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

Danışman
Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu

KARIŞIM ÖRNEKLERİNDE KAN ve TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİNİN miRNA İLE AYIRIMI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG REMZİYE ATALAY

İSTANBUL, 2022

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

Danışman
Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu

KARIŞIM ÖRNEKLERİNDE KAN ve TÜKÜRÜK ÖRNEKLERİNİN miRNA İLE AYIRIMI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG REMZİYE ATALAY
İSTANBUL, 2022

Bu tez projesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. **Proje No: 36198**

ÖNSÖZ

Tez danışmanım olarak her zaman ulaşabildiğim, bilgi alışverişi yaptığım, ders dönemimde dinleme, vakalar üzerine tartışabilme fırsatı yakaladığım, değerli hocam Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu'na,

Bilgi ve tecrübesini bana aktaran, yol gösteren, çalışmamın sonuçlanmasında büyük emeği olan, aklımda her zaman gerçek bir akademisyen olarak kalacak Dr. Öğr. Üyesi Bahadır Ercan'a,

Çalışmamızın planlaması için Öğr. Görevlisi Dr. Fatma Çavuş Yonar'a ve Dr. Ömer Karataş'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgimi arttıran, araştırmaya yönlendiren, üzerimde emeği olan tüm Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü hocalarıma,

Proje kapsamında örneklerin analizi için emek veren laboratuvar çalışanlarına,

Çalışmamızın istatistiksel analizi için Prof. Dr. Hafize Sezer'e,

Örnek toplama işleminde bana yardım eden sevgili Filiz Hemşire ve Melek Hemşireme,

Yüksek lisansım boyunca bana kolaylık sağlayan iş arkadaşlarıma,

Tez sürecim boyunca zorluklara birlikte göğüs gerdiğim, fikir alışverişinde bulunduğum, destekçim ve yol arkadaşım olan Nilay Lerzan Dalkıran'a,

Örnek vermek için gönüllü olan, arkamdaki desteklerini hep hissettiğim GENİŞ AİLEME,

Eğitim sürecim boyunca benimle sabreden, beni motive eden, benimle uzun enstitü yollarını kateden, yüreği benimkinden hızlı çarpan ANNE ve BABAMA,

Tükendiğim anda enerjileriyle beni motive eden YEĞENLERİME teşekkürlerimle…

Biyolog Remziye ATALAY

İÇİNDEKİLER

1. Giriş ve Amaç....5
2. Genel Bilgiler....7
2.1.Tarihçe....7
2.2.Adli Amaçlı Kullanılan Vücut Sıvıları....9
2.2.1.Kan....10
2.2.1.1.Kan analizinde kullanılan yöntemler....11
2.2.2.Tükürük....13
2.2.2.1.Tükürük analizinde kullanılan yöntemler....13
2.3.Ribo Nükleik Asit....17
2.4.miRNA Literatürü ve Adli Amaçlı Kullanım Alanları....21
2.5.miRNA Biyo Belirteçleri....23
2.6. miRNA Biyogenezi....24
3. Gereç ve Yöntem....26
3.1.Çalışma Grubu ve Örnek Hazırlama....26
3.2.Gereçler....27
3.2.1. Cihazlar....27
3.3. Kan ve Tükürük Örneklerinde RNA İzolasyonu....28
3.4.cDNA Eldesi....29
3.5.Veri Analizi....30
4.Bulgular....32
4.1.Gruplarda Oranlara Göre Elde Edilen hsa-miR-451A Ekspresyon Seviyeleri....37
4.1.1. GRUP 1 (Kadın Kan-Kadın Tükürük)....37
4.1.2. GRUP 2 (Erkek Kan-Erkek Tükürük)....39
4.1.3. GRUP 3 (Kadın Tükürük-Erkek Kan)....41
4.1.4. GRUP 4 (Erkek Tükürük-Kadın Kan)....43
4.2. Oranlara Göre hsa-miR-451A Ekspresyon Seviyelerinin Kıyaslanması....45
4.2.1. 1x1 (250 ul x 250 ul) oranında hazırlanan karışım örnekleri....45
4.2.2. 1x10 (500 ul x 50 ul) oranında hazırlanan karışım örnekleri....45
4.2.3. 1x20 (500 ul x 25 ul) Oranında Hazırlanan Karışım Örnekleri....46
4.2.4. 1x50 (500 ul x 10 ul) oranında hazırlanan karışım örnekleri....46
4.2.5. 1x100 (500 ul x 5 ul) oranında hazırlanan karışım örnekleri....47
4.3. Farklı Vücut Sıvıları İçin Hazırlanan Farklı Dilüsyonlarda Ölçülen miR-451A Ekspresyonu....48
4.3.1. Kan....48

4.3.2. Tükürük 50
4.4. Cinsiyete Göre hsa-miR-451A Ekspresyon Seviyesi 52
5. Tartışma 56
6.Sonuç 72
7. Kaynakça 75
Ekler 92
ÖZGEÇMİŞ 103

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Kan tüpünde gözlenen plazma ve kan hücreleri. 10
Şekil 2: Kan hücrelerinin fizyolojik görüntüsü. 11
Şekil 3: DNA ve RNA'nın yapısı. 18
Şekil 4: tRNA'ların sembolik yonca yaprağı görünümü. 19
Şekil 5: Farklı vücut sıvılarındaki miRNA belirteçlerinin PCR tekniği kullanılarak gösterilmesi 22
Şekil 6: miRNA biyogenezi. (https://www.youtube.com/watch?v=cvAymw1xKKQ adresinden 2022 yılında erişildi.) 25

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Vücut sıvılarının tanımlanmasında kullanılan aday miRNA'lar 23
Tablo 2: GRUP 1 için uygulanan yöntem 26
Tablo 3: GRUP 2 için uygulanan yöntem 26
Tablo 4: GRUP 3 için uygulanan yöntem 27
Tablo 5: GRUP 4 için uygulanan yöntem 27
Tablo 6: Gen ekspresyon analizi yapılan miRNA'lar için kullanılan primerler 31

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Grup 1 için miR-203A-3p ekspresyon seviyeleri 33
Grafik 2: Grup 1 için miR-451A ekspresyon seviyeleri 33
Grafik 3: Grup 2 için miR-203A-3p ekspresyon seviyeleri 34
Grafik 4: Grup 2 için miR-403A ekspresyon seviyeleri 34
Grafik 5: Grup 3 için miR-203A-3p ekspresyon seviyeleri 35
Grafik 6: Grup 3 için miR-451A ekspresyon seviyeleri 35
Grafik 7: Grup 4 için miR-203A-3p ekspresyon seviyeleri 36
Grafik 8: Grup 4 için miR-451A ekspresyon seviyeleri 36
Grafik 9: 1x1 oranı ekspresyon seviyesi 37
Grafik 10: 1x10 oranı ekspresyon seviyesi 37
Grafik 11: 1x20 oranı ekspresyon seviyesi 37
Grafik 12: 1x50 oranı ekspresyon seviyesi 38
Grafik 13: 1x100 oranı ekspresyon seviyesi 38
Grafik 14: 1x1 oranı ekspresyon seviyesi 39
Grafik 15: 1x10 oranı ekspresyon seviyesi 39
Grafik 16: 1x20 oranı ekspresyon seviyesi 39
Grafik 17: 1x50 oranı ekspresyon seviyesi 40
Grafik 18: 1x100 oranı ekspresyon seviyesi 40
Grafik 19: 1x1 oranı ekspresyon seviyesi 41
Grafik 20: 1x10 oranı ekspresyon seviyesi 41
Grafik 21: 1x20 oranı ekspresyon seviyesi 41
Grafik 22: 1x50 oranı ekspresyon seviyesi 42
Grafik 23: 1x100 oranı ekspresyon seviyesi 42
Grafik 24: 1x1 oranı ekspresyon seviyesi 43
Grafik 25: 1x10 oranı ekspresyon seviyesi 43
Grafik 26: 1x20 oranı ekspresyon seviyesi 43
Grafik 27: 1x50 oranı ekspresyon seviyesi 44
Grafik 28: 1x100 oranı ekspresyon seviyesi 44
Grafik 29: 1x1 (250 ul x 250 ul) oranında hazırlanan tüm karışım örnekleri 45
Grafik 30: 1x10 (500 ul x 50 ul) oranında hazırlanan tüm karışım örnekleri 45
Grafik 31: 1x20 (500 ul x 25 ul) oranında hazırlanan tüm karışım örnekleri 46
Grafik 32: 1x50 (500 ul x 10 ul) oranında hazırlanan tüm karışım örnekleri 46
Grafik 33: 1x100 (500 ul x 5 ul) oranında hazırlanan tüm karışım örnekleri 47
Grafik 34: Grup 1-kan yoğunluğu fazla olan tüm örnekler 48
Grafik 35: Grup 2-kan yoğunluğu fazla olan tüm örnekler 48
Grafik 36: Grup 3-kan yoğunluğu fazla olan tüm örnekler 49
Grafik 37: Grup 4-kan yoğunluğu fazla olan tüm örnekler 49
Grafik 38: Grup 1-tükürük yoğunluğu fazla olan tüm örnekler 50
Grafik 39: Grup 2-tükürük yoğunluğu fazla olan tüm örnekler 50

Grafik 40: Grup 3-tükürük yoğunluğu fazla olan tüm örnekler 51
Grafik 41: Grup 4-tükürük yoğunluğu fazla olan tüm örnekler 51
Grafik 42: 1x1 oranında Kadın Kanı ve Erkek Kanı ekspresyonu 52
Grafik 43: 1x10 oranında Kadın Kanı ve Erkek Kanı ekspresyonu 52
Grafik 44: 1x10 oranında Kadın Tükürük ve Erkek Tükürük ekspresyonu 52
Grafik 45: 1x20 oranında Kadın Kanı ve Erkek Kanı ekspresyonu 53
Grafik 46: 1x20 oranında Kadın Tükürük ve Erkek Tükürük ekspresyonu 53
Grafik 47: 1x50 oranında Kadın Kanı ve Erkek Kanı ekspresyonu 54
Grafik 48: 1x50 oranında Kadın Tükürük ve Erkek Tükürük ekspresyonu 54
Grafik 49: 1x100 oranında Kadın Kanı ve Erkek Kanı ekspresyonu 55
Grafik 50: 1x100 oranında Kadın Tükürük ve Erkek Tükürük ekspresyonu 55

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

µl: mikro litre

Ago: Argonaute

ANOVA: Tek Yönlü Varyans Analizi

Ark.: Arkadaşları

BFID: Geleneksel Vücut Sıvısı Tanımlama

cDNA: Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit

ddH2O: double distile su

DGCR8: DiGeorge Critical Region 8

DNA: Deoksiribonükleik asit

EK / E-Kan: Erkek Kan

ET / E-Tük: Erkek Tükürük

EtOH: Etanol

GRUP 1: Kadın Kan-Kadın Tükürük Karışımı

GRUP 2: Erkek Kan-Erkek Tükürük Karışımı

GRUP 3: Erkek Kan-Kadın Tükürük Karışımı

GRUP 4: Kadın Kan-Erkek Tükürük Karışımı

Hb: Hemoglobin

KK / K-Kan: Kadın Kan

KT / K-Tük: Kadın Tükürük

miR: Mikro Ribo Nükleik Asit

miRNA: Mikro Ribo Nükleik Asit

mRNA: Mesajcı Ribo Nükleik Asit

NA: Not Applicable

nm: nanometre

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

piRNA: PIWI Etkileşimli Ribonükleik Asit

PMI: Postmortem Interval

pri-miR: Öncü Mikro Ribo Nükleik Asit

RIA: Radyoimmünoassay

RISC: RNA-Induced Silencing Complex

RNA: Ribonükleik Asit

RNA Pol II: Ribonükleik Asit Polimeraz II

RNaz III: Ribonükleik Asit Polimeraz III

rRNA: Ribozomal RNA

RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

siRNA: Küçük İnterferans RNA

snoRNA: Küçük Nükleolar RNA

SNP: Tek Nükleotid Farklılıkları

snRNA: Küçük Nüklear RNA

STR: Kısa Ardışık Tekrar Dizileri

tRNA: Taşıyıcı RNA

ul: mikrolitre

UTR: Translasyona Uğramayan Bölge

UV: Ultraviyole

vb: ve benzeri

vs: vesaire

qRT-PCR: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ÖZET

Adli vakalarda, olay yerinden toplanan biyolojik örnekler olayın aydınlatılması için kanıt olma özelliği taşır. Bu nedenle olay yerinden toplanmaları, uygun koşullarda saklanmaları ve doğru yöntemlerle analiz edilip yorumlanmaları gerekir. Her bir olay yeri kendine özgü olsa da fail ve/veya mağdurun ardında bıraktığı vücut sıvıları (ter, idrar, semen, tükürük, kan vs.) sınırlıdır. Yapılan çalışmalarda, bu vücut sıvılarından güvenilir yorumlar yapabilmek için çeşitli genetik faktörler kullanılmaktadır. Son on yılda, adli amaçla, diğer yöntemlerden farklı olarak mikroRNA'lar (miRNA) kullanılmaya başlanmıştır. Kapsüllü, çevresel değişikliklere dirençli olan miRNA'ların, vücut sıvılarına özgü olmalarının yanı sıra birbirinin aynı Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) dizilimine sahip monozigotik ikizlerde farklı biyo belirteçler göstermeleri onları çok önemli ve çalışılmaya değer kılmaktadır. Güncel olarak vücut sıvılarını belirleme, monozigot ikizleri ayırt etme, periferik kan ile menstrual kanı birbirinden ayırma, bozulmuş örneklerde faili belirleme, postmortem interval tayininde kullanılabilirliği çalışılmaktadır. Fakat adaletin sağlanması ve adli olayların aydınlatılmasına olanak sağlayan bu çalışmalar arasında günümüzde sık rastladığımız çok failli cinsel istismar, cinayet ve benzeri (vb.) vakalarda sorun oluşturan karışım örnekleri henüz çalışılmamıştır. Bu çalışma ile karışım örneklerinde, miRNA biyo belirteçleri kullanarak, karışımdaki vücut sıvılarının varlığını göstermek amaçlanmıştır. Bu çalışma için gönüllülerden kan ve tükürük örnekleri toplanmıştır. Toplanan örnekler iki donörlü karışımlar olarak dört farklı grupta hazırlanmıştır. Her bir grup için 1/1, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 dilüsyonlu örnekler hazırlanmıştır. 4 kadın ve 4 erkek bireyden toplanan sıvılarından toplam 36 karışım örneği oluşturulmuştur. Hazırladığımız karışım örneklerinde kan varlığını göstermek için miR-451A biyo belirteci, tükürük varlığını göstermek için miR-203A-3p biyo belirteci tercih edilmiştir. Örnekler ilk olarak santrifüj edilip ardından miRNeasy Mini Kit kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre ile tayin edilmiştir. Sonrasında Taqman microRNA

Reverse Transcription Kit ile RNA'lardan cDNA (tamamlayıcı DNA) sentezlenmiştir. Referans gen olarak U6 gen bölgesi tercih edilmiş olup analizler RT-PCR ile yapılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS programı ile T testi kullanılarak yapılmıştır. Karşılaştırmalar 2^{-} delta delta Ct yöntemi ile hesaplanmıştır. Bu çalışma sonucunda, tükürük varlığını göstermek için miR-203A-3p belirtecinin uygun olmadığı düşünülmektedir. Karışımdaki kan örneklerinin varlığı tüm dilüsyonlarda gösterilmiş, en iyi seviye 1x1 oranında görülmüştür. Tüm gruplar incelendiğinde erkek donörlü karışımların diğer karışımlara oranla daha yüksek oranda eksprese edildiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: miRNA, karışım örnekleri, kan, tükürük, Real Time PCR

SUMMARY

In criminal cases, biological samples collected from the scene of crime serve as evidence for clarification of the event. For this reason, they must be collected from the scene, stored under appropriate conditions, and analyzed and interpreted with the right methods. Although each crime scene is unique, the body fluids (sweat, urine, semen, saliva, blood, etc.) left behind by the perpetrator and/or victim are limited. Various genetic factors are used in studies to make reliable interpretations of these body fluids. In the last decade, different from other methods, microRNAs (miRNA) have been used for forensic purposes. Encapsulated, miRNA's which have resistant to environmental changes, miRNAs are unique to body fluids and show different biomarkers in monozygotic twins with the same DNA sequence, which makes them very important and worthy of study. Currently, its usability is being studied in determining body fluids, distinguishing monozygotic twins, separating peripheral blood from menstrual blood, identifying the perpetrator in impaired samples, and determining the postmortem interval. However, among these studies that allow justice to be provided and to illuminate forensic events, sexual abuse with multiple perpetrators, murder, etc., which we have faced frequently today. Examples of mixtures that cause problems in cases have not been studied yet. In this study, it was aimed to show the presence of body fluids in the mixture by using miRNA biomarkers in the mixture samples. Blood and saliva samples were collected from volunteers for this study. Collected samples were prepared in four different groups as mixtures with two donors. Samples with 1/1, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 dilutions were prepared for each group. A total of 36 mixture samples were created from the fluids collected from 4 female and 4 male individuals. The miR-451A biomarker was preferred to show the presence of blood in the mixture samples we prepared, and the miR-203A-3p biomarker to show the presence of saliva. The samples were first centrifuged and then RNA was isolated using the miRNeasy Mini Kit.

The concentration and purity of the obtained RNAs were determined by spectrophotometer. Afterwards, cDNA (complementary DNA) was synthesized from RNAs with Taqman microRNA Reverse Transcription Kit. The U6 gene region was preferred as the reference gene and the analyzes were made by RT-PCR. Statistical analyzes were performed using SPSS program and T test. Comparisons were calculated using the 2-delta delta Ct method. As a result of this study, it is thought that the miR-203A-3p marker is not suitable for showing the presence of saliva. The presence of blood samples in the mixture was demonstrated at all dilutions, with the best level being 1x1. When all groups were examined, it was observed that mixtures with male donors were expressed at a higher rate than other mixtures.

Keywords: miRNA, mix samples, blood, saliva, Real Time PCR

1. Giriş ve Amaç

Ribo nükleik asitler (RNA), adli bilim alanında 1984 yılından itibaren çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalarda gen ifadesinin rolü ve adli bilimlerdeki uygulama alanları üzerinde durulmuş, mesajcı RNA (mRNA) ve mikro RNA'lar üzerindeki ilgi artarak devam etmiştir. Mikro RNA'lar, ilk kez 1993 yılında bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*' da keşfedilmiştir. Sonrasında arthropodlardan insanlara kadar birçok canlı türünde çok sayıda bulunmuştur. Adli bilimler alanında mikro RNA'ları çalışan ilk araştırmacılar Hanson ve arkadaşlarıdır (ark.). Çalışmalarında Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) analizini kullanarak periferik kan, tükürük, semen, vajinal sıvı ve menstrual kanda insan miRNA'sını incelemiş, farklı vücut sıvılarında farklı ekspresyon seviyesi gösteren miRNA'ların biyolojik sıvıların tayininde kullanılabilecek marker olduğunu belirtmişlerdir. Sonrasında farklı bilim insanları tarafından yapılan çalışmalar ile uyumsuz sonuçlar elde edilse de bugün farklı vücut sıvılarının elde edilmesinde kullanılabilecek birçok miRNA belirteci bilinmektedir. Mikro RNA'lar anti-bozunma özellikleri ve doku özgüllükleri nedeniyle adli tıpta potansiyel uygulamaları olan küçük (22-24 nükleotid) kodlanmayan RNA'lardır (1). Boyutları, proteinler ve lipidler içerisinde kapsüllü yapıyı almaları sebebi ile miRNA'lar diğer RNA'lara göre daha zor bozunma durumu gösterirler (2). Mikro RNA'nın bozunması oldukça zordur ve oldukça dokuya spesifiktir (3). Mikro RNA, ribo nükleaz enzimi ile kolayca parçalanmaz, sıcaklık, ısı, potansiyel hidrojen (pH) gibi çevresel etkenlere karşı bozunmaya dayanıklıdır. miRNA'ların bozulmuş doku örneklerinde bile varlığı tespit edilebilmiştir. Yıllardır birçok hastalığın tanısında, prognozunda, tedavisinde kullanılmalarının yanı sıra son on yıldır adli bilimler alanında da çalışmaları yapılmaktadır. Güncel olarak vücut sıvılarını belirleme, monozigot ikizleri ayırt etme, periferik kan ile menstrual kanı birbirinden ayırma, bozulmuş örneklerde faili belirleme, postmortem interval tayininde kullanılabilirliği için çalışmalar yapılmaktadır.

Adaletin sağlanması ve adli olayların aydınlatılmasına olanak sağlayan bu çalışmalar arasında günümüzde sık rastladığımız çok failli cinsel istismar, cinayet vb. vakalarda sorun oluşturan karışım örnekleri henüz çalışılmamıştır. Karışım örnekleri, iki ya da daha fazla katılımlı donörlerin oluşturduğu örneklerdir. Gözle görülmeyen yahut bilinmeyen sıvılarda DNA profilleme analizleri yapılarak varlığı ispatlanabilmektedir (4). Analiz edilmesi gereken karışım örnekleri yorumlanırken alel ve lokus kaybına sebep olacak az miktarda olması veya bozulmuş örneklerin toplandığı vaka çalışmalarında, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) okumamaları olur ve kimliklendirme yapılamamaktadır. Bu gibi zorlukları bertaraf edebilmek için farklı yöntemler denenmiştir. Bunlar çoklu Tek Nükleotid Farklılıkları (SNP), bileşik markörler (yani DIP-STR'ler, SNP-STR'ler ve DIP-SNP'ler) ve soy markörleri (Y kromozom STR'leri) geleneksel Kısa Ardışık Tekrar Bölgeleri (STR) çalışmaları olmuştur (5). Fakat tam olarak etkili ve kesin bir yöntem bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, olay yerinde birden fazla kişinin biyolojik materyalinin karışması durumunda bu biyolojik örneklerin miRNA biyo belirteçlerini kullanarak hangi orana kadar tiplendirilebileceğinin belirlenmesidir.

2. Genel Bilgiler

Dünya'nın varlığından bu yana adli olaylar hep var olmuştur. Cinayetler zehirli kimyasallar, kesici-delici aletler, ilaçlar, uyuşturucu maddeler kullanılarak kasıtlı ya da kasıt dışı gerçekleşmiştir. Kaza ya da kasten ölümler olmuştur. Bu olayların aydınlatılabilmesi ise biraz zaman almıştır. İlk olarak biyolojik materyaller tanımlanarak fail ve mağdura ulaşılmaya çalışılmıştır (6-14). Olay yerindeki örnekler incelenerek şüpheli kişilere ait kan grupları ve protein yapılarına bakılarak karşılaştırma yapılmıştır (15).

2.1.Tarihçe

1953 yılında Watson ve Crick'in DNA çift zincirli yapısını göstermesiyle DNA çalışmaları hız kazanmıştır. 1980 yılında David Botstein ve ark., DNA üzerinde bireylere özgü farklılıklar olduğunu öne sürmüştür. 1984 yılında Alec Jeffreys ve ark. tarafından DNA'nın kişiler için ayırt edici özellikte olduğu gösterilmiştir. Bir sonraki yıl karşılaşılan bir vakada bu farklı özellikler kullanılmış böylelikle geçerliliği kuvvetlenmiştir (16-18). Bu çalışma, sonrasında olay yerinde bulunacak olası vücut sıvısından, lekesinden hatta izinden DNA analizi yaparak faili bulabilmemizi sağlayacağından oldukça önemli bir gelişme olmuştur. DNA ile kimliklendirme çalışmaları büyük bir ilgi ile devam ederken hızlı degrade olduğu, bilinen tek zincirli yapısı ve az bilgiye sahip olunması RNA'ların çalışılmasını geciktirmiştir. RNA ile ilgili ilk çalışma 1984 yılında ikincisi ise bundan on yıl sonra gerçekleşmiştir ve postmortem vakaların değerlendirilmesi üzerine olmuştur (19-21). 1993 yılında Lee ve ark tarafından keşfedilen miRNA'lar üzerindeki ilk çalışmalar biyomedikal alanında olmuştur. Hanson ve ark., miRNA'ları adli bilimler çalışmalarına dahil eden ilk araştırmacılar olmuşlardır. Sonrasında gerçekleştirilen analizler ile miRNA'ların vücut sıvılarını kimliklendirmede biyo belirteç olarak kullanılabileceği kabul görmüştür ve halen çalışılmaktadır (22,23).

Li ve ark. ile Mayes ve ark. venöz kan, menstrual kan, tükürük ve meni örneklerini ayırt etmek için Geleneksel Vücut Sıvısı Tanımlama (BFID) sistemini geliştirmiş, ayırt etmede olumlu sonuçlar almışlardır (24).

Sonrasında yapılan çalışmalarda verilerin istatistiksel analizleri hesaplanmaya çalışılmıştır. Birçok çalışmada Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile t testleri kullanılmıştır (25).

O ve ark., Fisher testine dayalı matematiksel bir yöntem geliştirerek vücut sıvılarını tanımlamaya çalıştılar (26). Çok sayıda analiz sonucunda korelasyon gösterdiler.

2009 yılında Hanson ve ark. tarafından, miRNA tanımlaması için, adli BFID kullanılan ilk çalışma gerçekleştirilmiştir. 452 miRNA bölgesi qRT-PCR kullanılarak incelenmiştir. Araştırmacılar, miR-451A ve miR-16 venöz kanda, miR-412 ve miR-451A menstrüel kanda, miR-135b ve miR-10b menide, tükürükte miR-205 ve miR-658, vajinal sekresyonlarda miR-124a ve miR-372 varlığını gösterdiler (27).

2010 yılında Zubakov ve ark., vücut sıvılarında 718 miRNA bölgesine baktılar. Bir yıl saklanan örneklerde miRNA 135a, miRNA 891a, miRNA 144, miRNA 185 bölgelerinin bozulmadığını gösterdiler (28).

Courts ve Madea, 800 adet miRNA bölgesini inceleyerek kan örnekleri için miR-126, miR451A, miR-150; tükürük örnekleri için miR-205, miR-200c, miR-203 bölgelerinin kullanılabilir olduğunu gösterdiler (25)

Wang ve ark. 754 miRNA bölgesini inceleyerek periferal kan için miR-16 ve miR-486; menstrual kan için miR-214; semen için miR-888 ve miR-891a bölgelerini gösterdiler. Aynı araştırıcılar iki yıl sonra, miR-200c-3p, miR-203A ve miR-205-5p bölgelerini vücut sıvılarında incelediler. Çalışma sonucunda, miR-200c-3p vajinal sekresyonda; miR-203A tükürük, vajinal sekresyon ve menstrual kanda; miR-205-5p vajinal sekresyon ve menstrual kanda diğer vücut sıvılarına göre daha fazla miktarda bulunmuştur (29).

Sauer ve ark., yaptıkları analiz sonucunda miR-891a-5p'nin semen örneğine özgü olduğunu söylediler (30).

