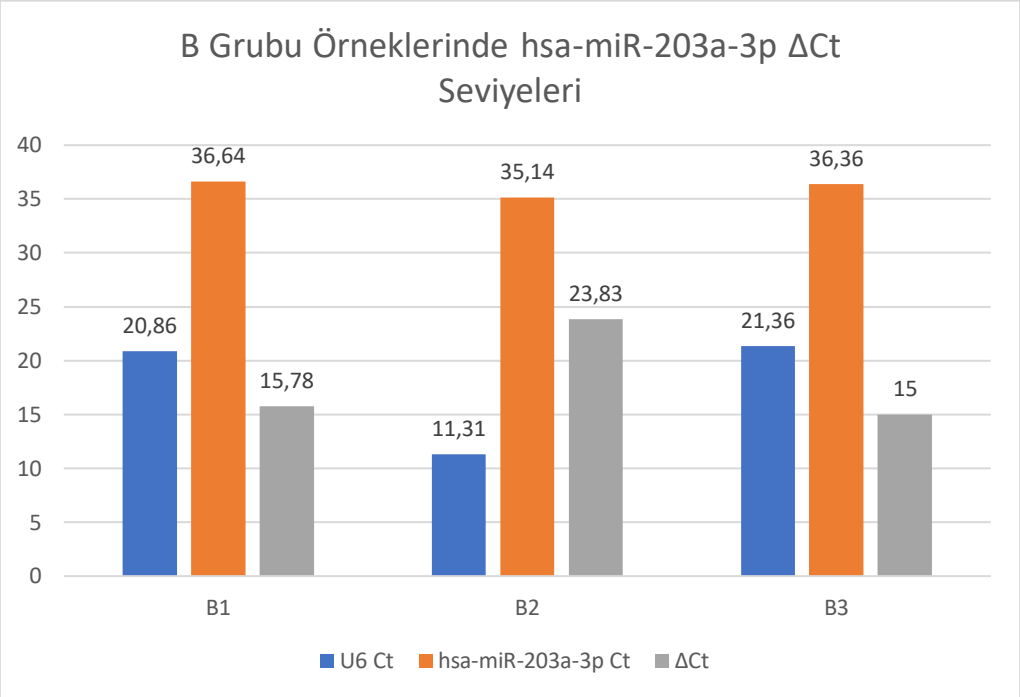
Şekil 4: A2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



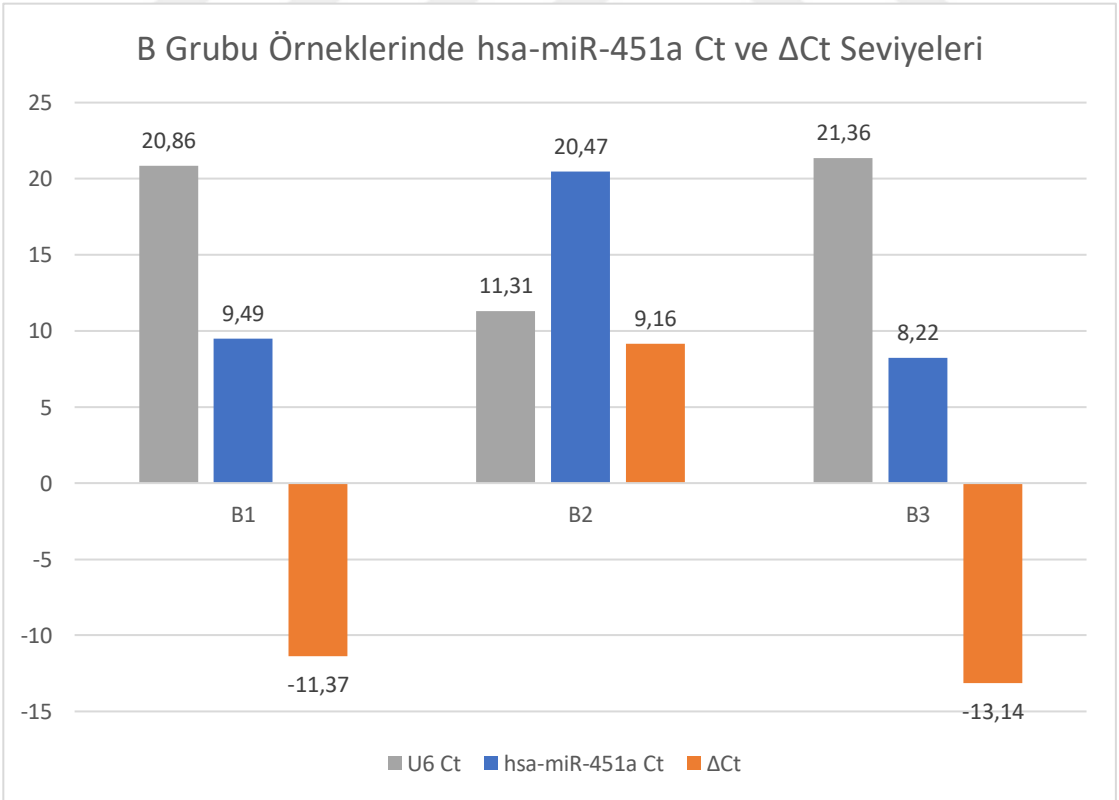
Şekil 5: A3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



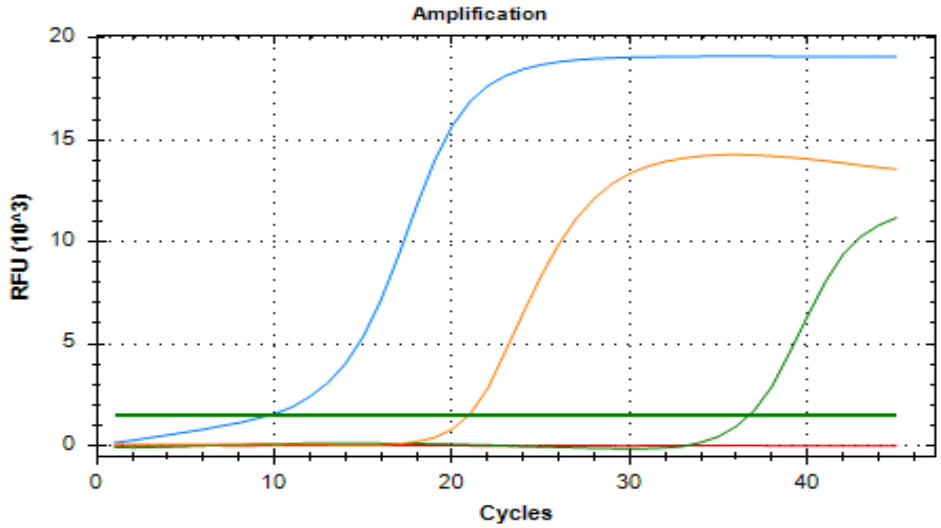
Şekil 6: A Grubu (A2-A3) Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



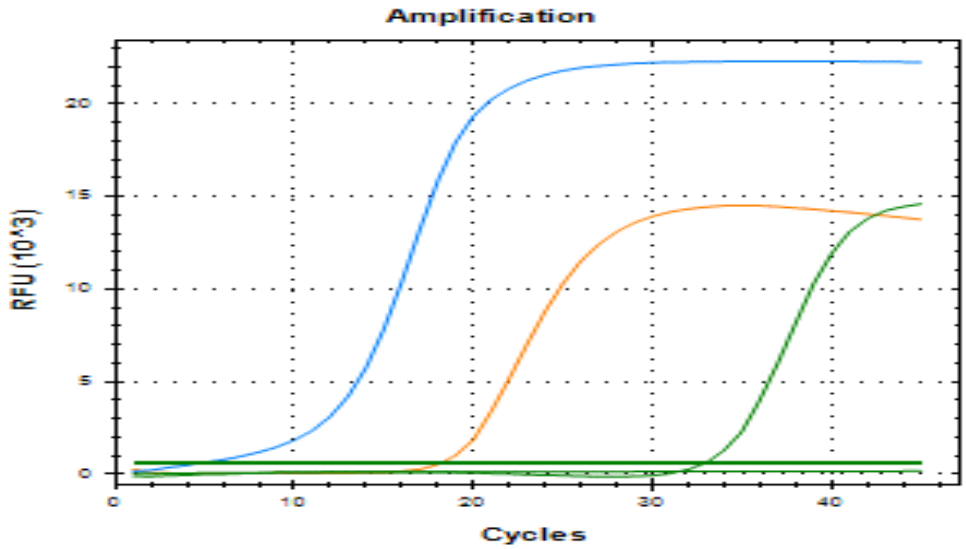
Şekil 7: B Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri



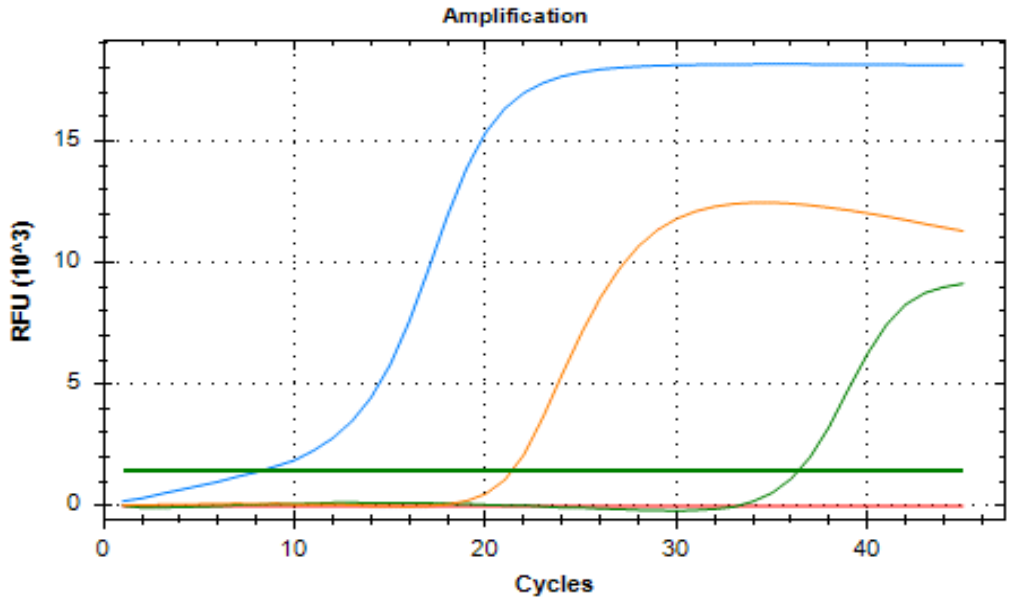
Şekil 8: B Grubu Örneklerinin hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri



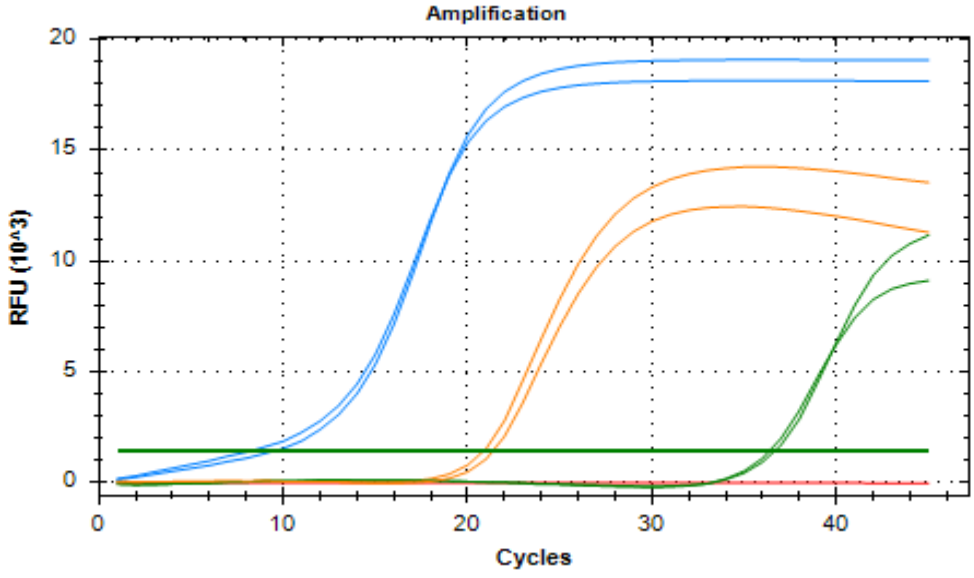
Şekil 9: B1 Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerler i(Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



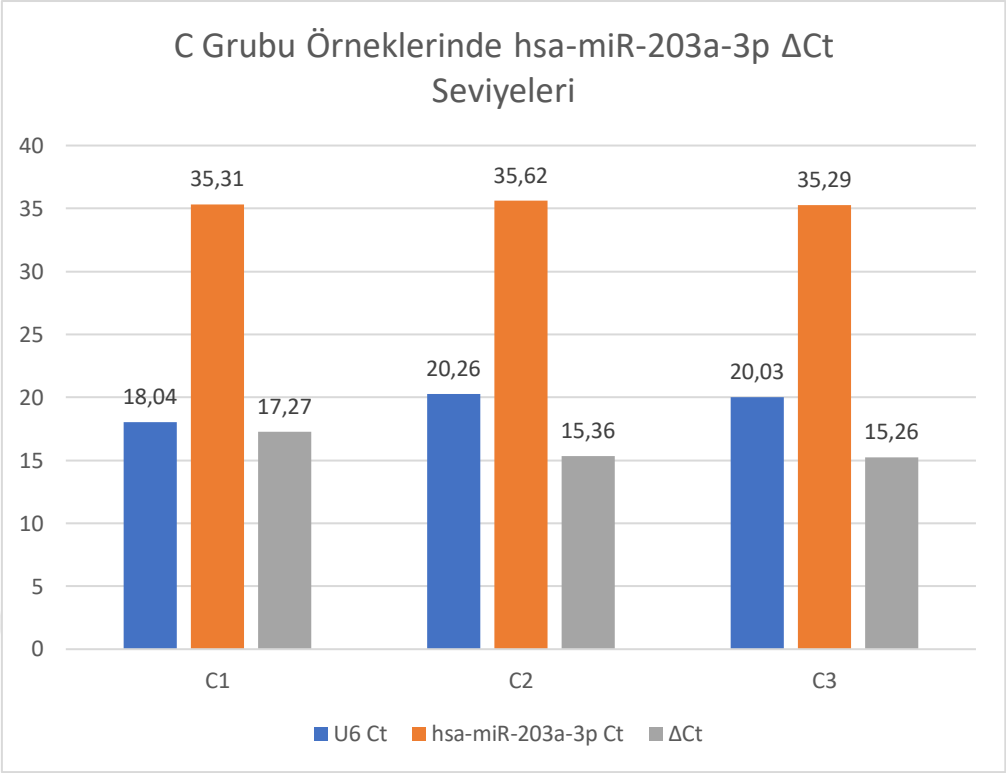
Şekil 10: B2 Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



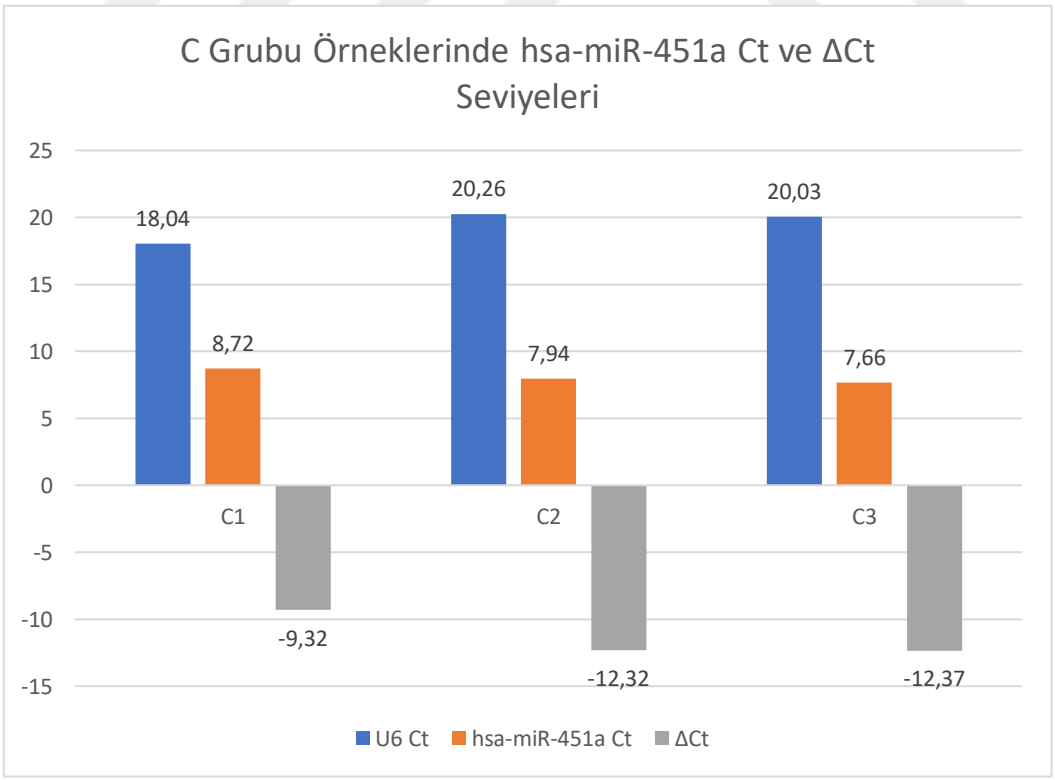
Şekil 11: B3 Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



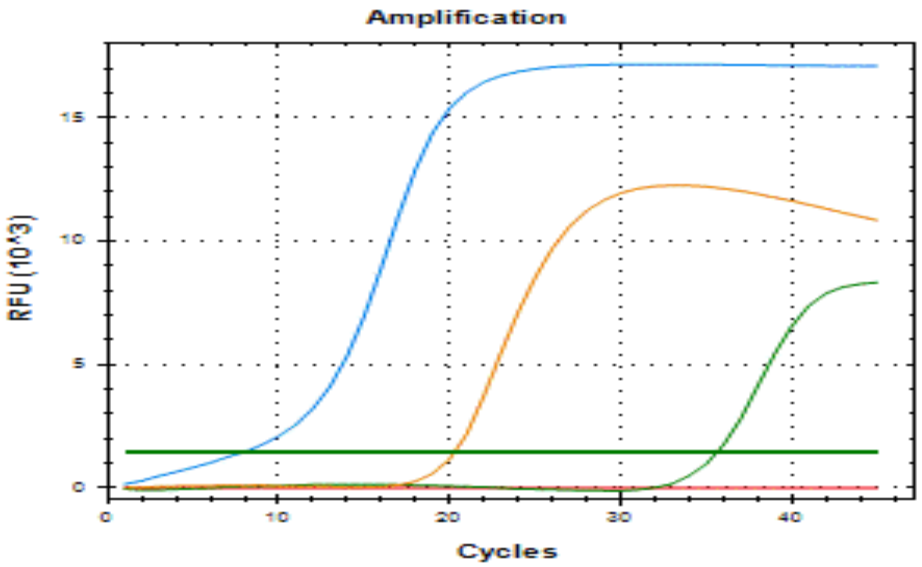
Şekil 12: B1- B3 Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



