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

Danışman
Doç. Dr. Hüseyin ÇAKAN

POSTMORTEM DOKULARDA MİKROBİYAL DNA DEGREDASYONU

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

M. Sc. Tıbbi Bio. Özgür SEVİM
İSTANBUL, 2021

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

Danışman
Doç. Dr. Hüseyin ÇAKAN

POSTMORTEM DOKULARDA MİKROBİYAL DNA DEGREDASYONU

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

M. Sc. Tıbbi Bio. Özgür SEVİM
İSTANBUL, 2021

Önsöz

Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsünde doktora eğitimi almama olanak sağlayan, desteklerini esirgemeyen İ.Ü.C. Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü sayın **Prof. Dr. Faruk AŞICIOĞLU'na**,

Tezime katkıda bulunan ve tecrübelerini paylaşan Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı sayın **Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU TÜFEK'e,**

Sunulan tezin tüm aşamalarında akademik tecrübesi ve rehberliği ile yol göstericim olan ve beni her zaman cesaretlendiren doktora tez danışmanım sayın **Doç. Dr. Hüseyin ÇAKAN'a,**

Tezimin daha iyi bir noktaya taşınmasına sundukları katkıdan dolayı tez yürütme kurulu üyeleri sayın **Prof Dr. İbrahim ÜZÜN** ve **Doç. Dr Erdal POLAT'a,**

Tezimin Adli Tıp Kurumunda yürütülmesinde sağladıkları imkandan ve katkılarından dolayı Adli Tıp Kurumu Başkanı sayın **Doç. Dr. Yalçın BÜYÜK'e**, Adli Tıp Kurumu Başkan Yardımcısı sayın **Uz. Dr. Ömer MÜSLÜMANOĞLU'na,** Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi Başkanı sayın **Uz. Tıbbi Bio. Bestami ÇOLAK'a** ve mesai arkadaşlarıma,

Tezime katkıda bulunan deneyimini esirgemeyen sayın **Prof. Dr. Görkem YAMAN'a** ve **Doç. Dr. Ayfer MUTLU'ya** saygı ve minnetle teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatımda sevgi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem, babam ve aile büyüklerime, doktora eğitimim boyunca en büyük destekçim olan değerli eşim **Canan MUTLU SEVİM** ve ona ayıracağım zamandan feragat eden canım oğlum **Ali Kerem SEVİM'e** ayrıca teşekkür ederim.

Özgür SEVİM

İçindekiler

	Sayfa No
Önsöz……...	**i**
İçindekiler……...	**ii**
Tablo, Şekil ve Grafik Dizinleri……	**v**
Tablo Listesi……	**v**
Şekil Listesi……	**vi**
Grafik Listesi……	**vii**
Simgeler ve Kısaltmalar……	**viii**
Özet……	**ix**
Abstract……..	**x**
1. Giriş ve Amaç……	**1**
2. Genel Bilgiler……	**3**
2.1. Adli Bilimler ……	**3**
2.2. Mikrobiyoloji……	**4**
2.3. Adli Mikrobiyoloji……...	**5**
2.3.1. Mikroorganizmaların adli biyolojik örneklere etkileri……	**5**
2.3.2. Postmortem çürüme kavramı……	**6**
2.4. Adli DNA ……..……	**7**
2.4.1. PCR……..	**9**
2.4.2. PCR inhibitörleri……	**9**
2.5. DNA Degredasyonu……	**10**
2.5.1. DNA degredasyonunu etkileyen faktörler……	**10**
2.5.1.1. *Isı*……	**10**

2.5.1.2. *Nem*…… 11

2.5.1.3. *Oksidasyon*……. 11

2.5.1.4. *Ultraviyole*…….. 11

2.5.1.5. *Mikrorganizmaların etkileri*…….. 12

2.5.2. Postmortem DNA degredasyonu…… 13

2.5.3. Çeşitli doku ve organlarda postmortem DNA degredasyonu…….. 15

2.5.4. DNA degredasyonunun Real Time PCR'la belirlenmesi…… 15

2.6. Kayıp şahısların kimliklendirilmesi…….. 16

2.6.1 Kayıp şahısların kimliklendirilmesi için materyal seçimi …… 18

2.7. Genel mikrobiyolojik yöntemler…….. 18

2.7.1. DNA dizi analizi…….…… 19

2.7.2. MALDI-TOF MS……. 19

3. Gereç ve Yöntem……..…….. 23

3.1. Çalışma Tasarımı…… 23

3.2. Materyallerin toplanması ve muhafaza edilmesi…… 23

3.3. Biyolojik örneklerin laboratuvar çalışmaları ……...……..…… 23

3.3.1. Kültür yöntemleri……..…… 23

3.3.2. MALDI-TOF MS analiz yöntemi…… 27

3.4. Veri Analizi …… 29

3.5. DNA degredasyon seviyelerini skorlama yöntemi……..…… 29

3.6. Çalışmada kullanılan cihazlar ve gereçler…… 29

3.6.1. Doku hazırlamada kullanılan sarf malzeme ve cihazlar……..... 29

3.6.2. Kültürde kullanılan sarf malzeme ve cihazlar……. 30

3.6.3. MALDI-TOF MSanalizinde kullanılan sarf malzeme ve cihazlar 30

4. Bulgular……... 31

5. Tartışma ……. 37

6. Sonuç…….. 42

7. Kaynaklar……... 43

8. Ekler…….…….. 57

Ek 1: Adli Tıp Kurumu Çalışma İzni……..…….…… 57

Ek 2: Etik Kurul Kararı……..... 58

Ek-3: Farklı degredasyon seviyelerine yönelik elektrofereogram örnekleri.. 60

9. Özgeçmiş……..……... 64

Tablo, Şekil ve Grafik Dizinleri

Tablo Listesi

Sayfa No

Tablo I: DNA Degredasyon skorlama tablosu……. **29**

Tablo II: Kültür dokularında tespit edilen bakterilerin tür ve cins dağılımları……. **32**

Tablo III: Dokuların bulunduğu ortam ve üreyen bakterilerin şubelere göre dağılımı…… **34**

Tablo IV: Bakterilerin bulunduğu ortam ve degredasyon düzeylerine göre dağılımları…… **34**

Tablo V: Bakterilerin bulunduğu ortama göre dağılımları…… **35**

Tablo VI: Doku örneklerinde Real Time PCR yöntemi ile belirlenen degredasyon indeksleri…….. **35**

Tablo VII: Bakterilerin dokulardaki degredasyon oranına göre görülme oranları … **36**

Tablo VIII: Bakterileri şubelerinin degrede dokuya göre görülme sıklığı…… **36**

Şekil Listesi

Sayfa No

Şekil 1: MALDİ-TOF- MS çalışma prensibi…….. **19**

Şekil 2: MALDİ-TOF- MS analiz sonuçları gösteririr elektrofereogramlar…… **20**

Şekil 3: MALDI-TOF MS'in numune hazırlığı……... **21**

Şekil 4: Postmortem alınan doku örnekleri ve mikrobiyoloji kültür çalışmalarının yapıldığı ekim kabini…… **24**

Şekil 5: Örneklerin TSB (Triptic Soy Broth) sıvı besiyerine aktarımı……. **25**

Şekil 6: TSB sıvı besiyerine pasajı…… **25**

Şekil 7: 37ºC de etüvde inkübasyon…….. **25**

Şekil 8: İnkübasyonu tamamlanan TSB sıvı besiyerinden kanlı agar'a ekim işlemleri……. **26**

Şekil 9: Eksiltme (Azaltma) yöntemi ile besiyeri pasajı…… **26**

Şekil 10: Besiyerlerinin 37ºC'de 24-48 saat……. **26**

Şekil 11: Kanlı agarda üreyen mikroorganizmaların etüvde inkübasyonu……..... **26**

Şekil 12: 2 ve 5'nolu örnek plaklarında üreyen çeşitli mikroorganizmalar……. **27**

Şekil 13: Bruker Microflex LT cihazı…….. **28**

Grafik Listesi

Sayfa No

Grafik 1: Degrede dokularda üreyen bütün bakteri cinslerinin dağılım oranları….. **33**

Grafik 2: Degrede dokularda üreyen bakterilerin şubelere göre dağılımları……. **33**

Simgeler ve Kısaltmalar

ATK: Adli Tıp Kurumu

CHCA: α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid

CLA : Large Autosomal Quantitation

CSA: Small Autosomal Quantitation

DI: Degredasyon İndeksi

DNA: Deoksiribonükleik Asid

DNAse: Deoksiribonukleaz

DMS: Dimethyl sulphide

MALDI-TOF MS: Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight mass spectrometry

MNU: N-metil-N-nitrosourea

rRNA : Ribozomal Ribonükleik Asid

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

spp: species

STR: Short tandem repeats

TSB: Triptic Soy Broth

Özet

Deprem, sel ve tsunami gibi doğal felaketlerle veya başka nedenlerle ölüp, kimliği fiziksel olarak tespit edilemeyen cesetlerin kimliklerinin kesin bir şekilde tespit edilebilmesine olanak sağlayan Otozomal STR DNA analizi tüm dünyada ve ülkemizde yaygın olarak yapılan testtir. Bu gibi olaylarda bulunan cesetlerdeki DNA genellikle yüksek düzeyde degredasyona ve hasara uğramakta, bu nedenle cesetlerin kimliklendirilmesi ve yakınlarına hızlı bir şekilde teslim edilmesi süreci uzatmaktadır.