Sirker ve ark., yaptığı çalışmalarla farklı vücut sıvılarında baktığı belirteçlerden miR-10b, miR-203, miR-374, miR-451A ve miR-943 bölgelerinin tanımlayıcı olduğunu gösterdiler. miR-451A kan türlerinde; MiR-451A ve miR-943 kanı diğer vücut sıvılarından ayırt etmede; miR-943 menstrual kanı deriden ayırmada; miR-10b, miR-203 ve miR-943 kombinasyonu venöz ve menstrual kanı ayırmada etkili olduğunu vurgulamışlardır. miR-10b ve miR-451A'nın ciltteki deri hücrelerini tükürükten ayırt ettiğini ve miR-374'ün meniyi kan örneklerinden ayırt edebildiğini açıklamışlardır. miR-203 belirtecinin, vajinal sekresyonu tükürük, meni ve kandan ayırabileceğini açıklamışlardır(31).

Seashols-Williams, ter, idrar ve dışkı örneklerini incelediler. Bunun için miR-200b, miR-1246, miR-320c, miR-10b-5p miR-26b ve miR-891a bölgelerine baktılar, ayırt edici sonuçlar elde ettiler (32).

Araştırmalarda kullanılan miRNA'lar sadece o vücut sıvısına özgü olmamaktadır. Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki bir belirtece farklı vücut sıvılarında da rastlanabilmektedir. Bu nedenle çalışmalarda ve bizim çalışmamızda kullanılan biyobelirteçler, ilgili vücut sıvısında en çok rastlanan aday bölgelerdir.

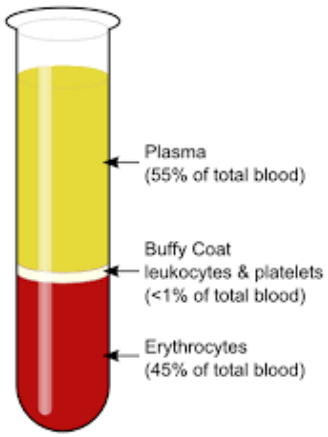
2.2.Adli Amaçlı Kullanılan Vücut Sıvıları

Adli bilimler, multidisipliner bir çalışma alanıdır. Birçok farklı alandaki adli vakalara hitap etmektedir. Olay yerinde bulunan her materyal kanıt niteliği taşımaktadır. Olay yerinden toplanacak olası materyallerden elde edilecek sıvılar bellidir. Bu sıvılar tükürük, meni, menstrual kan, periferik kan, vajinal sekresyon, idrar ve semendir. Vücut sıvıları taze-kurumuş, genç-yaşlı bireye ait, kadın-erkeğe ait, az-çok, tek-karışmış halde bulunabilir. Vakalar, yaralanma ya da ölümle sonuçlanmış kaza ya da cinayet olabilir. Olası her durumda adli amaçlı

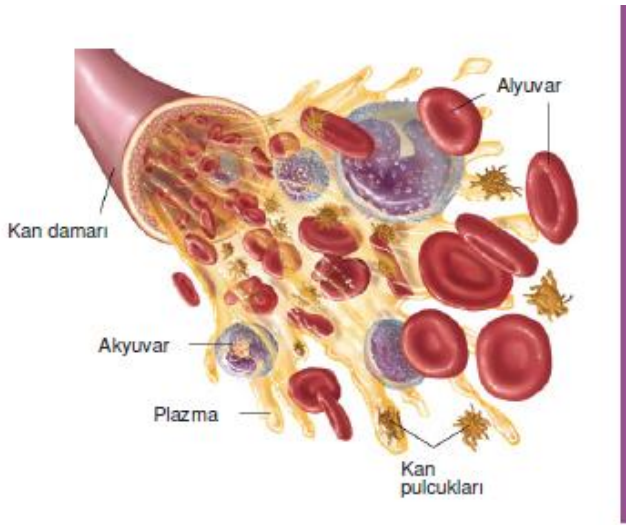
analizler sonucu kimliklendirme yapılabilmektedir. Bu tez kapsamında kan ve tükürük örnekleri çalışıldığı için bu iki vücut sıvısı hakkında bilgi verilecektir.

2.2.1.Kan

Kan, damarlar içinde dolaşan, plazma ve hücrelerden (alyuvar, akyuvar, trombosit) oluşan heterojen bir sıvıdır. Hayati önemi olan bu kırmızı sıvının neredeyse %90'ı sudan oluşurken geriye kalan kısmını plazma proteinleri, amino asitler, karbonhidratlar, yağlar, hormonlar, üre, ürik asit, laktik asit, enzimler, antikorlar, sodyum, potasyum, iyot, demir, bikarbonat gibi elementlerden oluşmaktadır. Plazma hafif sarı renklidir. İçinde su, kan proteinleri, tuzlar (elektrolitler), hormonlar, glikoz, çeşitli metabolizma artıkları, yağlar bulunur.



Şekil 1: Kan tüpünde gözlenen plazma ve kan hücreleri.



Şekil 2: Kan hücrelerinin fizyolojik görüntüsü.

Kan hücreleri savunma, solunum gazlarının taşınması (oksijen, karbondioksit vesaire), pıhtılaşma görevlerini yerine getirirken, plazma kısmı bağışıklığın düzenlenmesinde etkilidir. Kanın bu koruma, savunma, taşıma, düzenleme görevlerinin yanında atıkların uzaklaştırılması görevi de bulunmaktadır.

Yetişkin bir insanın kan hacmi tüm vücut ağırlığının 1/12'sine denk gelmektedir. Yetişkin dişi bireylerde ortalama 4-5 litre kan bulunurken yetişkin erkeklerde ortalama 6-7 litre kan bulunmaktadır. Erişkin bir bireyde bulunan 5-7 litre kanın 1-1.5 litresinin kaybı hayati tehlikeye yol açmaktadır (33,34).

2.2.1.1.Kan analizinde kullanılan yöntemler

İnsan vücudu için vazgeçilmez olan kan, adli vakaların aydınlatılması için de vazgeçilmez bir sıvı olmaktadır. Olay yerinde bulunma ihtimalinin yüksek olması sebebiyle önemli bir çalışma konusu olmuştur. Adli analizlerde kullanılan kan örneği kimliklendirilmesinde görüntüleme yöntemleri, kimyasal yöntemler ve immünolojik yöntemler kullanılmaktadır (35,36).

❖ Işık ile Görüntüleme Yöntemleri

Yöntem, 1991 yılında Stoilovic'in araştırmaları ile çalışılmaya başlanmıştır. Bu yöntem için paslı kan örneklerinde ve 1/1000 dilüsyondan düşük örneklerde sonuç alınamadığı bilinmektedir (37).

Kan analizlerinde tercih edilen yöntemlere ek olarak ön tanı ve doğrulama testleri kullanılır. Bu testlerin uygulanma amacı DNA testi maliyetinin önüne geçmek, elde olan örneğin verimli kullanılmasını sağlamaktır.

❖ Ön Tanıma Testleri

Ön tanıma testleri, alyuvar içerisindeki hemoglobin (Hb) varlığında renk değiştiren/ortama ışık yayan testlerdir. Hassas, ucuz, uygulaması kolay testlerdir. Fakat herhangi bir maddeye özel olmadığı için yanlış pozitif sonuç verme olasılığı yüksektir (38,39).

Ön tanı testlerinde yaygın olarak, fenolftalein, luminol, fluoresindir (40).

Luminol (3-aminophthalhydrazide), bir dizi kimyasal reaksiyon sonucunda ortama ışık yayma eğiliminde olan bir ön tanı testidir. Bu yöntem ile temizlenmiş, silinmiş, gözle görülmeyen kan lekelerinin görünür hale gelmesi sağlanmaktadır. Luminol, Hb ile çok yüksek hassasiyet gösterir. 1/5.000.000 dilüsyonda dahi kanı tespit edebilir. Ortama yaydığı mavi-yeşil ışık 30 saniye kadar görünür olduğu için özel fotoğraflama teknikleri kullanılmaktadır (41,42).

Fenolfitalein (Kastle-Mayer Testi), bir pamuk yardımıyla lekeye sürülür. Eğer leke kan lekesi ise pamuk üzerinde parlak pembe renk oluşturur. Bu renk değişimi birkaç saniye içinde belirir. Kastle-Meyer testinin hassasiyeti 1/10.000.000 dilüsyonlu kan örneğini tespit edebilecek kadar yüksektir (25,28,43).

Fluoresin, 415-480 nano metre (nm) dalga boyunda gözlemlenebilen bir ışıma sağlar. Diğer ön

tanı testlerinden farklı olarak bu ışıma daha uzun sürede gözlemlenmektedir (44,45).

- **Doğrulama Testleri**

Doğrulama testleri, ön tanı testlerine göre yanlış pozitif verme olasılığı daha düşük olan testlerdir. Fazla örnek gerektirmektedir. Maddeye özel olan olan bu testlerin laboratuvar ortamında uygulanması daha uygundur (46). Doğrulama testlerinin en bilinenleri Takayama testi (hemokromojen testi) ile Teichman testidir.

Takayama testi, hemoglobine özgü bir testtir. Ön tanı testi ile olası kan örneği, test sonucunda pembe renkte kristal oluşumuna sebep olursa örneğin kan olduğu belirlenmiş olur (26,31,39).

Teichman testi, kan sıvısı olduğu düşünülen örnek, test sonucunda kahverengi saman çöpü rengine bürünürse örneğin kan olduğu belirlenmiş olur (26,31,39,47).

2.2.2.Tükürük

Tükürük, insan ve hayvanlarda üretilen bir vücut sıvısıdır. İnsanlarda dilaltı, çene altı, kulak altı bölgelerinden üretilir. Sinirsel iletim ile salgılanan tükürük sıvısı ağız içerisinde karbonhidratların sindirimini başlatır. Burada besinlerin fiziksel ve kimyasal sindirimi gerçekleşir.

Adli amaçlı analizlerde tükürük sıvısı DNA tabanlı kimliklendirme için önem arz etmektedir. Elde edilen direkt tükürüğün yanı sıra ısırık, çiğnenmiş besin, sigara izmariti gibi yerlerde de tükürük analizi mümkün olmaktadır. Cinsel taciz-tecavüz davalarında öpme izinden tükürük analizi yapılabildiği de çalışmalar ile gösterilmiştir.

2.2.2.1.Tükürük analizinde kullanılan yöntemler

Tükürük sıvısının gözle görülme ihtimalinin diğer vücut sıvılarına göre daha zor olması faydalanma durumunu azaltmaktadır. Tükürük sıvısını tespit edebilmek için alternatif ışık

kaynağı kullanılır ve Ultraviyole (UV) ışık altında bakılır. Mavi-beyaz görüntü veren tükürük sıvısının diğer sıvılardan ayrımı oldukça güçtür. Tükürük için en çok tercih edilen yöntem tükürük içinde bulunan amilaz ile gerçekleştirilir. Leke üzerine uygulanan analiz ile lekede amilaz varsa yıkım gerçekleşecek ve renk değişimi gözlenecektir. Yapılan tükürük analizlerinde ağız içi yanak epitel dokusundan alınan örnekte kolaylıkla DNA analizi yapılabilmektedir (24,32,47-50).

Son dönemde kimliklendirme analizleri için tükürük sıvısı daha fazla tercih edilmeye başlanmıştır. Tükürük sıvısının kolay toplanabilmesinin yanı sıra son dönemdeki araştırma alanlarında olumlu sonuçlar vermesi de tercih sebebi olmasını açıklamaktadır. Adli olaylar için elde edilen tükürük delilleri ile, uyuşturucu, aşırı alkol, hormon tanımlama, zehirlenme, insan ve hayvan ısırıkları analizlerinde işe yarar sonuçlar alınmıştır (51,52).

Deri, giysi, cansız objelerden görünmez olabileceği için tükürük örneği toplamak zordur. Kurumuş tükürük örneklerini analizlemek için birkaç yöntem bulunmaktadır. Bunlar Lazer, UV, Floresan Spektroskopisi ve çeşitli kimyasallardır.

- **Kimyasallar**

Tükürük lekeleri için enzim ve farklı kimyasallar denenmiştir. Damgalardan ve zarflardan tükürük ile kimliklendirme, şeker ile indirgenme tepkimesine giren ve kırmızı çökelti oluşturan kimyasal tarafından elde edilmiştir. Yaygın olarak tercih edilen enzimler alkalin fosfataz, amilaz enzimi ve nişastadır. Analiz için nitrat ve tiyosiyanat tuzları da kullanılmıştır. Bu yöntemler, tükürük lekesinin yaşı ile içerdiği tortu miktarına göre sınırlı sonuçlar açığa çıkarır. Bunlara bağlı olarak farklı duyarlılık gösterir.

➢ **Floresan Spektroskopisi**

Tükürük içindeki alfa amilaz, aromatik amino asit, triptofan, floresan spektroskopisine özgü belirgin bir emisyon eğrisi verir. Bu nedenle deri üzerindeki kurumuş tükürük lekelerini tespit etmede işe yarar bir hassasiyete sahiptir (53).

➢ **Lazerler ve Ultraviyole Işık**

Argon iyon lazeri ile kuvars ark tüpü kullanılmaktadır (54,55).

➢ **Çift Çubuk Tekniği**

Islak pamuklu çubuk veya cilt üzerine serilen ıslak filtre kağıdının kullanıldığı klasik bir tekniktir. Deriden tükürük toplamak için etkili bir şekilde kullanılmıştır. Islak olan pamuklu çubuk ve sonrasında kuru olan pamuklu çubuk kullanan, çift çubuk tekniği denilen teknik, Sweet ve ark. tarafından deneylenmiştir. Analizlerde kullanılabilecek faydalı bir teknik olduğunu göstermişlerdir. Deriden alınan tükürük, tükürükten DNA ve derideki tükürük örneklerinden fenol-kloroform kullanılarak ekstre edilebilir (56,57).

Elde edilen tükürük örneklerinde amfetaminler, fensiklidin, kokain, barbitüratlar, benzodiazepinler, ve opioidler gibi ilaçlar belirlenebilmektedir. Tükürük, radyoimmunoassay tekniği ile esrarı tespit etmek için de kullanılabilir olduğu düşünülmektedir. Esrarın içeriğinde bulunan önemli bir bileşeni olan marijuana, tükürükte, içildikten sonraki süreçten 4 saat sonrasına kadar tespit edilebilir (58,59).

➢ **İmmunoassay Tekniği**

Peel ve diğerleri metanol ile birleştirilen, gaz kromatografisi/kütle spektrofotometrisi ve enzim çoklu immünoassay tekniği ile analizlenen tükürük örneğinde tespit edilebilir miktarda ilaç bulmuştur. İlaca özgün ve analiz için hassas olan bu yöntem, kimliklendirmede serolojik testlere alternatif olabilecektir. Birkaç araştırmacının çalışmaları ile morfin, fenobarbital, amfetamin gibi ilaçların, radyoimmünoassay (RIA) tekniği ile tükürük/ tükürük lekelerinde varlığı gösterilmiştir (60).

➢ **Drugwipe Testi**

Son zamanlarda Securetec firması, yüzeyde bulunan ilaçların tespiti için tanımlama yapabilecek Drugwipe'ı kullanılabileceğini açıkladı. Bu testin kullanılabilir olduğu çeşitli ülkelerde araştırılmaktadır. Drugwipe, tedavi amacı dışında kullanılan ilaçların belirlenmesi için tercih edilen, 10-15 cm boyutunda, immünokimyasal bir testtir. Farklı ilaç grupları için; kokain, kannabinoidler, piyatlar, ve amfetamin grubu için farklı testler kullanılmaktadır. Test üzerinde bulunan silme kısmı, farklı ilaçların yüzeyden tespitini sağlar (61).

Son zamanlarda tercih edilen tükürük sıvısı kortizon, kortizol, testosteron gibi hormonların tanımlanmasında kullanılır. Bu steroidler, tükürük içerisinde serbest halde bulunduğu, içerik ile bağ yapmadığı için tükürük sıvısının gerçek durumunu yansıtmaktadır (52).

➢ **İmmünoanaliz Tekniği**

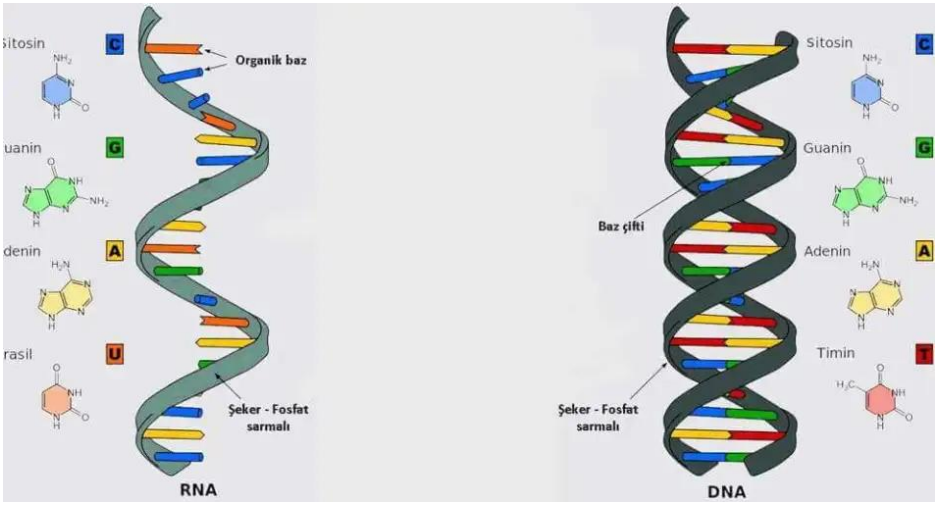
Fletcher ve diğerleri bir yılı aşkın bekleyen lekelerde tanımlama yapabilmek için tükürük içerisinde bulunan immünoglobulin A'yı baz alarak monoklonal antikora ihtiyaç duyan enzime

bağlı olan bir immünoanaliz tekniğini ortaya koydu. Tekniğin yetersiz kaldığı vakalarda karşılaştırma için çift jel difüzyon tekniği ve çapraz elektroforez tekniği kullanılmıştır. Bu teknik sadece ısırığın insana mı yoksa insan dışı bir canlıya mı ait olduğunu söyleyebilir. Hangi hayvana ait ısırık tespiti için yeterli değildir (62).

Isırık izlerinde incelenen tükürük sıvısında dökülen yanak içi epitel hücrelerini tayin edilebilmesi, suçu işleyen kişinin cinsiyetini belirleyebilme ihtimalini artırmıştır. Bu sonuca doğru şekilde ulaşabilmek, izlerin bulunduğu materyallere, olay örgüsü göz ününe alınarak belirlenecek çevresel etkenlere bağlıdır. Deri üzerinde bozunmadan kalabilmiş, birikmiş örneklerde birkaç hafta sonrası için mümkün olduğu düşünülmektedir. Her iki durumda da kan lekeleri örneklerini belirlemede kullanılan yöntemler düşünülerek cinsiyeti doğru tanımlayabilmek adına iki parametre sunulmuştur. İlk olarak, kadınlarda Barr cisimciği, erkeklerde ise F cisimleri tespiti ile cinsiyeti tanımlayabilmektir. İkinci olarak, 17B-estradiol, tetosteron gibi RIA tarafından saptanabilen cinsiyet hormonlarının bulunma yüzdelerine bakılıp tanımlanabilmektedir. İlk parametre tükürük analizlerinde olumlu sonuçlar göstermiştir (63).

2.3.Ribo Nükleik Asit

RNA (Ribonükleik asit), organik baz, şeker ve fosfat birleşiminden oluşan tek zincirli bir nükleotittir. DNA'da olduğu gibi adenin, guanin, sitozin bazını bulundururken farklı olarak timin yerine urasil bazı bulundurur. Yine DNA' dan farklı olarak deoksiriboz şekeri yerine riboz şekeri bulundurur. Tek zincirli olduğu için kendini eşleyemez, DNA tarafından eşlenir. RNA üç farklı şekilde bulunur; mesajcı RNA (mRNA), taşıyıcı RNA (tRNA), ribozomal RNA (rRNA) (64).



Şekil 3: DNA ve RNA'nın yapısı.

- **rRNA'lar**

Ribozomal RNA'lar. En fazla sayıda bulunan RNA çeşitidir. Ribozom organelinin yapısına katıldığı için böyle adlandırılmıştır. Ribozom organeli protein sentezinde görevli organeldir. Bu nedenle, organelin fazla sayıda bulunması gerekir ve yine bu nedenle ribozomal RNA sayısı en fazladır (65).

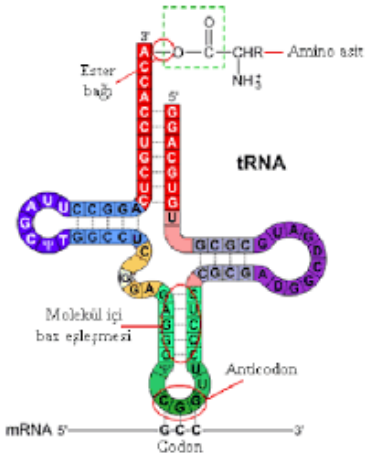
- **mRNA'lar**

Mesajcı RNA'lar. DNA' dan aldığı genetik şifreyi ribozoma iletir. DNA'nın çift zincirli yapısı DNA helikaz enzimi ile açılır. Sitoplazmadan gelen mRNA, RNA polimeraz enzimi ile şifrelenen bu mesajı ribozoma iletir. Böylece protein sentezini başlatmış olur (66).

- **tRNA'lar**

Taşıyıcı RNA'lar amino asitleri ribozom organeline taşır. Yonca görünümünde şematize edilirler. Aktarılan farklı amino asitler farklı proteinlerin oluşmasını sağlamaktadır (67,68).

RNA'lar protein kodlayan ve kodlamayan olarak ikiye ayrılır. Kodlanmayan RNA'lar rRNA, tRNA ve mikro RNA'lardır. rRNA ve tRNA protein sentezi için mutlak yapılar iken mikro RNA hücre içinde kalıtsal bilginin durumunu düzenler (69).



Şekil 4: tRNA'ların sembolik yonca yaprağı görünümü.

- **Kodlamayan RNA'lar**

Küçük kodlamayan RNA'lar mesajcı RNA, taşıyıcı RNA ve ribozomal RNA'nın yanı sıra farklı işlevlere sahip RNA çeşitlerini de içermektedir. Küçük kodlamayan RNA'lar olarak isimlendirilen bu RNA türleri özellik ve işlevlerine bakılarak Küçük interferans RNA (siRNA), Küçük nüklear RNA (snRNA), Küçük nükleolar RNA (snoRNA) ve mikro RNA (miRNA) olarak sınıflandırılmaktadır (70-72).

- Küçük nüklear RNA (snRNA): çekirdekte bulunan, mRNA'nın işlenmesi ile gen uyumunu sağlamasında önemli işlevleri olan küçük RNA çeşitidir. mRNA oluşturulduğunda genlerin kodlanma yapmayan (intron) bölgesinin çıkarılmasını sağlar. Bunun sonucunda olgun mRNA oluşumuna katkı sağlamış olurlar (73).

- Küçük interferans RNA (siRNA): çift iplik yapılı, 20-25 nükleotid uzunluğunda olan RNA çeşitidir. siRNA'lar özgü olduğu mRNA'lar ile bağ yapıp onları işaretler ve endonükleaz enzimleri ile yıkılmasına neden olurlar. Böylelikle gen ifadesinin durdurulmasında işlev görürler (74).

- Küçük nükleolar RNA (snoRNA): Ribozomun oluşumu için olması gereken ribozomal RNA modifikasyonlarını sağlarlar. Uzun pre-rRNA'ları daha kısa parçalara ayırarak işlevsel alt ünitelere (18S, 5.8S ve 28S moleküller) dönüşümünü sağlarlar (75).

- PIWI Etkileşimli RNA (piRNA): 25-30 nükleotid uzunluğunda olan RNA çeşitleridir. Kodlama yapmayan RNA'ların oldukça spesifik bir grubunu oluşturmaktadır. piRNA'lar germ-line hücrelerinde, sperm oluşumunda, farklı diğer genetik elemanların işlevinin durdurulmasını sağlamaktadır (76,77).

- Mikro RNA (miRNA): neredeyse 20-25 baz çiftinden oluşan küçük, tek iplikli, kodlanmayan RNA çeşitlerindendir. RNA Polimeraz II (Pol II) enzimi tarafından üretilen öncü miRNA'ların (pri-miR) sonrasında olgun miRNA'lara dönüşmesi ile oluşurlar (78). İnsan mRNA'sının yaklaşık %30'unun işlev düzenlemesinde görev

aldığı bilinmektedir (79). Postranskripsiyonel düzenlemede görev alırlar; DNA'dan sentezlenen mRNA dizilerine bağlanarak hedef transkripsiyonu ya da sonrasında gerçekleşecek translasyonu engeller. Doku ve vücut sıvılarına özgü olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre tek yumurta ikizlerinin ayrımında dahi kullanılabilirler. Adli Genetik alanında da biyo belirteç olarak kullanılmaktadırlar. Birçok tanımlanmış biyo belirteç miRNA bölgeleri bulunmaktadır (68,80,81). Bugünkü *miRBase* veri tabanı incelendiğinde, insan dokusunda varlığı bilinen 4690 miRNA biyo belirteci görülmektedir.

2.4.miRNA Literatürü ve Adli Amaçlı Kullanım Alanları

miRNA'ların çalışması, 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından lin-4'ün bulunması ile protein üretimini düzenlemek için işlevsel davranışlarının keşfedilmesiyle başladı. Yedi yıl sonra, ikinci miRNA keşfedildi, let-7 (83) ve sonrasında miRNA'lar yeni bir riboregülatör sınıfı olarak düzenlendi (83,84). Biyomedikal araştırma toplulukları nezdinde miRNA analizinin yapılması gerektiği, miRNA'ların çeşitli biyolojik ve patolojik durumlarda hayati görevler üstlendiği ve miRNA'ların dokuya spesifik olduğu, hastalığın ön tanısı olarak kullanılabileceği keşfedildiğinde çalışmaların devam etmesi gerektiği vurgulandı (3).

Yapılan ilk miRNA çalışmalarında çeşitli dokular, beyin omurilik sıvıları, kültürlenmiş birincil dokular gibi klinik biyolojik örneklere odaklanılsa da son on yılda adli bilimler alanında da çalışmalara başlanmıştır. Hanson ve ark., mikro RNA'ları adli bilimler alanı ile ilk tanıştıran araştırmacılar olmuşlardır. Çalışmalarında, vücut sıvılarının adli amaçlı tanımlamasının potansiyellerini göstermişlerdir (4). Sonrasında yapılan araştırmalarda, çeşitli vücut sıvılarına özgü miRNA biyo belirteçleri belirlenmeye çalışılmıştır (5,85,86). Günümüzde de bu çalışmalar devam etmektedir.

Mikro RNA'lar ile ilgili bir diğer çalışma konusu organ dokusu tanımlaması olmuştur. İlk

başlarda örneklerin büyük ve bozulmamış olması gerektiği öne sürülerek adli vakalarda kullanılamayacağı düşünülmüştür. Ama yapılan bir çalışmada, araştırmacılar, önceden seçilmiş 15 miRNA'nın RT-qPCR'sini (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) bozulmamış örneklerin yanı sıra karışık, eskitilmiş, bozulmuş örneklerde de inceleyerek kapsamlı bir araştırma yapmışlardır (87). Böylelikle adli bilimler alanında yeni bir araştırma konusunun kapıları aralanmıştır.