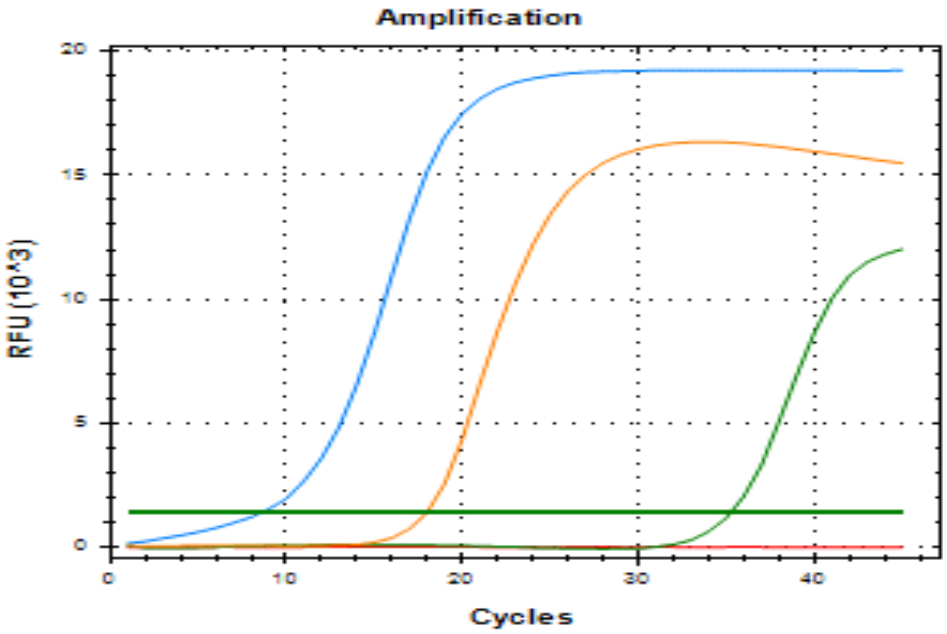
Şekil 13: C Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri



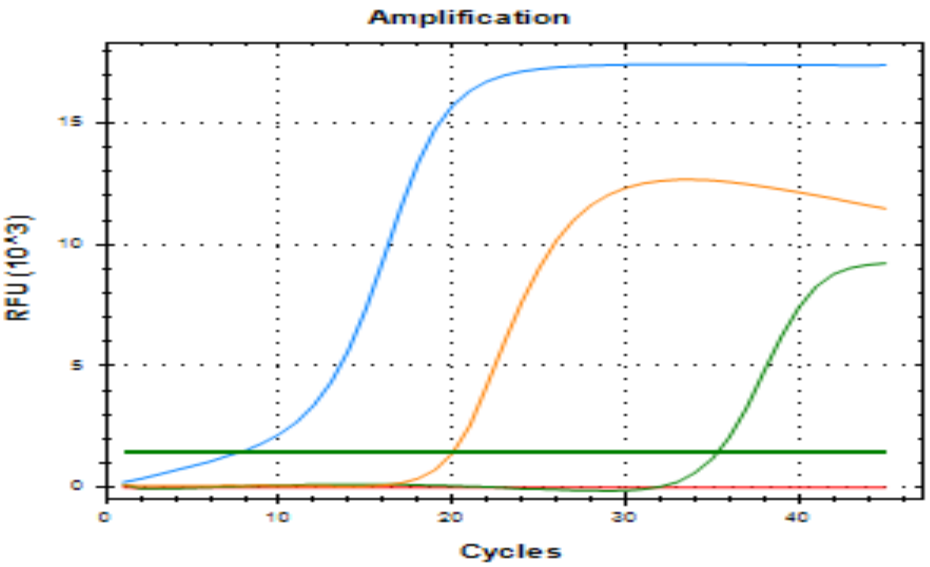
Şekil 14: C Grubu Örneklerinin hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri



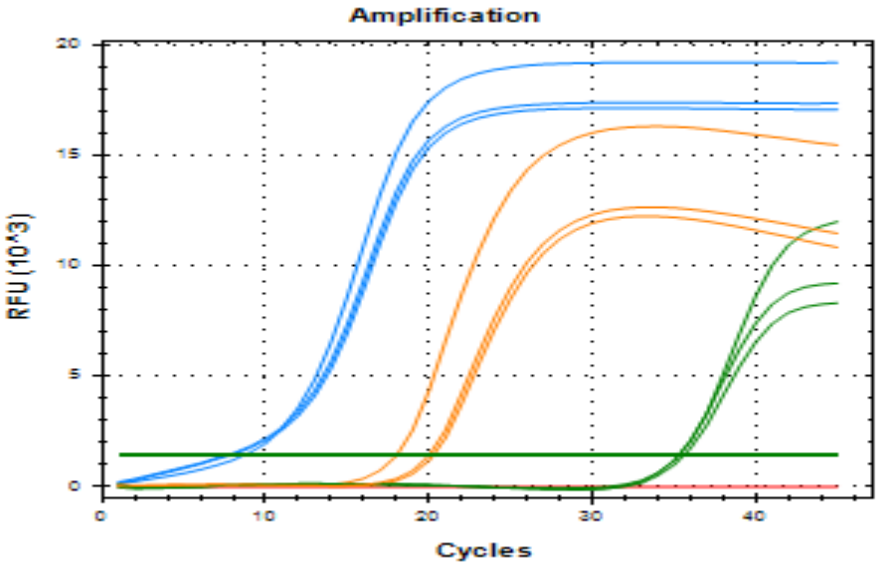
Şekil 15: C1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



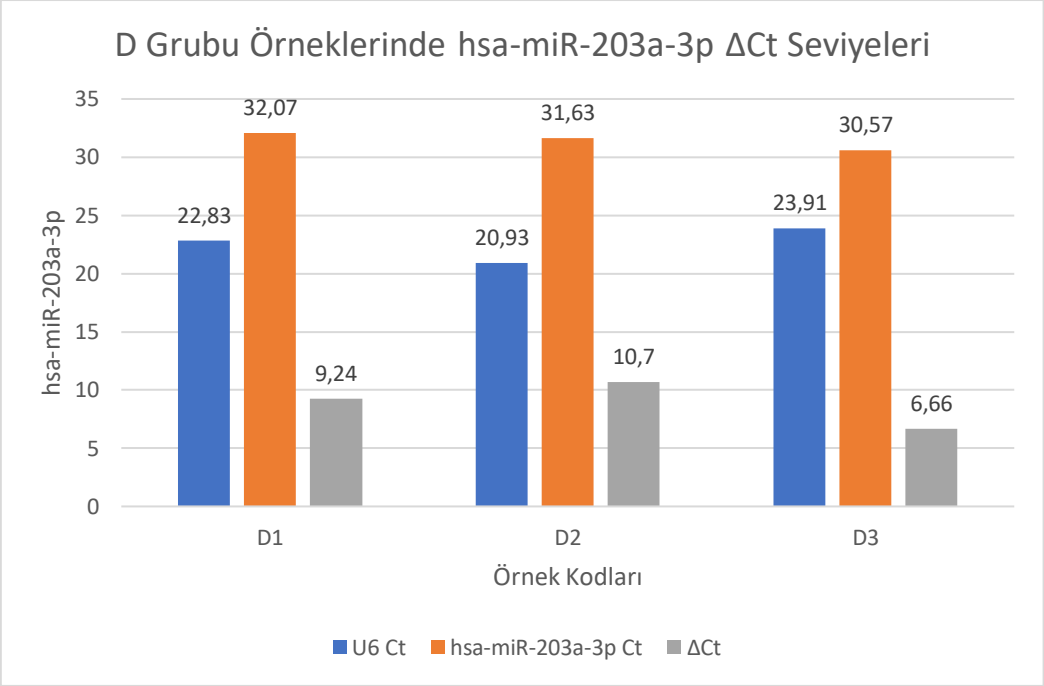
Şekil 16: C2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



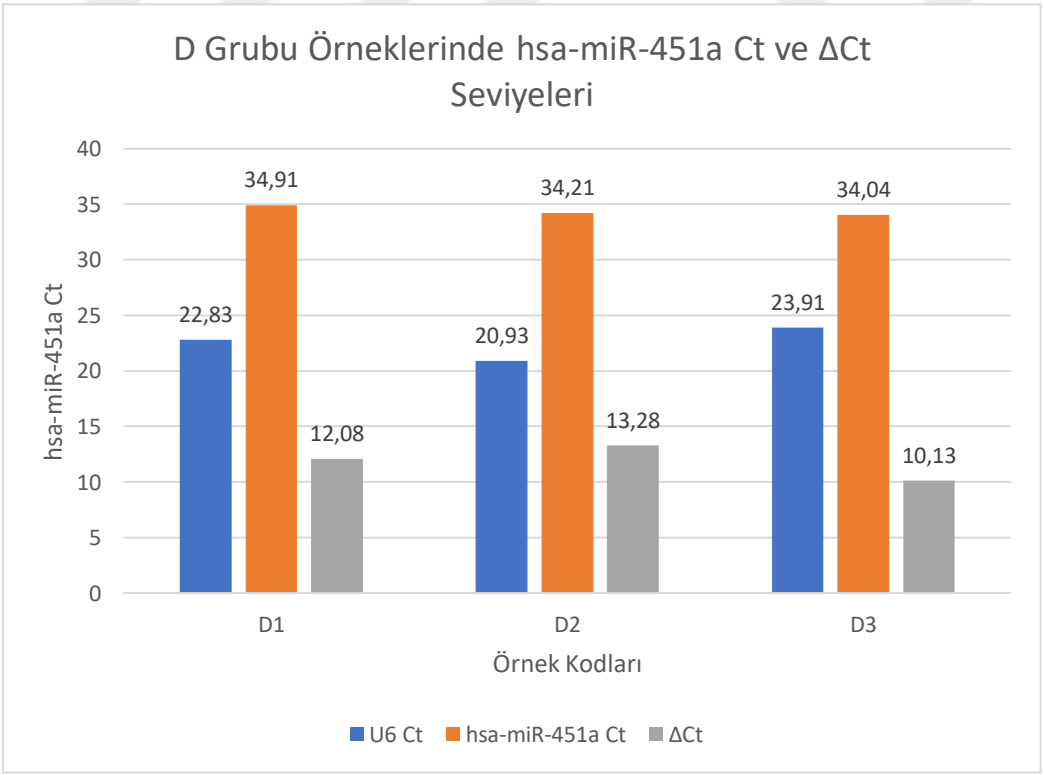
Şekil 17: C3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



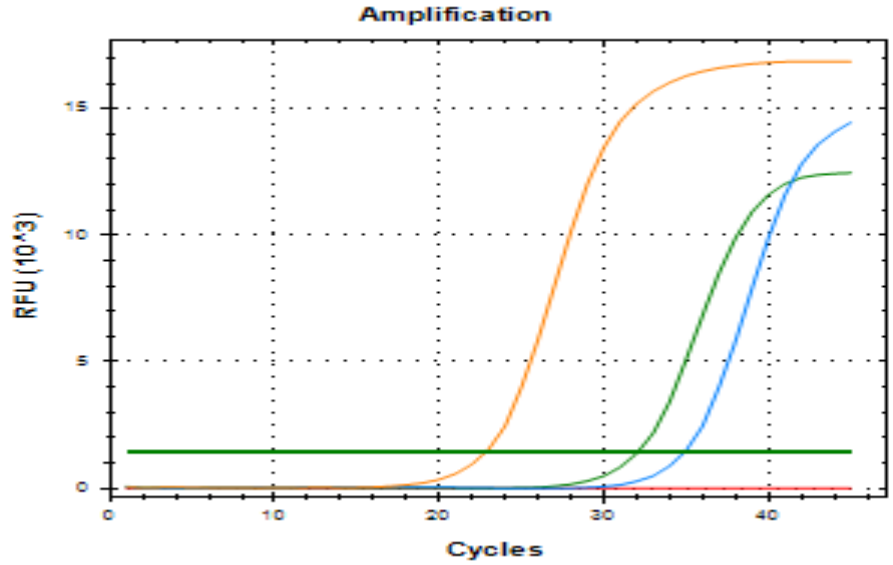
Şekil 18: C1-C2- C3 Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



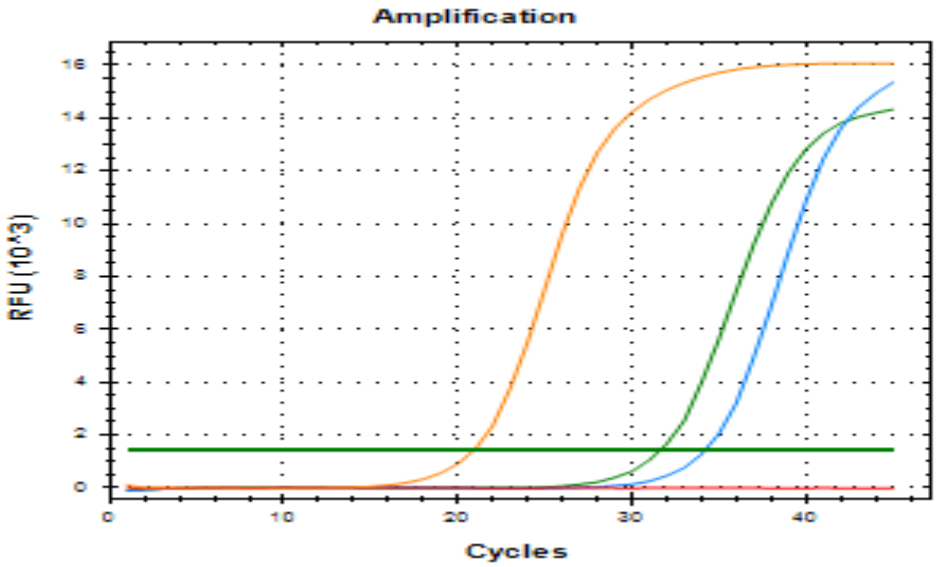
Şekil 19: D Grubu Örneklerinin hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri



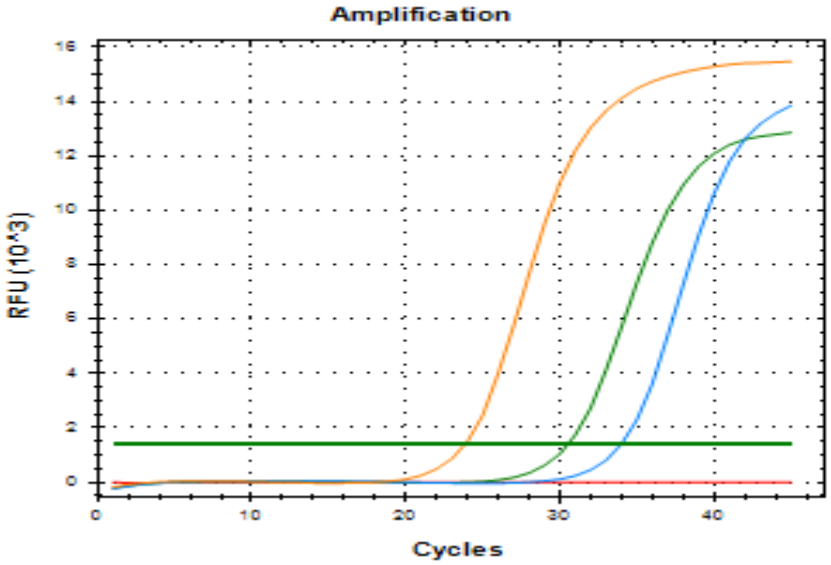
Şekil 20: D Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri



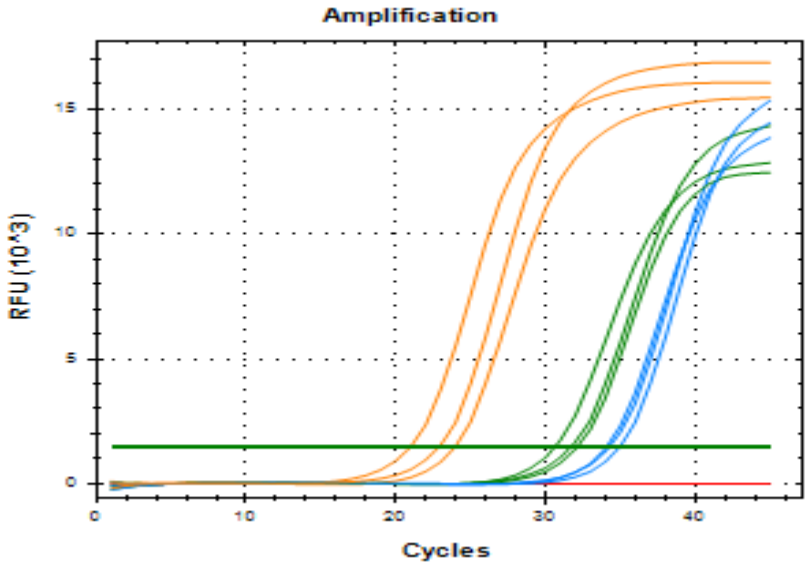
Şekil 21: D1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



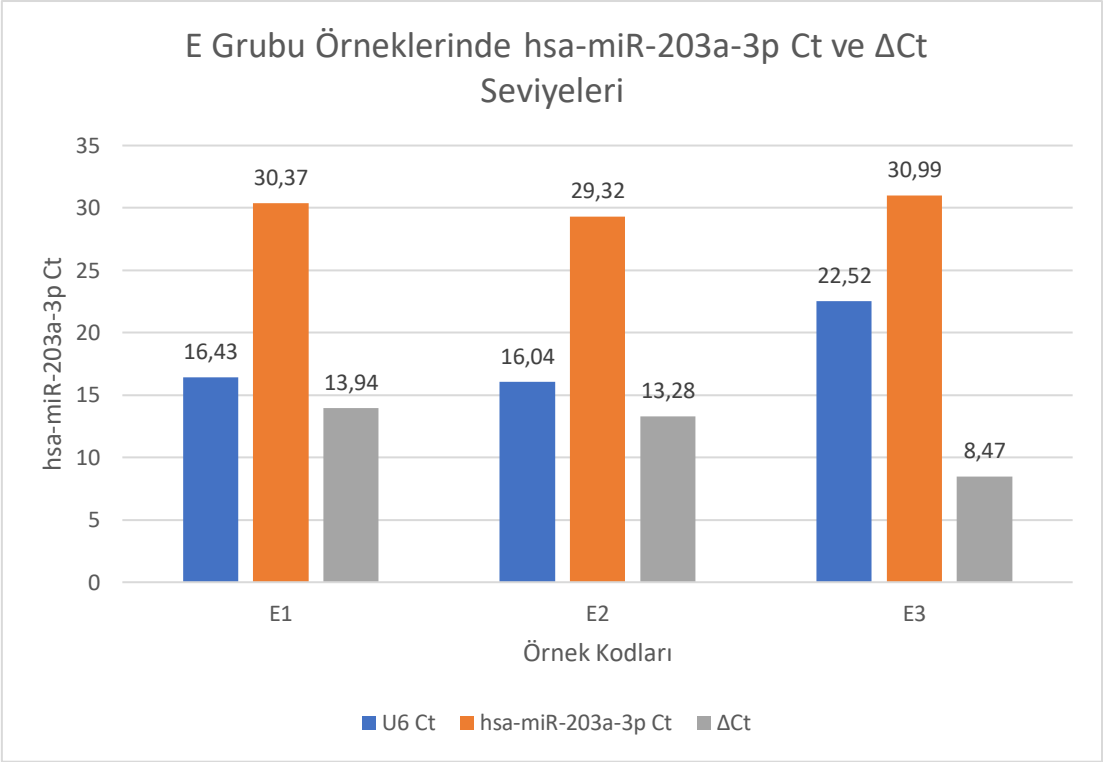
Şekil 22: D2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