DNA hasarına en çok neden olan etkenler cesette ve çevrede bulunan mikroorganizmaların salgıladığı enzimlerdir. Mikroorganizmaların çoğaldığı postmortem bir biyolojik örneğe DNA analiz metotları uygulandığında degredasyondan dolayı doğru ve kesin sonuçların alınması zordur. Mikrobiyal enzimler DNA'nın hasara uğramasına, PCR amplifikasyonunun yetersiz veya hiç olmamasına böylece DNA elekrofereogramındaki pik seviyelerindeki düzensizliklere, anlamsız ve eksik piklerin görülmesine neden olmaktadır.

MALDI-TOF MS mikroorganizma tanımlanmasında kullanılan hızlı, pratik, ekonomik, doğru sonuç veren yeni bir yöntemdir. MALDI-TOF MS yöntemiyle yaptığımız çalışmalarda DNA profili kısmi olarak tespit edilmiş olan postmortem dokularda *Proteus sp. Lactobacillus sp. Streptecocuss sp. Bacillus sp.türü bakterilerin* yüksek miktarlarda olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Postmortem mikrobiyoloji, DNA degredasyonu, Adli bilimler MALDİ- TOF MS

Abstract

Autosomal STR DNA analysis is a common test in the world and in our country, which enables the determination of the exact identity of the bodies that cannot be physically identified due to disasters such as earthquakes, floods, tsunamis, and various other reasons. The DNA in the corpses found in such events is generally highly degraded and damaged, so it becomes difficult to identify the bodies and deliver them quickly to their relatives.

The most common causes of DNA damage are enzymes secreted by microorganisms in the body and the environment. When DNA analysis methods are applied to a postmortem biological sample where microorganisms multiply, it will be difficult to get accurate and precise results due to degradation. Microbial enzymes will cause damage to the DNA, insufficient or no PCR amplification, thus irregularities in the peak levels of the DNA electropherogram, and insignificant and incomplete peaks.

MALDI-TOF MS is a fast, cheap, and accurate method for microorganism identification. In our studies with MALDI-TOF MS method, in postmortem tissues whose DNA profile was partially determined, *Proteus sp. Lactobacillus sp. Streptecoccus sp. Bacillus sp.* type bacteria were found to be in high amounts.

Keywords: Postmortem microbiology, DNA degradation, Forensic science, MALDI-TOF- MS

1. Giriş ve Amaç

DNA teknolojisindeki yenilikler bu yüzyılın en önemli bilimsel gelişmelerinden biri olarak her alanda hayatımıza girmiştir (1). Özellikle tıp alanında kullanılan bu teknoloji günümüzde adli bilimler için vazgeçilmez hale gelmiştir. Kişiler arasındaki farklılıkları kimliklendirmede kullanılan kan grupları ve enzim analizleri yerine, bugün hızlı ve doğruluk oranı yüksek DNA incelemeleri kullanılmaktadır (2).

1900'lü yıllarda kullanılan analiz yöntemleri yüksek kalitede DNA örneğine ihtiyaç duyarken, PCR analiz yönteminin bulunması ile hasara uğramış DNA örneklerinden de sonuç alınmasına imkân sağlanmıştır. Bu teknolojik gelişmeler olay yerinden toplanan biyolojik örneklerin önemini daha da arttırmıştır (3).

DNA analizi; çeşitli adli suçlarda şüpheli şahısların tespit edilmesi, kitlesel felaketler ve diğer sebeplerle ölen kimliği belirlenemeyen cesetlerin kimliklendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (4,5). Bu tip vakalarda olay yerinden adli laboratuvarlara gelen kimliği belirsiz cesetlerden alınan çoğu zaman kokuşmuş ve çürümekte olan doku numunelerine yapılan DNA analizlerinden yetersiz sonuçlar alınabilmektedir. DNA hasarına en çok neden olan etkenler cesette ve çevrede bulunan mikroorganizmaların salgıladığı enzimlerdir (6). Mikroorganizmaların çoğaldığı postmortem bir biyolojik örneğe DNA analiz metotları uygulandığında degredasyondan dolayı doğru ve kesin sonuçların alınması güçtür. Mikrobiyal enzimler, DNA'nın hasara uğramasına, PCR amplifikasyonunun yetersiz veya hiç olmamasına böylece DNA elekrofereogramındaki pik seviyelerinde düzensizliklere, anlamsız ve eksik piklerin görülmesine neden olmaktadır. İleri derecede çürümüş ve yanmış cesetlerde kimliklendirme iskelet dokusu veya diş örneklerinden sağlanabilmektedir (4). Ancak bu dokulardan elde edilen sonuçlar uzun bir sürede sonuç vermektedir. Adli olayların çözümünde

doğru ve kısa zamanda kimliklendirme yapılması cesetlerin yakınlarına teslim edilebilmesi açısından önemlidir. Kas dokusu, tüm vücutta büyük bir kütleye sahip olması, materyal toplama ve DNA analizinin kısa sürede sonuçlandırmasından dolayı adli olayların kimliklendirilmesinde tercih edilen materyal olmuştur (7).

Bu çalışmanın amacı, postmortem kas dokularda üreyen mikroorganizmaların (bakteri) kimliklendirilmelerinin adli bilimler açısından önemini değerlendirerek, DNA analizini engelleyip engellemediğini tespit etmek, engelliyor ise hangi bakterilerin buna sebep olabileceğini belirlemektir.

Bakterilerin DNA analizini güçleştirdiği ve kimliği belirsiz cesetlerin kimliklendirme zamanını uzattığı kanıtlanırsa, kimliği belirlenmesi istenen cesedin çürüme ve kokuşması en az görülen dokusundan laboratuvara örnek gönderildiği taktirde en hızlı sonuç alınabileceği ve yakınlarına hemen teslim edilebileceği; ayrıca olay yerinden laboratuvara gönderilecek materyallerde mikroorganizmaların üremesini yavaşlatacak, kontaminasyonu engellenerek kuru bir ortam ve soğuk zincirle teslim edilmesinin önemi vurgulanacaktır.

2. Genel Bilgiler

Suç olaylarının aydınlatılmasında ve suçu işleyen kişinin belirlenmesinde, adaletin yerini bulmasında Adli Bilimler alanı gün geçtikçe önemini arttırmaktadır. Her bireyde farklı yapıya sahip DNA molekülü, olay yerinden elde edilen biyolojik delillerin kimliklendirilmesini yaparak Adli olayların aydınlatılmasını sağlamaktadır (8). Mahkemelerce kabul gören DNA analizleri günümüzde en değerli deliller arasında yerini almıştır (9-11).

Toplumsal afetlerde, savaş suçları, trafik ve uçak kazaları ile terörist saldırıları gibi olaylarda kimliği tespit edilemeyen ölü kişilerin kimliklendirilmesi gerekmektedir (4,5). Olay yerinden adli laboratuvarlara gelen kimliği belirsiz cesetlerden alınan çoğu zaman kokuşmuş ve çürümekte olan doku numunelerine yapılan DNA analizlerinden yetersiz sonuçlar alınabilmektedir. DNA hasarına postmortem dokulardaki mikroorganizmalar neden olmaktadır. Bu nedenle DNA'nın elde edilmesi, miktarının belirlenmesi, korunması, incelenmesi için yeni metotların geliştirilmesi kimliklendirmenin en önemli aşamasıdır (12).

2.1. Adli Bilimler

Adli Bilimler, hukuk sisteminin sorularına yanıt vermek amacı ile analiz yöntemleri ve bilgi birikimlerinden faydalanılan tüm bilim dallarının birlikteliği olarak tanımlanmaktadır (13). Adli Bilimler, genel olarak yasal sorunların araştırılmasında ve çözümlenmesinde bilimsel faaliyetlerin uygulanmasıdır. Biyoloji, kimya fizik ve tıp, adli bilimlerin başlıca disiplinlerini içermektedir. Her bir disiplin içerisinde, adli bilim araştırmalarında kullanılabilecek birçok alt kategori içermektedir ve en önemli görevi, suçu kimin işlediğini tespit etmektir. Suç yerinden elde edilen kanıtlar bu soruya yanıt vermede önemli bir rol oynamaktadır (14).