Sonrasında bir biyolojik materyalden donörün yaşını tahmin etmek için çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmada, belirlenen miRNA'ların yaşa bağlı olarak azaldığını ortaya koyan araştırmacılar mikro RNA'ların önemini belirterek yaş göstergesi olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (88). Benzer şekilde, adli tıp araştırmalarında sıklıkla sorgulanan gerçek lekenin yaşının belirlenmesi, lekenin suçla ilgisi miRNA'lar kullanılarak araştırılmıştır (89). Son olarak, postmortem interval (PMI) tahmini çalışmaları, periferik kan ile menstrual kanı ayırma, tek yumurta ikizlerinin ayrımında miRNA analizi önerilmiştir (90-92).

Vücut sıvısı	n	HBB (%)	PBGD (%)	SPTB (%)	MMP7 (%)	MMP11 (%)	PRM1 (%)	PRM2 (%)	STATH (%)	HTN3 (%)	HBD1 (%)	MUC4 (%)
Kan	10	100	96	100	0	68	0	0	0	0	0	0
Menstrüel kan	10	100	40	72	100	100	0	0	0	0	0	0
Vajinal sekresyon	10	0	0	4	10	0	0	0	0	0	100	100
Semen	10	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
Tükürük	10	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0

Şekil 5: Farklı vücut sıvılarındaki miRNA belirteçlerinin PCR tekniği kullanılarak gösterilmesi

2.5.miRNA Biyo Belirteçleri

Mikro RNA'lar 20-25 nükleotit uzunluğunda kodlanmayan RNA molekülleridir (93). Olumsuz çevre şartlarına karşı dayanıklı olması, az örnekten analiz edilebilmesi yönüyle DNA ve diğer RNA çeşitlerine göre çalışılmaya daha değer görülmektedir (4,50,94). Yapılan çalışmalar miRNA'ların dokuya özgü olduğunu göstermektedir. İlk olarak Hanson ve ark. tarafından vücut sıvıları için biyo belirteç olabileceği söylenen mikro RNA'ların, Zubakov ve ark. yapmış olduğu çalışmalarla kan ve semene uyumlu belirteçlerinin varlığı kabul edilmiştir (95). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda farklı vücut sıvılarına spesifik mikro RNA belirteçleri bulunmuştur. Birbirinin aynı DNA'ya sahip tek yumurta ikizlerinde bile farklı mikro RNA biyo belirteçlerinin varlığı ispatlanmıştır (96).

Mikro RNA'lar, adlandırma sistemine göre 'miR' kısaltması ile sonrasında gelen, bulunma sırasını ifade eden, numara ile adlandırılır (1). Yıllarca süregelen araştırmalar sonucunda vücut sıvıları için belirlenmiş çeşitli miRNA bölgeleri bulunmaktadır. Biz çalışmamızda en yaygın kullanımı olan miR 203A ve miR 451A belirteçlerini kullandık.

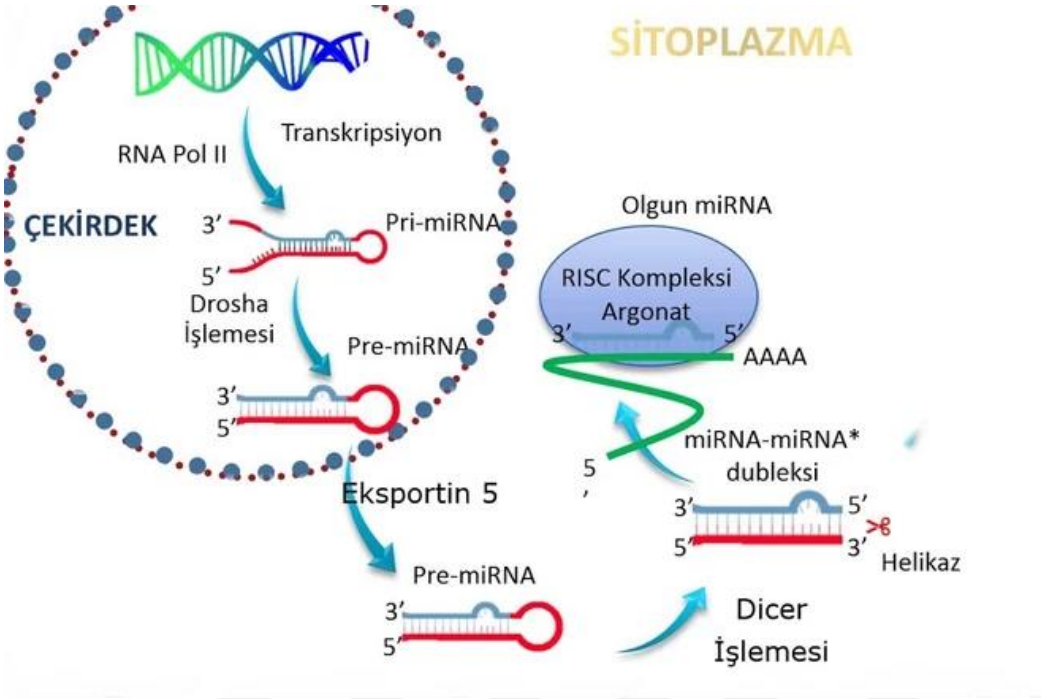
Tablo 1: Vücut sıvılarının tanımlanmasında kullanılan aday miRNA'lar

Vücut Sıvıları	**miRNA Belirteci**
Venöz Kan	❖ miR-451A ❖ miR-144-3p ❖ miR-16 ❖ miR-185 ❖ miR-126 ❖ miR-150 ❖ miR-486 ❖ miR-943 ❖ miR-200b ❖ miR-142-3p

Tükürük	❖ miR-205-5p ❖ miR-203A ❖ miR-658 ❖ miR-142-3p ❖ miR-200c ❖ miR-26b ❖ miR-223

2.6. miRNA Biyogenezi

Mikro RNA'ların oluşumu aşamalı olarak gerçekleşmektedir. Çekirdekte bulunan DNA'dan RNA Polimeraz II enzimi aracılığı ile saç tokası şeklinde tanımlanan öncü miRNA (pri-miRNA) sentezlenir. pri-miRNA'lar mRNA'da olduğu gibi 5' ucunda 7 metil guanozin, 3' ucunda poli adenozin taşır. Bir RNA Polimeraz III (RNaz III) enzimi olan Drosha ile DGCR8 (DiGeorge critical region 8) kompleksi pri-miR'e bağlanır ve *hairpin* yapısını keser. Sonucunda pri-miRNA, 60-70 nükleotitli pre-miRNA'ya dönüşür. Pre-miRNA'lar, bir taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve bir nüklear protein olan RAN-GTP ile sitoplazmaya taşınır. Burada farklı bir RNA Pol III enzimi olan Dicer, bir başka RNaz III enzimi olan, çift iplikli RNA'ya bağlanan TRBP (TAR RNA bağlayan protein) ile ya da polimeraz zincir reaksiyonunu aktive eden PACT ile oluşturduğu kompleksle pre-miRNA'yı parçalar; çift zincirli, 18-24 nükleotid uzunluğunda miRNA dubleksine dönüştürür. Bir RNaz olan Argonaute (Ago), çift iplikten 5' ucu daha kararlı olan ipliği komplekse katar (kılavuz iplik). Diğer iplik (yolcu iplik) RISC (RNA-Induced Silencing Complex) tarafından sindirilir. miRNA'ya bağlı olan RISC, mRNA'ya 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesinden (UTR) bağlanırsa eksik tamamlama ile translasyonu baskılar; hedef mRNA'nın ORF (açık okuma çerçevesi) bölgesine bağlanırsa Argonaute ile yıkım gerçekleşir (97).



Şekil 6: miRNA biyogenezi. (https://www.youtube.com/watch?v=cvAymw1xKKQ adresinden 2022 yılında erişildi.)

3. Gereç ve Yöntem

3.1.Çalışma Grubu ve Örnek Hazırlama

Çalışmaya gönüllü, 18 yaş üstü kadın ve erkeklerin katılmasına izin verildi. Çalışmaya 4 kadın ve 4 erkek katıldı. Karışım sayısı 36 örnek olacak şekilde yürütülen bu çalışmada kişilerden kan ve tükürük örnekleri toplandı. Kan örneği venöz yoldan 5 ml, tükürük örneği seçilmiş uygun kaba tükürme sureti ile alınıp ayrı ayrı uygun steril kaplarda toplandı. Örnekler çalışma zamanına kadar +4 °C'de bekletildi. Sonrasında toplanan vücut sıvılarından olası bir olay yerinde karşılaşılabilecek karışım örnekleri hazırlandı. Karışımlar iki donörlü karışımlar olarak modelleme yöntemiyle hazırlandı, her bir karışımın 1/1, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 oranlarında örnekleri hazırlandı. Karışım örnekleri Kadın Kan-Kadın Tükürük, Kadın Tükürük-Erkek Kan, Erkek Tükürük-Kadın Kan, Erkek Kan-Erkek Tükürük birlikteliğinde olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 2: GRUP 1 için uygulanan yöntem

	ÖRNEK NO	KADIN KAN (ul)	KADIN TÜKÜRÜK	TOPLAM	KARIŞIM	KARIŞIM ORANI
GRUP 1	örnek 1	250	250	500	K-Tük x K-Kan	1 x 1
	örnek 5	500	50	550	K-Tük x K-Kan	1 x 10
	örnek 6	50	500	550	K-Kan x K-Tük	1 x 10
	örnek 13	500	25	525	K-Tük x K-Kan	1 x 20
	örnek 14	25	500	525	K-Kan x K-Tük	1 x 20
	örnek 21	500	10	510	K-Tük x K-Kan	1 x 50
	örnek 22	10	500	510	K-Kan x K-Tük	1 x 50
	örnek 29	500	5	505	K-Tük x K-Kan	1 x 100
	örnek 30	5	500	505	K-Kan x K-Tük	1 x 100

Tablo 3: GRUP 2 için uygulanan yöntem

	ÖRNEK NO	ERKEK KAN	ERKEK TÜKÜRÜK	TOPLAM	KARIŞIM	KARIŞIM ORANI
GRUP 2	örnek 2	250	250	500	E-Tük x E-Kan	1 x 1
	örnek 7	500	50	550	E-Tük x E-Kan	1 x 10
	örnek 8	50	500	550	E-Kan x E-Tük	1 x 10
	örnek 15	500	25	525	E-Tük x E-Kan	1 x 20
	örnek 16	25	500	525	E-Kan x E-Tük	1 x 20
	örnek 23	500	10	510	E-Tük x E-Kan	1 x 50
	örnek 24	10	500	510	E-Kan x E-Tük	1 x 50
	örnek 31	500	5	505	E-Tük x E-Kan	1 x 100
	örnek 32	5	500	505	E-Kan x E-Tük	1 x 100

Tablo 4: GRUP 3 için uygulanan yöntem

	ÖRNEK NO	KADIN TÜKÜRÜK	ERKEK KAN	TOPLAM	KARIŞIM	KARIŞIM ORANI
GRUP 3	örnek 3	250	250	500	K-Tük x E-Kan	1 x 1
	örnek 9	50	500	550	K-Tük x E-Kan	1 x 10
	örnek 10	500	50	550	E-Kan x K-Tük	1 x 10
	örnek 17	25	500	525	K-Tük x E-Kan	1 x 20
	örnek 18	500	25	525	E-Kan x K-Tük	1 x 20
	örnek 25	10	500	510	K-Tük x E-Kan	1 x 50
	örnek 26	500	10	510	E-Kan x K-Tük	1 x 50
	örnek 33	5	500	505	K-Tük x E-Kan	1 x 100
	örnek 34	500	5	505	E-Kan x K-Tük	1 x 100

Tablo 5: GRUP 4 için uygulanan yöntem

	ÖRNEK NO	KADIN KAN (ul)	ERKEK TÜKÜRÜK	TOPLAM	KARIŞIM	KARIŞIM ORANI
GRUP4	örnek 4	250	250	500	E-Tük x K-Kan	1 x 1
	örnek 11	50	500	550	K-Kan x E-Tük	1 x 10
	örnek 12	500	50	550	E-Tük x K-Kan	1 x 10
	örnek 19	25	500	525	K-Kan x E-Tük	1 x 20
	örnek 20	500	25	525	E-Tük x K-Kan	1 x 20
	örnek 27	10	500	510	K-Kan x E-Tük	1 x 50
	örnek 28	500	10	510	E-Tük x K-Kan	1 x 50
	örnek 35	5	500	505	K-Kan x E-Tük	1 x 100
	örnek 36	500	5	505	E-Tük x K-Kan	1 x 100

3.2.Gereçler

3.2.1. Cihazlar

- Biosan DNA/RNA UV Çalışma İzolasyon Kabini
- IMER International SpA Compact Karıştırıcı
- Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) Cihazı
- Hettich Mikro 200 R Mikro Santrifüj 15000 Rpm/30X1.5-2.0 ml Mikrosantrifüj Cihazı
- Eppendorf Zentrifuge 3200 Santrifüj Cihazı

- Buzdolabı
- RT-PCR
- Tüp Vortex Karıştırıcı
- Derin Dondurucu
- Otomatik Pipet Seti

3.3. Kan ve Tükürük Örneklerinde RNA İzolasyonu

1. Hazırlanan 500 µl'lik karışım çözeltileri sırasıyla seramik boncuk içeren kaplara döküldü.
2. Tüplere 1 ml purezol döküldü.
3. Maximum devirde 45 saniye santrifüj edildi.
4. Karışım pembe renk görünümü aldı.
5. Oda ısısında 5 dk bekletildi.
6. Her bir tüpe 200 ul kloroform eklendi.
7. 5 dk beklendi.
8. Bu sayede RNA, DNA ve protein elde edildi.
9. 12.000 g' de, 20 dakika, 4 C ' de santrifüj yapıldı.
10. Santrifüj sonunda 3 adet faz oluşur.

FAZ 1 (Sulu faz): RNA bulundurur, renksizdir.

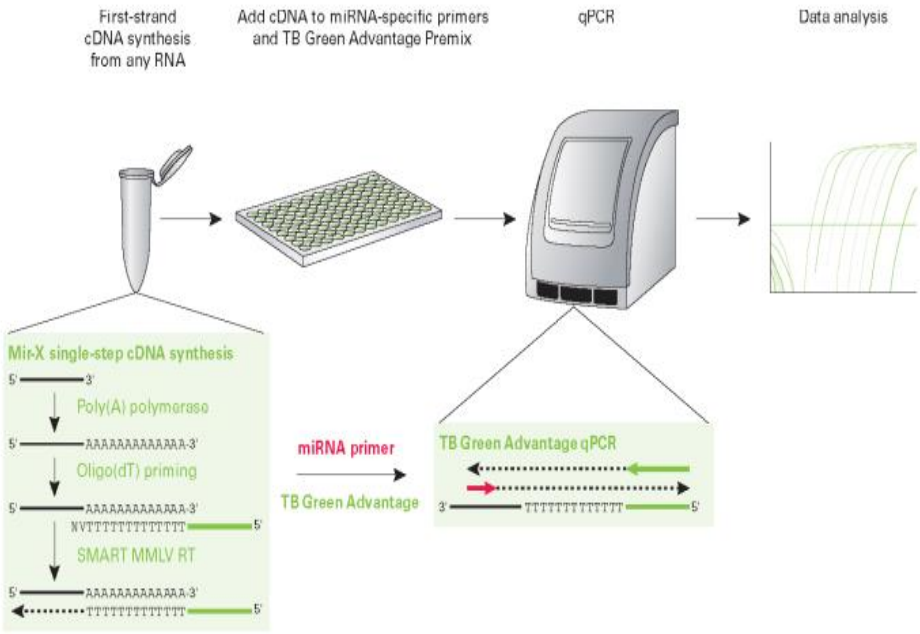
FAZ 2: DNA bulundurur, beyaz renklidir.

FAZ 3 (Organik faz): Protein bulundurur, kırmızı renktedir.

11. RNA izolasyonu yapıldığı için 1. tüpe aktarım yapıldı,
12. Farklı tüpe 500 ul izopropanol eklendi ve 10 dakika inkübeye bırakıldı.
13. 12.000 g' de, 10 dk, 4 C ' de santrifüjlendi.
14. Süpernatantlar atıldı.
15. Gözlenen çökelek oluşumuna 1 ml %75 EtOH eklendi.
16. 7.500 x g' de, 5 dk, 4 C'de santrifüjlendi.
17. Süpernatant atıldı.
18. 57 C' de EtOH uçuruldu.
19. Çökeleğe 50-100 ul RNAse free su eklenerek pipetaj yapıldı.

3.4.cDNA Eldesi

1. qPCR ile analiz etmek istediğimiz her RNA örneği için bir cDNA sentez reaksiyonu hazırlandı.
2. Bilinen bir sentetik miRNA konsantrasyonundan hazırlanan seyreltmelerden cDNA elde etmek için RNAaz içermeyen 0,2 ml'lik bir tüpte toplam hacim 10 olacak şekilde RNA, mRQ tamponu, mRQ enzimi eklendi.
3. Tüp 1 saat 37°C'de inkübe edildi, 85°C'de 5 saat inkübe edildi ve sonlandırıldı.
4. Total hacmin 100 µl olması için 90 µl ddH2O eklendi.
5. cDNA eldesi sağlandı.



Şekil 6: cDNA elde edilme sırası.

3.5.Yöntem

Örnekler ilk olarak santrifüjlendi ve ardından miRNeasy Mini Kit kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre ile tayin edildi. Sonrasında Taqman microRNA Reverse Transcription Kit ile RNA'lardan cDNA (tamamlayıcı DNA) sentezlendi, analiz için Real Time PCR tercih edildi. Karışımlardan kimliklendirme yapabilmek için vücut sıvısına özgü miRNA biyo belirteçleri miRBase veri tabanı kullanılarak belirlendi. Belirteçlerimiz olan miR-451-A ve miR-203A-3p için Reverse primerler universal olup kit içerisinde bulunmaktadır. Forward primer dizileri ise Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: Gen ekspresyon analizi yapılan miRNA'lar için kullanılan primerler

miRNA	Primer dizileri	*miRbase* kodu
hsa-miR-451A	5' AAACCGUUACCAUUACUGAGUU 3'	MIMAT0001631
hsa-mirR-203A-3p	5' GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG 3'	MIMAT0000264

2^- delta delta Ct yöntemi ile U6 referans geni kullanılarak normalizasyon yapıldı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS programı ile T testi kullanılarak yapılmıştır.

4.Bulgular

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Moleküler Genetik Öğrenci Laboratuvarında 2021-2022 yılları arasında yapılmıştır. Çalışmaya, gönüllü, on sekiz yaş üstü kadın ve erkekler dahil edilmiştir. Donörlerden kan ve tükürük örneği alınmıştır. Örnekler +4 derecede buzdolabında saklanmıştır. Donörlerden alınan örneklerden kan-tükürük olacak şekilde karışım örnekleri hazırlanmıştır. Karışım örnekleri kadın-kadın, kadın-erkek, erkek-erkek olarak gerçekleştirilmiştir. Karışımlar olası durumlar göz önüne alınarak 1/1, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 oranlarında yapılmıştır. Toplam 36 örnek iki donörlü olacak şekilde oluşturulmuştur.

Bu çalışmada seçili miRNA bölgelerinin ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. Bu çalışma için kan ve tükürük örneklerinde, kadın ve erkek donörler kullanılarak miRNA 203A-3p ve miRNA 451A biyo belirteçleri ekspresyon seviyeleri ölçülmeye çalışılmıştır. Karışım örneklerinin ayrımının yapılabilir olması hedeflenmiştir. Farklı oranlarda karıştırılan örnekler RT-PCR kullanılarak analizlenmiştir. Aşağıda, oluşturulan gruplar verilmiştir.

GRUP 1:Kadın KanxKadın Tükürük Karışımı (K-Kan x K-Tük),

GRUP 2:Erkek KanxErkek Tükürük Karışımı (E-Kan x E-Tük),

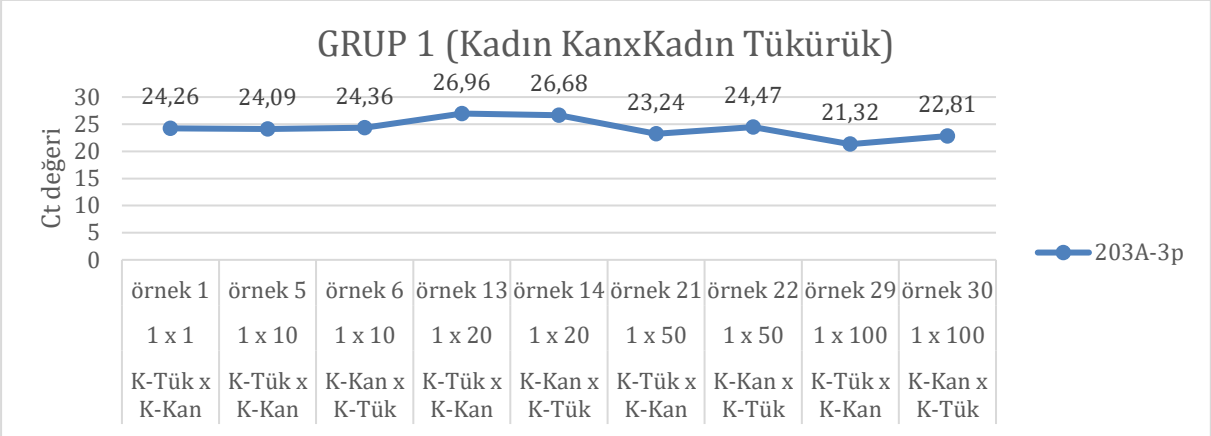
GRUP 3:Kadın TükürükxErkek Kan Karışımı (K-Tük x E-Kan),

GRUP 4:Erkek TükürükxKadın Kan Karışımı (E-Tük x K-Kan) olarak hazırlanmıştır.

Karışımlar, 1/1 oranı için 250x250, 1/10 oranı için 500x50, 1/20 oranı için 500x25, 1/50 oranı için 500x10, 1/100 oranı için 500x5 ul olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

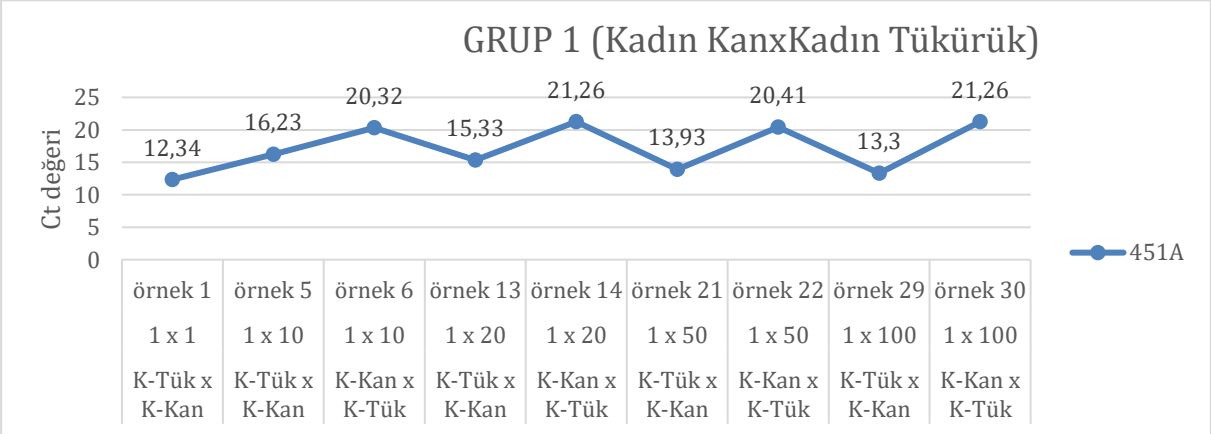
Biyo belirteç olarak Tükürük için hsa-miR-203A-3p, Periferik Kan için hsa-miR-451A biyo belirteç kullanımının uygunluğunu analiz edebilmek için tüm karışımlar kan ve tükürük içeren

karışımlar olarak hazırlanmıştır. Örneklerde, hsa-miR-203A-3p ve hsa-miR-451A belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür.



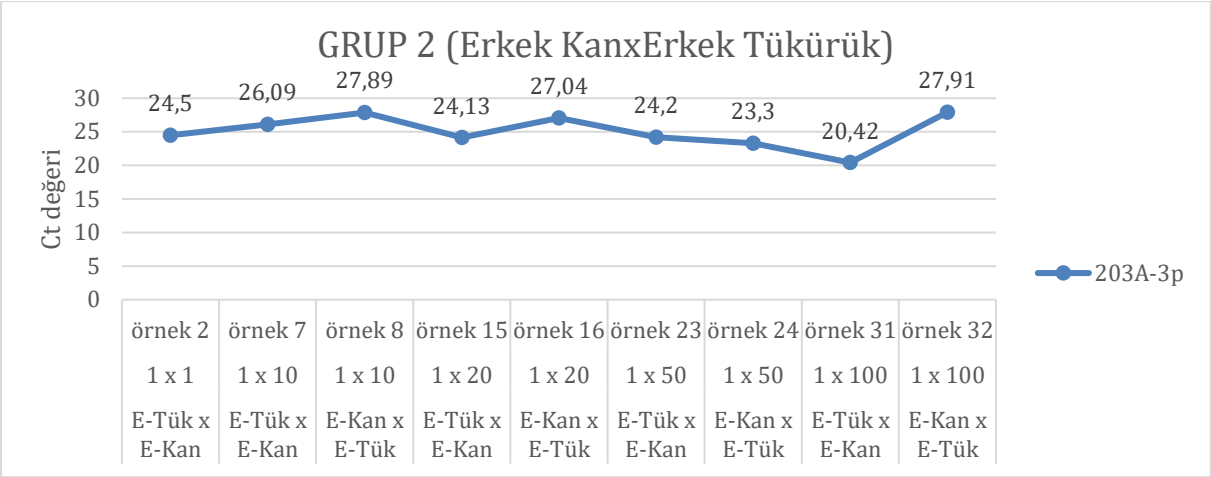
Grafik 1: Grup 1 için miR-203A-3p ekspresyon seviyeleri

Grup 1 örneklerinde gözlenen 203A-3p ekspresyon seviyeleri anlamlı bulunmamıştır.