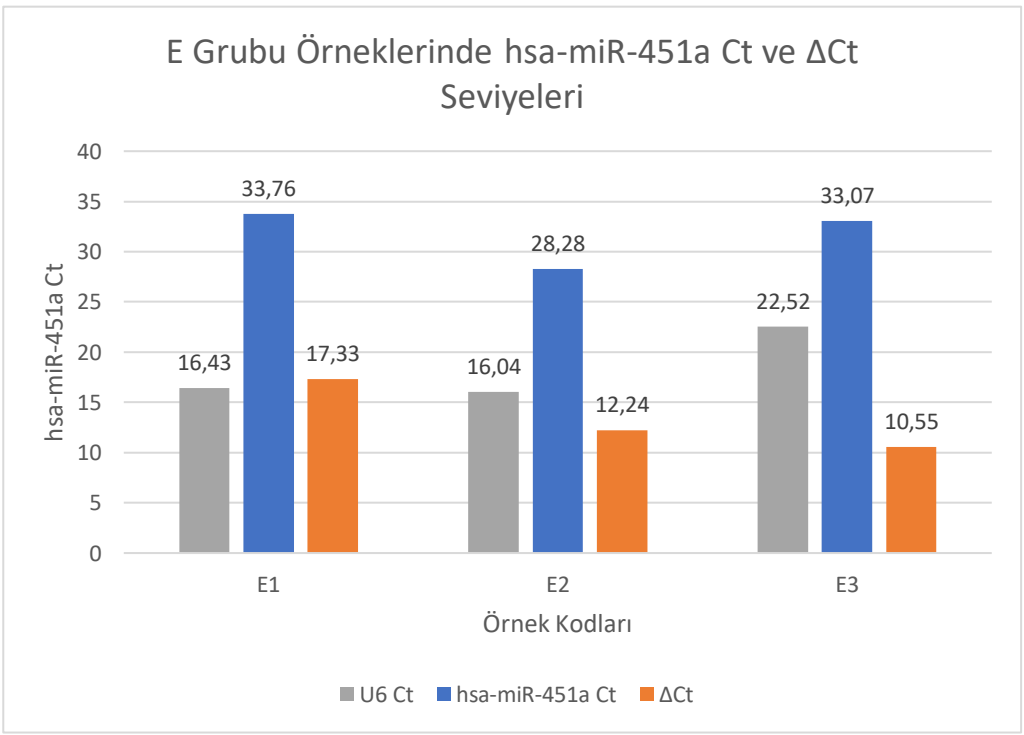
Şekil 23: D3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



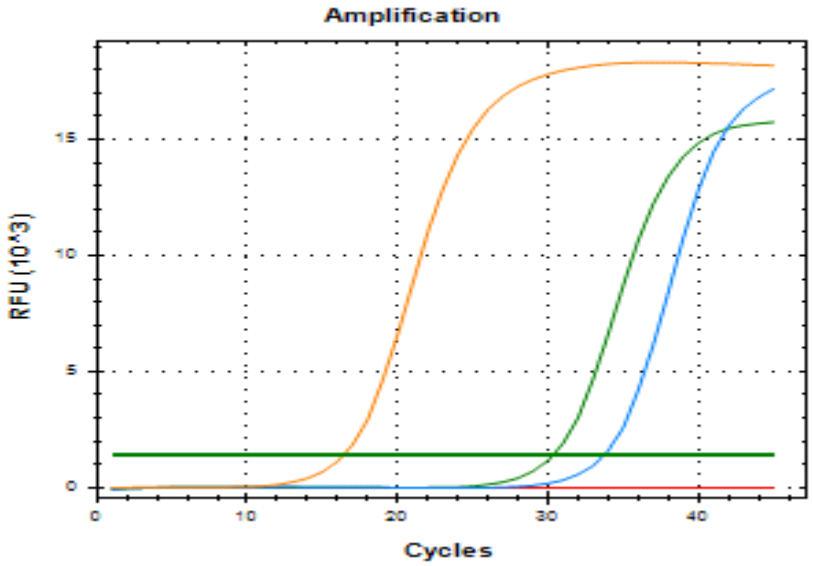
Şekil 24: D Grubunun hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



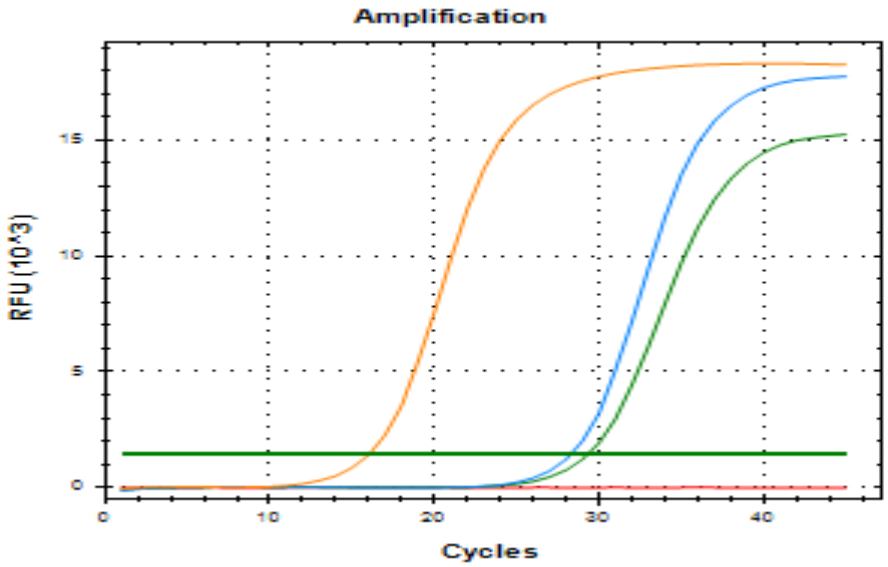
Şekil 25: E Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri



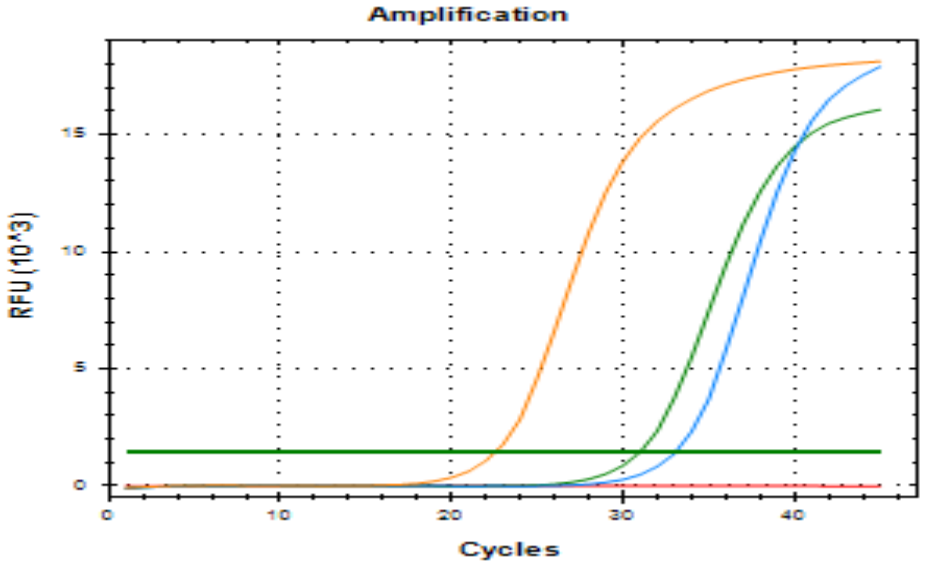
Şekil 26: E Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri



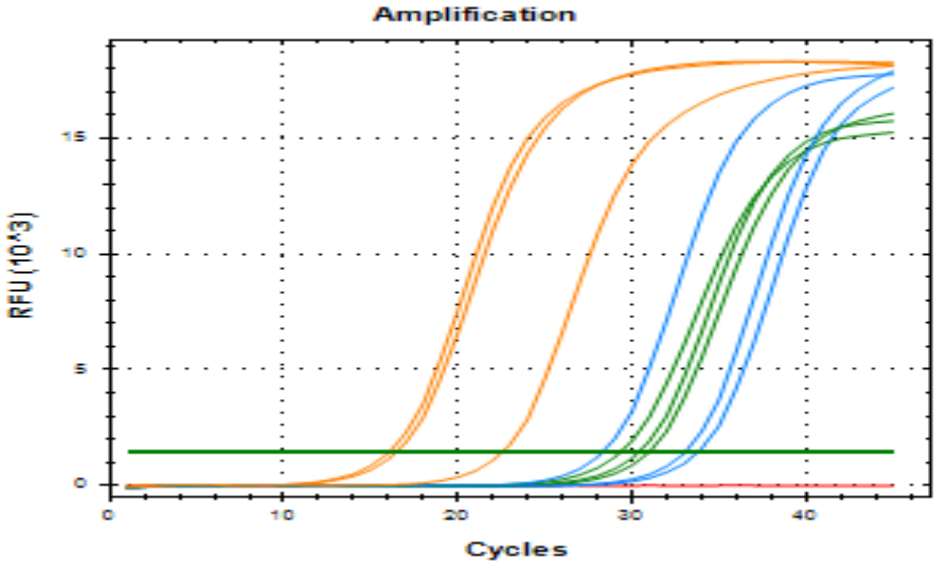
Şekil 27: E1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



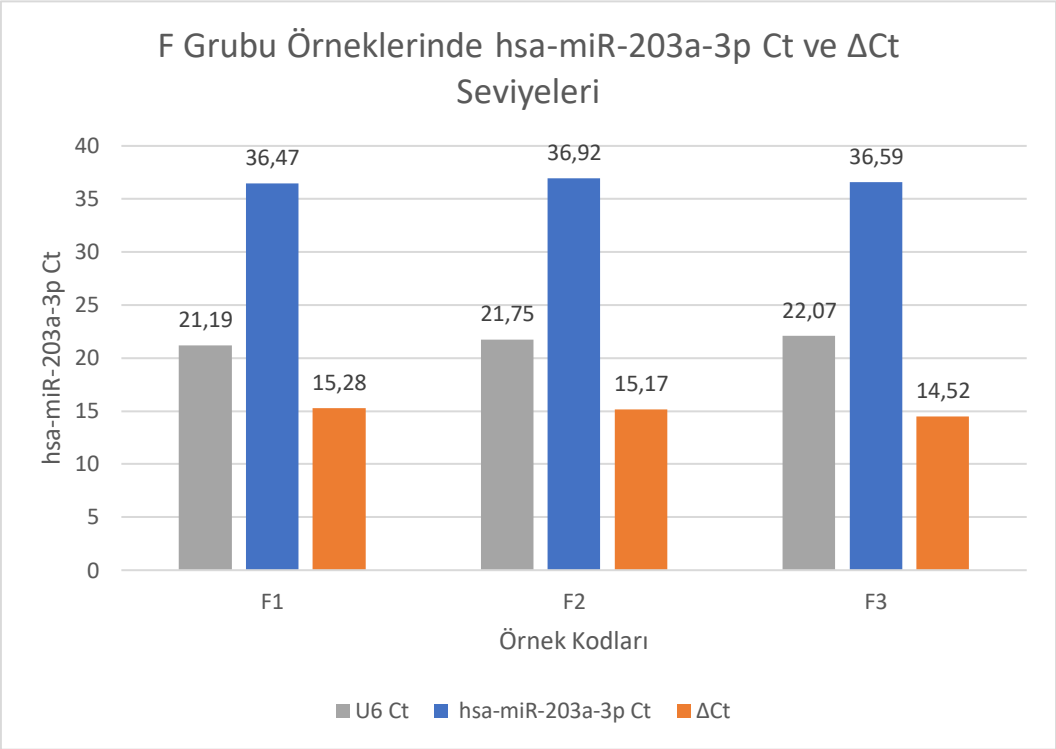
Şekil 28: E2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



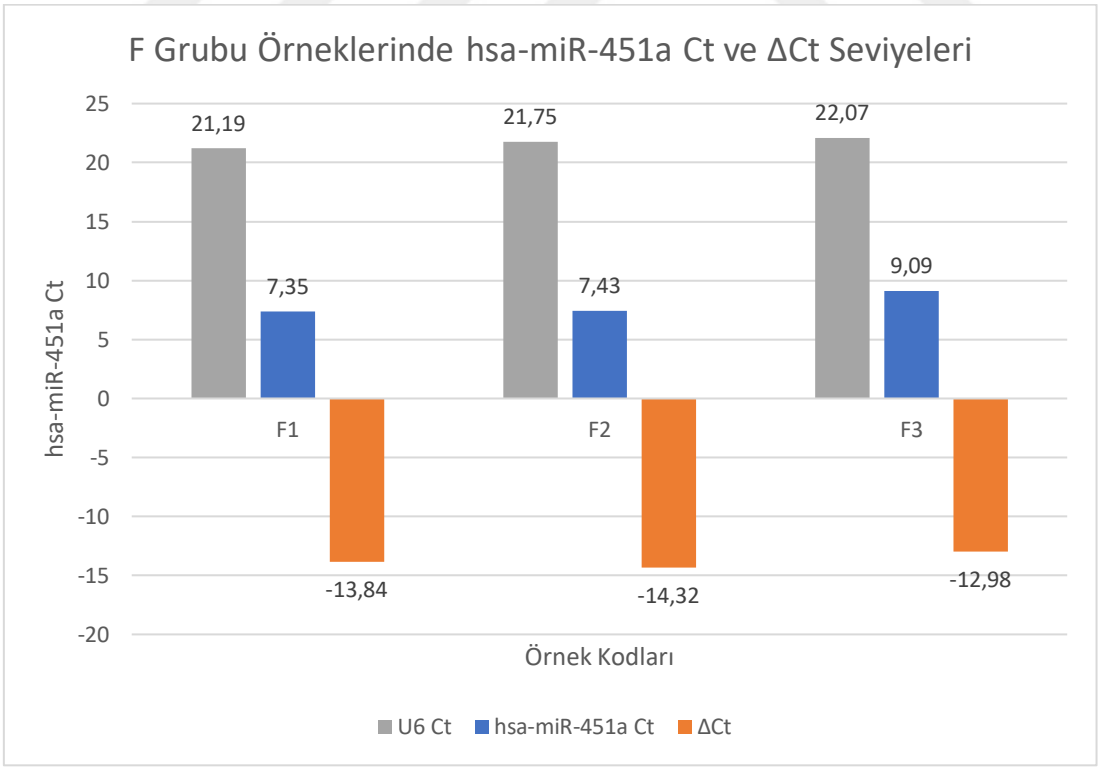
Şekil 29: E3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



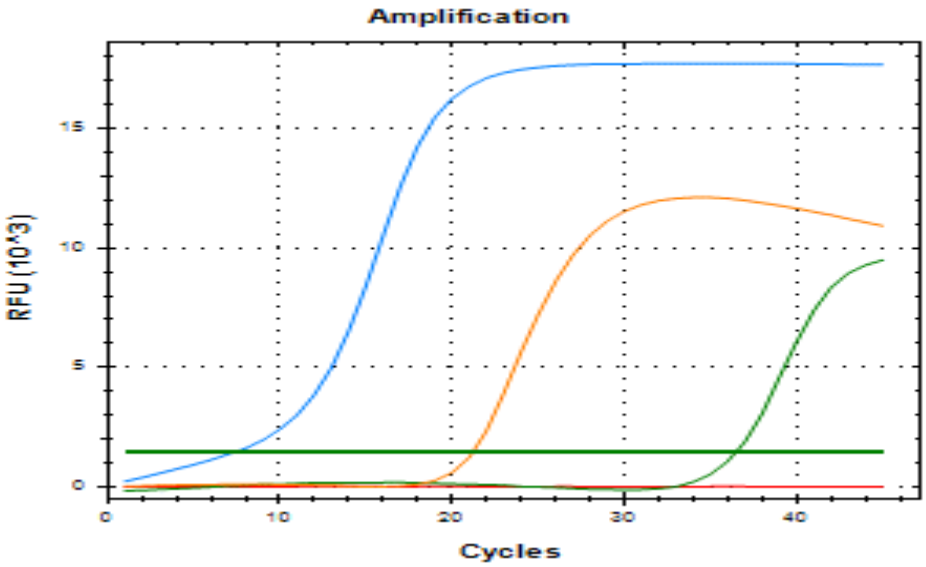
Şekil 30: E Grubunun hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



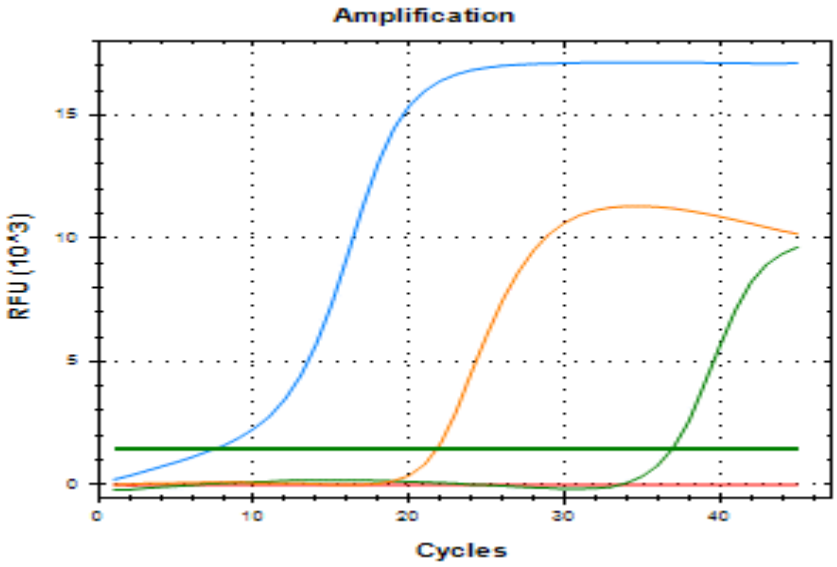
Şekil 31: F Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri



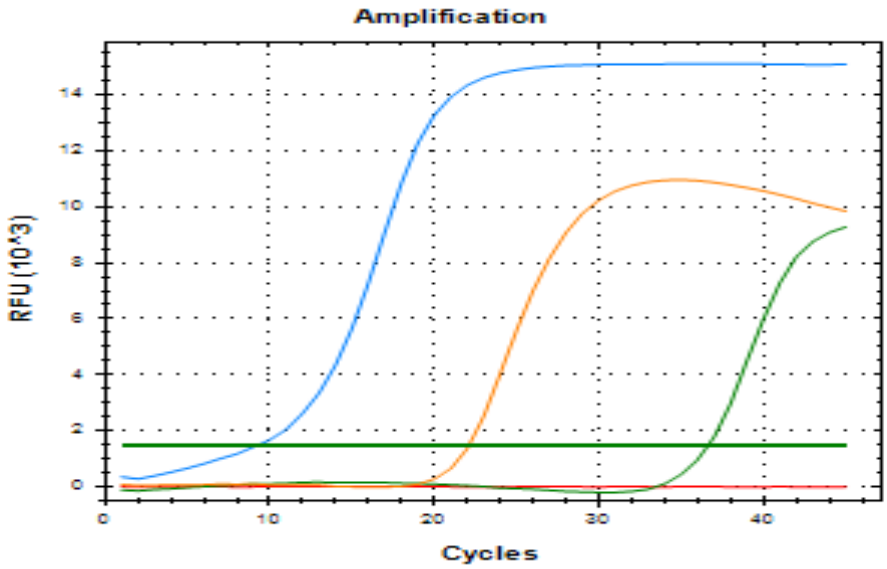
Şekil 32: F Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri



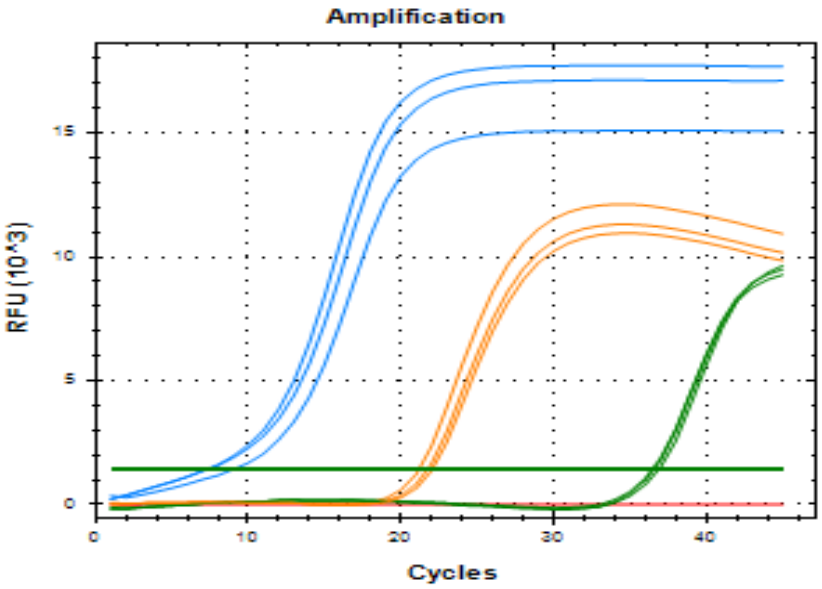
Şekil 33: F1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



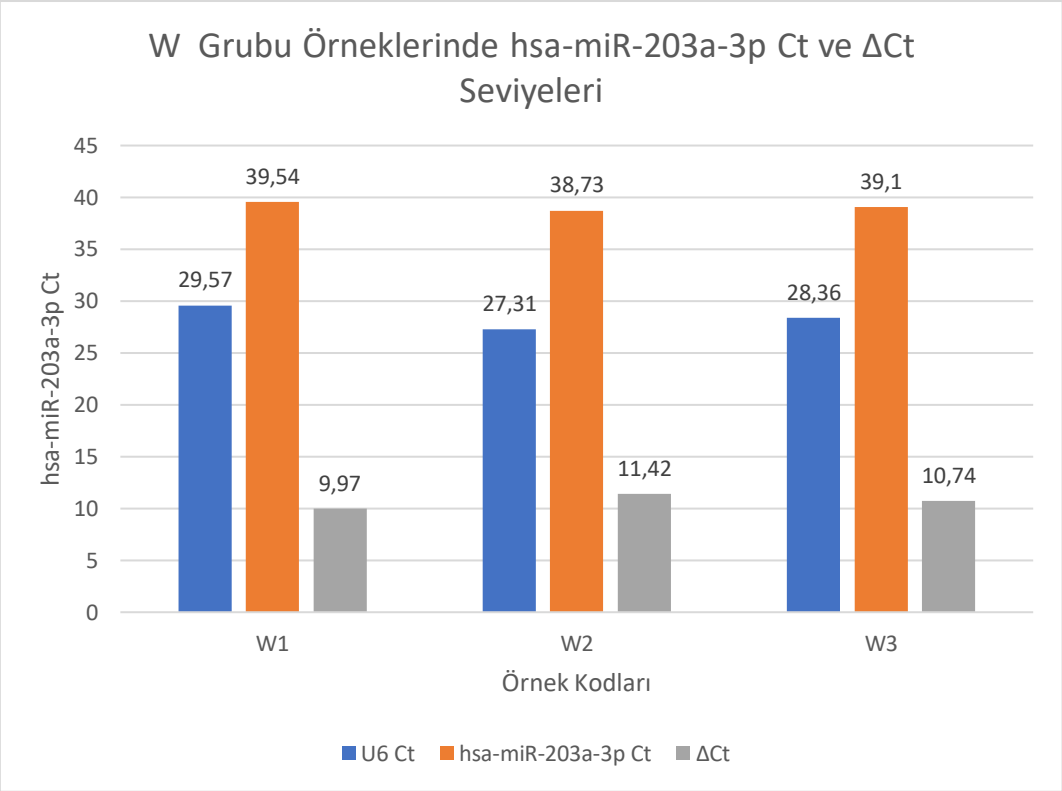
Şekil 34: F2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



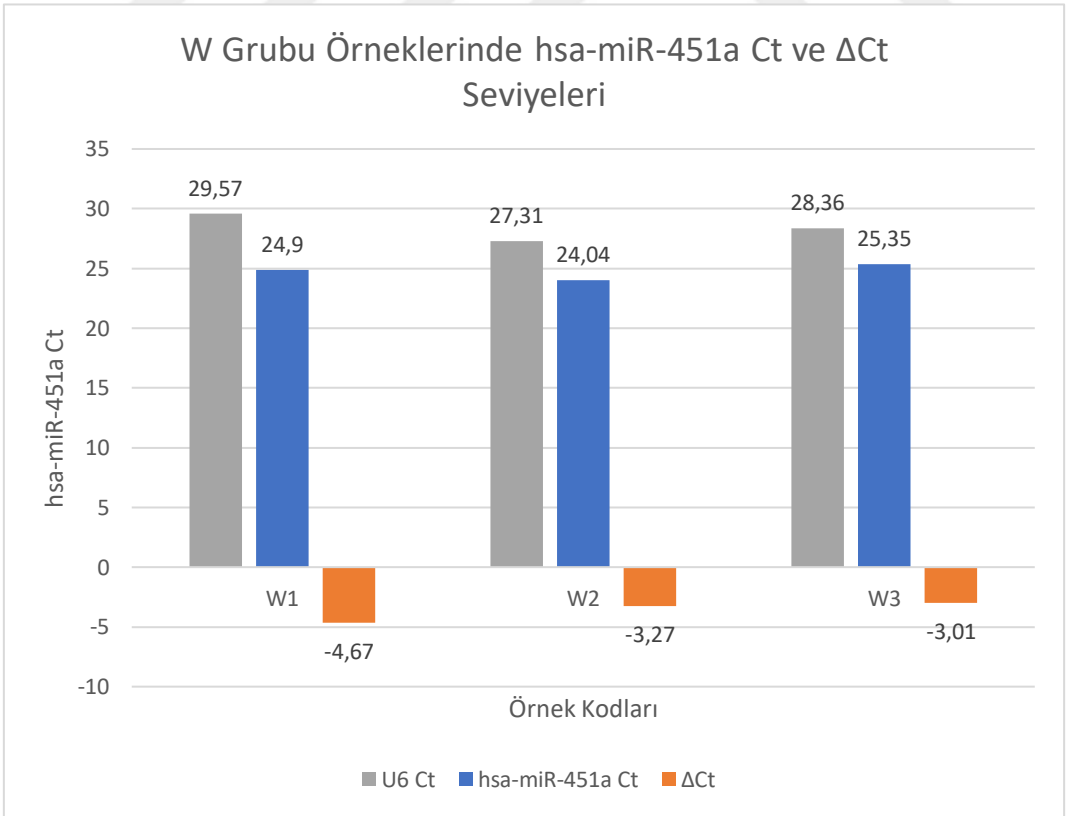
Şekil 35: F3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlenirinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



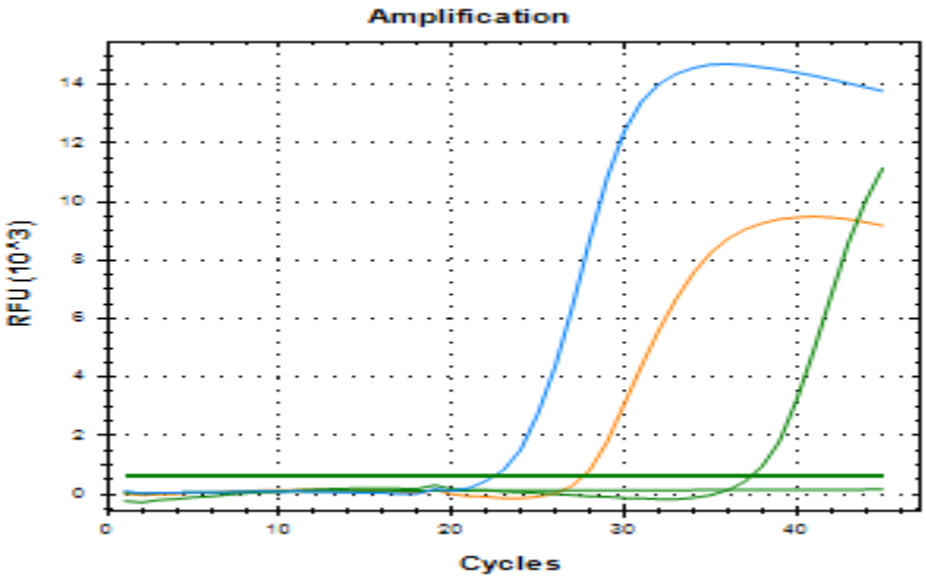
Şekil 36: F Grubunun hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



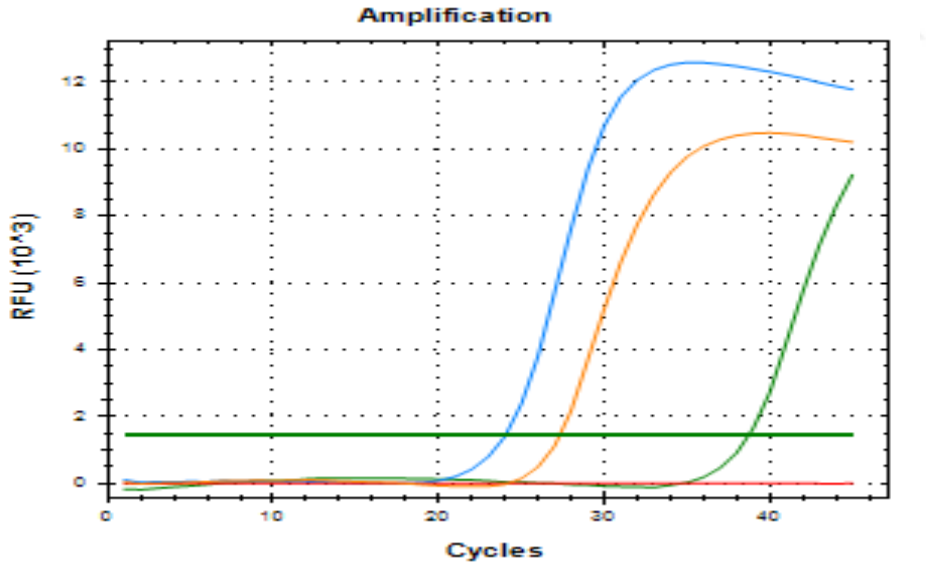
Şekil 37: W Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri



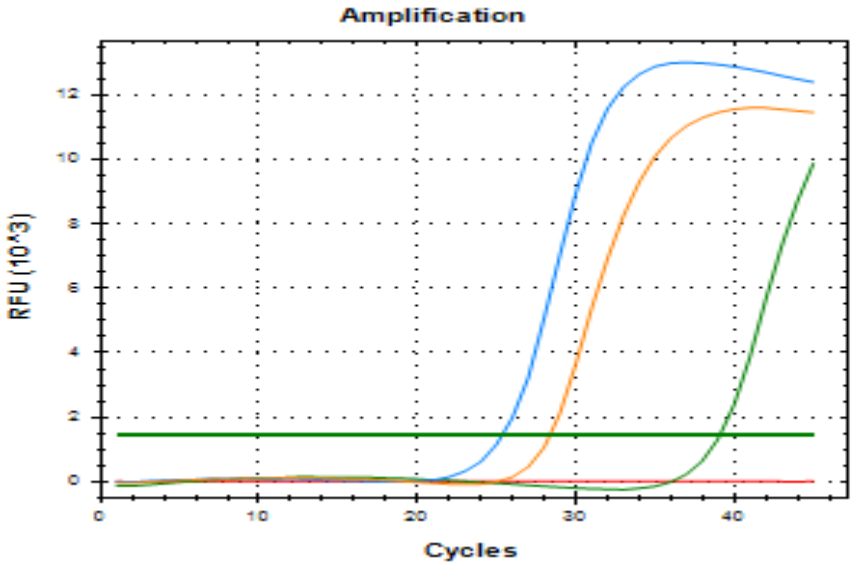
Şekil 38: W Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri



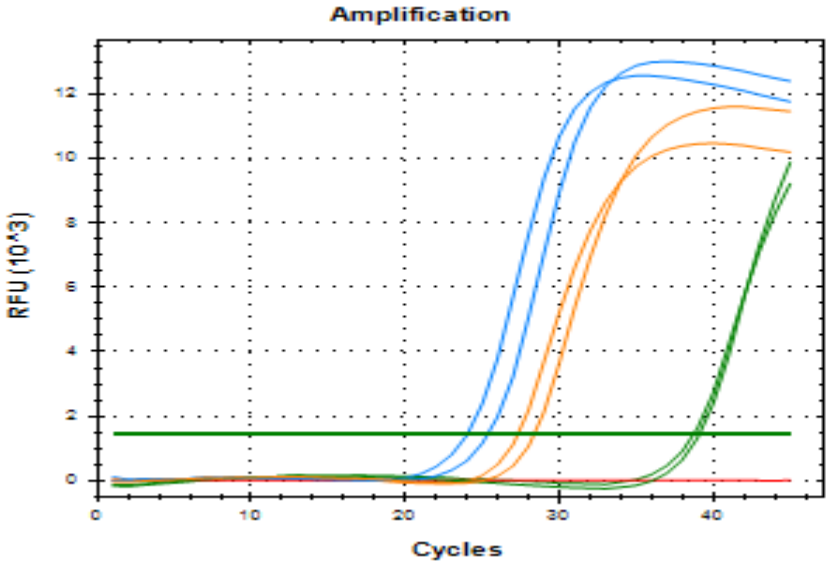
Şekil 39: W1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



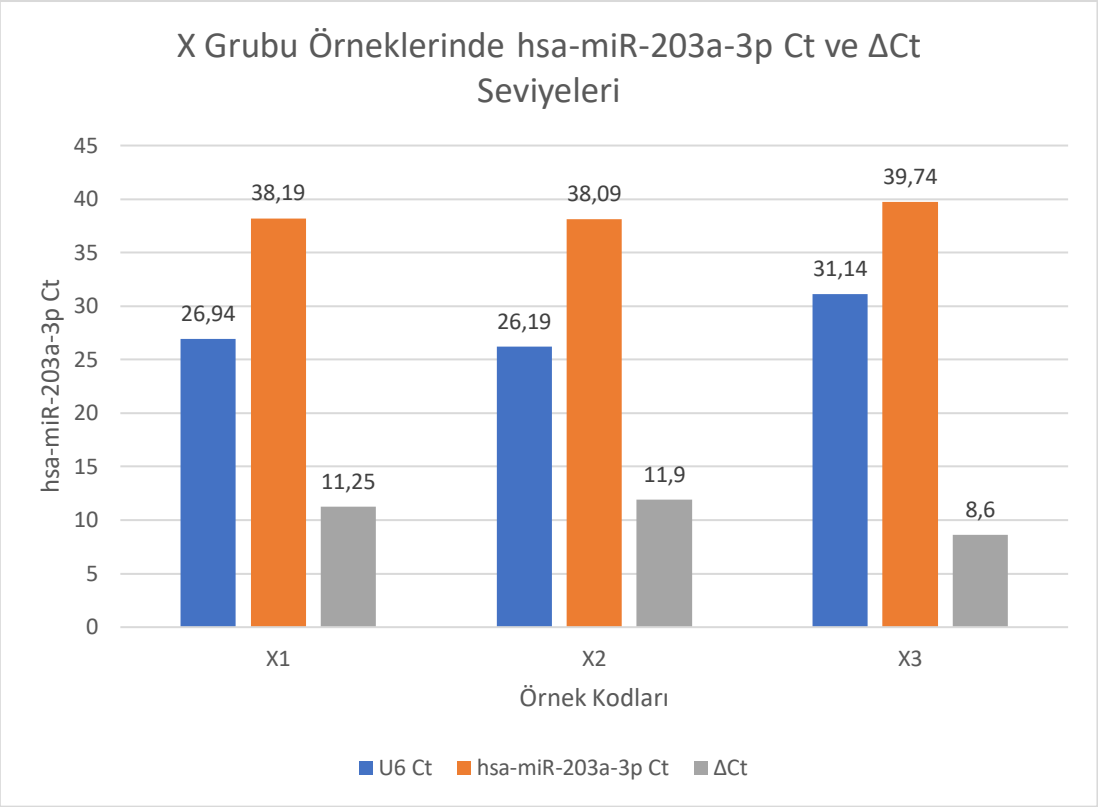
Şekil 40: W2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