2.2. Mikrobiyoloji

Mikrobiyoloji kelimesi Yunanca'dan türemiş olup mikros, bios ve logos sözcüklerinin birleşiminden oluşmaktadır (15). Mikrobiyoloji, çapları genellikle 1 mm'den küçük olan mikroorganizmaları incelemektedir. Mikroorganizmaların yapılarını, metabolizmalarını, çeşitliliğini, genetik ve evrimini, ekolojisini, bulaşıcı hastalıklardaki rolleri ve diğer bilim dalları ile ilişkileri dahil tüm yönlerini de araştırmaktadır (16).

Mikrobiyolojide sınıflandırma (taksonomi), mikroorganizmaların (bakteri) benzerliklerine göre gruplandırıp adlandırarak yapılmaktadır (17). Mikroorganizma(bakteri) hücre yapısı, hücresel metabolizma veya hücresel bileşenlerindeki (DNA, 16 sRNA yağ asitleri, pigment v.b.) farklılıklarına göre sınıflandırılır. Günümüzde bakterin sınıflandırması "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" 'nin belirttiği kurallara göre yapılmaktadır (18). Sınıflandırmada aşağıdaki sıra izlenmektedir (18).

Alem (Regnum) (örn. *Bacteria)*
Şube (Phylum) (örn. *Firmicutes)*
Sınıf (Classis) (örn. *Clostridia)*
Takım (Ordo) ("ales" eki ile son bulur, örn. *Clostridiales*)
Aile (Familia) (aceae eki ile son bulur, örn. Clostridiaceae)
Cins (Genus) (örn. *Clostridium*)
Tür (Species) (örn. *Clostridium perfiringens*)

Proteobakteriler bakterilerin ana gruplarından birini oluşturmaktadır. *Proteus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter* gibi pek çok başka cinsler bu grubun içinde yer alır (19). *Proteobacteria*, evrimsel, jeolojik ve çevresel açıdan önemli bir mikroorganizma grubudur. *Proteobacteria* şubesi üyeleri değişken morfolojiye ve çok yönlü fizyolojiye sahiptir, bu da onlara çeşitli çevresel ortamlarda hayatta kalma konusunda imkân sağlar. *Proteobakteriler, Firmicutes* ve *Bacteriodeslere* göre insan bağırsak florasında daha az

bulunurken; toprak, bitkiler, deniz suyu, tatlı su gibi habitatlarda diğer şubelere göre daha yüksek oranda görülmektedir (20).

2.3.Adli Mikrobiyoloji

Adli bilimler alanında mikroplar fiziksel kanıt olarak kullanılma potansiyeline sahiptir, çünkü her yerde bulunurlar ve öngörülebilir ekolojilere sahiptirler (21). Adli mikrobiyoloji, patojenite belirleme, insan ve hayvan ölüm nedenlerini aydınlatmayı amaçlamıştır. Bu çalışmalar, Louis Pasteur, Robert Koch ve Joseph Lister olmak üzere mikrobiyoloji biliminin son derece önemli bilim insanları tarafından yürütülmüştür. 20. yüzyılın başlarında, özellikle belirsiz ölüm nedenlerinin sebeplerini bulmak amacıyla Postmortem Mikrobiyoloji kurulmuştur (22,23). Adli mikrobiyoloji, ölüm nedeninin belirlenmesi ve suçu işleyen kişilerin belirlenmesi ile ilgilenmektedir (24).

2.3.1. Mikroorganizmaların adli biyolojik örneklere etkileri

DNA tiplemesi için toplanan biyolojik materyaller, çeşitli yollardan gelebilecek mikroorganizmaları barındırmaktadır. Bir insan vücudu, vücut hücrelerinin on katı kadar mikrop barındırır. Bu normal mikrop florası, vücudun fizyolojik, metabolik ve immünojenik fonksiyonlarından sorumlu olmaktadır (25).

DNA tipleme analizi için toplanacak biyolojik numuneler, suç mahallindeki herhangi bir yerde bulunabilmektedir (26). Çevresel faktörler ve biyolojik örneklerin yanlış toplanması mikrobiyal kontaminasyona buna bağlı olarak da daha fazla degredasyona neden olabilmektedir. Numunelerin oda sıcaklığında taşınması ve depolanması, suda kalması ve havadaki nem oranı biyolojik örneklerin mikrobiyal bozunmasında önemli bir rol oynamaktadır (27).

2.3.2. Postmortem çürüme kavramı

Canlı dönemde iç organlardaki bakteri miktarı, vücudun savunma sistemleri ve bağışıklık tepkileri ile dengede kalmaktadır. Sağlıklı insanlarda, beyin, kalp, karaciğer ve dalak gibi iç organları sterildir (28). Vücudun ölüm sonrası ayrışma sırasındaki mikrobiyal değişiklikleri, öncelikle konağın sindirim sisteminden diğer organ ve vücut kısımlarına doğal göç ve çevre ile temas yoluyla meydana gelmektedir (29). Çürükçül bakteriler büyük ölçüde bağırsaklarda ve akciğerlerde bulunur ve sulu ortamlarda kolayca yayılmaktadır (30). Çürüme sırasında gözlenen karakteristik mikrobiyal türler arasında *Bacilli* ve *Pseudomonas, Bacterioides fragilis, Eschericia coli, Clostridium perfringens, Proteus mirabilis, Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus faecalis* bulunmaktadır (31). Bakterilerin vücudun farklı bölgelerine yayılması, lenfatik ve vasküler sistemin kılcal damarlarının mikrobik istilası ve solunum sisteminde mukus zarlarının istilası ile oluşur (32). Ölümden sonra vücut hücrelerinin otolizi sonucunda biyomoleküllerin hücresel düzeyde önemli ölçüde bozulması ve hücresel karbondioksidin (CO_2) artmasıyla birlikte hafif asidik, anaerobik ve mikroorganizmalar için besleyici bir ortam oluşmaktadır. Normalde koruyucu, savunma hücreleri ve bariyerleri olmayan bu verimli ortamda, ortam havasının ısısı ve nem oranına göre hem yayılma özelliği gösteren çevreden gelen mikroorganizmalar, hem de fırsatçı endojen mikroorganizmaların çoğalması hızlanmaktadır. Böylece bakteriyel çoğalma, vücuttaki tüm dokulara yayılarak onları etkilemektedir (33). Bakterilerin çoğalmasıyla başlayan ayrışma süreçleri, gazların ve diğer metabolik ürünlerin üretimine neden olmaktadır. Bu olaylar, çürüyen organik bir cismin ayırt edici özelliği olarak bilinen ve "çürüme" olarak adlandırılan bazı karakteristik renk değişiklikleri, şişkinlik ve koku değişikliklerine neden olur. Moleküler düzeyde, mikrobiyal bozunmanın etkileri, vücudun kompleks biyomoleküllerini gazlara, sıvılara ve basit moleküllere dönüştürülmesi olarak ortaya çıkmaktadır. Çürüme, yapısal bütünlüğün ve dokuların tanınabilirliğinin tamamen (aşamalı da olsa) kaybına, dokuların

bileşen moleküllerine, moleküler fragmanlarına ve atomlarına kadar indirgenmesiyle sonuçlanmaktadır (34).

Biyolojik deliller ve cesetler çeşitli toprak tiplerine sahip suç mahallerinde gömülü olarak bulunabilmektedirler. Topraktaki mikrobiyal ve fungal saprofitler gibi ayrıştırıcı organizmalar, enerji için potansiyel kaynaklar olarak kadavra çürümesi sırasında toprağa salınan organik materyali ve besinleri (örneğin karbon, azot, fosfor, vb.) kullanıp çoğalmaktadır. Ancak bu maddeler ortam pH'ı değiştirerek, çevreyi olumsuz hale getirir ve doğrudan ya da dolaylı olarak başka mikroorganizmaların çoğalmalarını engelleyebilmektedir. Vücut tarafından organik madde salımındaki bu değişiklik, yerel toprak mikrobik topluluğunun bileşiminde değişikliklere neden olabilmektedir (35). Çakan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada uzun süre beklemiş otopsilerde *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginos*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Bacteroides fragilis ve Acinetobacter lwoffi* bakterileri türlerini tespit etmiştir (36). Bir diğer otopsi çalışmasında ise C- reaktif proteini negatif olan 79 adet vakada Enterococcus *spp, Enterococcus faecalis, Klebsiella spp, Klebsiella pneumoniae, Leuconostoc spp., Bacillus spp., Lactobacillus spp., Streptococcus spp., Staphylococcus spp, Proteus spp., Vibrio spp.* cinsi bakteriler gözlemlenmiştir (37).