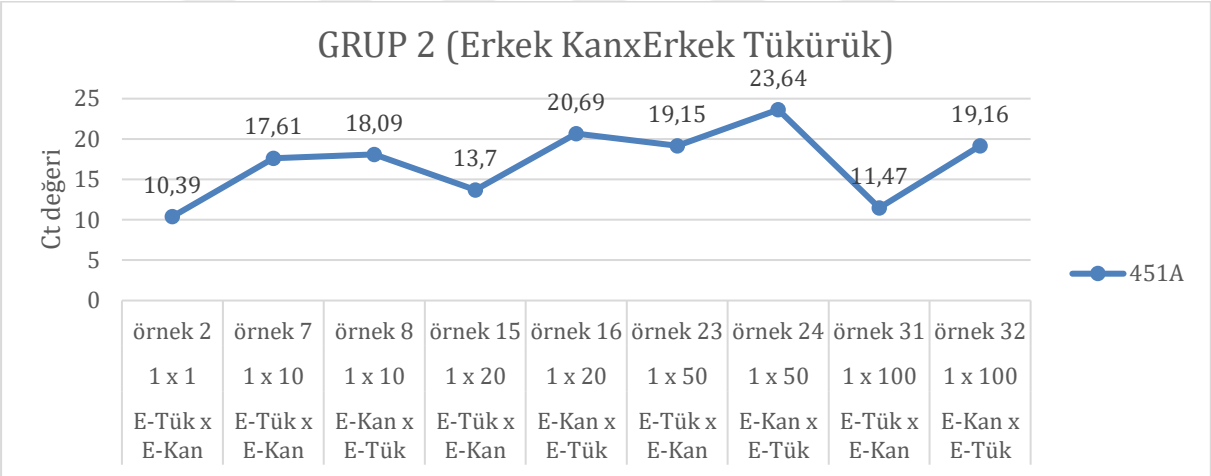
Grafik 2: Grup 1 için miR-451A ekspresyon seviyeleri

Grup 1 örneklerinde ölçülen 451A ekspresyon seviyeleri anlamlı bulunmuştur.



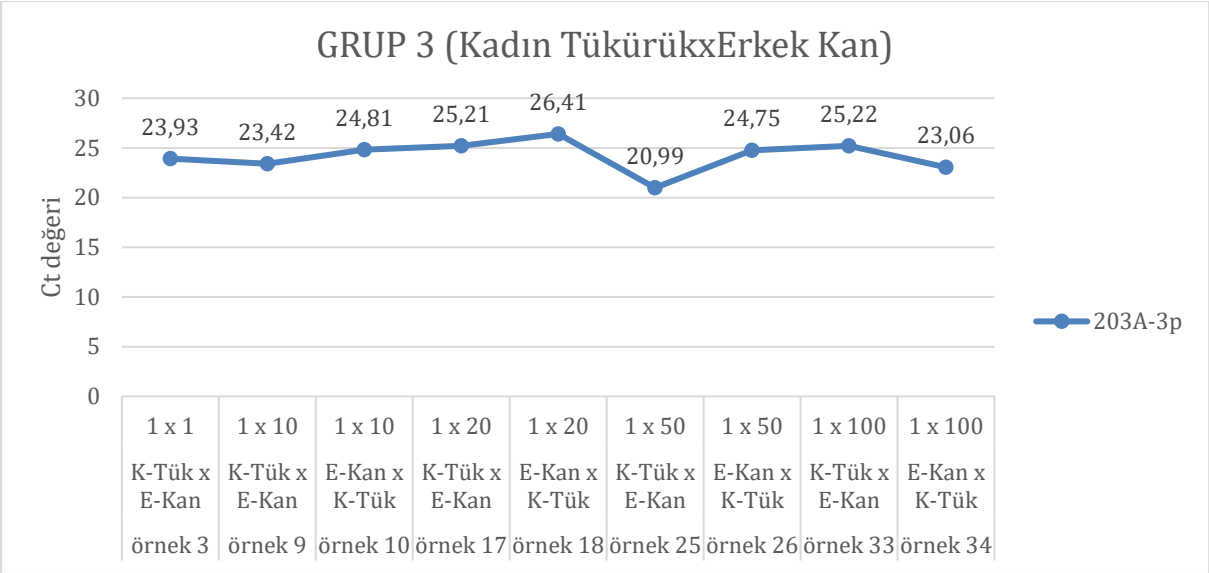
Grafik 3: Grup 2 için miR-203A-3p ekspresyon seviyeleri

Grup 2 örneklerinde ölçülen 203A-3p ekspresyon seviyeleri anlamlı bulunmamıştır.



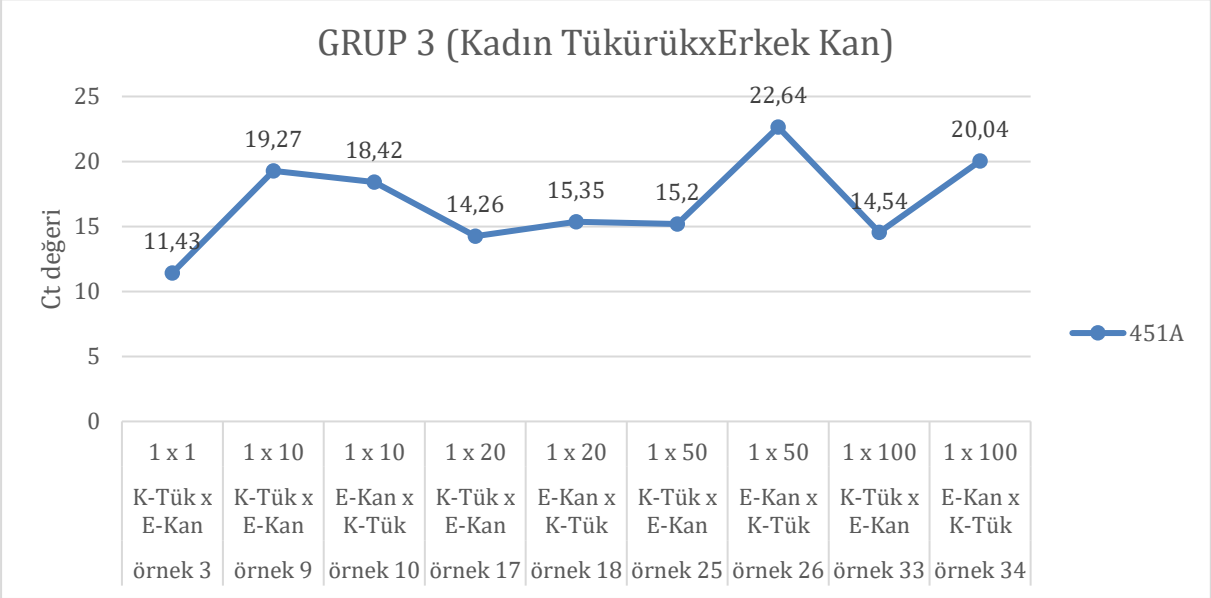
Grafik 4: Grup 2 için miR-403A ekspresyon seviyeleri

Grup 2 örneklerinde ölçülen 403A ekspresyon seviyeleri anlamlı bulunmuştur.



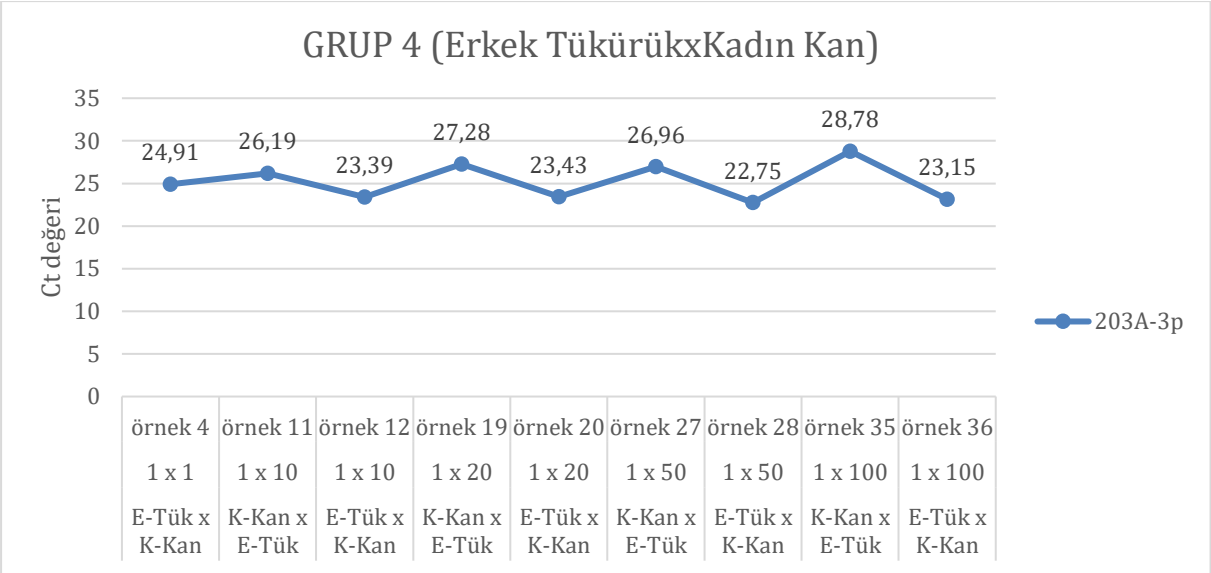
Grafik 5: Grup 3 için miR-203A-3p ekspresyon seviyeleri

Grup 3 örneklerinde ölçülen 203A-3p ekspresyon seviyeleri anlamlı bulunmamıştır.



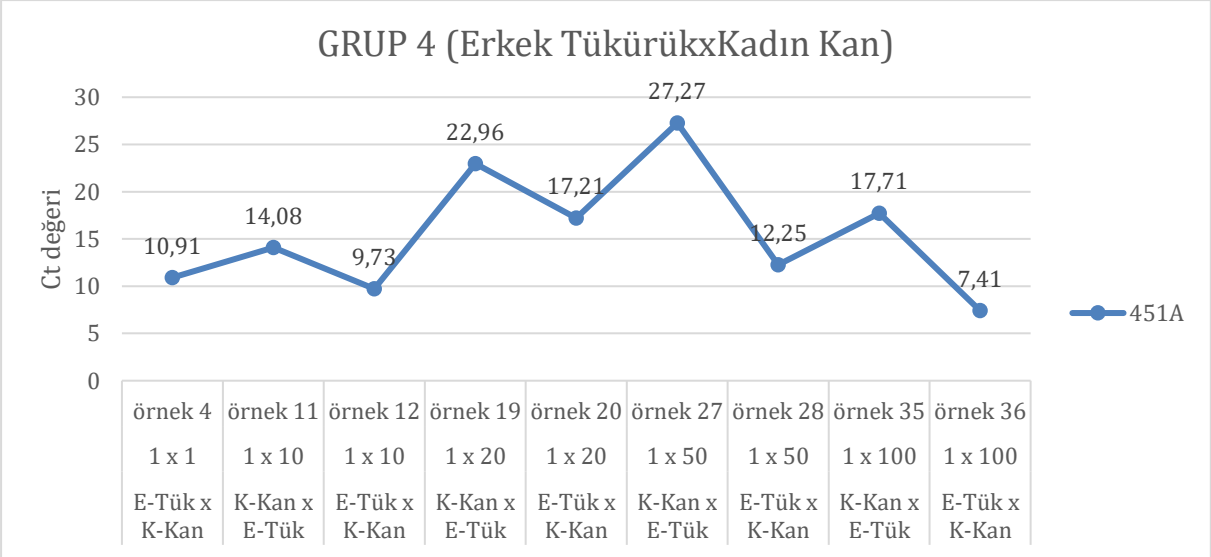
Grafik 6: Grup 3 için miR-451A ekspresyon seviyeleri

Grup 3 için ölçülen 451A ekspresyon seviyeleri anlamlı bulunmuştur.



Grafik 7: Grup 4 için miR-203A-3p ekspresyon seviyeleri

Grup 4 için ölçülen 203A-3p ekspresyon seviyeleri anlamlı bulunmamıştır.

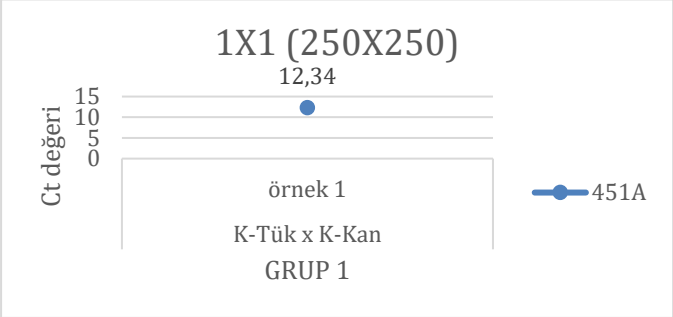


Grafik 8: Grup 4 için miR-451A ekspresyon seviyeleri

Grup 4 için ölçülen 451A ekspresyon seviyeleri anlamlı bulunmuştur.

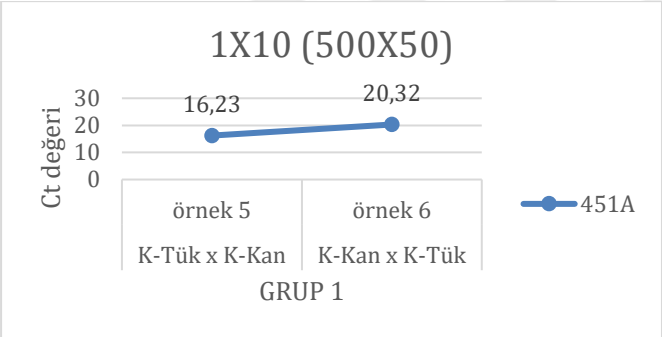
4.1.Gruplarda Oranlara Göre Elde Edilen hsa-miR-451A Ekspresyon Seviyeleri

4.1.1. GRUP 1 (Kadın Kan-Kadın Tükürük)



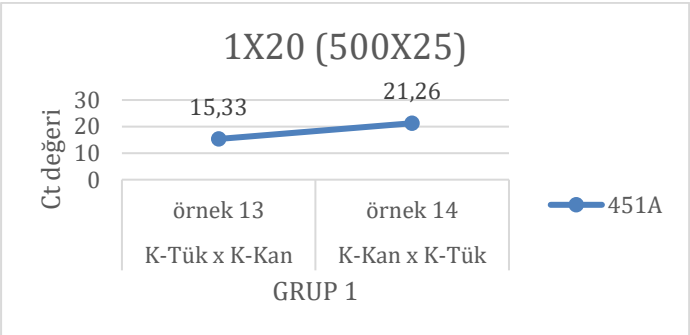
Grafik 9: 1x1 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x1 dilüsyonlu karışımda kandan eksprese edilen miR-451A değeri 12,34 olarak ölçülmüştür (Tablo IX).



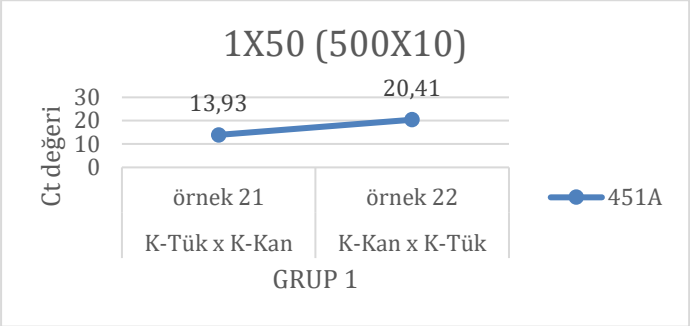
Grafik 10: 1x10 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x10 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 5'teki ekspresyon oranı 16,23 iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 6'da 20,32 olarak ölçülmüştür.



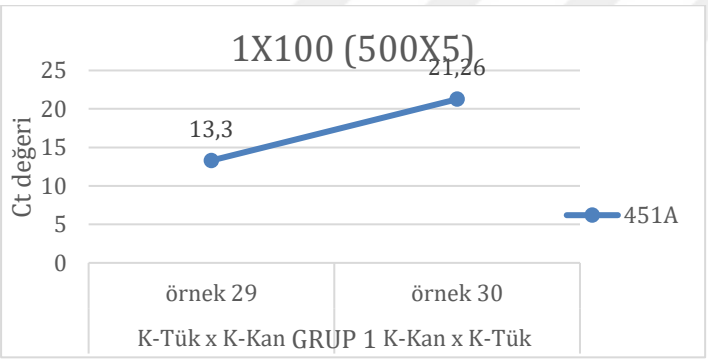
Grafik 11: 1x20 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x20 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 13'te ekspresyon seviyesi 15,33 iken, tükürük örneğinin yoğun olduğu örnek 14'te 21,26 olarak ölçülmüştür.



Grafik 12: 1x50 oranı ekspresyon seviyesi

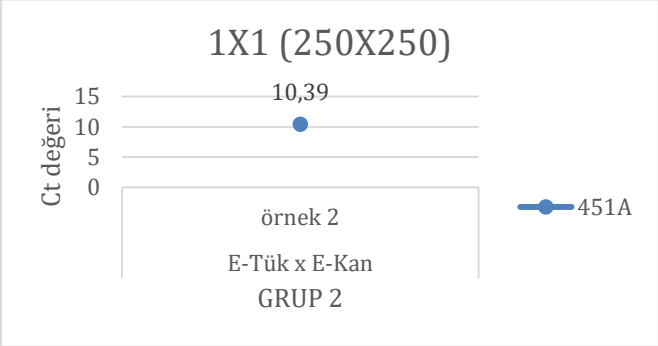
Hazırlanan 1x50 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 21'de ölçülen ekspresyon seviyesi 13,93 iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 22'de 20, 41 olarak ölçülmüştür.



Grafik 13: 1x100 oranı ekspresyon seviyesi

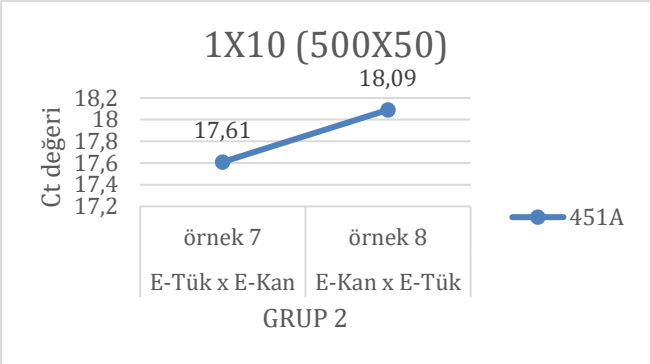
Hazırlanan 1x100 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 29'da ekspresyon seviyesi 13,3 iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 30'da 21,26 olarak ölçülmüştür.

4.1.2. GRUP 2 (Erkek Kan-Erkek Tükürük)



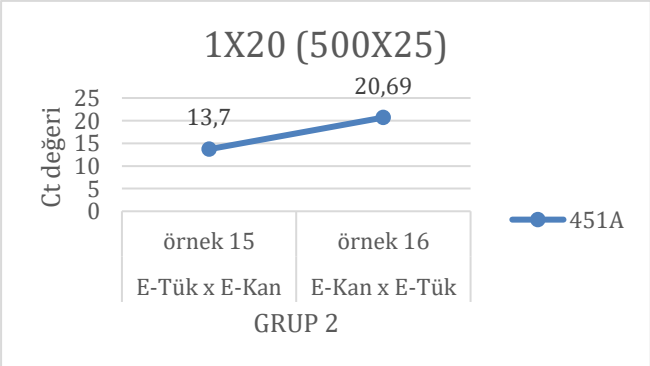
Grafik 14: 1x1 oranı ekspresyon seviyesi

GRUP 2 için hazırlanan 1x1 dilüsyonunda, örnek 2'de 10,39 değerinde miR-451A eksprese edilmiştir.



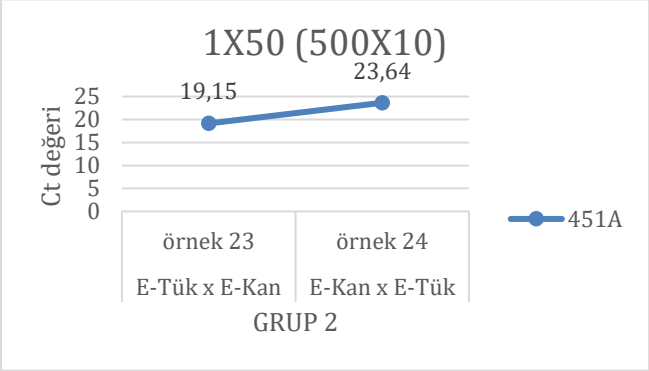
Grafik 15: 1x10 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x10 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 7'de ekspresyon seviyesi 17,61 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 8'de 18,09 olarak ölçülmüştür.



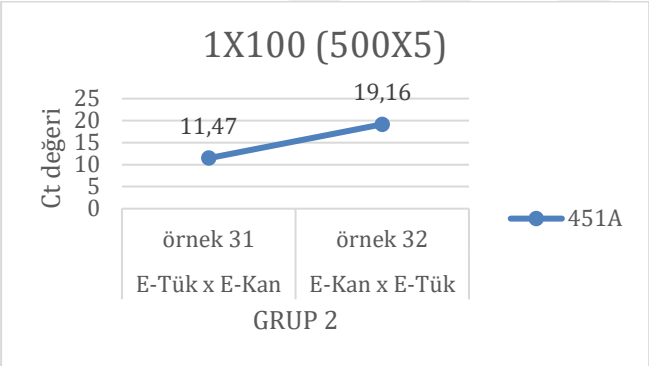
Grafik 16: 1x20 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x20 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 15'te ekspresyon 13,7 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 16'da 20,69 olarak ölçülmüştür.



Grafik 17: 1x50 oranı ekspresyon seviyesi

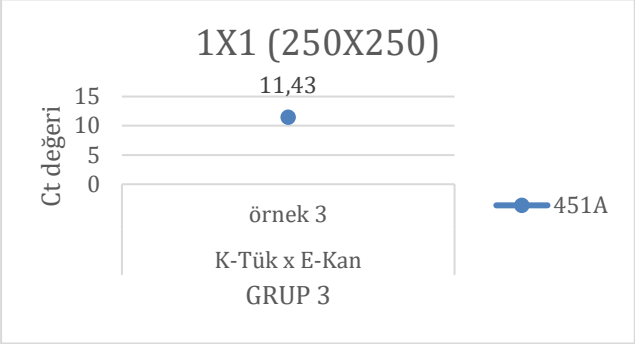
Hazırlanan 1x50 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 23'te ekspresyon seviyesi 19,15 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 24'te 23,64 olarak ölçülmüştür.



Grafik 18: 1x100 oranı ekspresyon seviyesi

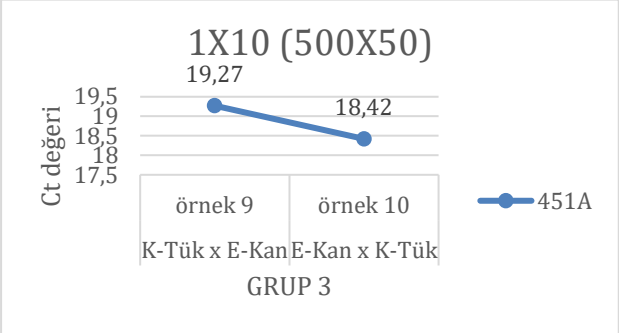
Hazırlanan 1x100 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 31'de ekspresyon seviyesi 11,47 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 32'de 19,16 olarak ölçülmüştür.

4.1.3. GRUP 3 (Kadın Tükürük-Erkek Kan)



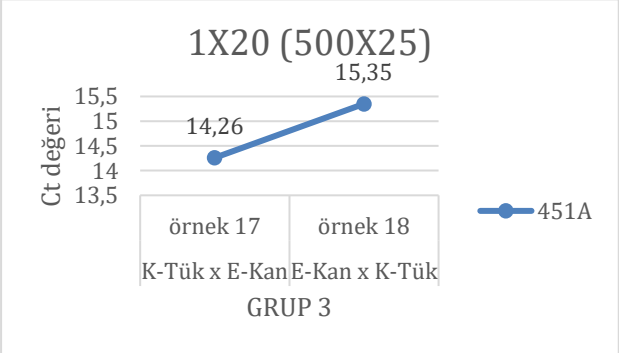
Grafik 19: 1x1 oranı ekspresyon seviyesi

GRUP 3 için hazırlanan 1x1 dilüsyonunda, örnek 3'te 11,43 seviyesinde ekspresyon tanımlanmıştır.



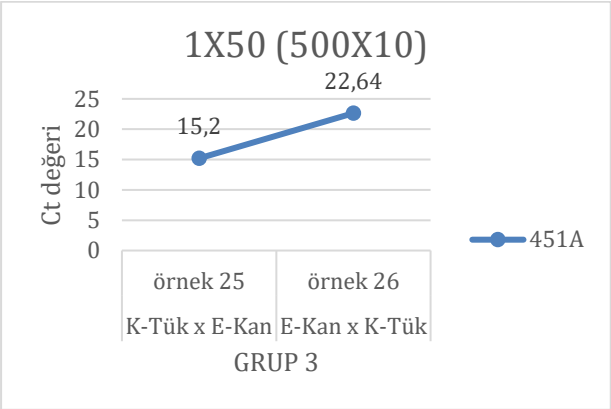
Grafik 20: 1x10 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x10 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 9'da ekspresyon seviyesi 19,27olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 10'da 18,42 olarak ölçülmüştür.



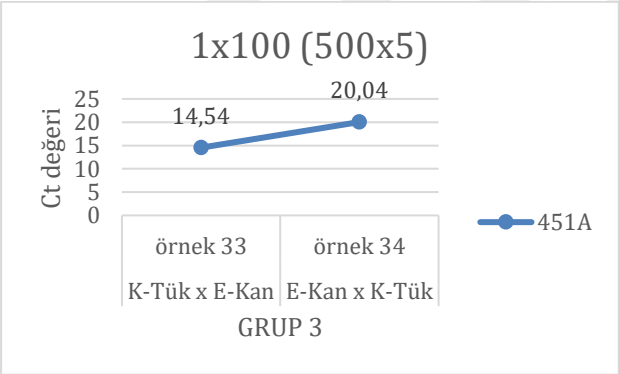
Grafik 21: 1x20 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x20 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 17'de ekspresyon seviyesi 14,26 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 18'de 15,35 olarak ölçülmüştür.



Grafik 22: 1x50 oranı ekspresyon seviyesi

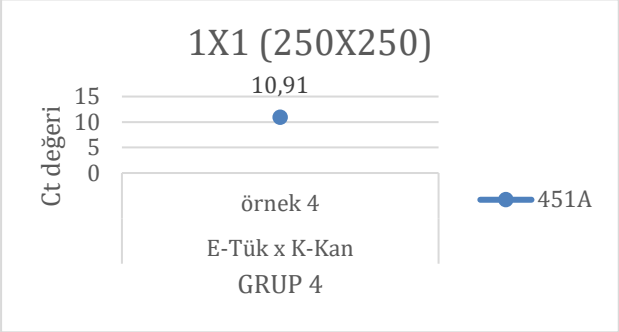
Hazırlanan 1x50 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 25'te ekspresyon seviyesi 15,2 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 26'da 22,64 olarak ölçülmüştür.



Grafik 23: 1x100 oranı ekspresyon seviyesi

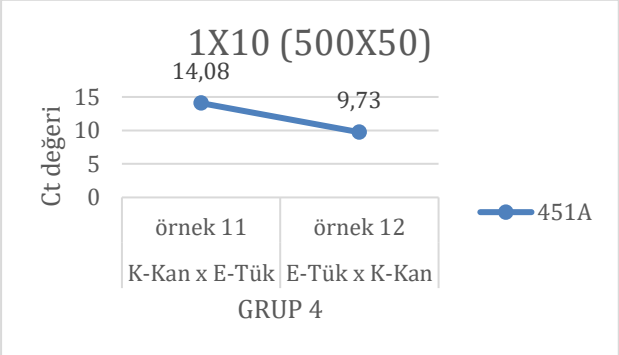
Hazırlanan 1x100 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 33'te ekspresyon seviyesi 14, 54 olaral ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 34'te 20,04 olarak ölçülmüştür.