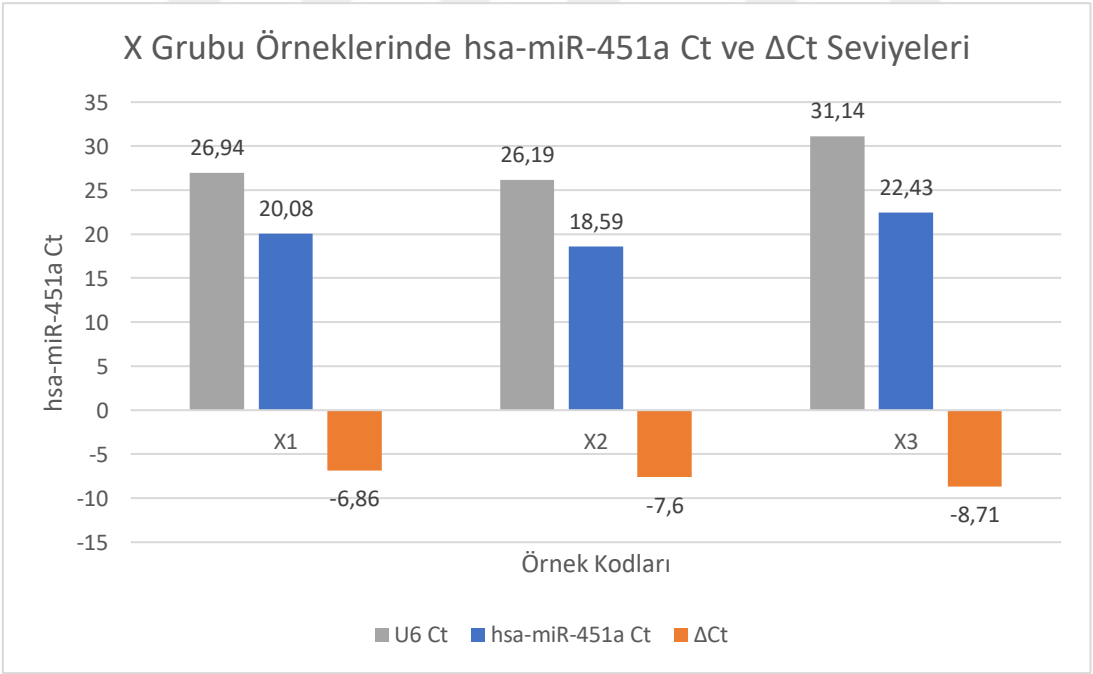
Şekil 41: W3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



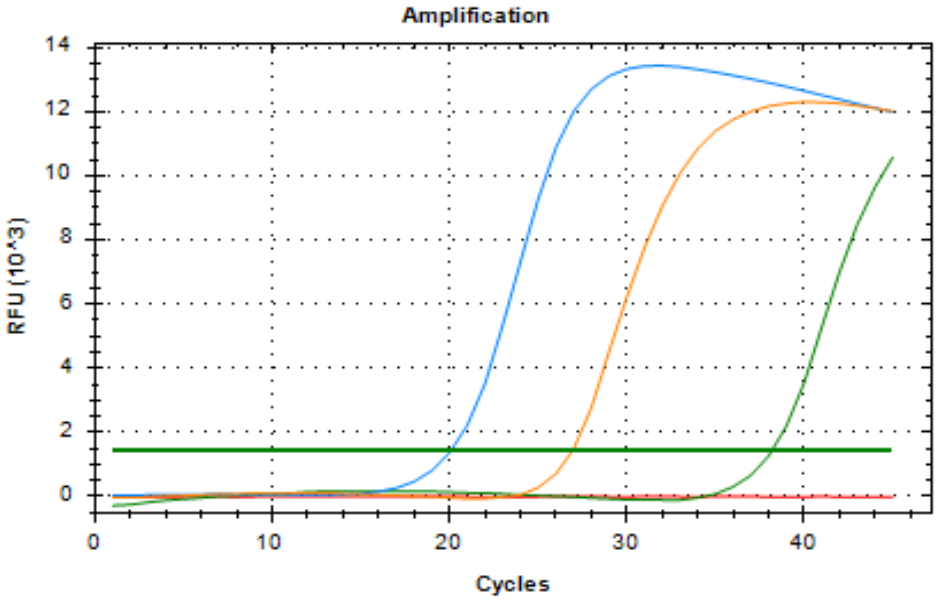
Şekil 42: W Grubunun hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



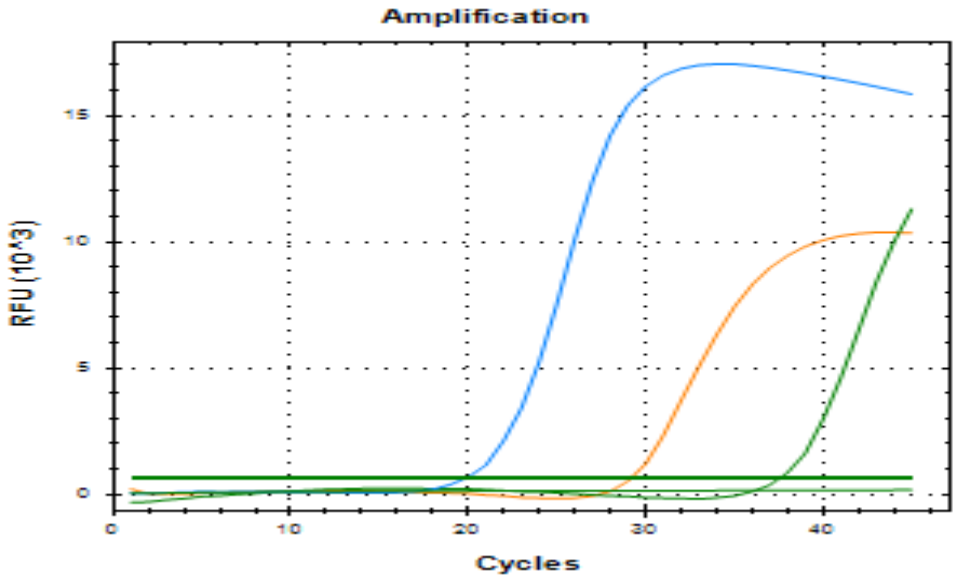
Şekil 43: X Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri



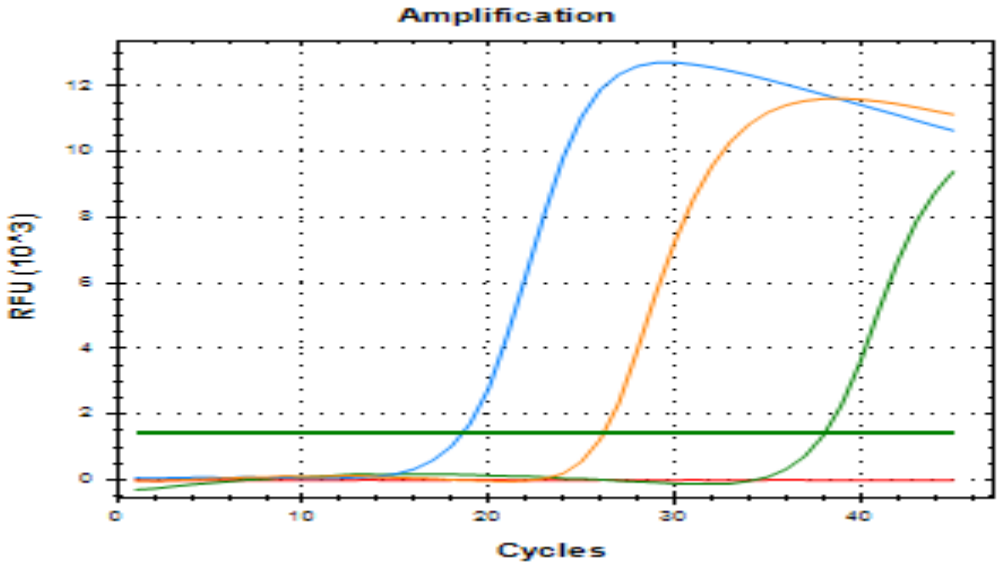
Şekil 44: X Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri



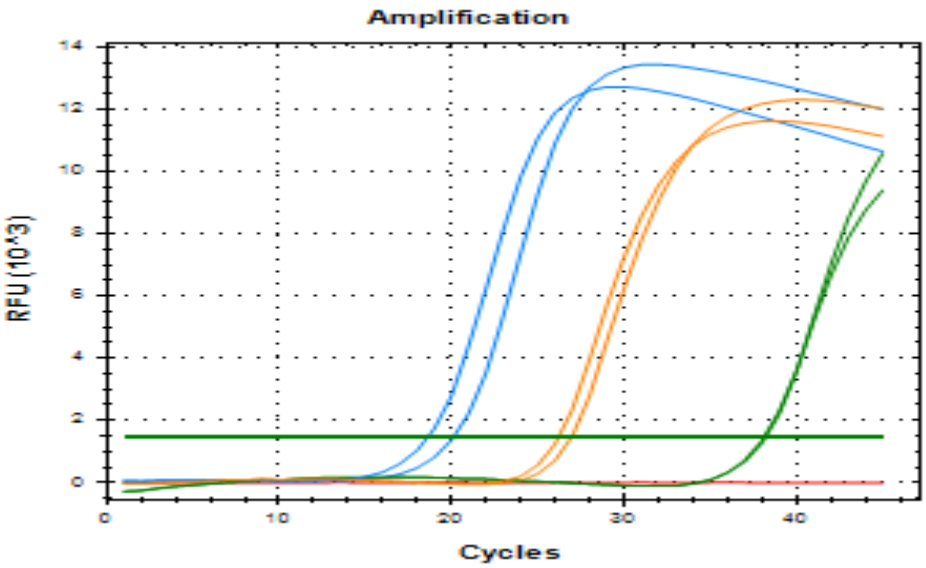
Şekil 45: X1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



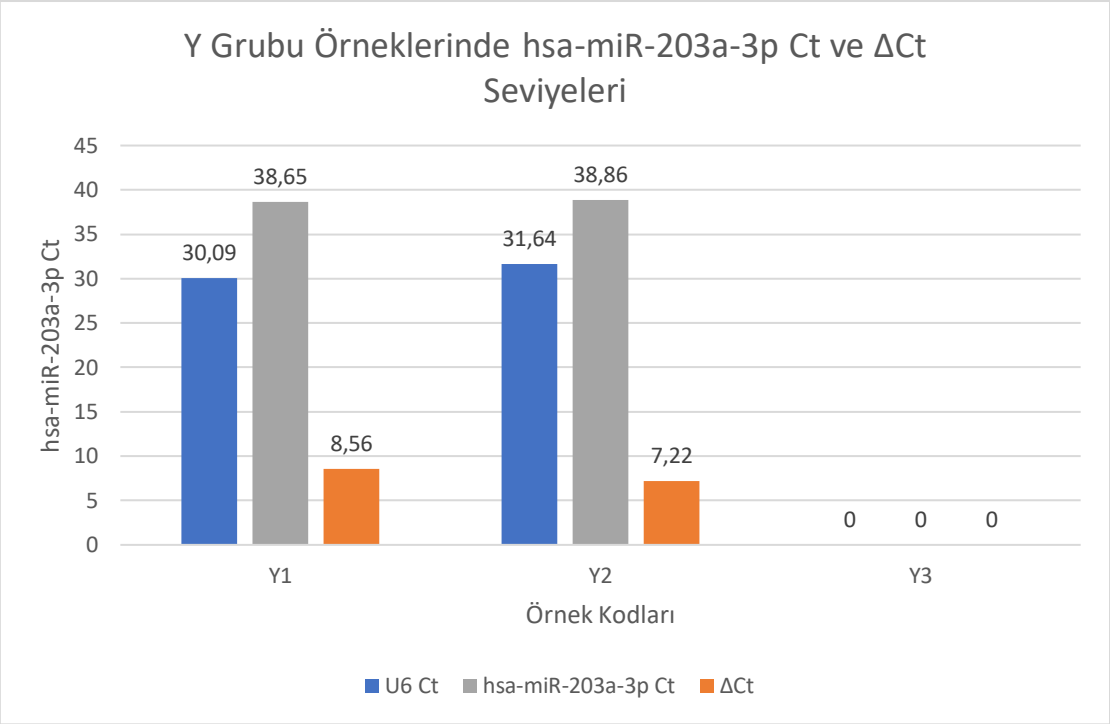
Şekil 46: X2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



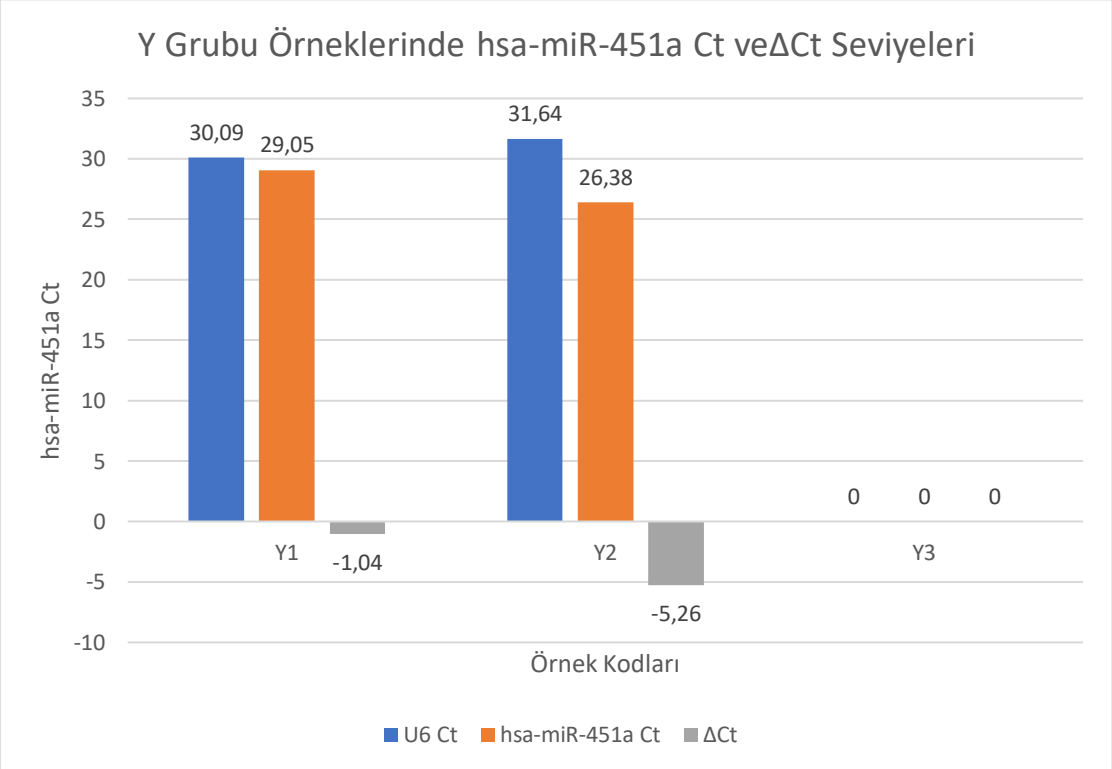
Şekil 47: X3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



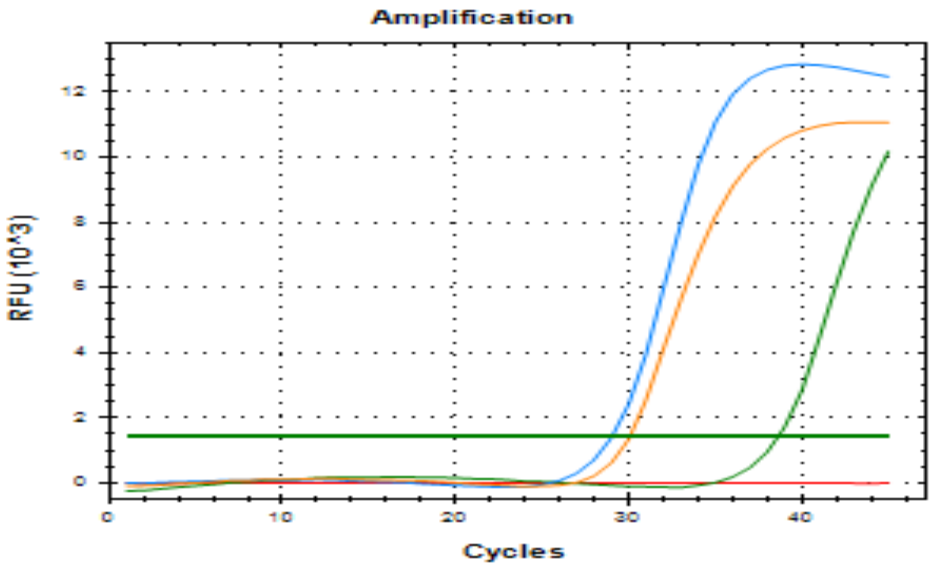
Şekil 48: X grubunun (X1-X2) Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



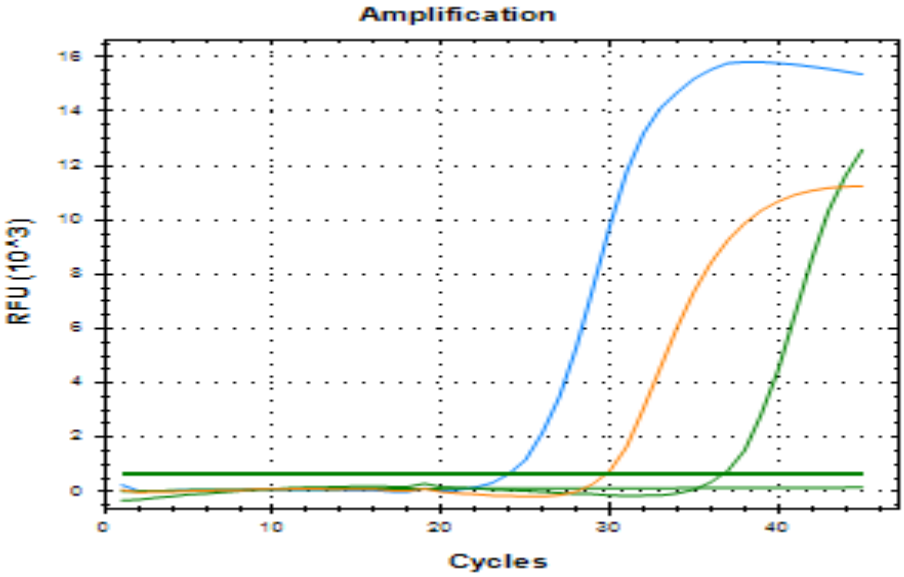
Şekil 49: Y Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri



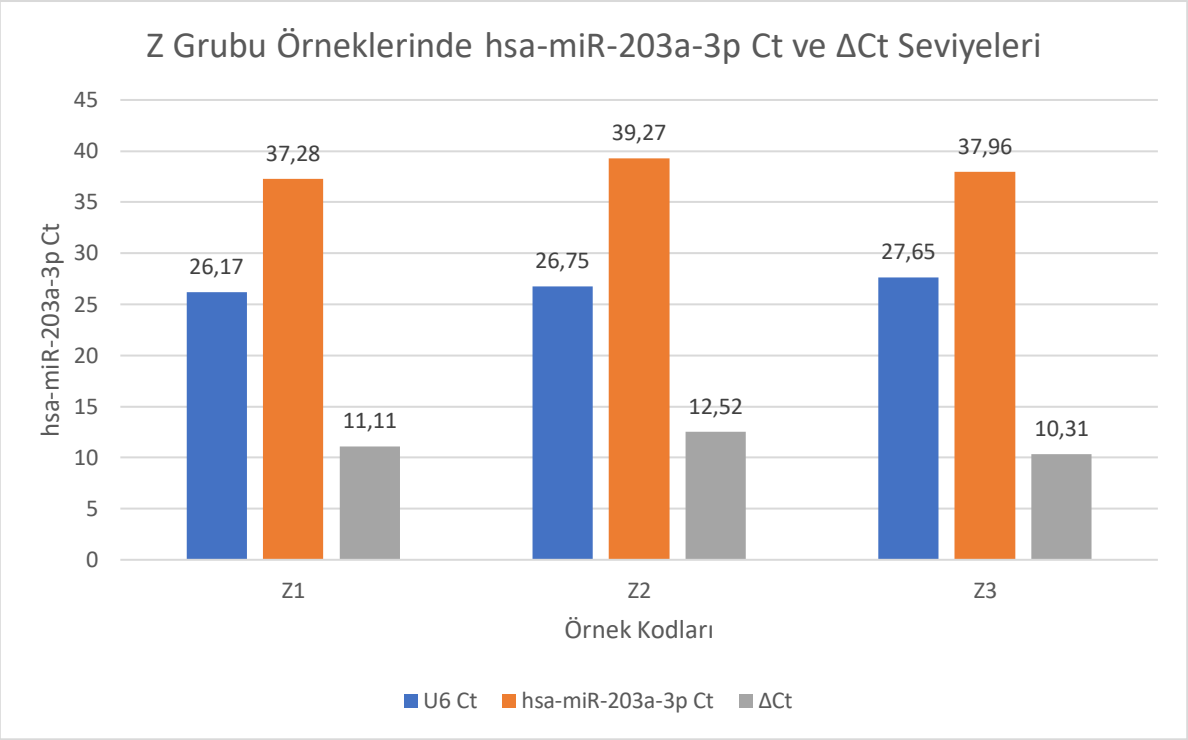
Şekil 50: Y Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct veΔCt Seviyeleri



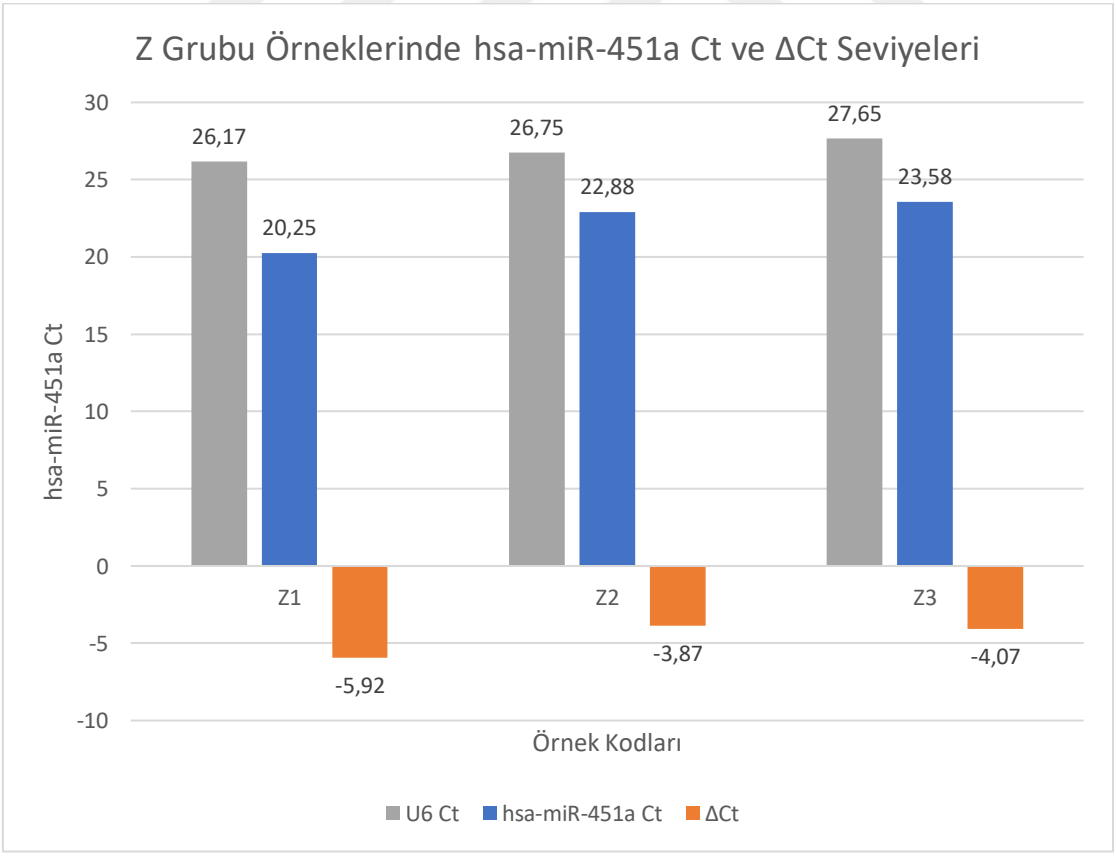
Şekil 51: Y1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



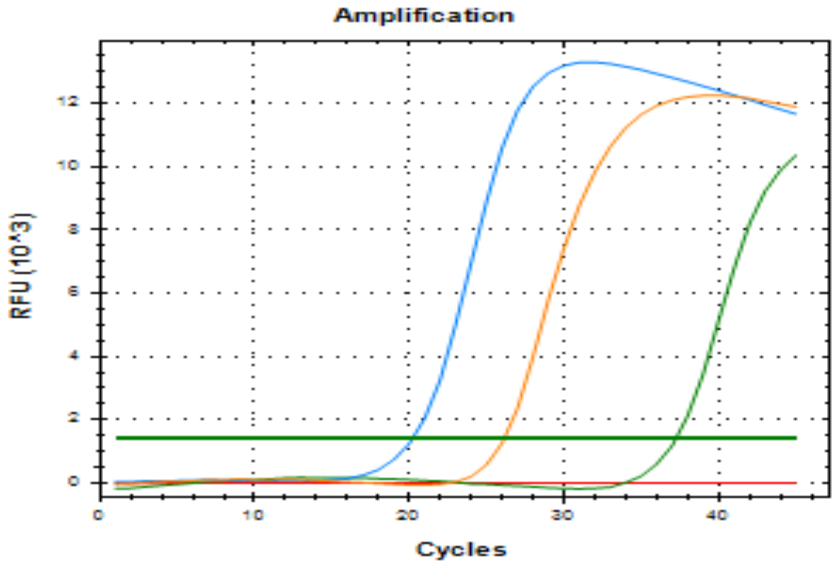
Şekil 52: Y2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



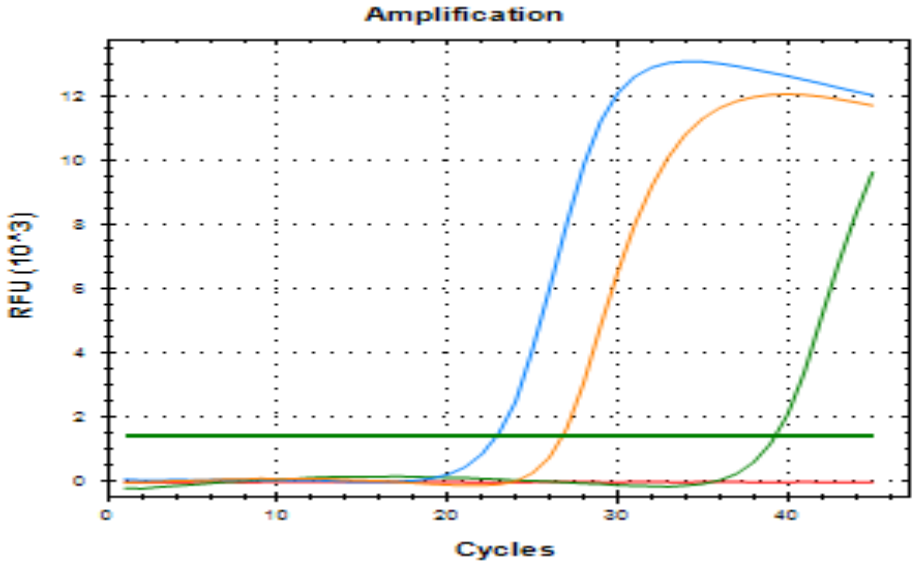
Şekil 53: Z Grubu Örneklerinde hsa-miR-203a-3p Ct ve ΔCt Seviyeleri



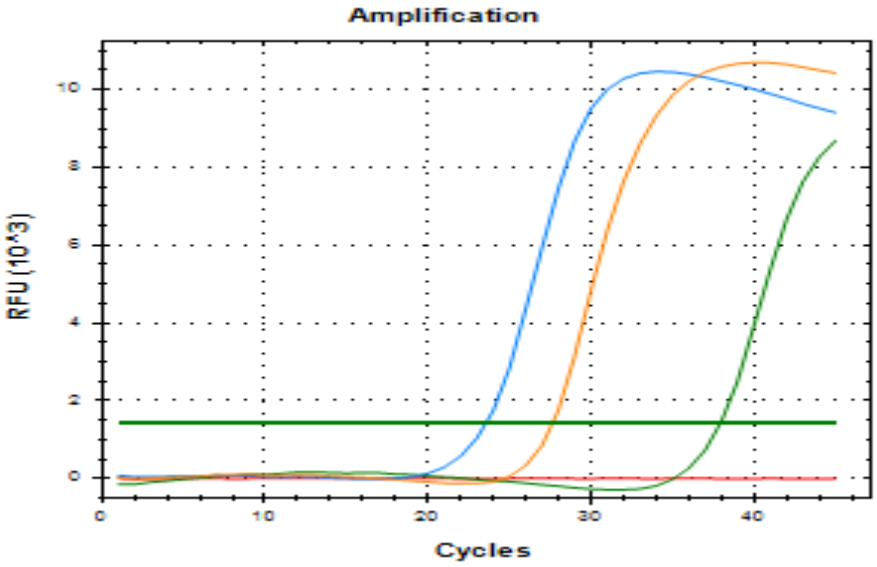
Şekil 54: Z Grubu Örneklerinde hsa-miR-451a Ct ve ΔCt Seviyeleri



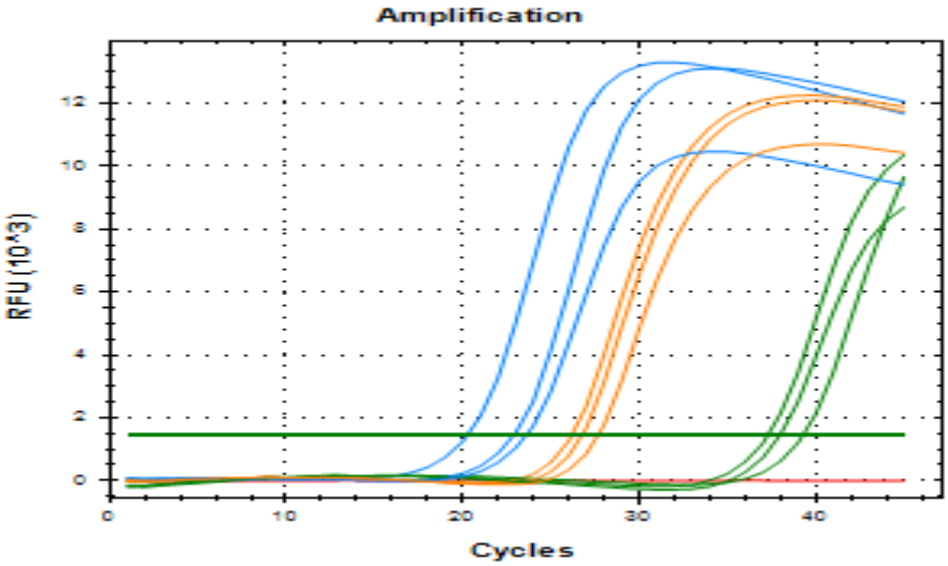
Şekil 55: Z1 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



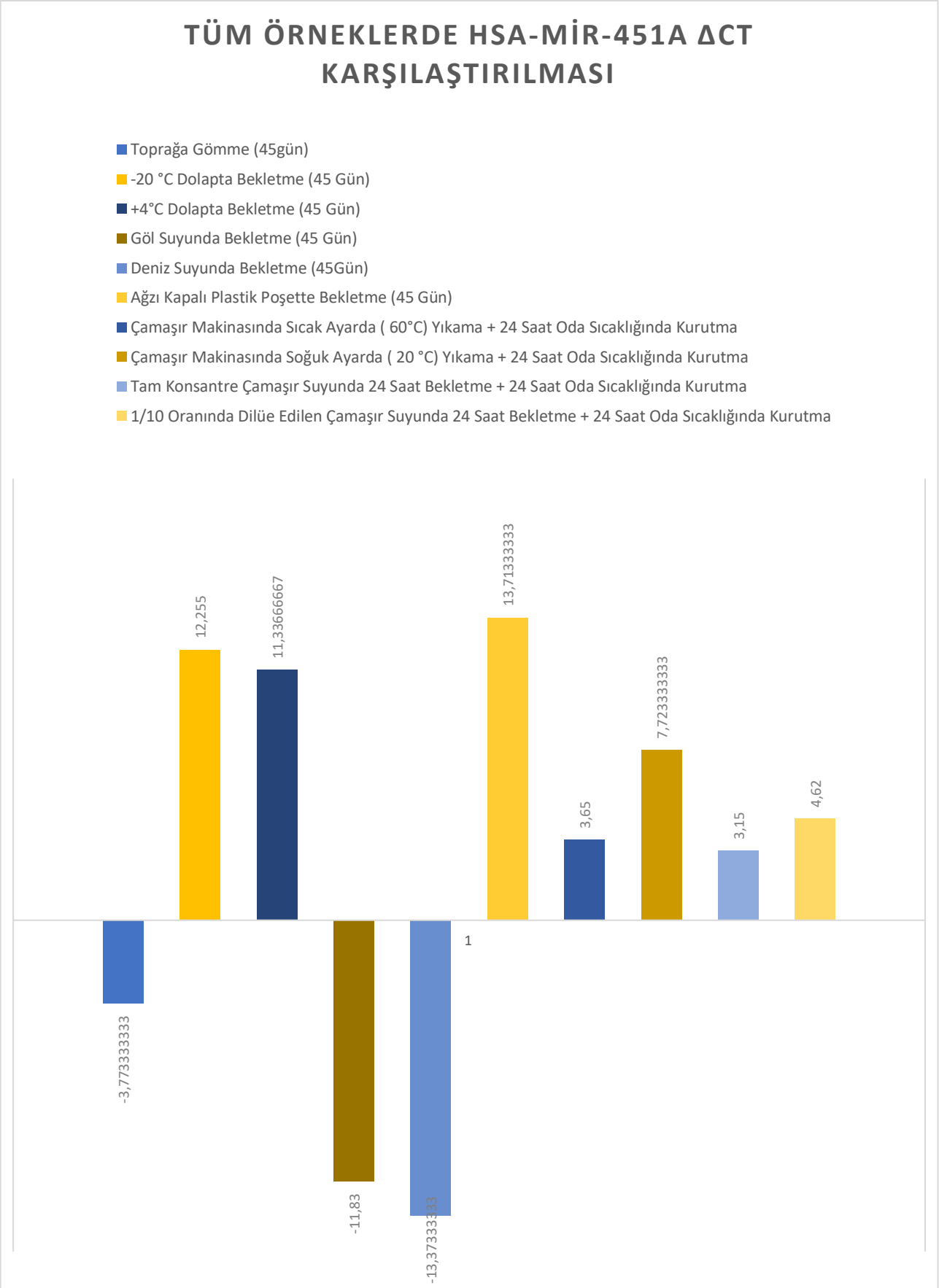
Şekil 56: Z2 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



Şekil 57: Z3 Örneğinin hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



Şekil 58: Z Grubunun hsa-miR-203a-3p, hsa-miR-451a ve U6 Genlerinin Ct Değerleri (Yeşil renk: hsa-miR-203a-3p – Mavi renk: Hsa-miR-451a - Turuncu renk: U6 - Kırmızı renk: Negatif Kontrol)



Şekil 59: Tüm Örneklerde Hsa-Mir-451A Ortalama Δct Karşılaştırılması

7. Tartışma ve Sonuç

Adli bilimlerde olay yerlerinden elde edilen vücut sıvılarının kaynağının tespit edilmesi delil, olay, olay yeri ve kişiler arasındaki bağlantının kurulması ve bu bağlantının ışığında olayın aydınlatılması açısından oldukça önemlidir (125, 126) Vücut sıvılarının tanımlanmasında günümüzde klasik her laboratuvarda yapılabilen immunolojik ve enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Kanın varlığını göstermek için genellikle hemoglobin varlığına dayalı testlerden yararlanılmaktadır. Kullanılan testlerin çoğunun tam spesifiklik göstermemesi ve her biyolojik vücut sıvısı için ayrı teknik ve yöntem kullanılması adli delile zarar veriyor olması gibi çeşitli dezavantajları bulunmaktadır (127,128). Bu dezavantajlar vücut sıvılarının tanımlanmasında daha spesifik ve daha özgül yeni yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle RNA temelli moleküler çalışmalar üzerinde araştırmalar gündeme gelmiştir. İlk çalışmalar DNA'ya göre çevresel koşullara daha dayanıklı olduğu bilinen mRNA üzerine yapılmıştır. Bazı mRNA'ların doku spesifik olarak ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir. Biyolojik örneklerden olabildiğince fazla bilgi elde edilebilmesi için adli tıp uzmanları tarafından yeni moleküler genetik yaklaşımlar oluşturularak uygun biyobelirteçler keşfetmek amaçlanmaktadır. Nem, ışık, sıcaklık, donma, çeşitli kimyasallar gibi çevresel etkenlerden oldukça etkilenen mRNA molekülünün stabilitesinin kolay bozulduğu belirtilmiştir. Bu durum geçmiş tarihli davaların, degrade örneklerin çalışılmasına engel olmaktadır (129, 130). Son zamanların araştırma konusu olan miRNA'larında dokuya özgü ifade edildiği ve daha küçük boyutlu olmaları neticesinde çevresel şartlar karşısında daha dayanıklı oldukları, bu nedenle de vücut sıvılarının tanımlanmasında rutinde kullanılan testlere ve mRNA'ya güçlü bir alternatif olabileceği fikri öne atılmıştır (131). Son zamanlar yapılan çalışmalar ile belirlenen birkaç RNA biyobelirtecinin, hücre tipi belirlenmesi ve vücut sıvısı tanımlanmasında büyük potansiyele sahip olduğu. Genellikle olay yerlerinde karşımıza çıkan vücut sıvısı örneği kandır. Kan lekesi örneklerindeki miRNA'ların ekspresyon profili ve stabilitesi hakkında detaylı bir araştırma

yapılmamıştır. Teknik sınırlamalar sebebi ile tüm miRNA profili çalışılamamış olup, belirli miRNA ekspresyonları incelenmiştir. Kan lekesi örneklerinde miRNA dizileme yöntemi üzerine yapılan geçmiş çalışmalar incelendiğinde, sonuçlar göstermiştir ki az miktarda vücut sıvısına özgü miRNA belirlenmesine rağmen miRNA profillerinin başarı ile elde edildiği görülmektedir. Direkt kan örneğine kıyasla kan lekesi örneğinde belirlenen miRNA'lar daha azdır (132, 133).