2.4. Adli DNA

Biyolojik materyallerin incelenmesi ve bireylerin kimliklendirilmesi ile ilgili çalışmalar 1900'lü yılların başlarına dayanmaktadır (9). DNA'nın hem canlı hem de ölü hücrelerde oldukça kararlı olduğu ve bozulmuş örneklerde bile varlığını devam ettirmektedir. Bu, DNA tipleme tekniğinin en büyük avantajlarından biridir (38).

İnsan vücudu yaklaşık 10 trilyon hücreden oluşmaktadır (39). DNA hücre çekirdeğinde (çekirdeksiz kırmızı kan hücreleri hariç) bulunmaktadır ve organizmanın genetik yapısını oluşturmaktadır. DNA'nın yapı taşı olan nükleotidler, belirli bir dizide bulunduğunda belirli fenotip oluşturan genetik bilgiyi depolamaktadırlar (40). Bununla birlikte, iki ayrı şahıs arasındaki ortalama nükleotid dizileri benzerlik oranı %99.5tir (41). Bireyler arasındaki farklılıkların tespitinde kullanılan polimorfizmi taşıyan kısım ise DNA'nın %0,5'lik bölümüdür. Bu bölümdeki farklıklar şahısların fiziksel görünümüne yansımaz ve tespit edilebilmeleri için bu bölgelere yönelik analizler gerektirmektedir (41).

DNA'nın belli bölgelerindeki polimorfizmlere dayanarak DNA üzerindeki kişisel ayrılıkların (farklılıkların) tespit edildiği yöntem "DNA Parmakizi Analizi" olarak adlandırılmaktadır (42). Günümüzde kısa ardışık tekrar dizilerindeki (STR) tekrar sayılarındaki bireysel farklılıklar tespit edilerek belirlenmektedir. Tekrar sekansları uzunluklarına göre farklı isimler almaktadırlar. Adli DNA analizlerinde yaygın bir kullanıma sahip olan STR'lar 2-6 bp'lik uzunlukta tekrar birimleri içermektedirler. Zarar görmüş DNA örneklerinden bile çalışmayı kolay hale getirmeleri açısından büyük avantaj sağlayan STR bölgeleri genomda hemen hemen bütün kromozomların üzerinde bulunmaktadırlar. STR bölgelerindeki tekrar sayısının bireyden bireye farklılık göstermesi ve düşük mutasyon oranına sahip olması kimliklendirme çalışmalarında STR'ları genetik işaretleyici olarak ön plana çıkarmaktadır (43).

PCR aracılığıyla STR analizi, DNA tiplemesi ve dizileme için yaygın yöntemlerdir (43). Adli tıp alanında babalık anlaşmazlıkları, kayıp şahısların kimlik tespiti, parçalanmış bedenlerin tespiti, cinsel saldırı vakaları ve suç mahallinde bulunan her çeşit biyolojik materyallerin menşeinin tespiti gibi birçok çeşitteki davaların çözümünde dünya genelinde kabul görmüştür. Çürümüş cesetlerin tanımlanması, adli genetik alanında rutin haline gelmiş çalışmalardır (44).

2.4.1. PCR

Polimeraz zincir reaksiyonu, herhangi bir organizmaya ait DNA'daki istenen bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan yöntem olarak tanımlanır. PCR, DNA aranması amacıyla ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiş, en güçlü moleküler biyolojik araçlardan biri durumundadır (45). PCR, bulaşıcı veya kalıtsal hastalıkların teşhisi, adli genetik analizler ve çok çeşitli örnek tiplerinde genetik analizler için kullanılabilir. PCR, genomik DNA'nın spesifik primer molekülleri kullanılarak bir DNA polimeraz tarafından katlanarak büyütüldüğü çok hızlı ve hassas bir yöntemdir (46). Esas olarak mekanizma yüksek ısıda yapısı bozulmayan bir DNA polimeraz kullanılarak, bir Thermo Cycler aracılığı ile DNA replikasyonunu invitro ortamda tekrarlanması sonucu DNA'nın çoğaltılmasını sağlamaktadır.

PCR tekniği sağladığı birçok avantajdan dolayı adli bilimler alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (47). Bunlardan biri çok az miktarda biyolojik materyalden DNA'nın çoğaltılabilmesidir. Teorik olarak nükleuslu tek hücre sonuca varmak için yeterli olmaktadır. Örneğin saç kılı, sigara izmariti üzerindeki dudak epiteli, kemik, kan lekesi, vajinal sıvı ile karışmış semen ve tırnak altından alınan dokular yeterli olmaktadır. Dolayısıyla kriminal olaylarda her türlü biyolojik delilden identifikasyon yapma olasılığı artmıştır. Özellikle eski ve hasara uğramış DNA ile çalışılırken tercih edilmektedir (48).

2.4.2. PCR inhibitörleri

PCR enzimatik bir reaksiyondur ve bu nedenle inhibitörlere duyarlıdır. PCR üzerinde olumsuz etkisi olan tüm maddeleri içeren PCR inhibitörlerinin olması, PCR için büyük bir dezavantajdır. PCR inhibitörleri numuneden kaynaklanabilir veya numune işleme veya nükleik asit ekstraksiyonu sırasında ortamda bulunabilmektedir. PCR'ın kısmen veya tamamen inhibisyonunun ana sonucu olarak, azalmış duyarlılık veya negatif sonuçlar ortaya çıkmaktadır (49). Bir inceleme örneği birçok farklı inhibitörü içerebildiği gibi, aynı inhibitörler farklı materyal kaynaklarında da bulunabilmektedir (50).

2.5. DNA Degredasyonu

Adli genetik uzmanları genellikle zorlu çevre koşullarına maruz kalan biyolojik numunelerle ilgilenmektedir (51). İç veya dış faktörlerin etkisiyle genetik materyalin moleküler bütünlüğünde meydana gelen tüm değişiklikler "DNA Hasarı" olarak tanımlanmaktadır (52). DNA'nın kimyasal veya fiziksel yollarla daha küçük parçalara ayrılması, insan kalıntılarının veya suç lekelerinin genetik tanımlaması için STR tiplemesi zorlaşmaktadır (51). Canlılardaki DNA hasarı, vücut tarafından onarım mekanizmaları ile bir şekilde ortadan kaldırılmaktadır, ancak ölüm sonrası hücre yapısı bozulur ve DNA, endojen enzimler (nekroz, otoliz) ve harici mikrobiyal türevli deoksiribonükleazlar (çürüme) ile parçalanmaktadır. Isı ve nem, enzimatik DNA parçalanma oranını etkileyen iki faktördür (53).

2.5.1. DNA Degredasyonunu etkileyen faktörler

DNA bozunma oranı, bakteriyel kontaminasyon ışık, nem ve sıcaklığa bağlı olarak, DNA örnekleri arasında değişiklikler göstermektedir (54). Bakteriyel, fungal kontaminasyonlar ve ardından bu mikroorganizmaların çoğalması, yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA'nın hızla fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal degredasyonuna yol açabilmektedir. Ortalama DNA fragman uzunluğu 300 bp'den daha küçük bir boyuta indirildiğinde, PCR için uygun şablon DNA'nın bulunmaması ve ardından STR amplifikasyonunun başarısız olması nedeniyle bir genetik bilgi kaybı meydana gelmektedir (55).

2.5.1.1. *Isı*

Biyolojik materyalin bozunması, bir dizi kimyasal reaksiyonun sonucu olarak meydana gelmektedir ve otoliz, 34ºC –40ºC'de maksimum kimyasal aktivite göstermektedir. Tüm kimyasal reaksiyonlar, sıcaklıktaki her 10º C' lik artış için reaksiyon hızında iki ila üç kat artışla, sıcaklıktan büyük ölçüde etkilenmektedir. Ek olarak, sıcaklık, mikrobiyal büyümeyi teşvik eden

daha yüksek sıcaklıklarla biyolojik ayrışma ile ilişkili mikrobiyal aktiviteyi etkiler. Bu nedenle, daha düşük sıcaklıklar genel olarak DNA'nın korunmasına yardımcı olmaktadır (56).