4.1.4. GRUP 4 (Erkek Tükürük-Kadın Kan)



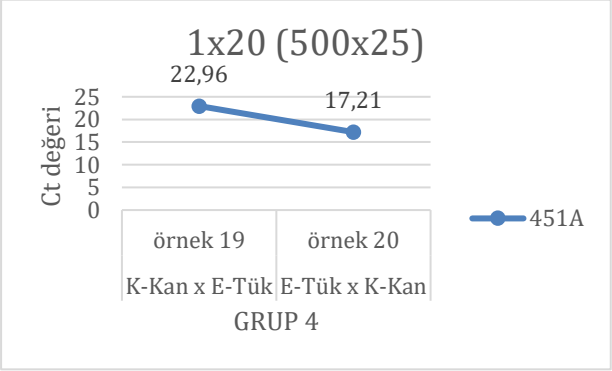
Grafik 24: 1x1 oranı ekspresyon seviyesi

GRUP 4 için hazırlanan 1x1 dilüsyonunda, örnek 4'te 10,91 seviyesinde ekspresyon tanımlanmıştır.



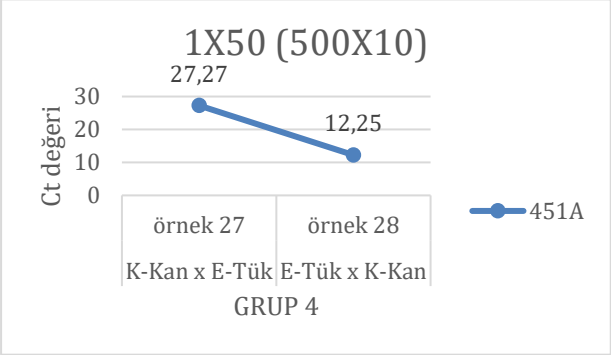
Grafik 25: 1x10 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x10 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 12'de ekspresyon seviyesi 9,73 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 11'de 14,08 olarak ölçülmüştür.



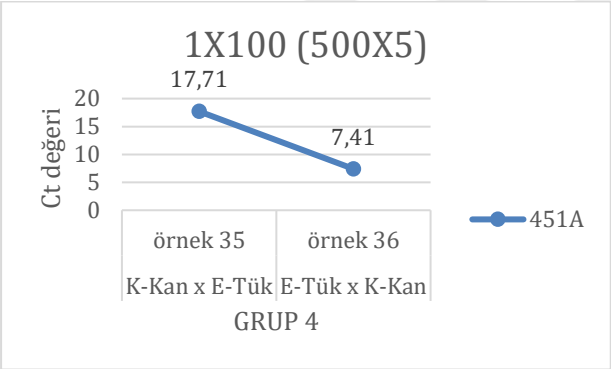
Grafik 26: 1x20 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x20 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 20'de ekspresyon seviyesi 17,21 olarak ölçülür iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 19'da 22,96 olarak ölçülmüştür.



Grafik 27: 1x50 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x50 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 28'in ekspresyon seviyesi 12,25 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğu fazla olan örnek 27'de 27,27 olarak ölçülmüştür.

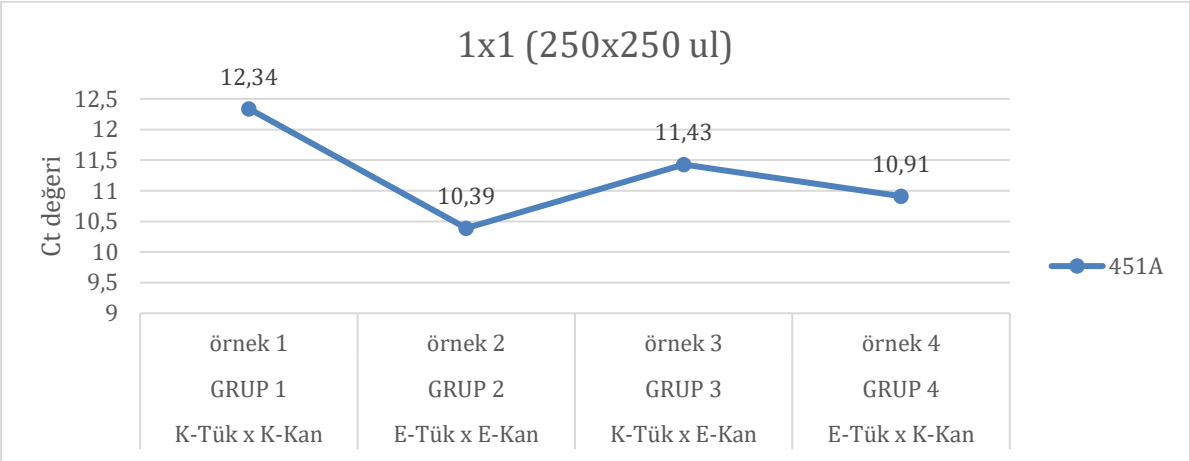


Grafik 28: 1x100 oranı ekspresyon seviyesi

Hazırlanan 1x100 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 36'da ekspresyon seviyesi 7,41 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 35'te 17,71 olarak ölçülmüştür.

4.2. Oranlara Göre hsa-miR-451A Ekspresyon Seviyelerinin Kıyaslanması

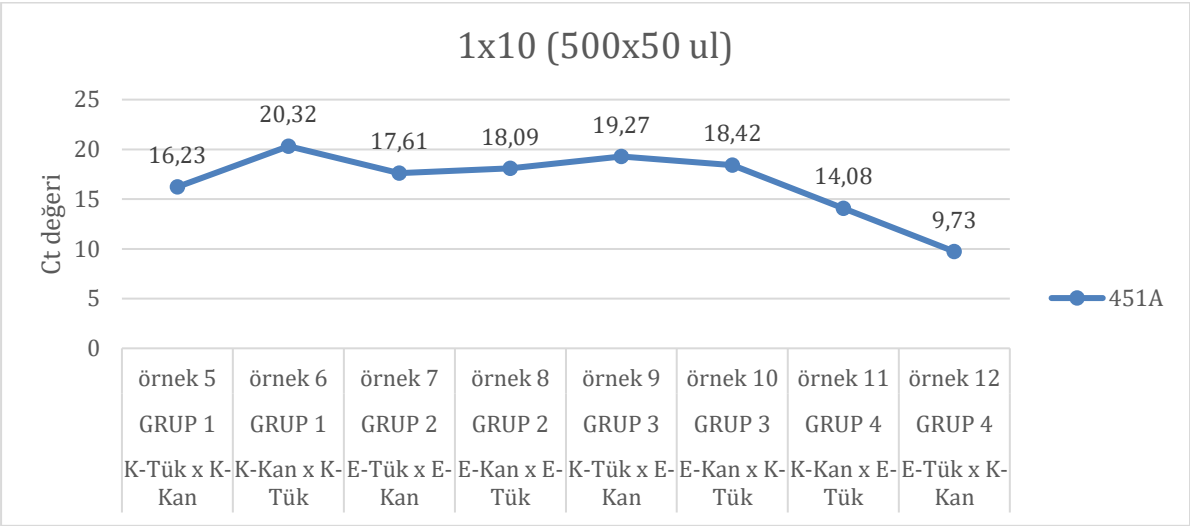
4.2.1. 1x1 (250 ul x 250 ul) oranında hazırlanan karışım örnekleri



Grafik 29: 1x1 (250 ul x 250 ul) oranında hazırlanan tüm karışım örnekleri

Eşit oranda bulunan kan-tükürük karışımlarında sadece erkek bireylerden oluşan (GRUP 2) örnek 2'de 10,39 seviyesinde, kadın ve erkek donörlerden oluşan (GRUP 4) örnek 4'te 10,91 seviyesinde en erken hsa-miR-451A ekspresyonuna rastlanmıştır.

4.2.2. 1x10 (500 ul x 50 ul) oranında hazırlanan karışım örnekleri

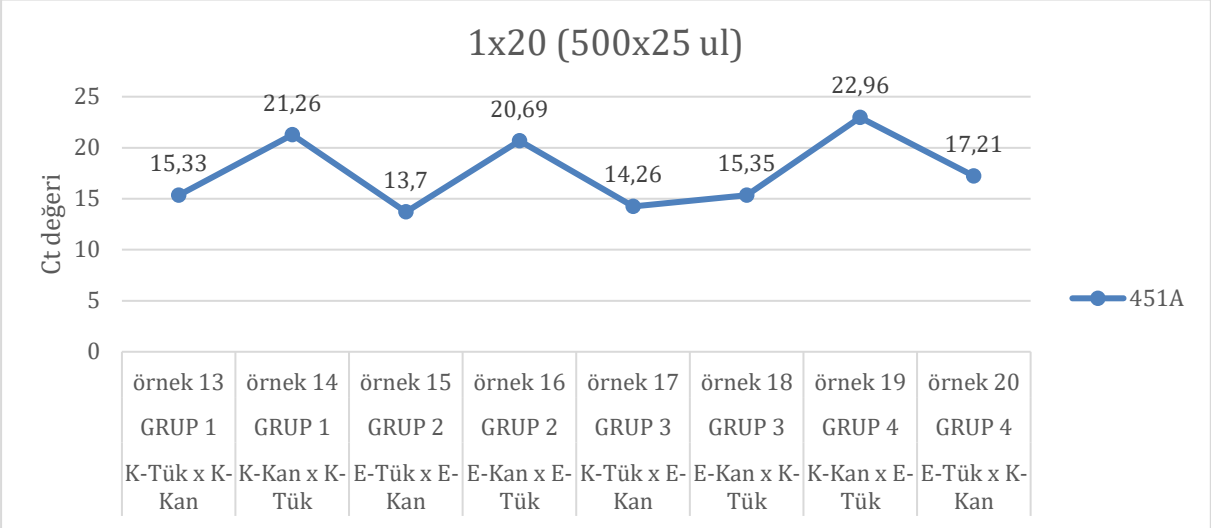


Grafik 30: 1x10 (500 ul x 50 ul) oranında hazırlanan tüm karışım örnekleri

1x10 oranında hazırlanan tüm örnekler incelendiğinde, kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 12, kan yoğunluğunun fazla olduğu diğer örneklere göre (örnek 5, örnek 7, örnek 9) 9,73

seviyesi ile daha erken eksprese olmuştur. En geç bulunan ve ekspresyon seviyesi en yüksek olan karışım örnek 6 olmuştur.

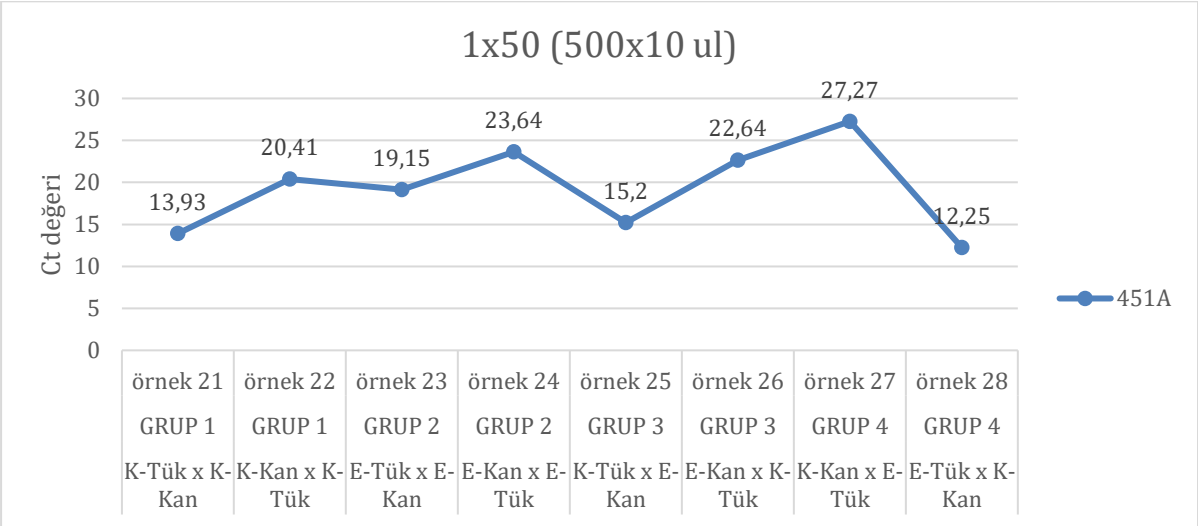
4.2.3. 1x20 (500 ul x 25 ul) Oranında Hazırlanan Karışım Örnekleri



Grafik 31: 1x20 (500 ul x 25 ul) oranında hazırlanan tüm karışım örnekleri

1x20 oranında hazırlanan dilüsyonlarda ekspresyon seviyesi en düşük olup erken tanımlanan örnekler 13,7 ile GRUP 2 ve 14,26 ile GRUP 3 olmuştur. En geç tanımlanıp ekspresyon seviyesi en yüksek olanlar 21,26 ile GRUP 1 ve 22,96 ile GRUP 4 olmuştur.

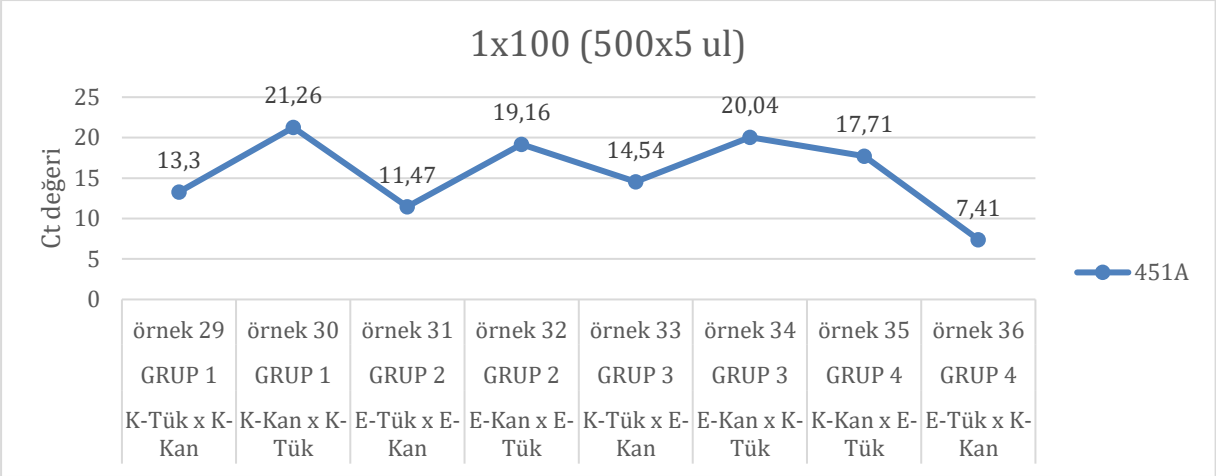
4.2.4. 1x50 (500 ul x 10 ul) oranında hazırlanan karışım örnekleri



Grafik 32: 1x50 (500 ul x 10 ul) oranında hazırlanan tüm karışım örnekleri

1x50 oranında hazırlanan tüm örnekler incelendiğinde, kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 28, kan yoğunluğunun fazla olduğu diğer örneklere göre (örnek 21, örnek 23, örnek 25) 12,25 seviyesi ile daha erken eksprese olmuştur. En geç bulunan ve ekspresyon seviyesi en yüksek olan karışım örnek 24 olmuştur.

4.2.5. 1x100 (500 ul x 5 ul) oranında hazırlanan karışım örnekleri

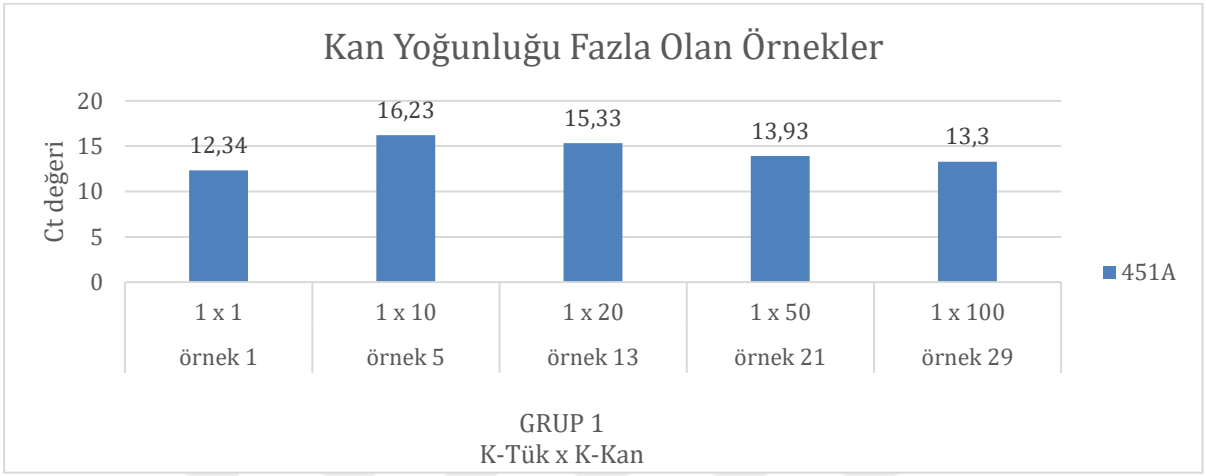


Grafik 33: 1x100 (500 ul x 5 ul) oranında hazırlanan tüm karışım örnekleri

1x100 oranında hazırlanan tüm örnekler incelendiğinde, kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 36, kan yoğunluğunun fazla olduğu diğer örneklere göre (örnek 29, örnek 31, örnek 33) 7,41 seviyesi ile daha erken eksprese olmuştur. En geç bulunan ve ekspresyon seviyesi en yüksek olan karışım örnek 30 olmuştur.

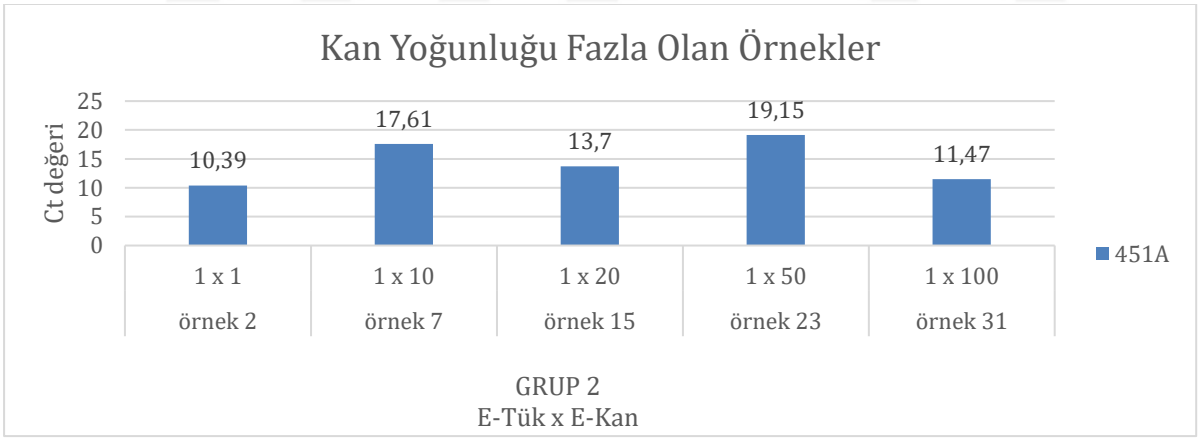
4.3. Farklı Vücut Sıvıları İçin Hazırlanan Farklı Dilüsyonlarda Ölçülen miR-451A Ekspresyonu

4.3.1. Kan



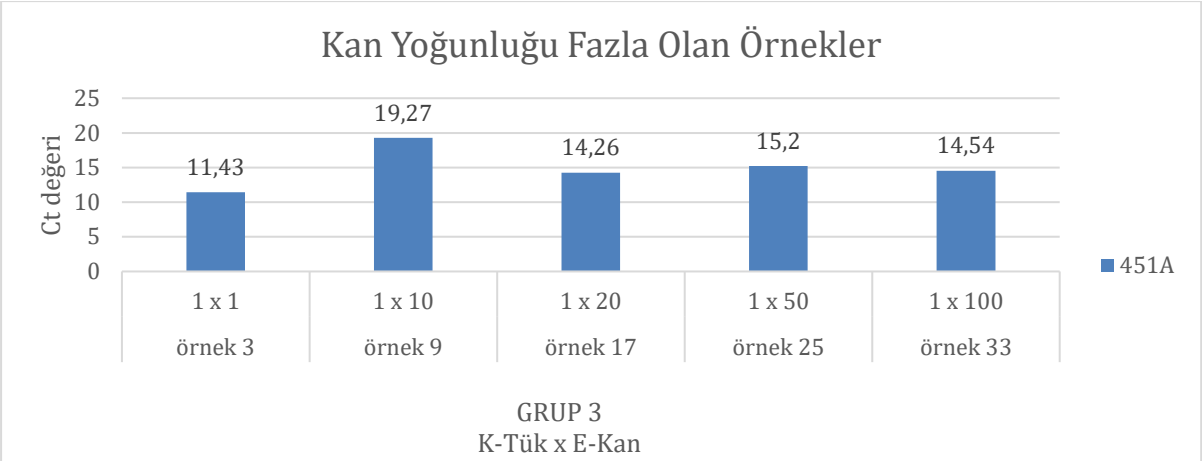
Grafik 34: Grup 1-kan yoğunluğu fazla olan tüm örnekler

Sadece kadın bireylerden oluşan GRUP 1 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x1 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x10 olmuştur.



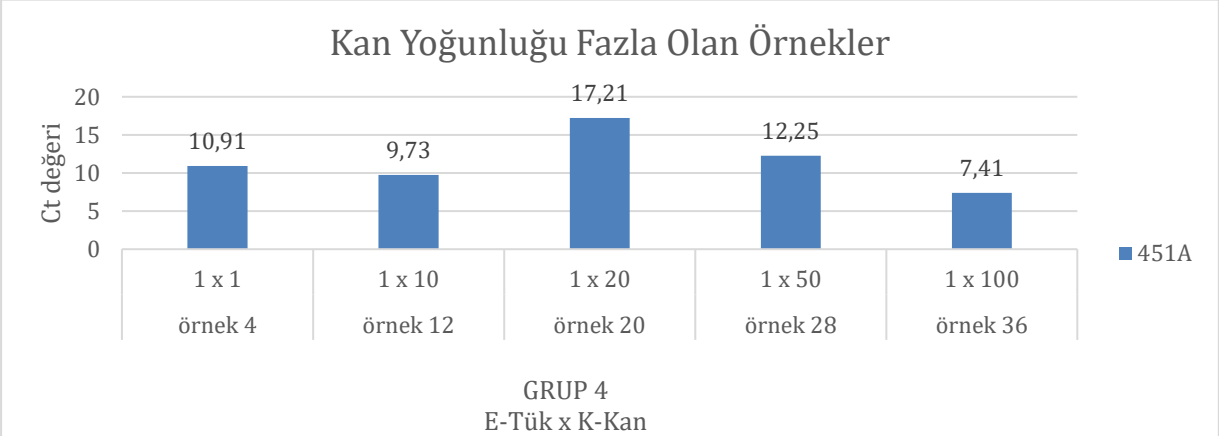
Grafik 35: Grup 2-kan yoğunluğu fazla olan tüm örnekler

Sadece erkek bireylerin oluşturduğu GRUP 2'ye ait karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x1 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x50 olmuştur.



Grafik 36: Grup 3-kan yoğunluğu fazla olan tüm örnekler

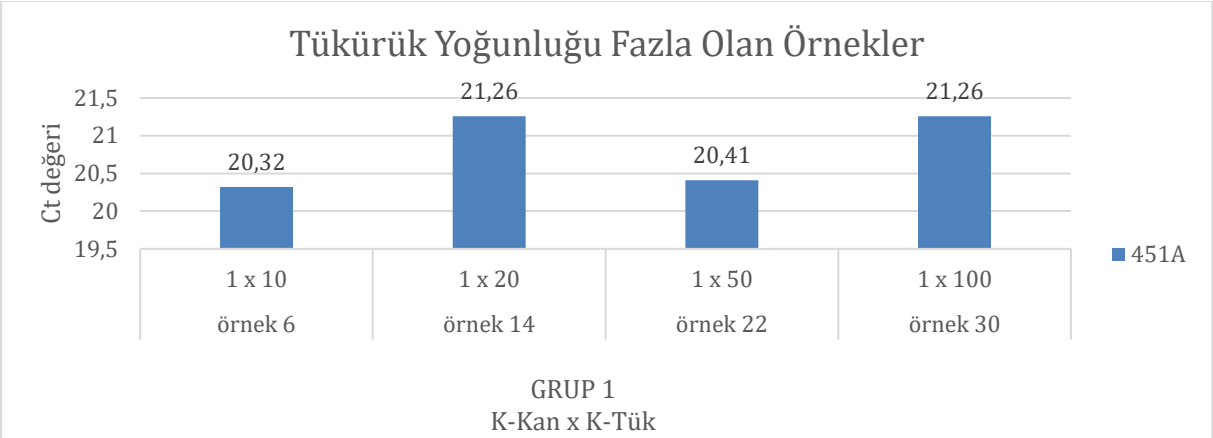
Erkek ve Kadın bireylerin bulunduğu, Erkek kanın yoğunlukta olduğu GRUP 3 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x1 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x10 olmuştur.



Grafik 37: Grup 4-kan yoğunluğu fazla olan tüm örnekler

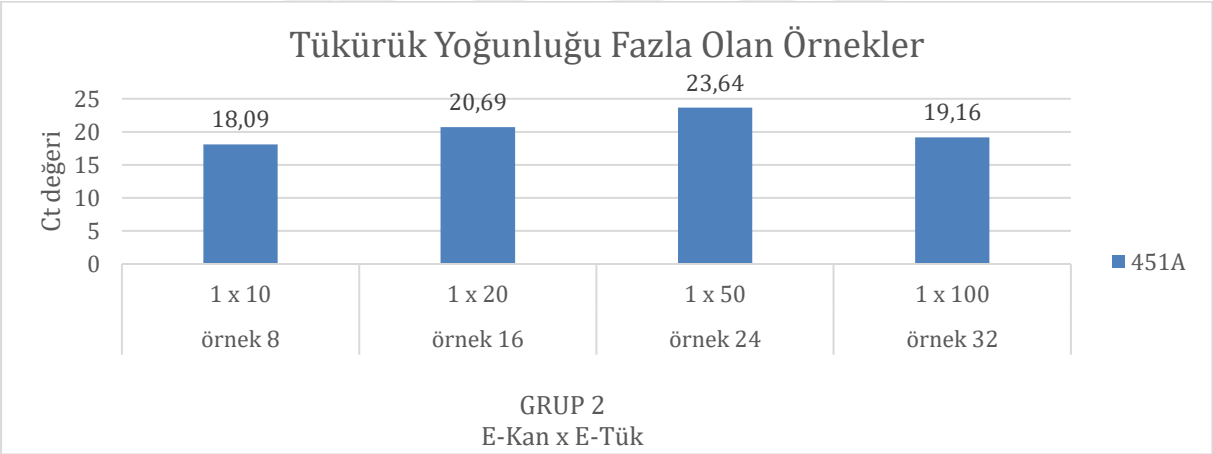
Erkek ve Kadın bireylerin bulunduğu, Kadın kanın yoğunlukta olduğu GRUP 4 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x100 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x20 olmuştur.