Çalışmamızda öncelikle RNA izolasyon yöntemi olarak lekeli kumaş örneklerinden klasik fenol-kloroform yöntemi ile yapılmak istenmiştir. Fakat örnek zemini olarak kot kumaşı kullanıldığından izolasyon için kullanılan sıvıyı emdiği gözlemlenmiş ve gerekli saflaştırma sağlanamamıştır. Fenol-kloroform izolasyon yönteminde modifikasyonlar yapılarak değiştirilmiştir. Kumaştaki kan transfer yöntemi kullanılarak steril swaplara transfer edilerek swaplar üzerinden fenol-kloroform ile izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Hsa-miR-203a-3p geni hiçbir örnek grubunda ifade edilememiştir. Bu durum hsa-miR-203a geninin kan dokusunda ifadesi olmadığı şeklinde yorumlanmıştır ve tartışmanın devamında bahsedilmeyecektir. Çeşitli çalışmalar incelendiğinde Hsa-miR-203a-3p geni ise genellikle serviks, özofagus ve epitel hücrelerinde görülmektedir (134-136).

Laboratuvar koşullarına en yakın örnek grubu +4 derecede bekletilen örnek grubu olduğundan diğer gruplar ile +4 derecedeki örnek grubu karşılaştırılarak istatistiksel analiz değerleri belirlenmiştir. Gruplar arası farklılık vardır. ($p<0.01$)

İlk örnek grubu olan toprağa gömülü 45 gün beklettiğimiz (A grubu) örnek hsa-miR-451a gen ifadesinin olmadığı görülmektedir ($p<0.01$). Toprakla karıştırılmış biyolojik numune örnekleri genellikle DNA profilleme için tehdit oluşturan materyallerle kontamine olmuştur (137). Bir gram toprakta yüzlerce farklı türde 10 milyon mikrop bulunduğu tahmin edilmektedir (138, 139). Bu toprak mikropları genetik materyali kısa sürede parçalayarak başarılı genetik profil

oluşturmayı engellemektedir (140). Kullanılan toprak kasım ayında yağışlı bir mevsimde İstanbul/ Bahçelievler ilçesinden toplanmıştır. Türkiye'deki bahçe topraklarının humus açısından zengin olduğu ve bol mikroorganizma barındırdığı bilinmektedir (141-144). A grubu örneklerinde hsa-miR-451a genlerinin ifadelerini elde edememezin sebebi toprağın organik yapısının kanın genetik materyaline zarar vermesinden kaynaklanabilir (145).

İkinci ve üçüncü örnek grubunda (B ve C grubu) örnekler +4 ve -20 derecede 45 gün bekletilmiştir. Düşük sıcaklıklarda bekletilmiş bu örneklerdeki hsa-miR-451a gen ifadesinin diğer örnek gruplarından anlamlı derecece de yüksek olduğu görülmektedir ($p<0.01$). Fang ve arkadaşlarının 2019 da yayınladığı çalışmada beş ay bekletilmiş örnekte miRNA'lar rahatlıkla tespit edilebilmiş, normal sıcaklıkların altında muhafaza edildiğinde degredasyonun en aza indiği belirtilmiştir. Zhao ve arkadaşlarının 2020 yayınındaki çalışmasında çeşitli ısılara maruz bırakılmış kan lekesi örneklerinin düşük derecelerde stabilitesinin daha fazla korunduğu ve miR-451a'nın belirlenebildiğini belirtmişlerdir, bu çalışmanın sonucunu destekler niteliktedir. Williams ve arkadaşlarının yaptığı çalışma verileri de Fang ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı çalışmayı destekler nitelikte 600'den fazla miRNA belirlenmiştir. MiRNA'ların laboratuvar koşullarında küçük boyutları nedeniyle stabil olduğu belirlenmiştir, bu stabilite adli bilimlerde vücut sıvılarının belirlenmesi amacıyla kullanmaya oldukça elverişli olduğunu vurgulamaktadır. Örneklerin bekletilme süresine bağlı olarak bu stabilitenin değiştiği belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre kan lekesi örneğindeki miRNA ekspresyonunun düşük gözlemlenmesi degredasyon ile ilişkilendirilebilir. Zhao ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı çalışmada kan örnekleri cam tabakalar üzerinde kurutularak -20 derece, +4 derece ve çeşitli koşullarda bekletilmiştir. -20 ve +4 derececede bekletilen kan örneklerindeki hsa-miR-451a geni tespit edilmiş ve ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. ($p<0.01$)

D (Göl Suyunda Bekletme) ve E (Deniz Suyunda Bekletme) örnek grubunda gözlemsel olarak kan lekelerinin renklerinin değiştiği yeşile yakın bir renk aldığı gözlemlenmiştir. Su yüzeyinin

jelatinimsi bir tabaka ile kaplandığı görülmektedir. Analiz edilen örneklerde hsa-miR-451a geninin ifade edilmediği görülmektedir. Göl ve deniz kenarlarında yüksek oranda tuz biriktiği bilinmektedir. Schlick ve ark., 1994 Genetik materyaller sulu ve tuzlu ortam şartlarına daha hassas olduğundan bozunma oranı yüksektir. Genetik materyalin miktarında ve yapısında degredasyona neden olabilir. Su, tuz ve ortamdaki mikrobiyal bulaşlar RNA için oldukça degrede edicidir. Bu ortam şartları sebebi ile yüksek oranda degrade olmuş RNA'dan hsa-miR-451a gen ifadesi elde edilememiştir.

Bir diğer grup olan F grubu (Ağzı kapalı plastik poşette bekletme) örneklerinde ise hsa-miR-451a geninin ifadesi istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.01$) olarak görülmektedir. Genetik materyal oda sıcaklığında ağzı kapalı poşette çok iyi korunmuştur. Kumaşa kan damlatıldıktan sonra kumaş oda sıcaklığında 24 saat kurumaya bırakılmış ve akabinde hemen plastik poşetin havası mümkün olduğunca boşaltılarak ağzı klipsli poşette saklanmıştır. Örnek grubunun dış etkenler ile teması en aza indirildiğinden ve kurutulmuş olduğundan degrade olmadığı düşünülmektedir.

Çamaşır makinesinde farklı sıcaklık ayarlarında yıkanmış kan lekeli örnekler için ise (W, X grubu) gözlemsel olarak incelendiğinde yıkandıktan sonra örnekler üzerindeki kan lekeleri hala görünür halde bulunmaktadır. Bu çalışma da soğuk ayarda yıkanan grubunda X (Soğuk Ayarda (20 °C) Yıkama + 24 Saat Oda Sıcaklığında Kurutma), W grubunda (Sıcak Ayarda (60°C) Yıkama + 24 Saat Oda Sıcaklığında Kurutma) hsa-miR-451a ifade edilmediği görülmektedir. Mayes ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı çalışmada soğuk ayarda (15°C) yıkanan ve makinede kurutulan örnek grubunda miR-451a tespit edilememiştir. ($p<0.01$)

Ayrıca yine Fang ve arkadaşlarının 2018 yılındaki çalışmasına göre yüksek oksidan maddeye maruz bırakılan örneklerin (Y ve Z) miRNA seviyesinin oldukça düştüğü görülmektedir. Bu tez çalışmasında da bu sonuçları destekler nitelikte, çamaşır suyuna maruz bırakılmış

örneklerde hsa-miR-451a gen ifadesi tespit edilememiştir. ($p<0.01$) Bunun sebebinin büyük ölçüde degredasyona uğramış genetik materyal olduğu düşünülmektedir (146).

Layne ve arkadaşlarının 2019'da bu çalışmaya benzer olarak çamaşır suyu ve çamaşır makinasında yıkanan örneklerde yayınladığı çalışmada miRNA seviyesinin oldukça düştüğünü fakat belirlenebilir olduğunu öne sürmüşler fakat bu çalışma sonucunda W, X, Y, Z gruplarında hsa-miR-451a geninin ifade edilmediği görülmektedir. Gilad ve arkadaşlarının çalışmasına göre degredasyon ve anormal miRNA ekspresyonu göreceli ekspresyon ve GC içeriği ile önemli ölçüde ilişkilidir. Daha düşük GC içeriğine sahip miRNA'ların daha yavaş bozulduğu gözlemlenmiştir. miRNA analizleri mutlak ekspresyon seviyeleri yerine göreceli ekspresyon seviyesine göre belirlenmektedir. Yani, miRNA'ların farklı degredasyon oranları kan lekesi örneğindeki miRNA'ların yukarı regüle olmasıyla ilişkilendirilebilir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki yüzden fazla yeni miRNA tespit edilmiş ve bunlardan iki tanesinin hem sıvı kan örneğinde hem de kan lekesi örneğinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu gelişme şüphelilerden direkt kan örneği alındığı ve bazen kan lekesi örneği ile karşılaştırılması gerektiği için oldukça önemli ve rutinde kullanılabilir bir analiz yöntemi olmaya adaydır. MiRNA'ların stabilitesini araştırmak, vücutta sıvıya özgü ifade edilip edilmediklerini belirlemek için çok adımlı prosedürler uygulanmalıdır. miR-451a birçok çalışmada da belirtildiği gibi kan da eksprese edilmektedir. Layne ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, çevresel şartlara maruz bırakılmış örnekler ve kontrol örnekleri arasında RNA miktarı olarak belirgin bir fark bulunmamaktadır.

Yapılan çalışmalarda kan dokusunda hsa-miR-451a geninin varlığı ekspresyon seviyeleri ile tespit edilmiş olmasına rağmen bu tez çalışması kapsamında hsa-miR-451a geni degrade olmuş kan örneklerinde tespit edilememiştir. Ancak bu çalışmalar henüz başlangıç aşamasında olmakla beraber, miRNA'ların vücut sıvılarının tanımlanmasında ciddi potansiyel gösterdiği düşünülmektedir. Dolayısıyla miRNA'ları adli bilimler alanında kullanılabilen standart ve güvenilir bir yöntem haline getirmek için detaylı ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (125,

126). Güçlü oksidan ve dondurma çözme metodunda miRNA stabilitesi ciddi oranda etkilenmiştir. Geçmiş çalışmalarda güçlü oksidan ve dondurma çözme yöntemi uygulanan örneklerden sağlıklı miRNA analizi yapılamadığı örneklerin bu koşullardan korunması gerektiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar, bu tez çalışmasının sonuçlarını destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmamızın sonuçları adli bilimler alanında vücut sıvılarının tanımlanmasında miRNA kullanımının uygulanabilirliğini desteklemektedir. Bununla birlikte bu alanda miRNA'ların kullanımı ile ilgili aydınlatılması gereken pek çok çözümlenmemiş konu bulunmaktadır. Çalışmalarda kullanılan aday miRNA'ların bazıları vücut sıvılarını ayırt edebilme kabiliyetine sahip olsa da çok sayıda miRNA ekspresyon profillerinin belirlenmesi ile daha güçlü adayların tespiti mümkün olacaktır. Ayrıca yapılacak çalışmalarda sağlıklı veya sağlıksız doku ve vücut sıvılarının potansiyel etkilerinin de araştırılması gerekmektedir. Ek olarak adli vakalarda sıkça karşılaşılan bozulmuş örnek analizinde miRNA kullanımının yararını kanıtlayan, daha geniş örneklemler üzerinde daha kapsamlı incelemelere ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda numunelerden farklı sonuçlar verebilecek çeşitli yöntemler ve farklı cihazlar kullanılmaktadır. Bu nedenle adli bilimler alanında kullanıma optimize edilmiş standart bir prosedüre ihtiyaç vardır. Bütün bunlara rağmen hiç şüphesiz ki miRNA'lar adli bilimler alanında çok büyük bir potansiyele sahiptir ve vücut sıvılarının tanımlanmasında biyomarker olarak adli laboratuarların rutin kullanımına uygun pratik yeni bir teknik olarak umut vermektedir.

8. Kaynaklar

(1) Fang, C., Zhao, J., Li, J., Qian, J., Liu, X., Sun, Q., ... & Yan, J. (2019). Massively parallel sequencing of microRNA in bloodstains and evaluation of environmental influences on miRNA candidates using realtime polymerase chain reaction. Forensic Science International: Genetics, 38, 32-38.

(2) Glynn, C. L. (2020). Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA*, *26*(1), 1-9.

(3) Clayton, T. M., Whitaker, J. P., & Maguire, C. N. (1995). Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci. Forensic science international, 76(1), 7-15.

(4) Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genetics selection evolution, 34(3), 275-305.

(5) Butler, J. M., Shen, Y., & McCord, B. R. (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. Journal of forensic sciences, 48(5), 1054-1064.

(6) Hares, D. R. (2015). Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. Forensic Science International: Genetics, 17, 33-34.

(7) PROFİLİ, A. K. A. D., & CANPOLAT, B. E. BULGARİSTAN GÖÇMENLERİNDE.

(8) Moretti, T. R., Baumstark, A. L., Defenbaugh, D. A., Keys, K. M., Smerick, J. B., & Budowle, B. (2001). Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. Journal of Forensic Science, 46(3), 647-660.

(9) R Hughes-Stamm, S., J Ashton, K., & Van Daal, A. (2011). Assessment of DNA degradation and the genotyping success of highly degraded samples. International journal of legal medicine, 125(3), 341-348.

(10) O'Leary, K. R., & Glynn, C. L. (2018). Investigating the isolation and amplification of microRNAs for forensic body fluid identification. Microrna, 7(3), 187-194.

(11) Hall, A., & Ballantyne, J. (2004). Characterization of UVC-induced DNA damage in bloodstains: forensic implications. Analytical and bioanalytical chemistry, 380(1), 72-83.

(12) Setzer, M., Juusola, J., & Ballantyne, J. (2008). Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. Journal of forensic sciences, 53(2), 296-305.

(13) Vennemann, M., & Koppelkamm, A. (2010). mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. Forensic science international, 203(1-3), 71-75.

(14) Hanson, E. K., & Ballantyne, J. (2013). Circulating microRNA for the identification of forensically relevant body fluids. In Circulating MicroRNAs (pp. 221-234). Humana Press, Totowa, NJ.

(15) Hall, A., Sims, L. M., & Ballantyne, J. (2014). Assessment of DNA damage induced by terrestrial UV irradiation of dried bloodstains: forensic implications. Forensic Science International: Genetics, 8(1), 24-32.

(16) Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. cell, 75(5), 843-854.

(17) Ambros, V. (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. Cell, 107(7), 823-826.

(18) Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. Nature cell biology, 11(3), 228-234.

(19) Bauer, M., & Patzelt, D. (2002). Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. Journal of Forensic Science, 47(6), 1278-1282.

(20) Sijen, T. (2015). Molecular approaches for forensic cell type identification: on mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. Forensic Science International: Genetics, 18, 21-32.

(21) Virkler, K. (2009). Raman spectroscopy of body fluids: A nondestructive identification technique for forensic applications. State University of New York at Albany.

(22) Juusola, J., & Ballantyne, J. (2003). Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. Forensic science international, 135(2), 85-96.

(23) Lee, J., Hever, A., Willhite, D., Zlotnik, A., & Hevezi, P. (2005). Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues. The FASEB journal, 19(10), 1356-1358.

(24) Bauer, M., Polzin, S., & Patzelt, D. (2003). Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains?. Forensic science international, 138(1-3), 94-103.

(25) Lindley, R., Li, M., Chen, W. Y., Hudson, C., & Xiao, X. (2019). Subsea bolt failure analysis using advanced forensics. Journal of Failure Analysis and Prevention, 19(4), 1001-1009.

(26) Alvarez, M., Juusola, J., & Ballantyne, J. (2004). An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. Analytical biochemistry, 335(2), 289-298.

(27) Bowden, A., Fleming, R., & Harbison, S. (2011). A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ™ system. Forensic Science International: Genetics, 5(1), 64-68.

(28) Van der Meer, D., Uchimoto, M. L., & Williams, G. (2013). Simultaneous analysis of micro-RNA and DNA for determining the body fluid origin of DNA profiles. Journal of Forensic Sciences, 58(4), 967-971.

(29) Butler, E., & Li, R. (2014). Genetic markers for sex identification in forensic DNA analysis.

(30) Watanabe, K., Iwashima, Y., Akutsu, T., Sekiguchi, K., & Sakurada, K. (2014). Evaluation of a co-extraction method for real-time PCR-based body fluid identification and DNA typing. Legal Medicine, 16(1), 56-59.

(31) Zhang, W., Cheng, B., & XU, B. (2017). Application of next-generation sequencing technology in forensic science. Chinese Journal of Forensic Medicine, 40-43.

(32) Wang, D. Y., Chang, C. W., Lagacé, R. E., Oldroyd, N. J., & Hennessy, L. K. (2011). Development and validation of the AmpFℓSTR® identifiler® direct PCR amplification kit: A multiplex assay for the direct amplification of single-source samples. Journal of forensic sciences, 56(4), 835-845.

(33) Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite'regions in human DNA. Nature, 314(6006), 67-73.

(34) Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. Gene, 234(2), 177-186.

(35) Butler, J. M. (2009). *Fundamentals of forensic DNA typing*. Academic press.

(36) Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene, 234*(2), 177-186.

(37) Karadayi, H., Bulbul, O., & Filoglu, G. (2017). Development of a 20plex STR multiplex panel. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 6*, e280-e281.

(38) Sirker, M., Fimmers, R., Schneider, P. M., & Gomes, I. (2017). Evaluating the forensic application of 19 target microRNAs as biomarkers in body fluid and tissue identification. Forensic Science International: Genetics, 27, 41-49.

(39) Courts, C., Pfaffl, M. W., Sauer, E., & Parson, W. (2019). Pleading for adherence to the MIQE-Guidelines when reporting quantitative PCR data in forensic genetic research. Forensic Science International: Genetics, 42, e21-e24.

(40) Bustin, S. A., & Nolan, T. (2004). Analysis of mRNA expression by real-time PCR. Real-time PCR. An essential guide, 125-184.