2.5.1.2. *Nem*

Cesetlerin ve biyolojik materyalin bulunduğu ortamında su ve nemin varlığı biyolojik ayrışmayı etkilemektedir (57). Su molekülleri, DNA moleküllerini parçalayan ve modifiye eden hidrolitik reaksiyonlara katılmaktadırlar. Hidrolik reaksiyonlar deaminsyon ve depurinasyona neden olmaktadır. Genel olarak, biyolojik materyalin bulunduğu ortamda ne kadar fazla su veya nem varsa, DNA hasar olasılığı o kadar artmaktadır (58). Tropikal iklimlerde sel, tsunami ve suda kalmış mağdurlarının kurtarılması gibi doğal ve kitlesel afet durumlarında bu tür hidrolize sıkça rastlanmaktadır. Bununla birlikte, belirli su ortamlarının, diğer çevresel değişkenlerin etkisiyle DNA'nın etkilenme durumu değişkenlik göstermektedir (59). Su kaybı hücrenin kimyasal aktivitesini yavaşlatarak ve mikrobiyal çoğalmayı azaltarak DNA'yı hasara karşı korumaktadır (60).

2.5.1.3. *Oksidasyon*

Süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri, ölüm sonrası dokularda kolonize olan anaerobik bakteriler tarafından üretilir (61). Bu reaktif oksijen türlerinin artması, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması lezyonlara neden olarak hasara neden olmaktadır. Ek olarak, oksijen seviyeleri, mikrobiyal ayrışmanın oranını ve kapsamını etkiler. Bu nedenle, oksijen bakımından zengin ortamlar daha fazla DNA bozulmasına yol açmaktadır (62).

2.5.1.4. *Ultraviyole*

Pirimidin dimerleri, DNA ultraviyole ışığa maruz kaldığında çapraz bağlanan bitişik timin (T) veya sitozin (C) baz çiftleridir. Fotokimyasal maruz kalma, PCR sırasında replikasyonu durduran C = C veya T = T çift bağlarının oluşmasını indüklemektedir (63).

2.5.1.5. *Mikrorganizmaların etkileri*

Hem endojen hem de eksojen mikroorganizmalar biyolojik ayrışmaya katkıda bulunmaktadır. Ölümden sonra bağışıklık sisteminin durmasıyla birlikte mikroplar hızlıca çoğalmaktadır. Büyük miktarlarda mikrobiyal türlerin varlığı, ayrışma sırasında insan hücrelerinden serbest kalan DNA'nın geleceği için önemlidir. Mikroplar hücre ve dokuların protein bileşenini sindirerek DNA'yı hasara daha yatkın hale getirmektedirler. Bu DNA'nın kalıcılığını etkileyen en önemli faktörlerdendir (6). Hasar, DNA'nın küçük parçalara ayrılmasına neden olur ve DNA analizinin sonuçlarını etkilemektedir. Mikroorganizmalar, DNA moleküllerini parçalayan DNAse enzimleri üretmektedir. DNAselar, fosfodiester bağlarını parçalayarak DNA hidrolizini katalize etmektedirler. Bu DNAselar, DNA'yı yapı taşlarına (deoksiriboz, inorganik ortofosfat ve azotlu bazlar) böler ve daha sonra mikrobiyal topluluklar tarafından bir karbon, nitrojen ve fosfor kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. *Escherichia coli* ve *Serratia marcescens* gibi bazı bakteri türleri karbon kaynağı olarak DNA bileşenlerini kullanmaktadır (64).

Mikroorganizmalar çeşitli yollar vasıtasıyla biyolojik numuneleri kontamine ederek, DNA tipleme analizinde sorunlara neden olmaktadırlar (65). DNA degredasyonu veya hasarı, DNA tipleme tekniklerinde sonuç elde edememenin başlıca nedenlerinden biridir. Bu bağlamda, *Pseudomonas putida ve Pseudomonas deceptionensis'in* bakteri izolatlarının, DNA'ya zarar veren potansiyel bir ajan olan dimetilsülfit (DMS) üretmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından başka bir güçlü mutajen olan N-metil-N-nitrosourea'nın (MNU) sentezine yol açmaktadır. Hem DMS'nin hem de MNU'nun DNA sekansında çoğunlukla alkilleme aktivitesi ile mutasyona neden olmaktadırlar (66). DNA moleküllerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yoluyla in vitro amplifikasyonu şu anda uygulanan STR-tabanlı DNA tipleme tekniğinin temelidir. DNA polimeraz, adli biyolojik numunelerde proteaz üreten mikropların kontaminasyonundan kaynaklanabilen PCR sürecinin inhibisyonu için iyi bir

hedeftir. *Pseudomonas aeruginosa, Streptomyces griseus, Staphylococcus aureus ve Aerococcus* gibi kontamine edici mikroplardan sentezlenen proteazlar, DNA polimeraz enzimini parçalayabilmektedirler. *Streptococcus agalactiae, Pseudomonas spp. Staphylococcus aureus ve Plasmodium spp.* gibi birçok pigment üreten mikrop DNA tiplemesinde kullanılan primerlerin floresan problarını engelleyebilir duyarlılıklarını azaltarak DNA tiplemesini engelleyebilmektedir (67).

2.5.2. Postmortem DNA degredasyonu

Çürümeye uğramış dokudan elde edilen numunenin analizinde, taze dokudan elde edilen bir numuneye kıyasla kalitesiz DNA elde edilmesine neden olmaktadır. Böyle bir durum (STR) analizinde alel kayıplarına neden olmaktadır (68). Hücresel ölüm, kan akışının kesilmesi oksijen ve besin maddelerinin tükenmesinden kısa bir süre sonra, apoptoz veya nekroz yoluyla başlamaktadır. Programlanmış enerjiye bağımlı (ATP) hücre ölümü olan apoptoz, stoplazma yoğunlaşması hücre küçülmesi ve büzüşmesi ile karakterizedir (69). Nekroz sırasında, lizozomlardaki içerik hücre içi matrise dökülür ve otoliz süreci başlamaktadır (70). Otoliz sırasında, sindirim enzimleri hücre ve çekirdek zarlarını parçalamakta ve hücrenin içeriğini hücre dışı matrise salmaktadırlar. Lizozomlar tarafından salınan bir sindirim enzimi kategorisi nükleazlardır. Bu nükleazlar hücre içi ortama salındığında ciddi DNA hasarına neden olmaktadırlar. Bu enzimlerin çoğu asidik pH'da aktiftir ve bu ortamda biyomolekülleri parçalayabilmektedir. Histon proteinlerinin (kromatin yapısında yer alan başlıca proteinler) lizozomal proteazlarla bileşenlerine ayrılması, endonükleazlarla DNA bölünme işlemini kolaylaştırmaktadır. Ölüm sonrasında oluşan DNA fragmanları, konak hücreler tarafından salınan endojen nükleazlar veya mikroorganizmalar ve çevresel omurgasızlar tarafından salınan eksojen nükleazlar tarafından bozulmaya maruz kalmaktadırlar (71).

Endojen enzimlerin ilk saldırısından sonra DNA, vücudun hem içinde hem de dışında bulunan mikroplar tarafından daha da bozulmaktadır. Ayrıca hidrolitik ve oksidatif kimyasal reaksiyonlar, parçalanma ve kimyasal modifikasyon yoluyla moleküllere zarar verdiğinden, DNA yıkımı uzun süre devam etmektedir. Analiz edilebilir DNA, kemiklerde ve dişlerde vücudun yumuşak dokularındakinden çok daha uzun süre kalmaktadır (72). Çünkü kemiklerin ve dişlerin sert yapısı DNA bozulmasına karşı bir miktar koruma sağlamaktadır. DNA molekülleri, sert dokuların hidroksiapatitine kimyasal olarak bağlanmakta, bu da DNA'yı stabilize etmekte ve bozulmaya karşı bir miktar koruma sağlamaktadır (72). Hücre ölümlerinin ilerleyen aşamalarında hücre zarlarının yırtılması, besin açısından zengin sıvıların çevreye salınmasına yol açar ve bu durum çevresel mikroorganizmaların çoğalmasını sağlayarak, makromoleküllerin daha fazla degredasyonuna neden olmaktadır. Toprakta yaşayan mikroorganizmaların %70'ten fazlası nukleaz enzimlerine sahiptir. Çoğunlukta olan toprak mikroorganizmaları, nükleik asitleri ve bunların parçalanma ürünlerinin çoğunu ayrıştırabilir. Hofreiter ve arkadaşları uygun besinlerin mevcudiyeti, pH, elektron alıcıları ve vericileri, iyonik konsantrasyon ve toksik metal iyonlarının yokluğu gibi faktörler, hangi mikrobik toplulukların postmortem dokuyu kolonize edeceğini göstermiştir (74).