4.3.2. Tükürük



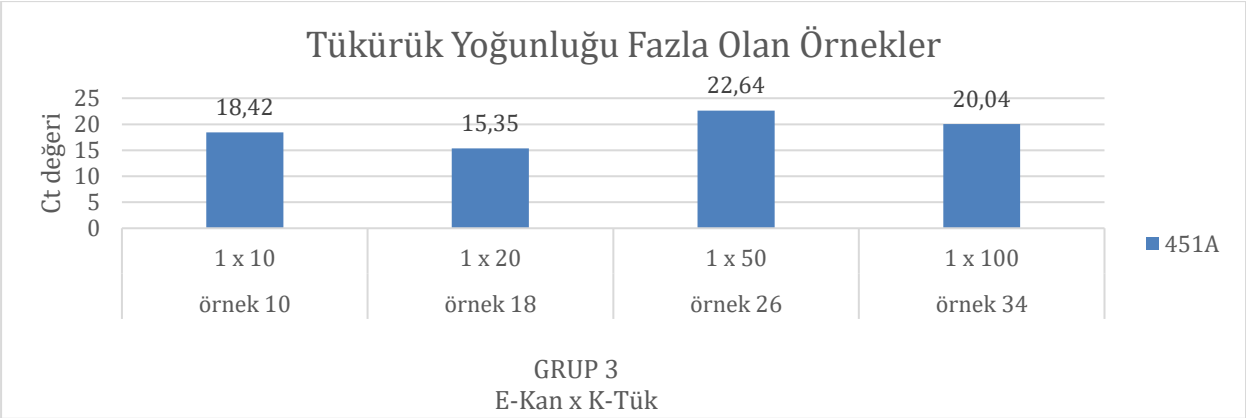
Grafik 38: Grup 1-tükürük yoğunluğu fazla olan tüm örnekler

Sadece kadın bireylerden oluşan GRUP 1 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x10 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x20 ve 1x100 olmuştur.



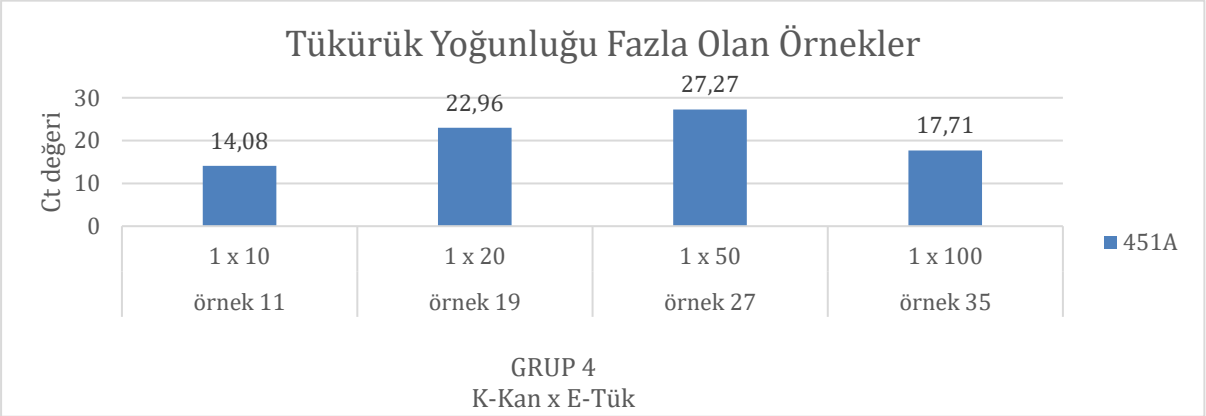
Grafik 39: Grup 2-tükürük yoğunluğu fazla olan tüm örnekler

Sadece erkek bireylerin oluşturduğu GRUP 2'ye ait karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x10 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x50 olmuştur.



Grafik 40: Grup 3-tükürük yoğunluğu fazla olan tüm örnekler

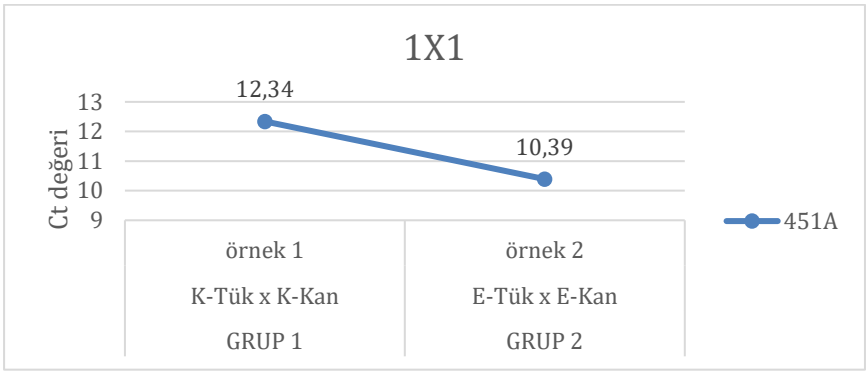
Erkek ve Kadın bireylerin bulunduğu, Kadın tükürüğünün yoğunlukta olduğu GRUP 3 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x20 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x50 olmuştur.



Grafik 41: Grup 4-tükürük yoğunluğu fazla olan tüm örnekler

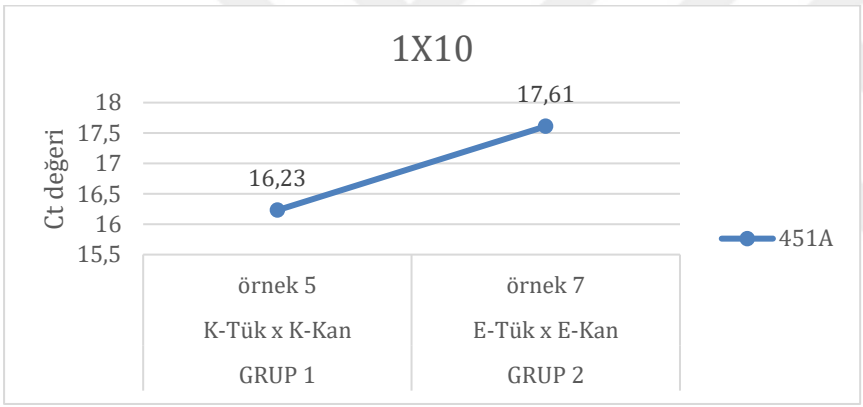
Erkek ve Kadın bireylerin bulunduğu, Erkek tükürük yoğunlukta olduğu GRUP 4 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x10 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x50 olmuştur.

4.4. Cinsiyete Göre hsa-miR-451A Ekspresyon Seviyesi



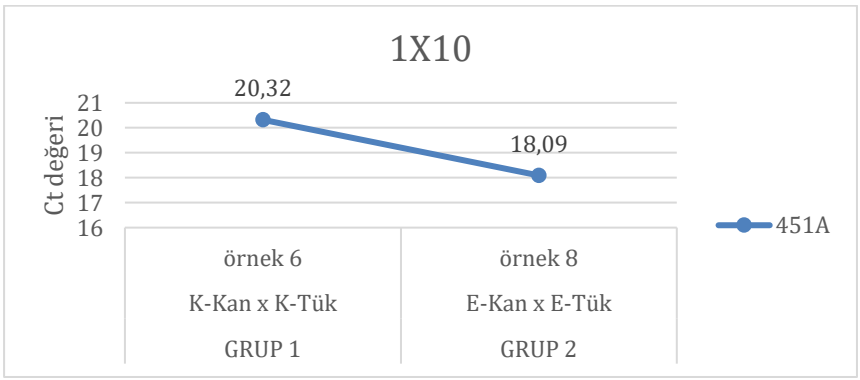
Grafik 42: 1x1 oranında Kadın Kanı ve Erkek Kanı ekspresyonu

1x1 oranında hazırlanan örnek 1 ve örnek 2' ye bakıldığında, Erkek bireylerden oluşan karışım örneği Kadın bireylerden oluşan karışım örneğinden daha erken eksprese olmuştur.



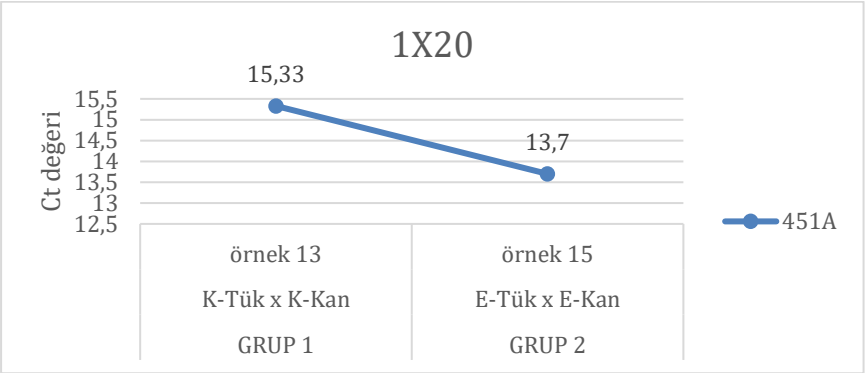
Grafik 43: 1x10 oranında Kadın Kanı ve Erkek Kanı ekspresyonu

Örnek 5 ve örnek 7, 1x10 oranında (500 ul x 50 ul) hazırlananmıştır. 451A ekspresyonu, Kadın karışımının olduğu örnek 5'te daha erken eksprese olmuştur.



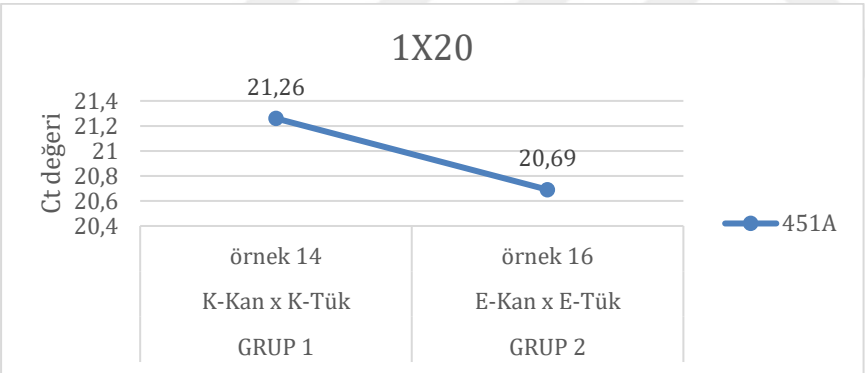
Grafik 44: 1x10 oranında Kadın Tükürük ve Erkek Tükürük ekspresyonu

Örnek 6 ve örnek 8, 1x10 oranında (500 ul x 50 ul) hazırlananmıştır. Erkek bireylerden oluşan karışım örnek 8, kadın bireylerden oluşan karışım örnek 6'ya göre daha erken eskprese olmuştur.



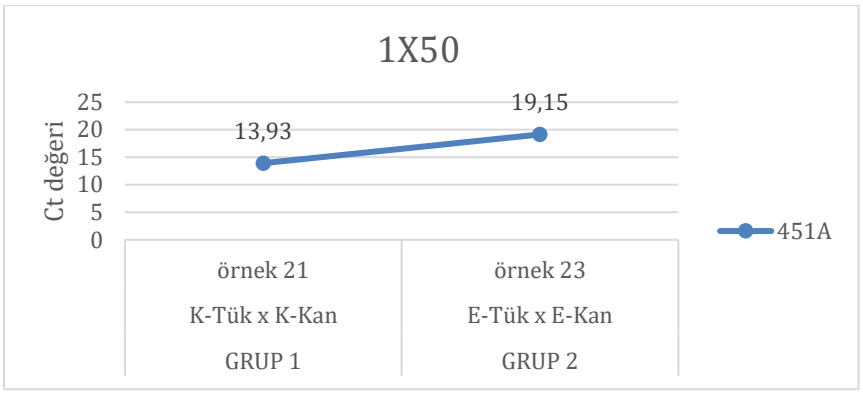
Grafik 45: 1x20 oranında Kadın Kanı ve Erkek Kanı ekspresyonu

Örnek 13 ve örnek 15, 1x20 oranında (500 ul x 25 ul) hazırlananmıştır. Erkek bireylerden oluşan karışım örnek 15, kadın bireylerden oluşan karışım örnek 13'e göre daha erken eskprese olmuştur.



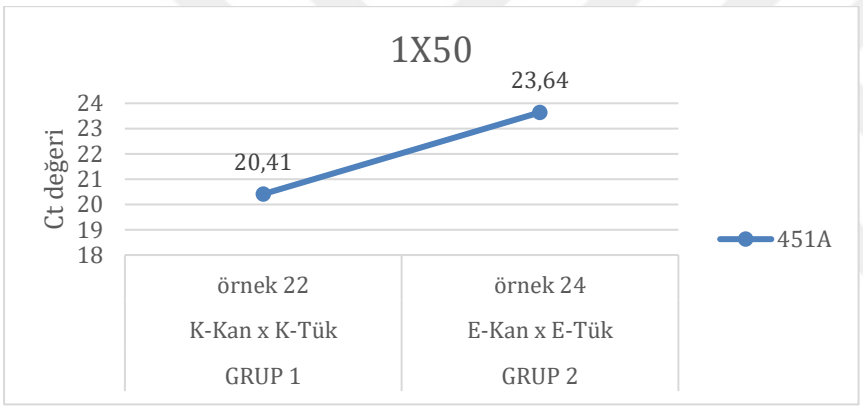
Grafik 46: 1x20 oranında Kadın Tükürük ve Erkek Tükürük ekspresyonu

Örnek 14 ve örnek 16, 1x20 oranında (500 ul x 25 ul) hazırlananmıştır. Erkek bireylerden oluşan karışım örnek 16, kadın bireylerden oluşan karışım örnek 14'e göre daha erken eskprese olmuştur.



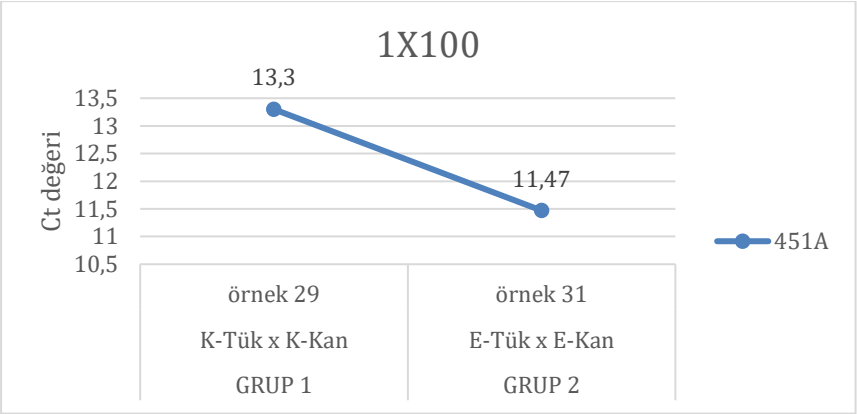
Grafik 47: 1x50 oranında Kadın Kanı ve Erkek Kanı ekspresyonu

Örnek 21 ve örnek 23 1x50 oranında (500 ul x 10 ul) olarak hazırlanmıştır. Kadın bireylerden oluşan karışım örnek 21, Erkek bireylerden oluşan karışım örnek 23'e göre daha erken eksprese olmuştur.



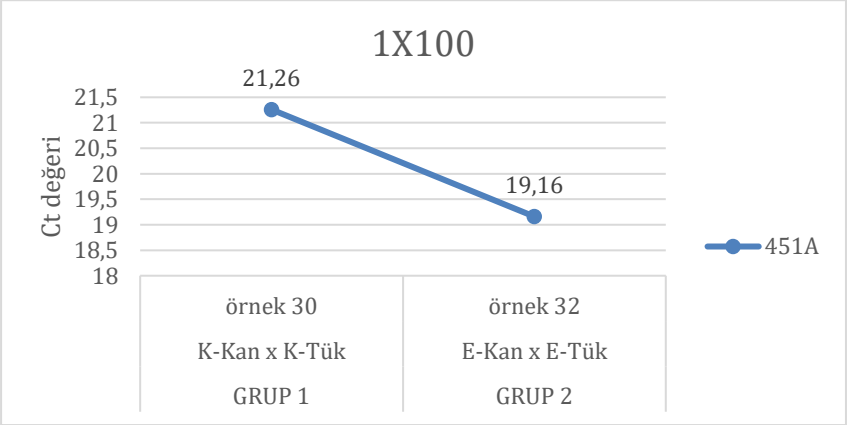
Grafik 48: 1x50 oranında Kadın Tükürük ve Erkek Tükürük ekspresyonu

Örnek 22 ve örnek 24, 1x50 oranında (500 ul x 10 ul) olarak hazırlanmıştır. Kadın bireylerden oluşan karışım örnek 22, Erkek bireylerden oluşan karışım örnek 24'e göre daha erken eksprese olmuştur.



Grafik 49: 1x100 oranında Kadın Kanı ve Erkek Kanı ekspresyonu

Örnek 29 ve örnek 31, 1x100 oranında (500 ul x 5 ul) hazırlananmıştır. Erkek bireylerden oluşan karışım örneği 31, kadın bireylerden oluşan karışım örneği 29'a göre daha erken eskprese olmuştur.



Grafik 50: 1x100 oranında Kadın Tükürük ve Erkek Tükürük ekspresyonu

Örnek 30 ve örnek 32, 1x100 oranında (500 ul x 5 ul) hazırlananmıştır. Erkek bireylerden oluşan karışım örneği 32, kadın bireylerden oluşan karışım örneği 30'a göre daha erken eskprese olmuştur.

5. Tartışma

Adli bilimler çalışma alanı, hukukun üstünlüğünü gözeterek adalete hizmet etme amacındadır. Birçok farklı lisansa sahip araştırmacının bilgi birikimine ihtiyaç duyar. Olası bir kaza, yaralanma, cinayet, zehirleme/zehirlenme, yüksekten düşme, taciz, tecavüz, gasp olaylarında mağduru anlama ve faile ulaşma açısından birçok delil elde edilir. Doğru hesaplamalar, doğru analizler ve beraberinde doğru bir olay örgüsü kurabilmek için farklı disiplinden araştırmacıların desteğine ihtiyaç duyar.

Adli bilimlere duyulan ihtiyaç ilk olarak kan grupları ve immünolojik testler kullanılarak giderilmeye çalışılmıştır. DNA'nın keşfi ve sonrasında DNA'nın bireye özgü 'parmak izi' olduğu anlaşılınca faili bulma çalışmalarında tercih edilmeye başlanmıştır. Tek yumurta ikizlerinin aynı DNA'ya sahip olması, DNA'nın olay yerinde az bulunması, olası örneğin degrade olması araştırmacıları farklı molekül arayışına sokmuştur (1).

RNA'lar ile yapılan araştırmalarda kodlama yapmayan RNA'ların varlığı kimliklendirmeye yeni bir soluk kazandırmıştır. Kodlama yapmayan miRNA çeşitlerinin dokulara özgü olduğu fikri üzerine çalışmalar bu yönde hız kazanmıştır. Çalışmalar göstermiştir ki miRNA'lar vücut sıvılarını (menstrual kan, periferik kan, semen, idrar, tükürük vs) ayırmada kullanılabilir biyo belirteçlerdir. Tek yumurta ikizlerinin dahi birbirinden ayrımını sağlayabilirler (98).

Bu çalışmada, kan ve tükürük sıvısının karışmış olduğu örneklerde miRNA belirteçleri kullanarak, bu iki vücut sıvısının ayrımının yapılması amaçlanmıştır.

Çalışma için olası bir olay yerinde görülme olasılığı yüksek olan kan ve tükürük örnekleri seçilmiştir. Karışımda tükürük varlığını tespit etmek için miR-203A-3p (99-102), periferik kan varlığını tespit etmek için miR-451A biyo belirteci kullanılmıştır (25,27,31). Vücut sıvılarının elde edildiği donörleri çeşitlendirmek için karışımlar kadın-kadın, erkek-erkek, kadın-erkek olarak hazırlanmıştır. Olay yerindeki örneklerin azlığı, olay örgüsü farklılığı düşünülerek

örnekler 1x1, 1x10, 1x20, 1x50, 1x100 dilüsyonlarında hazırlanmıştır. Her bir dilüsyon için oluşturulan dört grup analiz edilmiştir. Grup 1 Kadın kanı ve Kadın tükürüğünden; Grup 2 Erkek kanı ve Erkek tükürüğünden; Grup 3 Kadın tükürüğü ve Erkek kanından; Grup 4 Erkek tükürüğü ve Kadın kanından oluşturulmuştur. Böylelikle hem kan yoğunluğunun fazla olduğu hem de tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örneklerde ayrımın, farklı cinsiyetlerde, hangi oranda yapılabileceğine bakılmıştır. Analiz için, spesifik olmayan amplifikasyonlardan etkilenmeyen, reaksiyon sırasında analiz yapabilen Real Time PCR tekniği kullanılmıştır (95).

RT-PCR ile elde edilen ekspresyon seviyeleri bize bir Ct değeri verir. Bu değer, seçtiğimiz belirteci kaç döngü sonrasında elde edebildiğimizi gösterir. Analiz yorumlanırken Ct değeri 25 ve üzeri olan örnekler primer dimer oluşumu düşünülerek uygulanabilir kabul edilmez (Not Applicable:NA).

Çalışma için U6 (housekeeping) geni referans olarak alındı. Her bir örnek için kontrol grubu olarak U6 geni ekspresyon seviyesi hesaplanmıştır.

Çalışmamızda, tükürük sıvısı için tercih ettiğimiz hsa-miR-203A-3p belirtecinde elde edilen Ct değerlerine bakıldığında, en erken ekspresyon örnek 31'de 20,42 olarak ölçülmüştür (Tablo III). Bu değer tükürükte 203A-3p belirtecinin çok yüksek tekrarlar sonrasında bulunduğunu ve tükürük için iyi bir biyo belirteç olmadığını göstermektedir. 2019 yılında Mersin Üniversitesi'nde yapılan çalışmada, tükürükte büyük oranda miRNA-203A-3p bulunduğu sonucuna varılmıştır (99). Benzer şekilde, Japonya'da 2019 yılında yapılan ve adli olarak vücut sıvılarının incelendiği bir çalışmada tükürük için iyi bir biyo marker olduğu söylenmiştir (23). 2005 (29) ve 2006 (25) yılında yapılan çalışmalarda tükürükte miRNA-203 belirtecinin varlığı söylense de 2015 yılında Zheng Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 203A-3p belirtecinin tükürük için değil de venöz kan için (103); 2016 yılında Eva Sauer ve ark. yaptığı çalışmada ise yine tükürük için iyi bir belirteç olmayıp venöz kan için kullanılabileceği gösterilmiştir

(102). Ek olarak, 2017 yılında Sirker ve ark. yaptığı çalışmada yeniden miR-203A-3p belirtecinin tükürük için iyi bir belirteç olmadığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da tükürükte miR-203A-3p belirteci ekspresyon seviyesi anlamlı bulunmamıştır (Tablo I,III,V,VII) (Ek 1).

Çalışmamızda, tükürük örneklerimiz uygun kaplara tükürme suretiyle alındı. Örnekler, +4 derecede buzdolabında bekletildi. Prosedür gereği olmamakla birlikte örneklerimiz bir hafta süreyle beklemiştir. Literatürde, tükürük örneklerinin miRNA belirteçleri üzerine stabilizasyonu çalışılmamıştır. Tükürük içerisinde bulunan enzimlerin zamanla miRNA için yıkıcı olabilirliği olasıdır. Bu türde çalışmaların yapılması daha net yorumlamaların yapılmasına yardımcı olacaktır.

Kan sıvısını ayırt etmek için seçtiğimiz hsa-miR-451A belirtecinin Ct değerleri bu vücut sıvısı için doğru bir marker olduğunu göstermiştir. Tüm örneklerde erken ekspresyon seviyeleri oluşmuştur (Tablo II,IV,VI,VIII). Hanson ve ark. yaptığı çalışmalar ile birçok vücut sıvısı için potansiyel biyo belirteçler açıklanmıştır. Bu biyo belirteçlerden biri olarak da kanda miR-451A belirteci gösterilmiştir (27). Benzer şekilde, Courts ve Madea çalışmalarında 800 adet miRNA bölgesi inceleyerek kan için 451A'nın uygunluğunu bir kez daha göstermişlerdir (25). Sirker ve ark. farklı vücut sıvılarını inceleyerek uygun biyo belirteçleri belirlemeye çalışırken kan çeşitleri için 451A belirtecinin uygunluğunu tespit etmişlerdir (31). Bizim çalışmamızda da literatürdeki çalışmalara uygun bir sonuç elde edilmiştir (Ek 2).

Kan ve tükürük örneklerindeki yoğunluk farkı ekspresyonları için yapılan T testi sonucuna göre $p<0.005$ çıkmıştır; ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir farkın var olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, tükürük sıvısında hsa-miR-203A-3p eksprese edilemediği için yorumlamalar kanda hsa-miR-451A için yapılmıştır.

Çalışmamızda gruplarda oranlara göre elde edilen hsa-miR-451A ekspresyon seviyeleri için yorumlama yapılırken karışımlardaki tükürük ve kanın bulunma miktarına bakılmıştır. Örneğin, 1x10 oranındaki bir karışım 500 ul x 50 ul olarak konulmuştur. Kadın KanxKadın Tükürük karışımı 1x10 oranında hazırlandıysa, Kadın Kan 50 ul, Kadın Tükürük 500 ul konulmuş demektir.

Yüksek seviyede çıkan ekspresyon oranları belirtecin geç ortaya çıktığını ve belirlenmekte zorlanıldığını ifade eder.

Çalışmadaki dört grubun herbiri için bir örnek 1x1 karışımı hazırlanmıştır. Her grup için 1x10, 1x20, 1x50, 1x100 oranlarında hazırlanmış iki örnek çalışılmıştır. Bu iki örnekten birinde kan yoğunluğu yüksek tutulmuşken ikincisinde tükürük yoğunluğu yüksek tutulmuştur. Olası bir olay yerinde karşılaşılabilecek farklı yoğunluktaki örnekler oluşturulmaya çalışılmıştır.

Farklı vücut sıvılarındaki ekspresyon seviyelerinin karşılaştırması 2^-delta delta Ct yöntemi ile hesaplanmıştır (104).

Grup 1 (Kadın Kan-Kadın Tükürük**)** için hazırlanan 1x1 dilüsyonlu karışımda kandan eksprese edilen miR-451A değeri 12,34 olarak ölçülmüştür (Tablo IX). 1x10 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 5'teki ekspresyon oranı 16,23 iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 6'da 20,32 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 4,09 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo X). 1x20 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 13'te ekspresyon seviyesi 15,33 iken, tükürük örneğinin yoğun olduğu örnek 14'te 21,26 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 5,93 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XI). 1x50 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 21'de ölçülen ekspresyon seviyesi 13,93 iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 22'de 20, 41 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 6,48 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XII). 1x100 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 29'da

ekspresyon seviyesi 13,3 iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 30'da 21,26 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 7,96 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XIII).