(41) Sirker, M., Fimmers, R., Schneider, P. M., & Gomes, I. (2017). Evaluating the forensic application of 19 target microRNAs as biomarkers in body fluid and tissue identification. Forensic Science International: Genetics, 27, 41-49.

(42) Park, J. L., Park, S. M., Kwon, O. H., Lee, H. C., Kim, J. Y., Seok, H. H., ... & Kim, S. Y. (2014). Microarray screening and qRT-PCR evaluation of microRNA markers for forensic body fluid identification. Electrophoresis, 35(21-22), 3062-3068.

(43) Mayes, C., Houston, R., Seashols-Williams, S., LaRue, B., & Hughes-Stamm, S. (2019). The stability and persistence of blood and semen mRNA and miRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples. Legal Medicine, 38, 45-50.

(44) Bauer, M., & Patzelt, D. (2003). A method for simultaneous RNA and DNA isolation from dried blood and semen stains. Forensic science international, 136(1-3), 76-78.

(45) Lewis, C. A., Layne, T. R., & Seashols-Williams, S. J. (2019). Detection of microRNAs in DNA extractions for forensic biological source identification. Journal of forensic sciences, 64(6), 1823-1830.

(46) Hanson, E. K., Lubenow, H., & Ballantyne, J. (2009). Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. Analytical biochemistry, 387(2), 303-314.

(47) Zubakov, D., Boersma, A. W., Choi, Y., van Kuijk, P. F., Wiemer, E. A., & Kayser, M. (2010). MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. International journal of legal medicine, 124(3), 217-226.

(48) Courts, C., & Madea, B. (2011). Specific micro-RNA signatures for the detection of saliva and blood in forensic body-fluid identification. Journal of forensic sciences, 56(6), 1464-1470.

(49) Wang, Z., Zhang, J., Luo, H., Ye, Y., Yan, J., & Hou, Y. (2013). Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. Forensic Science International: Genetics, 7(1), 116-123.

(50) Seashols-Williams, S., Lewis, C., Calloway, C., Peace, N., Harrison, A., Hayes-Nash, C., ... & Zehner, Z. E. (2016). High-throughput miRNA sequencing and identification of biomarkers for forensically relevant biological fluids. Electrophoresis, 37(21), 2780-2788.

(51) Mayes, C., Seashols-Williams, S., & Hughes-Stamm, S. (2018). A capillary electrophoresis method for identifying forensically relevant body fluids using miRNAs. *Legal Medicine*, *30*, 1-4.

(52) Tian, H., Lv, M., Li, Z., Peng, D., Tan, Y., Wang, H., ... & Liang, W. (2018). Semen-specific miRNAs: Suitable for the distinction of infertile semen in the body fluid identification?. Forensic Science International: Genetics, 33, 161-167.

(53) Kosaka, N., Iguchi, H., & Ochiya, T. (2010). Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. Cancer science, 101(10), 2087-2092.

(54) Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. Nature cell biology, 13(4), 423-433.

(55) Lee, H. Y., Park, M. J., Choi, A., An, J. H., Yang, W. I., & Shin, K. J. (2012). Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. International journal of legal medicine, 126(1), 55-62.

(56) Kayser, M., & De Knijff, P. (2011). Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. Nature Reviews Genetics, 12(3), 179-192.

(57) Shaler, R. C. (2002). Modern forensic biology. *Forensic science handbook*, *1*, 525-613.

(58) Gardner, R. M., & Bevel, T. (2009). Practical crime scene analysis and reconstruction. CRC press.

(59) Ganong, W. F. (1999). Blood types. Review of medical physiology. Stanford, CT, USA: Appleton and large, A Simon and Schuster Co, 513-4.

(60) Coyle, H. M., Shutler, G., Tully, L., Pagliaro, E., Harper, A., Palmbach, T., & Lee, H. C. (2005). Validation of a DNA method for the individualization of plant evidence. Annotation.

(61) Acar, B. Adli tıpta vücut sıvılarının tanımlanmasında biyolojik marker olarak mikroRNAnın kullanımı [Uzmanlık Tezi]. Mersin Üniversitesi, 2019.

(62) Virkler, K., & Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic science international*, *188*(1-3), 1-17.

(63) Thorogate, R., Moreira, J. C., Jickells, S., Miele, M. M., & Daniel, B. (2008). A novel fluorescence-based method in forensic science for the detection of blood in situ. Forensic Science International: Genetics, 2(4), 363-371

(64) Stoilovic, M. (1991). Detection of semen and blood stains using polilight as a light source. Forensic Science International, 51(2), 289-296.

(65) Inman, K., & Rudin, N. (2002). The origin of evidence. Forensic science international, 126(1), 11-16.

(66) Vandenberg, N., & van Oorschot, R. A. (2006). The use of Polilight® in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests. Journal of Forensic Sciences, 51(2), 361-370.

(67) Budowle, B., Chakraborty, R., Carmody, G., & Monson, K. L. (2000). Source attribution of a forensic DNA profile. Forensic Science Communications, 2(3), 6pp.

(68) Santucci, K. A., Nelson, D. G., McQuillen, K. K., Duffy, S. J., & Linakis, J. G. (1999). Wood's lamp utility in the identification of semen. *Pediatrics*, *104*(6), 1342-1344.

(69) Leeman, M., Choi, J., Hansson, S., Storm, M. U., & Nilsson, L. (2018). Proteins and antibodies in serum, plasma, and whole blood—size characterization using asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4). Analytical and bioanalytical chemistry, 410(20), 4867-4873.

(70) Ramsthaler, F., Schmidt, P., Bux, R., Potente, S., Kaiser, C., & Kettner, M. (2012). Drying properties of bloodstains on common indoor surfaces. International journal of legal medicine, 126(5), 739-746.

(71) Goodpaster, J. V., & Liszewski, E. A. (2009). Forensic analysis of dyed textile fibers. Analytical and bioanalytical chemistry, 394(8).

(72) Castelló, A., Francés, F., & Verdú, F. (2009). Bleach interference in forensic luminol tests on porous surfaces: More about the drying time effect. Talanta, 77(4), 1555-1557.

(73) Meyer, G. M., & Gies, W. J. (1903). The influence of repeated external hemorrhages on the general composition of the blood. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1(1), 44-45.

(74) Kastle, J. H., & Shedd, O. M. (1901). Phenolphthalin as a reagent for the oxidizing ferments. Am Chem J, 26, 526.

(75) Quinones, I., Sheppard, D., Harbison, S., & Elliot, D. (2007). Comparative analysis of luminol formulations. Canadian Society of Forensic Science Journal, 40(2), 53-63.

(76) Blum, L. J., Esperanca, P., & Rocquefelte, S. (2006). A new high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence. Canadian Society of Forensic Science Journal, 39(3), 81-99.

(77) Castello, A., Alvarez, M., & Verdu, F. (2002). Accuracy, reliability, and safety of luminol in bloodstain investigation. Canadian Society of Forensic Science Journal, 35(3), 113-121.

(78) Hortoğlu, M. B. (2016). Suç mahallerinde kan varlığının tespitinde kullanılan bir kemilüminesant bileşik olan luminol'un in-vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması (Master's thesis, Uludağ Üniversitesi).

(79) Al-Bustan, S., El-Zawahri, M., Al-Azmi, D., & Al-Bashir, A. A. (2002). Allele frequencies and molecular genotyping of the ABO blood group system in a Kuwaiti population. International journal of hematology, 75(2), 147-153.

(80) Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Enzymes are powerful and highly specific catalysts. *Biochemistry. 5th edition. 5th. WH Freeman*.

(81) Alkass, K., Buchholz, B. A., Ohtani, S., Yamamoto, T., Druid, H., & Spalding, K. L. Age Estimation in Forensic Sciences.

(82) Ahlquist, D. A., & Schwartz, S. (1975). Use of leuco-dyes in the quantitative colorimetric microdetermination of hemoglobin and other heme compounds. *Clinical Chemistry*, *21*(3), 362-369.

(83) AÇIKGÖZ, N., HANCI, İ. H., & ÇAKIR, A. H. (2002). Olay yerinden DNA analizi için biyolojik örnek toplama ve örneklerin laboratuara gönderilme usulleri. Ankara Üniversitesi Hukuk Fakültesi Dergisi, 51(2).

(84) Parker, G. J., McKiernan, H. E., Legg, K. M., & Goecker, Z. C. (2021). Forensic proteomics. Forensic Science International: Genetics, 54, 102529.

(85) Webb, J. L., Creamer, J. I., & Quickenden, T. I. (2006). A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence, 21(4), 214-220.

(86) Palmbach, T. M. (2016). Crime scene investigation and examination: chain of evidence. Encyclopaedia Forensic Legal Med, 1, 679-685.

(87) Gaensslen, R. E. (1983). Sourcebook in forensic serology, immunology, and biochemistry (p. 628). Washington, DC: US Department of Justice, National Institute of Justice.

(88) Hatch, A. L. (1993). A modified reagent for the confirmation of blood. Journal of Forensic Science, 38(6), 1502-1506.

(89) Lee, H. C., & Pagliaro, E. M. (2005). SEROLOGY| Blood Identification.

(90) Hochmeister, M. N., Budowle, B., Sparkes, R., Rudin, O., Gehrig, C., Thali, M., ... & Dirnhofer, R. (1999). Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. Journal of Forensic Science, 44(3), 597-602.

(91) Pang, B. C. M., & Cheung, B. K. K. (2007). Double swab technique for collecting touched evidence. *Legal Medicine, 9*(4), 181-184.

(92) Hoofnagle, A. N., & Wener, M. H. (2009). The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. Journal of immunological methods, 347(1-2), 3-11.

(93) Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953, January). The structure of DNA. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 18, pp. 123-131). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

(94) Buel, E., & Noreault-Conti, T. (2009). Bringing tissue identification into the 21st century: mRNA analysis as the next molecular biology revolution in forensic science.

(95) Gomes, I., Strohbücker, B., Rothschild, M. A., & Schneider, P. M. (2013). Evaluation of mRNA specific markers using a pentaplex system for the identification of skin and saliva from contact trace evidence. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 4(1), e180-e181.

(96) Juusola, J., & Ballantyne, J. (2007). mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. Journal of forensic sciences, 52(6), 1252-1262.

(97) Haas, C., Klesser, B., Maake, C., Bär, W., & Kratzer, A. (2009). mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. Forensic Science International: Genetics, 3(2), 80-88.

(98) Fazzari, M. J., & Greally, J. M. (2010). Introduction to epigenomics and epigenome-wide analysis. Statistical Methods in Molecular Biology, 243-265.

(99) Lee, H. Y., Park, M. J., Choi, A., An, J. H., Yang, W. I., & Shin, K. J. (2012). Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. International journal of legal medicine, 126(1), 55-62.

(100) Frumkin, D., Wasserstrom, A., Budowle, B., & Davidson, A. (2011). DNA methylation-based forensic tissue identification. Forensic Science International: Genetics, 5(5), 517-524.

(101) Gaensslen, R. E. (1983). Sourcebook in forensic serology, immunology, and biochemistry (p. 628). Washington, DC: US Department of Justice, National Institute of Justice.

(102) Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). DNA, RNA, and the Flow of Genetic Information. Biochemistry, 5e. Freeman, WH & Company, 195.

(103) Dammeier, S., Nahnsen, S., Veit, J., Wehner, F., Ueffing, M., & Kohlbacher, O. (2016). Mass-spectrometry-based proteomics reveals organ-specific expression patterns to be used as forensic evidence. Journal of proteome research, 15(1), 182-192.

(104) Domon, B., & Aebersold, R. (2010). Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. Nature biotechnology, 28(7), 710-721.

(105) He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nature reviews genetics, 5(7), 522-531.

(106) Silva, S. S., Lopes, C., Teixeira, A. L., De Sousa, M. C., & Medeiros, R. J. F. S. I. G. (2015). Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids?. Forensic Science International: Genetics, 14, 1-10.

(107) Beuvink, I., Kolb, F. A., Budach, W., Garnier, A., Lange, J., Natt, F., ... & Weiler, J. (2007). A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. Nucleic acids research, 35(7), e52.

(108) Courts, C., & Madea, B. (2010). Micro-RNA–a potential for forensic science?. Forensic science international, 203(1-3), 106-111.

(109) Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. cell, 120(1), 15-20.

(110) Zubakov, D., Boersma, A. W., Choi, Y., van Kuijk, P. F., Wiemer, E. A., & Kayser, M. (2010). MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. International journal of legal medicine, 124(3), 217-226.

(111) Elkins, K. M. (2018). Introduction to forensic chemistry. CRC Press.

(112) Ramezani A. (2021). CtNorm: Real time PCR cycle of threshold (Ct) normalization algorithm. *Journal of microbiological methods*, *187*, 106267.

(113) Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., ... & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. nature, 403(6772), 901-906.

(114) Almeida, M. I., Reis, R. M., & Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 717(1-2), 1-8.

(115) Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. Nature reviews Molecular cell biology, 15(8), 509-524.

(116) Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nature Reviews Genetics, 11(9), 597-610.

(117) Wang, Z., Zhang, J., Luo, H., Ye, Y., Yan, J., & Hou, Y. (2013). Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. Forensic Science International: Genetics, 7(1), 116-123.

(118) Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2012). Regulation of microRNA biogenesis and function. Thrombosis and haemostasis, 107(04), 605-610.

(119) Berezikov, E., Chung, W. J., Willis, J., Cuppen, E., & Lai, E. C. (2007). Mammalian mirtron genes. Molecular cell, 28(2), 328-336.

(120) Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M., & Lai, E. C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. Cell, 130(1), 89-100.

(121) Perron, M. P., & Provost, P. (2008). Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 13, 2537.

(122) Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. Nature reviews genetics, 9(2), 102-114.

(123) Gangaraju, V. K., & Lin, H. (2009). MicroRNAs: key regulators of stem cells. Nature reviews Molecular cell biology, 10(2), 116-125.

(124) Zhao, Y., & Srivastava, D. (2007). A developmental view of microRNA function. Trends in biochemical sciences, 32(4), 189-197.

(125) Silva, S. S., Lopes, C., Teixeira, A. L., De Sousa, M. C., & Medeiros, R. J. F. S. I. G. (2015). Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids?. Forensic Science International: Genetics, 14, 1-10.

(126) Hanson, E. K., & Ballantyne, J. A. C. K. (2010). RNA profiling for the identification of the tissue origin of dried stains in forensic biology. Forensic science review, 22(2), 145.

(127) Virkler, K., & Lednev, I. K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. Forensic science international, 188(1-3), 1-17.

(128) Park, J. L., Park, S. M., Kwon, O. H., Lee, H. C., Kim, J. Y., Seok, H. H., ... & Kim, S. Y. (2014). Microarray screening and qRT-PCR evaluation of microRNA markers for forensic body fluid identification. Electrophoresis, 35(21-22), 3062-3068.

(129) Haas, C., Hanson, E., Kratzer, A., Bär, W., & Ballantyne, J. (2011). Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood. Forensic Science International: Genetics, 5(5), 449-458.

(130) Bauer, M. (2007). RNA in forensic science. Forensic Science International: Genetics, 1(1), 69-74.

(131) Lee, H. Y., Park, M. J., Choi, A., An, J. H., Yang, W. I., & Shin, K. J. (2012). Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. International journal of legal medicine, 126(1), 55-62.

(132) Peiró-Chova, L., Peña-Chilet, M., López-Guerrero, J. A., García-Giménez, J. L., Alonso-Yuste, E., Burgues, O., ... & Ribas, G. (2013). High stability of microRNAs in tissue samples of compromised quality. Virchows archiv, 463(6), 765-774.

(133) Hanson, E. K., Lubenow, H., & Ballantyne, J. (2009). Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. Analytical biochemistry, 387(2), 303-314.

(134) Bai, P., Deng, W., Wang, L., Long, B., Liu, K., Liang, W., & Zhang, L. (2013). Micro RNA profiling for the detection and differentiation of body fluids in forensic stain analysis. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 4(1), e216-e217.

(135) Jiang, M., Shi, H., Xu, Y., Bai, W., Wang, P., & Ju, Q. (2019). miR-203a-3p regulates the cellular processes of esophageal cancer cells via targeting CtBP2. Translational cancer research, 8(8), 2791–2802.

(136) Luo, Z., Dou, J., Xie, F., Lu, J., Han, Q., Zhou, X., Kong, J., Chen, D., & Liu, A. (2021). miR-203a-3p promotes loureirin A-induced hair follicle stem cells differentiation by targeting Smad1. Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007), 304(3), 531–540.

(137) Zhang, C., Liu, P., Huang, J., Liao, Y., Pan, C., Liu, J., Du, Q., Liu, T., Shang, C., Ooi, S., Chen, R., Xia, M., Jiang, H., Xu, M., Zou, Q., Zhou, Y., Huang, H., Pan, Y., Yuan, L., Wang, W., … Yao, S. (2021). Circular RNA hsa_circ_0043280 inhibits cervical cancer tumor growth and metastasis via miR-203a-3p/PAQR3 axis. Cell death & disease, 12(10), 888.

(138) Bever, R.A. and Creacy, S. (1995). Validation and utilization of commercially available STR multiplexes for parentage analysis. In: Proceedings from the Fifth International Symposium on Human Identification 1994. Promega Corporation, 61–8.

(139) Brinkmann, B., Moller A. and Wiegand, P. (1995). Structure of new mutations in 2 STR Sistems. Int. J. Leg. Med. 107, 201–3.

(140) Butler J.M. Forensic DNA Typing:Biology and Technology Behind STR Markers. (2001). New York, Academic Press.

(141) Benecke, M., Schmitt, C. and Staak, M. (1996). Development of a fast new STR triplex Sistem for identification of urine samples. Poster at the First European Symposium on Human Identification. Toulouse, 29 -31.5. Promega Co.

(142) Murray, R. C., & Tedrow, J. C. (1975). Forensic geology: Earth sciences and criminal investigation. New Brunswick, NJ: Rutgers University Press.

(143) Murray, R. C., & Mcdonald, J. R. (1991). Design for containment of hazardous materials (No. UCRL-JC-107830; CONF-9104193-2). Lawrence Livermore National Lab., CA (United States).

(144) Shou, J., Murray, R. C., Rim, P. C., & Calof, A. L. (2000). Opposing effects of bone morphogenetic proteins on neuron production and survival in the olfactory receptor neuron lineage. Development, 127(24), 5403-5413.

(145) McPhee, J. J. (1996). On the use of linear graph theory in multibody system dynamics. Nonlinear Dynamics, 9(1), 73-90.

(146) Kyoko, M., Yohei, O., Takashi, A., Aki, O., Kazutoshi, T., Keisuke, O., ... & Shinya, Y. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. Nat Biotechnol, 27, 743-745.

(147) Ambers, A., Turnbough, M., Benjamin, R., King, J., & Budowle, B. (2014). Assessment of the role of DNA repair in damaged forensic samples. International journal of legal medicine, 128(6), 913-921.