2.5.3. Çeşitli doku ve organlarda postmortem DNA degredasyonu

Tüm organlar eşit derecede DNA bulundurmamaktadırlar. Beyin korteksinde, lenf düğümlerinde ve psoas kasında, ölümden sonraki 3 haftalık bir süre boyunca DNA miktarı stabil kalmaktadır (75). Buna karşılık dişler ve kemikler, aylar ve yıllar sonra bile iyi bir DNA kaynağı görevi görmektedirler. Baş ve uzuvların, esas olarak daha yüksek bir yumuşak doku kütlesinin varlığına bağlı olarak, vücut gövdesine kıyasla daha hızlı bir oranda ayrışmaktadır. Prostat veya uterusun çürümeye uzun süre dayandığı kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bozunma hızı vücuttan vücuda değişir ve ayrıca bir dizi çevresel faktöre bağlıdır (28,76).

Çalışmalar, insanlardan alınan iskelet kası hücrelerinin izole edilebileceğini ve ölümden sonra 17 gün boyunca canlı ve işlevsel kalabileceğini göstermiştir (77). DNA analizi, şahsın kesin tanımlanmasını yaparken fiziksel özelliklerini, etnik kökeni ve cinsiyeti hakkında ayrıntılı bilgi sunmaktadır (78). Günümüzde güvenirlilik düzeyi yüksek DNA analizleri kullanılması sebebiyle mahkemeler tarafından yasal deliller olarak kullanılmaktadır (79).

2.5.4. DNA degredasyonunun Real Time PCR'la belirlenmesi

Günümüzde DNA kantitasyonu uygulaması ile örnek üzerindeki total DNA miktarı DNA'nın degredasyona uğrayıp uğramadığı veya uğradıysa ne oranda degrede olduğu saptanabilmektedir (80). Örnekler üzerinde PCR (polymerase chain reaction) inhibitörlerinin varlığı ve hangi inhibitörlerin olduğu tespit edilebilmektedir. DNA'nın kalitesi ve miktarı bilinmezse uygun PCR metodu uygulanamamasından dolayı eksik veya düzensiz lokus alelleri ortaya çıkmaktadır. Kantitasyonun yapılmadığı durumlarda uygun PCR metodu sağlanana kadar tekrarlayan çalışmalar yapılarak zaman ve ekonomik kayıplar meydana gelmektedir (81). Real-time PCR DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek tüpte belirlemeyi mümkün kılan yaygın bir metotdur. Bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. Real Time PCR monitör ile görüntülenen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile paralel olarak arttığı bir çoğaltma işlemidir (82). Real Time PCR'da kullanılan Quantifiler Trio Kit'in küçük amplikon sinyalinden elde edilen kantitasyon verileri, örneklerin konsantrasyonunu belirlemek için kullanılırken, büyük amplikon sinyalinden gelen veriler yalnızca örneklerdeki DNA bozunma düzeyini değerlendirmek için kullanılmaktadır (83). Büyük DNA fragmanları, daha küçük fragmanlara göre bozulmaya daha duyarlı olduğundan, iki probdan gelen sinyaller arasındaki oran Degredasyon İndeksini (DI) belirlemek için kullanılabilir.

"DI = CSA/CLA"

CSA, numunedeki küçük otozomal prob konsantrasyonudur ve CLA daha büyük olanıdır. Dolayısıyla, DI, bir numunedeki bozulma seviyesinin genel bir göstergesini temsil eder; burada Degredasyon İndeksi ne kadar yüksekse, degredasyon seviyesi o kadar yüksektir (84).

Degredasyon derecesi 4 seviyede bulunmaktadır: Degredasyon İndeksi 0-1,5 seviyesinde ise "*degredasyon yok"*, 1,5-4 seviyesinde "*hafif degredasyon"*, 4-10 seviyesinde ise "*degredasyon"*, 10'dan büyük değerlerde "*şiddetli degredasyon"* varlığından söz edilmektedir (83).

2.6. Kayıp şahısların kimliklendirilmesi

Bir şahsın tanınmasında ve diğer insanlardan ayırt edilmesinde baskın olan özelliklerin tümüne "kimlik", yaşayan ya da ölü bir kişinin bu özelliklerinin belirlenmesine ise "kimlik tespiti" denilmektedir (85). Canlıda ve ölüde pek çok farklı nedenden dolayı kimlik tespiti yapmak gereklidir. Adli tıp ve hukuk uygulamalarında iki tür kimlik tanımlanmaktadır. "Adli kimlik" bireyin nüfus kayıtlarında bulunan bilgiler, "Tıbbi kimlik" ise tüm vücut özelliklerinin birlikte değerlendirilmesinin sonucu ortaya çıkan kimliktir. Bir kişinin tıbbi kimliğini oluşturan fiziksel yapıların başında yaş, cinsiyet, parmak izi, kemik ve dişler gelmektedir (86).

Adli kimliklendirme, ölen bireyin akrabaları ve yakınları tarafından tanınması ile yapılabilmekte. Ancak cesedin tanınamaz olduğu durumlarda, DNA temelli adli genetik çalışmalar ön plana çıkmaktadır (87). İleri derecede çürümüş ve yanmış cesetlerde kimliklendirme iskelet dokusu veya diş örneklerinden sağlanabilmektedir (4). Ölen bir şahsın kimliklendirilmesi genellikle yara izleri, dövmeler ve parmak izleri gibi belirli dış özellikler, tıbbi implantlar ve diş muayenesi gibi ölüm öncesi ve sonrası verilerin karşılaştırılması ve genetik analiz yoluyla gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, aşırı sıcaklık değişimi ve

fiziksel koşulların etkili olduğu kitlesel afetlerde bu yöntemlerin çoğunun başarısız olduğu veya hiç uygulanamadığı durumlar bulunmaktadır (88).

DNA'nın korunma derecesi, cesedin ortamda kalma süresi ve çevresel ortamın şartlarına bağlıdır. İnsan cesetleri kötü şekilde bozunmaya uğrayabilir veya parçalara ayrılmış halde bulunabilmektedirler (örneğin patlamalarda, toplu mezarlarda farklı cesetlerin parçaları birbirine karışmış halde bulunabilmektedirler (89). Kayıp bir şahsın akrabalarından toplanan referans örnekler (bukkal svap ya da kan ve/veya kan lekesi örnekleri) veya sağlık kurumlarında arşivlenen doku örnekleri kimliklendirme amacıyla kullanılmaktadır. Vaka ister tek bir birey olsun ister büyük ölçekli bir felaketteki gibi birçok şahsı içeriyor olsun mağdurları teşhis etme yeteneği adli bilimin sağlayabileceği önemli bir hizmettir. Günümüzdeki teknolojik ilerlemeler, DNA miktarının az ve degrede olduğu örneklerde de DNA analizlerinin yapılmasına olanak sağlamaktadır. Ancak bu gelişmelere rağmen bugün bile bazı durumlarda DNA analizi başarısız olmaktadır (90).

2.6.1 Kayıp şahısların kimliklendirilmesi için materyal seçimi

Genetik analiz için biyolojik materyallerin seçimi, insan kalıntılarının durumuna bağlıdır. Yumuşak doku ve kas dokusundan alınan örnekler kemik ve diş örneklerinden daha kısa sürede sonuç vermektedir (91). Fakat daha hızlı çürümeye ve DNA degredasyonuna uğrarlar ve tam bir DNA verisi ortaya çıkmayabilmektedir. Kemik örneklerinin çalışılması daha fazla ekipman, iş gücü ve süre gerektirmektedir. Özellikle toplu felaketlerde çok sayıda kemik örneği çalışılacağı için kontaminasyon sorunu da ortaya çıkmaktadır (92). Kas dokusundan tam bir DNA profili elde etmek için az miktarda doku yeterli olmaktadır. Yayınlanmış kılavuzlar 1 g kas alınmasını önermektedir. Çoğu durumda 100 mg doku (3-4 mm^3) analiz için yeterli DNA sağlamaktadır (93). Yüzey kası diğer vücut DNA ile temas yoluyla kontamine olabileceğinden, mümkün olduğunca derin dokulardan örnekler alınmaktadır. Görünür çürüme veya ayrışma

belirtisi göstermeyen vücudun diğer bölümlerinden çift numuneler alınmaktadır. Deri örnekleri ve ölüm sonrası kan örnekleri zayıf DNA kaynakları olmaktadır (94).