GRUP 1 içerisinde yer alan Kadın Kan-Kadın Tükürük örnekleri farklı oranlarda karıştırılmış ve kan sıvısını tanımlamak için mikro RNA 451A biyo belirteci eksprese edilmeye çalışılmıştır. Her oranda Kan yoğunluğunun fazla olduğu karışımda Tükürük yoğunluğunun fazla olduğu karışıma göre daha erken ekspresyona ulaşılmıştır. Dilüsyon oranı arttıkça kan ve tükürük arasındaki ekspresyon farkı da artmıştır.

Grup 2 (Erkek Kan-Erkek Tükürük) için hazırlanan hazırlanan 1x1 dilüsyonunda, örnek 2'de 10,39 değerinde miR-451A eksprese edilmiştir (Tablo XIV). 1x10 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 7'de ekspresyon seviyesi 17,61 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 8'de 18,09 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 0,48 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XV). 1x20 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 15'te ekspresyon 13,7 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 16'da 20,69 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 6,99 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XVI). 1x50 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 23'te ekspresyon seviyesi 19,15 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 24'te 23,64 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 4,49 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XVII). 1x100 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 31'de ekspresyon seviyesi 11,47 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 32'de 19,16 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 7,69 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XVIII).

GRUP 2 içerisinde yer alan Erkek Kan-Erkek Tükürük örnekleri farklı oranlarda karıştırılmış ve kan sıvısını tanımlamak için mikro RNA 451A biyobelirteci eksprese edilmeye çalışılmıştır. Her oranda Kan yoğunluğunun fazla olduğu karışımda Tükürük yoğunluğunun fazla olduğu karışıma göre daha erken ekspresyona ulaşılmıştır. 1x50 oranı hariç dilüsyon oranı arttıkça kan ve tükürük arasındaki ekspresyon farkı da artmıştır.

GRUP 3 (Kadın Tükürük-Erkek Kan) için hazırlanan 1x1 dilüsyonunda, örnek 3'te 11,43 seviyesinde ekspresyon tanımlanmıştır (Tablo XIX). 1x10 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 9'da ekspresyon seviyesi 19,27olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 10'da 18,42 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 0,85 kat daha geç eksprese olmuştur (Tablo XX) (Ek 3). 1x20 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 17'de ekspresyon seviyesi 14,26 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 18'de 15,35 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 1,09 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XXI). 1x50 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 25'te ekspresyon seviyesi 15,2 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 26'da 22,64 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 7,44 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XXII**)**. 1x100 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 33'te ekspresyon seviyesi 14, 54 olaral ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 34'te 20,04 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 5,5 kat daha erken eksprese olmuştur **(**Tablo XXIII**).**

GRUP 3 içerisinde yer alan Kadın Tükürük-Erkek Kan örnekleri farklı oranlarda karıştırılmış ve kan sıvısını tanımlamak için mikro RNA 451A biyobelirteci eksprese edilmeye çalışılmıştır. Örnek 9 ve 10'un çalışıldığı 1x10 oranı hariç diğer oranlarda Kan yoğunluğunun fazla olduğu

karışımda Tükürük yoğunluğunun fazla olduğu karışıma göre daha erken ekspresyona ulaşılmıştır. 1x100 örnekleri hariç dilüsyon oranı arttıkça kan ve tükürük arasındaki ekspresyon farkı da artmıştır.

GRUP 4 (Erkek Tükürük-Kadın Kan) için hazırlanan 1x1 dilüsyonunda, örnek 4'te 10,91 seviyesinde ekspresyon tanımlanmıştır (Tablo XXIV). 1x10 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 12'de ekspresyon seviyesi 9,73 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 11'de 14,08 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 4,35 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XXV). 1x20 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 20'de ekspresyon seviyesi 17,21 olarak ölçülür iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 19'da 22,96 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 5,75 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XXVI). 1x50 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 28'in ekspresyon seviyesi 12,25 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğu fazla olan örnek 27'de 27,27 olarak ölçülmüştür. Örnek 27' de elde edilen Ct değeri uygulanabilir değildir (NA). Yani ekspresyon görülmemiştir (Tablo XXVII) (Ek 2). 1x100 dilüsyonlu karışımda kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 36'da ekspresyon seviyesi 7,41 olarak ölçülmüş iken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek 35'te 17,71 olarak ölçülmüştür. Kan örneği, tükürük örneğine göre 10,3 kat daha erken eksprese olmuştur (Tablo XXVIII).

GRUP 4 içerisinde yer alan Erkek Tükürük-Kadın Kan örnekleri farklı oranlarda karıştırılmış ve kan sıvısını tanımlamak için mikro RNA 451A biyobelirteci eksprese edilmeye çalışılmıştır. Her oranda Kan yoğunluğunun fazla olduğu karışımda Tükürük yoğunluğunun fazla olduğu karışıma göre daha erken ekspresyona ulaşılmıştır. Dilüsyon oranı arttıkça kan ve tükürük arasındaki ekspresyon farkı da artmıştır.

Tüm gruplarda bakılan farklı oranlardaki karışımlar incelendiğinde görülmüştür ki, periferik kan belirteci olarak kabul edilen hsa-miRNA-451A belirteci, GRUP 3'te yeralan örnek 9 ve 10'un çalışıldığı 1x10 oranı hariç diğer tüm çalışmalarda, Kan yoğunluğunun fazla olduğu karışımda Tükürük yoğunluğunun fazla olduğu karışıma göre daha erken ekspresyona ulaşılmıştır.

Oranlara göre hsa-miR-451A ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması için 1x1 (250 ul x 250 ul) oranında hazırlanan karışım örnekleri, her grup için 250 ul kan, 250 ul tükürük eklenerek karışım örneği hazırlanmıştır. Eşit oranda bulunan kan-tükürük karışımlarında sadece erkek bireylerden oluşan (GRUP 2) örnek 2'de 10,39 seviyesinde, kadın ve erkek donörlerden oluşan (GRUP 4) örnek 4'te 10,91 seviyesinde en erken hsa-miR-451A ekspresyonuna rastlanmıştır. En geç ekspresyon seviyesi ise sadece kadın bireylerden oluşan (GRUP 1) örnek 1'de 12,34 olarak ölçülmüştür (Tablo XXIX).

1x10 (500 ul x 50 ul) oranında hazırlanan karışım örneklerinde, her grup için hazırlanan iki örnekten birinde kan yoğunluğu, ikincisinde tükürük yoğunluğu fazla tutulmuştur. Her grubun kendi içinde kıyaslanmasına 'Gruplarda Oranlara Göre Elde Edilen hsa-miR-451A Ekspresyon Seviyeleri' başlığı altında bakılmıştır ve sonuç olarak kan yoğunluğu fazla olan örneklerde daha erken ekspresyon yapıldığı sonucuna ulaşılmıştır.

1x10 oranında hazırlanan tüm örnekler incelendiğinde, kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 12, kan yoğunluğunun fazla olduğu diğer örneklere göre (örnek 5, örnek 7, örnek 9) 9,73 seviyesi ile daha erken eksprese olmuştur; Erkek Tükürüğünün 50 ul, Kadın Kanının 500 ul konulduğu karışımda (GRUP 4) diğer gruplara göre en iyi ekspresyona ulaşılmıştır.

En geç bulunan ve ekspresyon seviyesi en yüksek olan karışım örnek 6 olmuştur. Tükürük yoğunluğunun fazla olduğu bu karışım, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu diğer karışımlara

göre daha yüksek değerde bulunmuştur. Kadın Kanının 50 ul, Kadın Tükürüğünün 500 ul konulduğu karışımda (GRUP 1) diğer gruplara göre en geç ekspresyon tanımlanmıştır (Tablo XXX).

1x20 (500 ul x 25 ul) oranında hazırlanan karışım örnekleri incelendiğinde ekspresyon oranları çok yakın değerde olan örnekler görülmüştür. Diğer sonuçlar ile kıyaslandığında yine ekspresyon seviyesi en düşük örnek kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek olmuşken, ekspresyon seviyesinin en yüksek ölçüldüğü örnek tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnek olmuştur. 1x20 oranında hazırlanan dilüsyonlarda ekspresyon seviyesi en düşük olup erken tanımlanan örnekler 13,7 ile GRUP 2 ve 14,26 ile GRUP 3 olmuştur. En geç tanımlanıp ekspresyon seviyesi en yüksek olanlar 21,26 ile GRUP 1 ve 22,96 ile GRUP 4 olmuştur (Tablo XXXI).

1x50 (500 ul x 10 ul) oranında hazırlanan karışım örneklerine ait PCR eğrisi yorumlanırken ekspresyon seviyesi 25 ve üzeri olan örnekler uygulanabilir kabul edilmez (NA). Örnek 27 için ölçülen değer 27,27 olduğu için eksprese edilemediği düşünülerek yorumlamaya alınmadı (Ek 2). 1x50 oranında hazırlanan tüm örnekler incelendiğinde, kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 28, kan yoğunluğunun fazla olduğu diğer örneklere göre (örnek 21, örnek 23, örnek 25) 12,25 seviyesi ile daha erken eksprese olmuştur; Erkek Tükürüğünün 10 ul, Kadın Kanının 500 ul konulduğu karışımda (GRUP 4) diğer gruplara göre en iyi ekspresyona ulaşılmıştır. En geç bulunan ve ekspresyon seviyesi en yüksek olan karışım örnek 24 olmuştur. Tükürük yoğunluğunun fazla olduğu bu karışım, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu diğer karışımlara göre daha yüksek değerde bulunmuştur. Erkek Kanının 10 ul, Erkek Tükürüğünün 500 ul konulduğu karışımda (GRUP 2) diğer gruplara göre en geç ekspresyon tanımlanmıştır (Tablo XXXII).

1x100 (500 ul x 5 ul) oranında hazırlanan tüm örnekler incelendiğinde, kan yoğunluğunun fazla olduğu örnek 36, kan yoğunluğunun fazla olduğu diğer örneklere göre (örnek 29, örnek 31, örnek 33) 7,41 seviyesi ile daha erken eksprese olmuştur; Erkek Tükürüğünün 5 ul, Kadın Kanının 500 ul konulduğu karışımda (GRUP 4) diğer gruplara göre en iyi ekspresyona ulaşılmıştır. En geç bulunan ve ekspresyon seviyesi en yüksek olan karışım örnek 30 olmuştur. Tükürük yoğunluğunun fazla olduğu bu karışım, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu diğer karışımlara göre daha yüksek değerde bulunmuştur. Kadın Kanının 10 ul, Kadın Tükürüğünün 500 ul konulduğu karışımda (GRUP 1) diğer gruplara göre en geç ekspresyon tanımlanmıştır (Tablo XXXIII).

Oranlara göre hsa-miR-451A ekspresyon seviyelerinin kıyaslanması için yaptığımız çalışmalar göstermiştir ki, 1x1, 1x10, 1x50, 1x100 dilüsyonunda hazırlanmaları farketmeksizin en erken eksprese olan ve ekpresyon seviyesi en düşük olan örnekler GRUP 4'e aittir. Kadın Kanının yoğun, Erkek tükürüğünün az oranda bulunduğu bu örnekler 1x20 oranı hariç miR-451A için en iyi sonucu vermiştir. Kan yoğunluğunun fazla olduğu örnekte en iyi sonucun alınması 'Gruplarda Oranlara Göre Elde Edilen hsa-miR-451A Ekspresyon Seviyeleri' başlığında elde ettiğimiz sonuçla uyumludur.

Ekspresyonun en geç ve en yüksek değerlerde ölçüldüğü örnekler 1x1, 1x10, 1x20, 1x100 dilüsyonunda hazırlanmaları farketmeksizin GRUP 1'e aittir. Kadın tükürüğünün yoğun, Kadın Kanının az bulunduğu bu örnekler 1x50 oranı hariç miR-451A için en zor tanımlanan örnekler olmuştur.

Sonuç olarak, kan yoğunluğunun fazla olduğu örnekler periferik kanda hsa-miR-451A için en erken şekilde eksprese olurken, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnekler en yüksek ekspresyon seviyelerinde ölçülmüştür. Bu da miRNA-451A'nın kan için uygun bir biyo belirteç olduğunu desteklemektedir.

Kan yoğunluğunun fazla olduğu tüm gruplara ait örnekler içerisinde, büyük oranda, GRUP 4'e ait örneklerin en iyi oranda eksprese olduğu görülmüştür. Kadın-erkek karışımları, kadın-kadın, erkek-erkek karışımlarından daha iyi sonuç vermiştir. GRUP 3 ve GRUP 4 kıyaslandığında görülmüştür ki, kadın-erkek karışımlarında, Kadın Kan'ının yoğun olduğu karışımlar, erkek kanının yoğun olduğu karışımlardan daha iyi sonuç vermiştir.

Tükürük yoğunluğunun fazla olduğu tüm gruplara ait örnekler içerisinde karışımlarda en yüksek değer, büyük oranda, GRUP 1'de ölçülmüştür. Kadın-Kadın bireylere ait karışımlar diğer tüm karışımlardan daha zor tanımlanmıştır.

Literatürde, farklı dilüsyonlar hazırlanarak karışım örneklerinin ayırt edilmesi çalışılmamıştır. Sonuçlarımızın tasdik edileceği çalışmaların olması gerektiğini düşünmekteyiz.

Kan ve tükürük sıvıları için hazırlanan farklı dilüsyonlarda ölçülen miR-451A ekspresyonunda kan örnekleri için; Sadece kadın bireylerden oluşan GRUP 1 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x1 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x10 olmuştur (Tablo XXXIV) (Ek 4). Sadece erkek bireylerin oluşturduğu GRUP 2'ye ait karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x1 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x50 olmuştur (Tablo XXXV) (Ek 5). Erkek ve Kadın bireylerin bulunduğu, Erkek kanın yoğunlukta olduğu GRUP 3 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x1

oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x10 olmuştur (Tablo XXXVI) (Ek 6). Erkek ve Kadın bireylerin bulunduğu, Kadın kanın yoğunlukta olduğu GRUP 4 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x100 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x20 olmuştur (Tablo XXXVII) (Ek 7).

Tükürük örnekleri için; sadece kadın bireylerden oluşan GRUP 1 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x10 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x20 ve 1x100 olmuştur (Tablo XXXVIII) (Ek 8). Sadece erkek bireylerin oluşturduğu GRUP 2'ye ait karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x10 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x50 olmuştur (Tablo XXXIX) (Ek 9). Erkek ve Kadın bireylerin bulunduğu, Kadın tükürüğünün yoğunlukta olduğu GRUP 3 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x20 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x50 olmuştur (Tablo XL) (Ek 10). Erkek ve Kadın bireylerin bulunduğu, Erkek tükürük yoğunlukta olduğu GRUP 4 karışım örneklerinde miR-451A belirteci en erken 1x10 oranında ölçülmüştür. Belirtecin en geç görüldüğü oran ise 1x50 olmuştur (Tablo XLI) (Ek 11).

Kan yoğunluğunun fazla olduğu örneklere bakıldığında, GRUP 4 hariç diğer gruplarda 1x1 (250 ul x 250 ul) oranında en düşük ekspresyon seviyesine ulaşılmıştır. En yüksek ekspresyon seviyeleri her grup için farklı oranlarda görülmüştür.

Tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örnekler incelendiğinde, GRUP 3 hariç diğer gruplarda 1x10 (500 ul x 50 ul) oranında en düşük ekspresyon seviyesine ulaşılmıştır. En yüksek ekspresyon seviyeleri GRUP 1 hariç diğer gruplarda 1x50 (500 ul x 10 ul) oranında ölçülmüştür.

Kan ve Tükürük yoğunluğu fazla olan farklı örneklerde görülmüştür ki, kan-tükürük örneği karışımda eşit olan (1x1) ve ya en yüksek değerde (1x10) bulunan karışımlarda daha erken eksprese edilmiştir. Ekspresyonun en yüksek seviyelerde olduğu örnekler ise düşük değerdeki (1x50) karışımlarda ölçülmüştür.

1x1 dilüsyon örnekleri hariç diğer dilüsyonları incelediğimizde kadın kanı yoğunluğundaki örnekler 1x100 oranında en erken ekspresyon göstermişlerdir. Yani kanın en fazla miktarda bulunup tükürüğün en az miktarda olduğu karışımda ekspresyon en yüksek seviyede ölçülmüştür. Tükürük yoğunluğu fazla olan örneklerde ise 1x10 oranında en geç ekspresyona ulaşılmıştır. Yani tükürük yoğunluğunda bulunan en fazla kan miktarından 451-A ekspresyonu en iyi değerde ölçülmüştür. hsa-miR-451A belirtecinin kan sıvısı için potansiyel bir marker olduğu bilindiğinden sonuçlarımız literatürle ve önceki sonuçlarımızla uyumludur.

Cinsiyete göre hsa-miR-451A ekspresyon seviyesi için; 1x1 oranında hazırlanan örnek 1 ve örnek 2’ ye bakıldığında, Erkek bireylerden oluşan karışım örneği Kadın bireylerden oluşan karışım örneğinden daha erken eksprese olmuştur (Tablo XLII). Örnek 5 ve örnek 7, 1x10 oranında (500 ul x 50 ul) hazırlananmıştır. 451A ekspresyonu, Kadın karışımının olduğu örnek 5’te daha erken eksprese olmuştur (Tablo XLIII). Örnek 6 ve örnek 8, 1x10 oranında (500 ul x 50 ul) hazırlananmıştır. Erkek bireylerden oluşan karışım örnek 8, kadın bireylerden oluşan karışım örnek 6’ya göre daha erken eskprese olmuştur (Tablo XLIV). Örnek 13 ve örnek 15, 1x20 oranında (500 ul x 25 ul) hazırlananmıştır. Erkek bireylerden oluşan karışım örnek 15, kadın bireylerden oluşan karışım örnek 13’e göre daha erken eskprese olmuştur (Tablo XLV). Örnek 14 ve örnek 16, 1x20 oranında (500 ul x 25 ul) hazırlananmıştır. Erkek bireylerden oluşan karışım örnek 16, kadın bireylerden oluşan karışım örnek 14’e göre daha erken eskprese

olmuştur (Tablo XLVI). Örnek 21 ve örnek 23 1x50 oranında (500 ul x 10 ul) olarak hazırlanmıştır. Kadın bireylerden oluşan karışım örnek 21, Erkek bireylerden oluşan karışım örnek 23'e göre daha erken eksprese olmuştur (Tablo XLVII). Örnek 22 ve örnek 24, 1x50 oranında (500 ul x 10 ul) olarak hazırlanmıştır. Kadın bireylerden oluşan karışım örnek 22, Erkek bireylerden oluşan karışım örnek 24'e göre daha erken eksprese olmuştur (Tablo XLVIII). Örnek 29 ve örnek 31, 1x100 oranında (500 ul x 5 ul) hazırlanmıştır. Erkek bireylerden oluşan karışım örneği 31, kadın bireylerden oluşan karışım örneği 29'a göre daha erken eskprese olmuştur (Tablo XLIX). Örnek 30 ve örnek 32, 1x100 oranında (500 ul x 5 ul) hazırlanmıştır. Erkek bireylerden oluşan karışım örneği 32, kadın bireylerden oluşan karışım örneği 30'a göre daha erken eskprese olmuştur (Tablo L).

Periferik kan için bir biyo belirteç olarak görülen hsa-miR-451A'nın kadın ve erkek bireylerden oluşan karışımları ayrı ayrı hazırlanarak analiz edilmiştir (GRUP 1 ve GRUP 2). Hazırlanan 1x1 dilüsyonlu karışımlar göstermiştir ki, Erkek bireylerin oluşturduğu karışım örneği Kadın bireylerin oluşturduğu karışım örneğinden daha erken tanımlanmıştır. Ayrı ayrı kan yoğunluğu fazla olan ve tükürük yoğunluğu fazla olan örneklere bakıldığında 1x50 dilüsyonu hariç diğer dilüsyonlarda yine Erkek bireylerden oluşan karışım örnekleri daha erken tanımlanmıştır. 1x50 dilüsyonunda her iki yoğunlukta da Kadın bireylerden oluşan örnekler daha erken eksprese olmuştur (Ek 12).

Sonuç olarak, hsa-miR-451A biyo belirteci, aynı oranda bulunan, aynı vücut sıvılarından oluşan, aynı karışım yoğunluğuna sahip örneklerde, Kadın ve Erkek donörlerden farklı oranlarda eksprese edilmiştir.

Mikro RNA'ların, kadın ve erkek bireylerden farklı seviyelerde eksprese edildiği çeşitli çalışmalarda görülmüştür (105). Katie Torley ve ark. eşeysel farklılıkların miRNA'lar ile

düzenlendiği hipotezleri için, koyun fetüsünün testis ve yumurtalıklarını incelemişlerdir. Çalışma sonunda, memeli fetüsündeki miRNA'ların da tıpkı koyun fetüsündekiler gibi testis ve yumurtalıkta farklı eksprese edileceğini söylemişlerdir (106). Benzer çalışmalar domuz ve farelere ait testis ve yumurtalıklar üzerinde de yapılmıştır (107,108). Çalışma sonucunda testis ve yumurtadaki miRNA ekspresyonlarında farklılıklar olduğu açıklanmıştır. MiRNA'ların eşeysel görev ve işlevleri düzenlediğini söylemişlerdir.

miRNA'ların gonozomal farklılıklarının yan ısıra otozomal farklılıklarının görüldüğü çalışmalar da yapılmıştır. Sıçan karaciğerinde (109), gebe fare akciğerinde (110), dişi ve erkek bireylerde, miRNA ekspresyonu ölçülmüş ve farklı seviyelerde eskpresyonu görülmüştür. İnsan beyni üzerine yapılan bir çalışmada, dişi ve erkek prefrontal korteksinde farklı seviyelerde miRNA ifadesi elde edilmiştir (111).

Ekspresyon seviyesinde görülen farklılıkların epigenetik nedenli olduğunu söyleyen bir çalışmada, iyonlaştırıcı radyasyon dişi ve erkek farelere uygulanmıştır. Sonucunda ise dişi ve erkekte farklı miRNA seviyeleri tanımlanmıştır (112).

Erkek ve dişi fareler üzerinde, otoimmün hastalıklar ve bağışıklığın, cinsiyete özgü miRNA ekspresyon farklılığının ölçülebilmesi için bir çalışma yapılmıştır (113). Lupus eğilimli farelerden dişi olanlarda daha yüksek ekspresyonlara ulaşılmıştır. Bağışıklık ve immünitedeki cinsiyet farklılıklarını gösteren diğer çalışmalarda dişi bireylerin erkek bireylere oranla hastalıklara daha dirençli olduğu gösterilmiştir (114-116).

miRNA'ların östrojen ve androjen hormonlarını ve bu hormonlar ile bağlantılı hastalıkları düzenlediğine dair çalışmalar da yer almaktadır (117-124).

Literatür çalışmaları incelendiğinde, miRNA ekspresyonlarının, farklı cinsiyetlerde, bağışıklık, otoimmün hastalıklar, otozomal ve gonozomal kromozomlar üzerindeki farklılıkları çalışılmıştır. Dişi ve erkek bireylerde miRNA ekspresyonlarında farklılıklar olduğu söylenmiştir. Fakat cinsiyete göre, vücut sıvılarında bulunan miRNA ekspresyonları incelenmemiştir. Bizim çalışmamızda, vücut sıvısı olan kan ve tükürükte cinsiyete göre (GRUP 1 ve GRUP 2 kıyaslanması) miRNA ifade edilme seviyelerine bakılmıştır. hsa-miR-451A ekspresyon seviyeleri ölçülmüş ve dişi ve erkek bireylerde diğer çalışmalarda olduğu gibi ekspresyon farklılığına rastlanmıştır. İstatistiki olarak bu fark $p>0.005$ olarak bulunmuştur; Grup 1 ve Grup 2'de ölçülen ekspresyon farklılıkları T testi ile gösterilememiştir.

Daha önce dişi ve erkek bireylerde, vücut sıvılarında miRNA ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması yapılmadığı için bizim çalışmamız bir ilk olmuştur. Sonuçlarımızın güvenilirliği ve kesinliği için benzer çalışmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

Bağışıklık, hastalıklar, tedaviler, olası bir olay yerinde bulunacak deliller göz önüne alındığında miRNA'lardan en iyi şekilde yararlanmak istiyorsak, cinsiyete göre değerlendirme yapmamız gerektiği görüşündeyiz. Çalışmalarda kullanılan deneklerin kadın ve erkek bireylerden seçilmesi tedavi üzerine kurulu bir çalışmada daha gerçekçi sonuç oluşturacaktır. Olay yerinde bulunan kan-tükürük karışımının kadın, erkek ya da kadın-erkek karışımındaki ekspresyon seviyesi bize olayı aydınlatmada kolaylık sağlayacaktır.

6.Sonuç

Bu tez çalışmasında, olası bir olay yerinden elde edilebilecek deliller üzerinde çalışılmıştır. Bu örnekler cinsel istismar davaları başta olmak üzere çok katılımlı yaralama ve cinayet vakaları düşünülerek hazırlanmıştır. Olay yerinde mağdur ve failin yahut faillerin vücut sıvıları birbirine karışmış olabilmektedir. Fazlaca bulunan vücut sıvısının az miktarda bulunan vücut sıvısını maskelemesi vakaların aydınlatılmasında yanıltıcı sonuçlar oluşturabildiği gibi hatalı bir olay örgüsüne de yol açabilmektedir.

Çalışmamızda, karışımı oluşturulacak vücut sıvıları kan ve tükürük olarak seçilmiştir. Vaka farklılıkları göz önüne alınarak, kan ve tükürükten oluşan karışımlarda dilüsyon farklılıkları oluşturulmuştur. Karışımdaki vücut sıvıları 1x1, 1x10, 1x20, 1x50, 1x100 olacak şekilde hem kan hem de tükürük için ayrı ayrı hazırlanmıştır.

Örnekler iki donörlü olacak şekilde, vaka farklılıkları göz önüne alınarak, kadın-kadın, erkek-erkek, kadın-erkek olacak şekilde, kişilere ait kan ve tükürük sıvıları karıştırılarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan karışım örneklerinin analizi Real Time PCR cihazı kullanılarak yapılmıştır. Karışımdaki kan ve tükürük sıvısının varlığı, miRNA aday belirteçleri kullanılarak gösterilmeye çalışılmıştır. Tükürük için hsa-miR-203A-3P, kan için hsa-miR-451A tercih edilmiştir. Hazırlanan karışımların her biri için, seçili miRNA'dan cDNA elde edilerek SYBR Green analizi ile yorumlamalar yapılmıştır. Karışımdaki farklı dilüsyonlar $2^{\wedge-}$ delta delta Ct yöntemi ile kıyaslanmıştır. Sonuçlar arasındaki korelasyon istatistiksel olarak T testi ile hesaplanmıştır.

Kan ve tükürük karışımı olarak hazırlanan tüm örneklerde, belirteç olarak miR-203A ve miR-451A'nın uygunluğuna bakılmıştır. Literatür incelendiğinde, bizim çalışmamızda kan için uygun bir marker olduğunu gösterdiğimiz miR-451A'nın diğer kaynaklarda da uygunluğu görülmektedir. miR-203A-3p belirtecinde ise tükürük için uygun olduğunu söyleyen çalışmalar yanında uygun olmadığını söyleyen çalışmalar da bir hayli fazladır. Biz çalışmamız sonucunda, miR-203A-3p'nin tükürük sıvısı için uygun olmadığı söylemekteyiz.