2.7. Genel Mikrobiyolojik Yöntemler

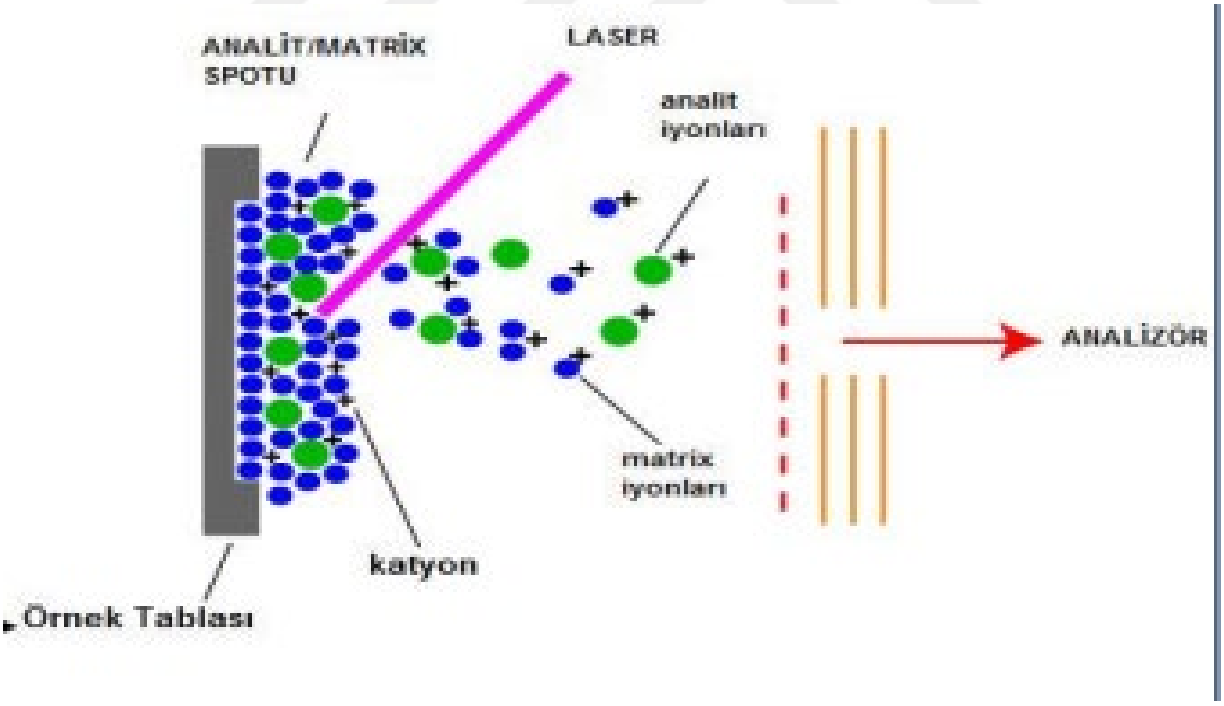
Son yıllarda mikrobiyoloji laboratuvar hizmetlerinde tanı tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanmasına yönelik olarak birçok yenilikler ve teknolojik gelişmeler görülmektedir. Geleneksel mikroskopi, kültür ve biyokimyasal test teknikleri, uzun zamandan beri mikroorganizmaların tanımlanması ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinin temel dayanağı olmuştur (95). Bu testler temel dayanak ve standart uygulama olarak çoğu laboratuvarda kullanılırken, DNA analizler ve kütle spektrometresi gibi yeni teknikler giderek daha fazla laboratuvarda kullanılmaktadır. Bazı durumlarda, bunlar mevcut teşhis algoritmalarını geliştirmekte ve geleneksel test yaklaşımlarının yerini almaktadır (96).

2.7.1. DNA dizi analizi

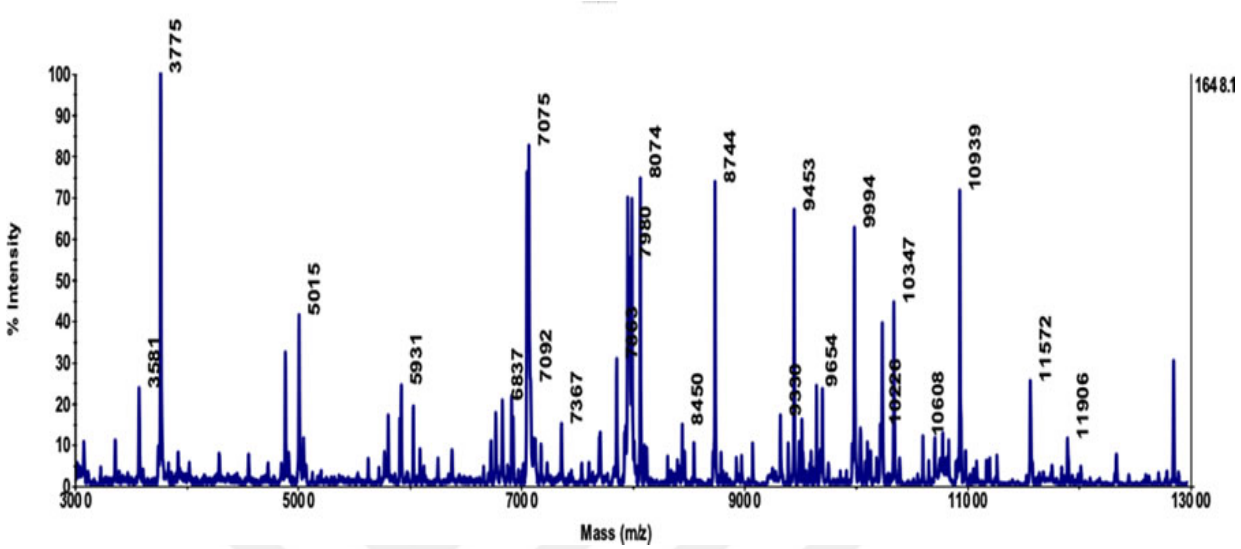
DNA Dizi Analizi son yıllarda büyük ilerlemeler göstermiştir. DNA dizi analizlerindeki teknolojik gelişmeler ve otomasyon bakterilerin tür ve cins seviyesinde tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (96). 16S rRNA bölgeleri çok az değişikliğe uğrayan korunmuş bölgelere ve veri tabanına sahip olduğundan mikroorganizmaların tespit edilebilmesi için 16S rRNA dizi analizi en iyi yöntemlerden biri olmuştur. Ayrıca bakteriyolojik çalışmalar sonucunda elde edilen kültür kolonisinden ve alınan postmortem biyolojik örneklerden kolayca analiz edilebilecek en uygun yöntemlerdendir. Elde edilen DNA dizileri daha sonra organizmayı tanımlamak için referans veri tabanları ile karşılaştırılmaktadır. Yaygın olarak organizma tanımlaması için başarılı bir test olarak görülmekle birlikte yüksek maliyeti mikrobiyoloji laboratuvarında rutin kullanımını engellemektedir (98).

2.7.2. MALDI-TOF MS

Adli ve klinik mikrobiyoloji alanında karşılaşılan sorunların etkili yönetimi için örneklerden bakterilerin hızlı ve doğru tanımlanması önemlidir (99). MALDI-TOF MS yöntemi ile mikroorganizma(bakteri)lara ait biyomoleküllerin ve organik makromoleküllerin iyonize edilip, manyetik bir ortamdan geçirilerek protein yapıları belirlenmektedir (Şekil 1), (100). Elde edilen spektrumlara ait monitör görüntülerin sistemin veri tabanındaki referans mikroorganizmalarla karşılaştırılması ile mikroorganizmaların cins ve türleri kısa süreler içinde tespit edilebilmektedir (Şekil 2), (101-103).

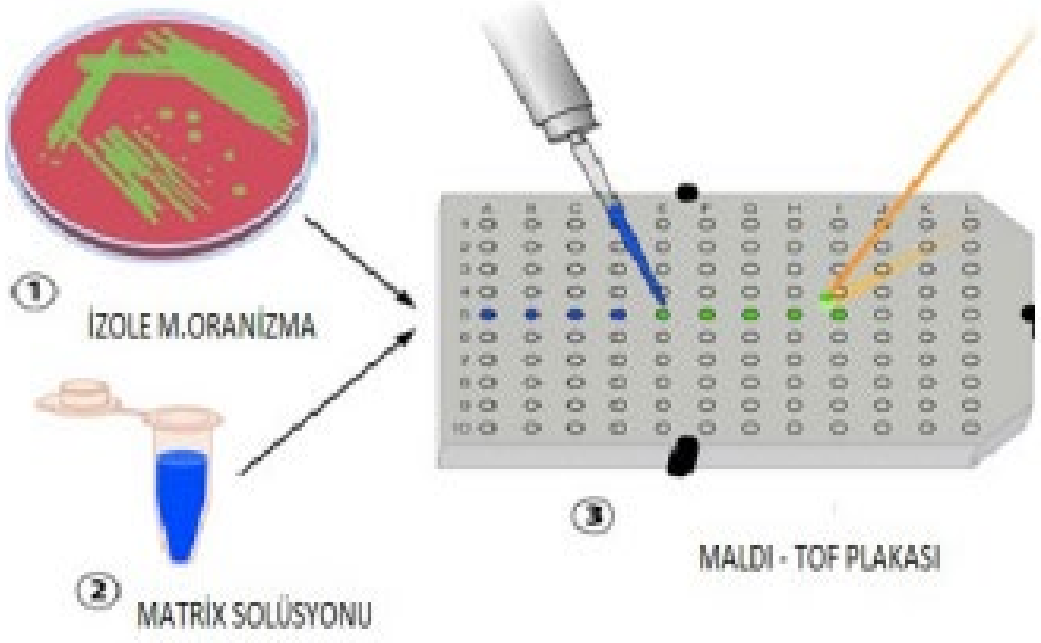


Şekil 1. MALDİ-TOF MS çalışma prensibi *(100)*



Şekil 2. MALDİ-TOF MS analiz sonuçları gösteririr elektrofereogramlar (101)