Çalışmamız için uygun kaplara tükürme sureti ile toplanan tükürük sıvısı +4 derecede, deney planlamamızdan bağımsız olarak bir hafta bekletildi. Tükürük sıvısından miR-203A-3p elde edememiş olmamız birçok çalışma tarafından desteklenmektedir fakat geçmiş yıllarda var olduğunu söyleyen çalışmalar düşünüldüğünde, tükürük içerisindeki enzimlerden kaynaklı olarak elde edememiş olabileceğimizi düşünmekteyiz. Tükürük sıvısının stabilitesini gösteren bir çalışmanın olmaması kesin bir yorum yapmamızı engellemektedir.

Çalışmamızda, benzer şekilde venöz yoldan alınıp uygun kaplara aktarılan kan örneklerimiz de +4 derecede bir hafta beklemiştir. Fakat bu bekleme süresi 451A belirtecini etkilememiş ve kan için yüksek oranda amplifikasyon sağlanmıştır. Ayrıca 451A belirteci, tükürük yoğunluğunun fazla olduğu örneklerde bile iyi bir ekspresyon seviyesi göstermiştir. Tükürük içinde bulunan enzimlere karşı dayanıklı bir biyo belirteç olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamıza 4 kadın, 4 erkek birey katılmıştır. Dilüsyonlara ve gruplara uygun olacak şekilde, bireylere ait vücut sıvıları tesadüfi olarak karıştırılmıştır; hangi tüpte hangi bireye ait örnek olduğu bilinmemektedir. Çalışmamız sonucunda, erkek katılımcılardan oluşan karışımların kadın katılımcılardan oluşan karışımlara göre daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur.

Cinsiyete göre miRNA ekspresyonunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürde, çeşitli canlılar üzerine otozomal, gonozomal, bağışıklık, hormanal açıdan miRNA çalışmalarını incelediğimizde, kadınların bağışıklığı daha güçlü bireyler olduğu, androjen ve östrojene bağlı hastalıklarda miRNA seviyelerinin değiştiğini, genellikle X kromozomu üzerinde belirteçlerin bulunduğunu söyleyebiliriz. Fakat aynı miRNA'nın kadın, erkek, kadın-erkek karışımlarındaki ekspresyonu ilk olarak bizim çalışmamızda yer almaktadır.

Hazırlanan tüm dilüsyonlar incelendiğinde, 250 ul kan-250 ul tükürük (1x1) olarak hazırlanan her grup karışım örneğinde, en erken ekspresyona ulaşılmıştır. Çalışmamızda bulunan dört grubumuzun her biri için bir tane 1x1 karışımı hazırlanmıştır. Katılımcı cinsiyeti değişse bile aynı oranda kan ve tükürük sıvısı karıştırılmıştır. Ekspresyon seviyeleri her grup için farklı sonuç göstermiştir. Yine sadece erkek katılımcıların olduğu karışım en yüksek ekspresyonu göstermiştir. Bu durum bize miRNA belirteçlerinin cinsiyete göre farklı seviyelerde eksprese edilebileceğini düşündürmüştür. Farklı bir bakış açısı ile aynı/farklı cinsiyetli bireylerin karışımları o vücut sıvısının stabilizasyonunu etkiliyor olabilir.

Literatürde, vücut sıvılarından oluşan bir karışımın ayrımı çalışılmamıştır. Biz çalışmamızda, vücut sıvılarından oluşan bir karışımın, farklı dilüsyonlarda, cinsiyete göre, miRNA belirteçleri kullanarak ayrımını amaçladık. Gördük ki iki vücut sıvısının uygun miRNA belirteci kullanılarak ayrımı yapılabilmektedir. Ekspresyon oranları katılımcı cinsiyetine göre değişebilmektedir. Tükürük varlığında kan içerisindeki 451-A belirteci kendini koruyabilmektedir.

Elde ettiğimiz sonuçların bir ilk olması sebebiyle, çalışmamızın örnek olması ve sonuçlarının güvenilirliği açısından yeni çalışma konuları arasında olması gerektiğini düşünmekteyiz.

7. Kaynakça

(1)Bieber, F. R., Buckleton, J. S., Budowle, B., Butler, J. M., & Coble, M. D. (2016). Evaluation of forensic DNA mixture evidence: protocol for evaluation, interpretation, and statistical calculations using the combined probability of inclusion. *BMC genetics*, *17*(1), 125. https://doi.org/10.1186/s12863-016-0429-7

(2)Oldoni, F., & Podini, D. (2019). Forensic molecular biomarkers for mixture analysis. *Forensic science international. Genetics*, *41*, 107–119. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.04.003

(3)Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., & Wang, K. (2011). Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutation research*, *717*(1-2), 85–90. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.004

(4)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. https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.037

(5)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.

(6) Lomholt, B., & Keiding, N. (1977). Tetrabase, an alternative to benzidine and orthotolidine for detection of haemoglobin in urine. *Lancet (London, England)*, *1*(8011), 608–609. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(77)92044-x

(7)Garner, D. D., Cano, K. M., Peimer, R. S., & Yeshion, T. E. (1976). An evaluation of tetramethylbenzidine as a presumptive test for blood. *Journal of forensic sciences*, *21*(4), 816–821.

(8)KOHN, J., & O'KELLY, T. (1955). An ortho-tolidine method for the detection of occult blood in faeces. *Journal of clinical pathology*, *8*(3), 249–251. https://doi.org/10.1136/jcp.8.3.249

(9) Weber K. (1966). Die Anwendung der Chemiluminescenz des Luminols in der gerichtlichen Medizin und Toxikologie. I. Der Nachweis von Blutspuren [The use of chemiluminescence of Luminol in forensic medicine and toxicology. I. Identification of blood stains]. *Deutsche Zeitschrift fur die gesamte gerichtliche Medizin*, *57*(3), 410–423.

(10) Creamer, J. I., Quickenden, T. I., Crichton, L. B., Robertson, P., & Ruhayel, R. A. (2005). Attempted cleaning of bloodstains and its effect on the forensic luminol test. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*, *20*(6), 411–413. https://doi.org/10.1002/bio.865

(11) Kent, E. J., Elliot, D. A., & Miskelly, G. M. (2003). Inhibition of bleach-induced luminol chemiluminescence. *Journal of forensic sciences*, *48*(1), 64–67.

(12) Foot, C. H., & Wiener, K. (1979). Phadebas amylase test kits. *Clinical chemistry*, *25*(5), 818.

(13) Quarino, L., Dang, Q., Hartmann, J., & Moynihan, N. (2005). An ELISA method for the identification of salivary amylase. *Journal of forensic sciences*, *50*(4), 873–876.

(14) Keating, S. M., & Higgs, D. F. (1994). The detection of amylase on swabs from sexual assault cases. *Journal - Forensic Science Society*, *34*(2), 89–93. https://doi.org/10.1016/s0015-7368(94)72889-9

(15) Duncan GT., Tracey ML. Serology and DNA Typing. In Introduction to Forensic Science Ed. Eckert WG. CRC Press, New York, 1992; 233–294.

(16) Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, *316*(6023), 76–79. https://doi.org/10.1038/316076a0

(17) Witkowski JA. Milestones in The Development of DNA Technology. In Forensic DNA Technology, Ed. Farley MA and Harrington JJ. Lewis Publishers, 1991; 10–17.

(18) Sensabaugh GF., Beroldingen CV. The Polymerase Chain Reaction: An Application to The Analysis of Biological Evidence. In Forensic DNA Technolog, Ed. Farley MA and Harrington JJ. Lewis Publishers, 1991;66–78.

(19) Oehmichen, M., & Zilles, K. (1984). Postmortale DNS- und RNS-Synthese: Erste Untersuchungen an menschlichen Leichen [Postmortem DNA and RNA synthesis. Preliminary studies in human cadavers]. *Zeitschrift fur Rechtsmedizin. Journal of legal medicine*, *91*(4), 287–294. https://doi.org/10.1007/BF02332322

(20) Phang, T. W., Shi, C. Y., Chia, J. N., & Ong, C. N. (1994). Amplification of cDNA via RT-PCR using RNA extracted from postmortem tissues. *Journal of forensic sciences*, *39*(5), 1275–1279.

(21) 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. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.11.003

(22)Rocchi, A., Chiti, E., Maiese, A., Turillazzi, E., & Spinetti, I. (2020). MicroRNAs: An Update of Applications in Forensic Science. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, *11*(1), 32. https://doi.org/10.3390/diagnostics11010032

(23)Fujimoto, S., Manabe, S., Morimoto, C., Ozeki, M., Hamano, Y., Hirai, E., Kotani, H., & Tamaki, K. (2019). Distinct spectrum of microRNA expression in forensically relevant body fluids and probabilistic discriminant approach. *Scientific reports*, *9*(1), 14332. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50796-8

(24)Vennemann, M., Scott, G., Curran, L., Bittner, F., & Tobe, S. S. (2014). Sensitivity and specificity of presumptive tests for blood, saliva and semen. *Forensic science, medicine, and pathology*, *10*(1), 69–75. https://doi.org/10.1007/s12024-013-9515-6

(25) Büyük Y, Aşıcıoğlu F. Kan lekesi analizinde ihtimali reaktifler; Özgüllük, özgünlük ve kontaminasyonun etkisi. Adli Bilimler Dergisi. 2006;5(2):13- 21.

(26) Hatch A. L. (1993). A modified reagent for the confirmation of blood. *Journal of forensic sciences*, *38*(6), 1502–1506.

(27) Rudin N, Inman K. An Introduction to Forensic DNA Analysis. 2nd ed.USA:CRC Press;2002.

(28) Higaki, R. S., & Philp, W. M. S. (1976). A study of the sensitivity, stability and specificity of phenolphthalein as an indicator test for blood. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, *9*(3), 97-102.

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

(30) Ballantyne J. Serology Overview. In:Payne-James J, Byard RW, Corey TS, Henderson C, editors. Encyclopedia of forensic and legal medicine. Volume-4.Spain:Elsevier Academic Press, 2005; 53-63.

(31) De Forest, P. R., & DeForest, P. R. (1983). *Forensic science: an introduction to criminalistics*. New York: McGraw-Hill Humanities/Social Sciences/Languages.

(32) Park, H. Y., Son, B. N., Seo, Y. I., & Lim, S. K. (2015). Comparison of Four Saliva Detection Methods to Identify Expectorated Blood Spatter. *Journal of forensic sciences*, *60*(6), 1571–1576. https://doi.org/10.1111/1556-4029.12864

(33) Bevel T, Gardner RM. Bloodstain pattern analysis. Newyork, CRC Press, 1997.

(34) Ganong, W. F. (1995). Review of medical physiology. *Dynamics of blood and lymph flow*, *30*, 525-541.

(35) 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. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.06.003

(36) 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. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013

(37) Stoilovic M. (1991). Detection of semen and blood stains using polilight as a light source. *Forensic science international*, *51*(2), 289–296. https://doi.org/10.1016/0379-0738(91)90194-n

(38) 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. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00065.x

(39) Ballantyne J. Serology Overview. In:Payne-James J, Byard RW, Corey TS, Henderson C, editors. Encyclopedia of forensic and legal medicine. Volume-4.Spain:Elsevier Academic Press, 2005;53-63.

(40) James, S. H., Kish, P. E., & Sutton, T. P. (2005). *Principles of bloodstain pattern analysis: theory and practice*. CRC press.

(41) Creamer, J. I., Quickenden, T. I., Apanah, M. V., Kerr, K. A., & Robertson, P. (2003). A comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence*, *18*(4), 193-198.

(42) Cox, M. (1991). A study of the sensitivity and specificity of four presumptive tests for blood. *Journal of Forensic Science*, *36*(5), 1503-1511.

(43) Barni, F., Lewis, S. W., Berti, A., Miskelly, G. M., & Lago, G. (2007). Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*, *72*(3), 896-913.

(44) Abacus Diagnostics. Hemascein Technical Information Sheet. Catalog # 800121

(45) Rudin N, Inman K. An Introduction to Forensic DNA Analysis. 2nd ed.USA, CRC Press, 2002.

(46) Lee HC, Pagliaro EM. Serology/Blood İdentification. In:Payne-James J, Byard RW, Corey TS, Henderson C. Encyclopedia of forensic and legal medicine.Volume-4. Spain: Elsevier Academic 2005; 64-70.

(47) Herman, Y., Feine, I., & Gafny, R. (2018). Acid phosphatase test on Phadebas® sheets - An optimized method for presumptive saliva and semen detection. *Forensic science international*, *288*, 218–222. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.04.047

(48) Ricci, U., Carboni, I., & Torricelli, F. (2014). False-positive results with amylase testing of citrus fruits. *Journal of forensic sciences*, *59*(5), 1410–1412. https://doi.org/10.1111/1556-4029.12457

(49) Carboni, I., Rapi, S., & Ricci, U. (2014). Stability of human α-salivary amylase in aged forensic samples. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, *16*(4), 214–217. https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2014.03.004

(50) Kulstein, G., & Wiegand, P. (2018). Comprehensive examination of conventional and innovative body fluid identification approaches and DNA profiling of laundered blood- and saliva-stained pieces of cloths. *International journal of legal medicine*, *132*(1), 67–81. https://doi.org/10.1007/s00414-017-1691-6

(51) Saxena, S., & Kumar, S. (2015). Saliva in forensic odontology: A comprehensive update. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, *19*(2), 263–265. https://doi.org/10.4103/0973-029X.164549

(52) Bhandari, R., Kakkar, T., Bhullar, R. K., Bansal, H., Sandhu, S. V., & Jassar, S. (2011). Saliva-An adjunct in forensic odontology. *Baba Farid University Dental Journal*, *2*(2), 144-147.

(53) Nanda, K. D. S., Ranganathan, K., Umadevi, K. M., & Joshua, E. (2011). A rapid and noninvasive method to detect dried saliva stains from human skin using fluorescent spectroscopy. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, *15*(1), 22.

(54) Auvdel, M. J. (1987). Comparison of laser and ultraviolet techniques used in the detection of body secretions. *Journal of Forensic Science*, *32*(2), 326-345.

(55) Auvdel, M. J. (1988). Comparison of laser and high-intensity quartz arc tubes in the detection of body secretions. *Journal of Forensic Science*, *33*(4), 929-945.

(56) Mittleman, R. E., Stuver, W. C., & Souviron, R. (1980). Obtaining saliva samples from bitemark evidence. *FBI L. Enforcement Bull.*, *49*, 16.

(57) Sweet, D., Lorente, M., Lorente, J. A., Valenzuela, A., & Villanueva, E. (1997). An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *Journal of Forensic Science*, *42*(2), 320-322.

(58) Cone, E. J. (1993). Saliva testing for drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *694*, 91-127.

(59) Rai B. Oral fluid in toxicology. Internet J Toxicol. 2006;3(2):1-5. Avaliable from: http://print.ispub.com/api/0/ispub-article/8140 [27 haziran 2022 tarihinde erişim sağlandı].

(60) Peel, H. W., Perrigo, B. J., & Mikhael, N. Z. (1984). Detection of drugs in saliva of impaired drivers. *Journal of forensic sciences*, *29*(1), 185–189.

(61) Samyn, N., & Van Haeren, C. (2000). On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. *International journal of legal medicine*, *113*(3), 150-154.

(62) Fletcher, SM, Dolton, P. ve Harris-Smith, PW (1984). Monoklonal antikor kullanılarak enzim bağlantılı immünolojik test (ELISA) ile kan ve tükürük lekelerinin tür tanımlaması. *Adli bilimler dergisi* , *29* (1), 67-74.

(63) Stimson PG, Mertz CA. Forensic Dentistry. Florida: CRC Press, LLC; 1997.

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

(65) Milo, R., Jorgensen, P., Moran, U., Weber, G., & Springer, M. (2010). BioNumbers—the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic acids research*, *38*(suppl_1), D750-D753.

(66) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1994). Molecular biology of the cell, Garland Publishing Inc. *New York*.

(67) Mattick, J. S., & Gagen, M. J. (2001). The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. *Molecular biology and evolution*, *18*(9), 1611-1630.

(68) 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.

(69) Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2007). *Biochemistry (Loose-Leaf)*. Macmillan.

(70) Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2019). *Lehrbuch der Biochemie*. John Wiley & Sons.

(71) Wei, J. W., Huang, K., Yang, C., & Kang, C. S. (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncology reports*, *37*(1), 3-9.

(72) Egloff, S., O'Reilly, D., & Murphy, S. (2008). Expression of human snRNA genes from beginning to end. *Biochemical Society Transactions*, *36*(4), 590-594.

(73) Harvey RA, Champe PC. Biyokimya. (Çeviri Ed: Ulukaya E) RNA yapısı ve sentezi, 3. Baskı Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2007, 413-444.

(74) Rossi J. J. (2005). Mammalian Dicer finds a partner. *EMBO reports*, *6*(10), 927–929. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400531

(75) Vennemann, M., & Koppelkamm, A. (2010). mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic science international*, *203*(1-3), 71–75. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.006

(76) Seto, A. G., Kingston, R. E., & Lau, N. C. (2007). The coming of age for Piwi proteins. *Molecular cell*, *26*(5), 603–609. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.021

(77) Chang, S., Wen, S., Chen, D., & Jin, P. (2009). Small regulatory RNAs in neurodevelopmental disorders. *Human molecular genetics*, *18*(R1), R18–R26. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp072

(78) Voorhoeve, P. M., & Agami, R. (2007). Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1775*(2), 274-282.

(79) Gnepp, D. R., Schroeder, W., & Heffner, D. (1989). Synchronous tumors arising in a single major salivary gland. *Cancer*, *63*(6), 1219-1224.

(80) Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H., & Zhang, X. (2013). MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. *Chemical reviews*, *113*(8), 6207-6233.

(81) Glynn C. L. (2020). Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA (New York, N.Y.)*, *26*(1), 1–9. https://doi.org/10.1261/rna.072173.119

(82) Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, *408*(6808), 86–89. https://doi.org/10.1038/35040556

(83) Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5543), 858–862. https://doi.org/10.1126/science.1065062

(84) Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5543), 862–864. https://doi.org/10.1126/science.1065329

(85) 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.

(86) Dørum, G., Ingold, S., Hanson, E., Ballantyne, J., Russo, G., Aluri, S., ... & Haas, C. (2019). Predicting the origin of stains from whole miRNome massively parallel sequencing data. *Forensic Science International: Genetics*, *40*, 131-139.

(87) Sauer, E., Extra, A., Cachée, P., & Courts, C. (2017). Identification of organ tissue types and skin from forensic samples by microRNA expression analysis. Forensic Science International: Genetics, 28, 99-110.

(88) Hooten, N. N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A. B., & Evans, M. K. (2010). microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. PloS one, 5(5), e10724.

(89) Anderson, S., Howard, B., Hobbs, G. R., & Bishop, C. P. (2005). A method for determining the age of a bloodstain. Forensic science international, 148(1), 37-45.

(90) Henssge, C., & Madea, B. (2007). Estimation of the time since death. Forensic science international, 165(2-3), 182-184.

(91) He, H. X., Ji, A. Q., Han, N., Zhao, Y. X., Hu, S., Kong, Q. L., Liu, Y., & Sun, Q. F. (2020). Identification of Peripheral Blood and Menstrual Blood Based on the Expression Level of MicroRNAs and Discriminant Analysis. Fa yi xue za zhi, 36(4), 514–518. https://doi.org/10.12116/j.issn.1004-5619.2020.04.016

(92) Fang, C., Zhao, J., Liu, X., Zhang, J., Cao, Y., Yang, Y., Yu, C., Zhang, X., Qian, J., Liu, W., Wu, H., & Yan, J. (2019). MicroRNA profile analysis for discrimination of monozygotic twins using massively parallel sequencing and real-time PCR. Forensic science international. Genetics, 38, 23–31. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.011

(93)Alshehhi, S., & Haddrill, P. R. (2020). Evaluating the effect of body fluid mixture on the relative expression ratio of blood-specific RNA markers. *Forensic science international*, *307*, 110116. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.110116

(94) Alshehhi, S., & Haddrill, P. R. (2019). Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers. *Forensic science international*, *298*, 58–63. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.046

(95) 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. https://doi.org/10.1007/s00414-009-0402-3

(96) Fang, C., Zhao, J., Liu, X., Zhang, J., Cao, Y., Yang, Y., Yu, C., Zhang, X., Qian, J., Liu, W., Wu, H., & Yan, J. (2019). MicroRNA profile analysis for discrimination of monozygotic twins using massively parallel sequencing and real-time PCR. *Forensic science international. Genetics*, *38*, 23–31. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.011

(97) Çinpolat, Ö. Tükürük bezi tümörlerinde mikroRNA ekspresyonu [Uzmanlık Tezi]. Mersin: Mersin Üniv. Tıp Fakültesi KBB Hastalıkları ABD, 2015

(98) An, J. H., Shin, K. J., Yang, W. I., & Lee, H. Y. (2012). Body fluid identification in forensics. *BMB reports*, *45*(10), 545–553. https://doi.org/10.5483/bmbrep.2012.45.10.206

(99) Acar, B. Adli tıpta vücut sıvılarının tanımlanmasında biyolojik marker olarak mikroRNAnın kullanımı [Uzmanlık Tezi]. Mersin: Mersin Üniv. Tıp Fakültesi Adli Tıp ABD, 2019

(100) 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. https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01894.x

(101) 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. https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.037

(102) Sauer, E., Reinke, A. K., & Courts, C. (2016). Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. *Forensic science international. Genetics*, *22*, 89–99. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.01.018

(103)Wang, Z., Zhang, J., Wei, W., Zhou, D., Luo, H., Chen, X., & Hou, Y. (2015). Identification of Saliva Using MicroRNA Biomarkers for Forensic Purpose. *Journal of forensic sciences*, *60*(3), 702–706. https://doi.org/10.1111/1556-4029.12730

(104) (103)Wang, Z., Zhang, J., Wei, W., Zhou, D., Luo, H., Chen, X., & Hou, Y. (2015). Identification of Saliva Using MicroRNA Biomarkers for Forensic Purpose. *Journal of forensic sciences*, *60*(3), 702–706. https://doi.org/10.1111/1556-4029.12730

(105) Dai, R., & Ahmed, S. A. (2014). Sexual dimorphism of miRNA expression: a new perspective in understanding the sex bias of autoimmune diseases. *Therapeutics and clinical risk management*, *10*, 151–163. https://doi.org/10.2147/TCRM.S33517

(106) Torley, K. J., da Silveira, J. C., Smith, P., Anthony, R. V., Veeramachaneni, D. N., Winger, Q. A., & Bouma, G. J. (2011). Expression of miRNAs in ovine fetal gonads: potential role in gonadal differentiation. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, *9*, 2. https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-2

(107) Li, M., Liu, Y., Wang, T., Guan, J., Luo, Z., Chen, H., Wang, X., Chen, L., Ma, J., Mu, Z., Jiang, A. A., Zhu, L., Lang, Q., Zhou, X., Wang, J., Zeng, W., Li, N., Li, K., Gao, X., & Li, X. (2011). Repertoire of porcine microRNAs in adult ovary and testis by deep sequencing. *International journal of biological sciences*, *7*(7), 1045–1055. https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1045

(108) Ro, S., Park, C., Sanders, K. M., McCarrey, J. R., & Yan, W. (2007). Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Developmental biology*, *311*(2), 592–602. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.009

(109) Cheung, L., Gustavsson, C., Norstedt, G., & Tollet-Egnell, P. (2009). Sex-different and growth hormone-regulated expression of microRNA in rat liver. *BMC molecular biology*, *10*, 13. https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-13

(110) Mujahid, S., Logvinenko, T., Volpe, M. V., & Nielsen, H. C. (2013). miRNA regulated pathways in late stage murine lung development. *BMC developmental biology*, *13*, 13. https://doi.org/10.1186/1471-213X-13-13

(111) Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2014). Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. *Molecular psychiatry*, *19*(7), 848–852. https://doi.org/10.1038/mp.2013.93

(112) Siegel, C., Li, J., Liu, F., Benashski, S. E., & McCullough, L. D. (2011). miR-23a regulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) contributes to sex differences in the response to cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(28), 11662–11667. https://doi.org/10.1073/pnas.1102635108

(113) Dai, R., McReynolds, S., Leroith, T., Heid, B., Liang, Z., & Ahmed, S. A. (2013). Sex differences in the expression of lupus-associated miRNAs in splenocytes from lupus-prone NZB/WF1 mice. *Biology of sex differences*, *4*(1), 19. https://doi.org/10.1186/2042-6410-4-19

(114) Libert, C., Dejager, L., & Pinheiro, I. (2010). The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nature reviews. Immunology*, *10*(8), 594–604. https://doi.org/10.1038/nri2815

(115) Wijchers, P. J., & Festenstein, R. J. (2011). Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. *Trends in genetics : TIG*, *27*(4), 132–140. https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.01.004

(116) Fish E. N. (2008). The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nature reviews. Immunology*, *8*(9), 737–744. https://doi.org/10.1038/nri2394

(117) Khan, D., Cowan, C., & Ahmed, S. A. (2012). Estrogen and signaling in the cells of immune system. *Advances in Neuroimmune Biology*, *3*(1), 73-93.

(118) Björnström, L., & Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, *19*(4), 833–842. https://doi.org/10.1210/me.2004-0486

(119) Castellano, L., Giamas, G., Jacob, J., Coombes, R. C., Lucchesi, W., Thiruchelvam, P., Barton, G., Jiao, L. R., Wait, R., Waxman, J., Hannon, G. J., & Stebbing, J. (2009). The estrogen receptor-alpha-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(37), 15732–15737. https://doi.org/10.1073/pnas.0906947106

(120) Panneerdoss, S., Chang, Y. F., Buddavarapu, K. C., Chen, H. I., Shetty, G., Wang, H., Chen, Y., Kumar, T. R., & Rao, M. K. (2012). Androgen-responsive microRNAs in mouse Sertoli cells. *PloS one*, *7*(7), e41146. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041146

(121) Coppola, V., De Maria, R., & Bonci, D. (2010). MicroRNAs and prostate cancer. *Endocrine-related cancer*, *17*(1), F1–F17. https://doi.org/10.1677/ERC-09-0172

(122) Shi, X. B., Xue, L., Yang, J., Ma, A. H., Zhao, J., Xu, M., Tepper, C. G., Evans, C. P., Kung, H. J., & deVere White, R. W. (2007). An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(50), 19983–19988. https://doi.org/10.1073/pnas.0706641104

(123) Pérez-Cremades, D., Mompeón, A., Vidal-Gómez, X., Hermenegildo, C., & Novella, S. (2018). miRNA as a New Regulatory Mechanism of Estrogen Vascular Action. *International journal of molecular sciences*, *19*(2), 473. https://doi.org/10.3390/ijms19020473

(124) Fujimoto, S., Manabe, S., Morimoto, C., Ozeki, M., Hamano, Y., Hirai, E., Kotani, H., & Tamaki, K. (2019). Distinct spectrum of microRNA expression in forensically relevant body fluids and probabilistic discriminant approach. *Scientific reports*, *9*(1), 14332. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50796-8