MALDI -TOF MS tarafından analiz edilecek olan numune, matriks adı verilen enerji emici, organik bir bileşik çözeltisi ile karıştırılarak veya kaplanarak hazırlanmaktadır (Şekil 3), (104). Matriks kristalleştiğinde, matriks içine hapsedilmiş olan numune aynı zamanda birlikte kristalleşmektedir. Matriks içindeki numune, lazer ışını ile otomatik bir modda iyonize edilmektedir. Lazer ışını ile desorpsiyon ve iyonizasyon, numunedeki analitlerden protonlanmış iyonlar üretmektedir. Protonlanmış iyonlar daha sonra sabit bir potansiyelde hızlandırılarak kütle-şarj oranları temelinde birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Yüklenen analitler, dörtlü kütle analizörleri, iyon tuzak analizörleri, uzunluk analizörleri gibi farklı tipte kitle analizörleri kullanılarak belirlenmekte ve ölçülmektedir. Mikrobiyolojik uygulamalar için çoğunlukla TOF kütle analizörleri kullanılmaktadır (105).



Şekil 3. MALDI-TOF MS numune hazırlığı (104)

Günümüzde kullanılan MALDI-TOF MS teknikleri kültür için kullanılan besiyerlerinden ve üreme koşullarından etkilenmeden çalışmaktadır fakat analiz için alınacak koloninin eski olmaması tercih edilmektedir (106). Eski olan kültürlerde tanımlama için gerekli olan ribozomal protein yapılarında bozulmalar görülmektedir. Biyolojik örnekten elde edilen bilgilerin veri tabanındaki bilgilerle karşılaştırılması sonucunda "Bakteriyel Tanımlama" işlemi yapılmaktadır. Besi yerindeki kolonilerden doğrudan tanımlama yapılabilmektedir. Tanımlama yapılamadığı zaman koloniye ek protokol çalışmaları yapılarak sonuç alınabilmektedir (107).

MALDI-TOF MS yöntemi mikrobiyolojik tanımlama için yeni bir yöntem olduğundan bakterilerin tanımlanma için gerekli olan spektrum referans değerleri her geçen gün veritabanına işlenmekte ve bakterilerin büyük çoğunluğu cins ve tür bazında tanımlanabilmektedir. Rutin bakteri izolatlarında MALDI-TOF MS'in tür bazında doğru tanımlama oranı %90 -95 seviyelerine ulaşmıştır (108).

Yapılan araştırmalar, geleneksel mikrobiyolojik yöntemlere göre doğruluk açısından MALDI-TOF'un daha kesin bir sonuç verdiğini bildirmektedir (102). Moleküler yöntemlerle karşılaştıracak olursak; moleküler yöntemler pahalı ve rutin çalışan laboratuvarlar için uygun değildir. Bu yöntemlerle tek test ile sınırlı sayıda mikroorganizma (bakteri) için analiz yapılabilmektedir ayrıca sonuç için gerekli olan süre de MALDI-TOF MS'den daha uzundur (109). MALDI-TOF MS hızlı tanımlama yapılmasına imkân veren, yeni gelişmekte olan ve yakın bir gelecekte cihazın yaygınlaşması ve fiyatının ucuzlaması ile konvansiyonel ve otomatize bakteri tanımlama yöntemlerinin yerine kullanılabilecek bir yöntemdir (107).

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Çalışma Tasarımı

Çalışmada kullanılacak materyaller ATK Biyoloji İhtisas Dairesine "Kimlik Tespit"i için gönderilen 15'i evde 10'u dış ortamda ölü bulunma ve 5'i suda boğulma toplam 30 vakadan alınmıştır (Ek-1 ATK Çalışma İzni). Covid-19 global pandemi dönemine denk gelen araştırmamızda, laboratuvar çalışma sürelerindeki aksamalar bazı örneklerin araştırma kapsamından çıkarılmasına yol açmıştır, bu da örneklem sayısının azalmasına neden olmuştur. Gönderilen yumuşak doku örneklerinin kas dokusu olması sebebiyle çalışmamızda kas dokusu örnekleri kullanılmıştır. İncelenmek üzere seçilen numuneler tekrarlanan DNA çalışmalarıyla kimliklendirilmiş olan materyallerden oluşmaktadır (Ek-2 Etik Kurul Kararı).

3.2. Materyallerin Toplanması ve Muhafaza Edilmesi

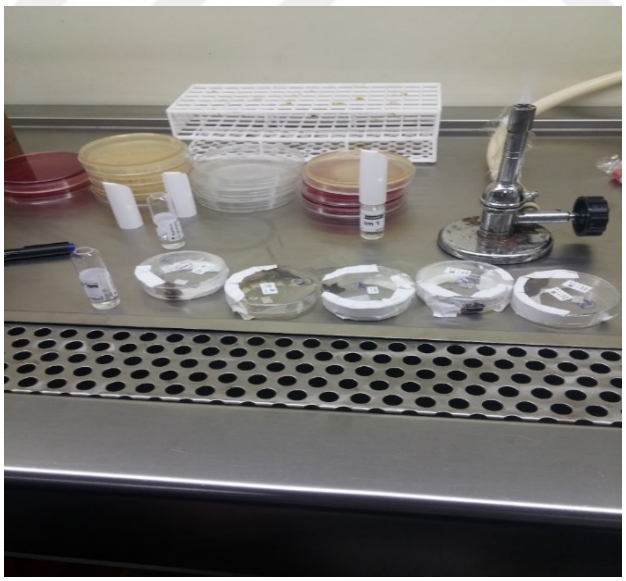
ATK Morg İhtisas Dairesinden Biyoloji İhtisas Dairesine hüviyeti meçhul cesetlerin kimliklendirilmesi için gönderilen kas dokusu örneklerinden 02.04.2019 tarihi itibariyle steril bistürü ve penset yardımıyla 3-5 g numune alınıp –20 ºC'de buzdolabında muhafaza altına alınmıştır. Her doku alınışında bistürü ve penset kontaminasyonu engellemek için değiştirilmiştir (Şekil 4). Örneklere Adli Bilimler ve Adli Tıp Enstitüsü, Adli Mikrobiyoloji ve Parazitoloji laboratuvarında kültür yöntemleri uygulanmıştır. MALDI-TOF MS analiz yöntemiyle de 15.05.2020 tarihinde tür tayini yapılmıştır.

3.3. Biyolojik Örneklerin Laboratuvar Çalışmaları

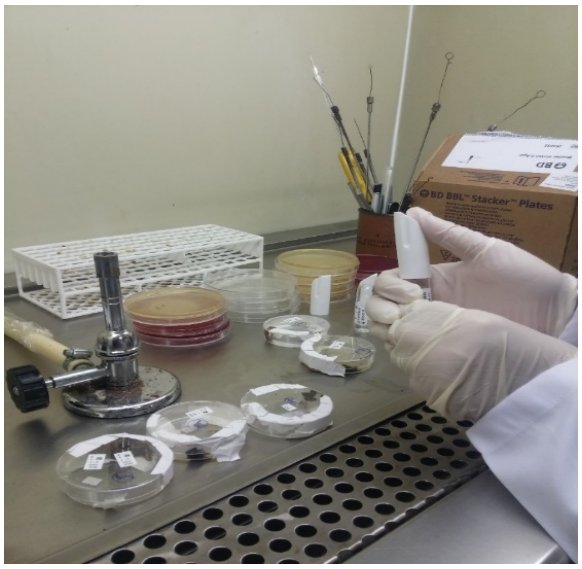
3.3.1. Kültür yöntemleri

Topladığımız kas dokusu örnekleri 10'ar ml Triptic Soy Broth (TSB) sıvı besiyerinde (buyyon) çözündürülerek yarım saat 37ºC de etüvde inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 5-7). TSB pepton, glukoz, sodyum klorid ve potasyum hidrojen fosfattan oluşan genel amaçlı sıvı

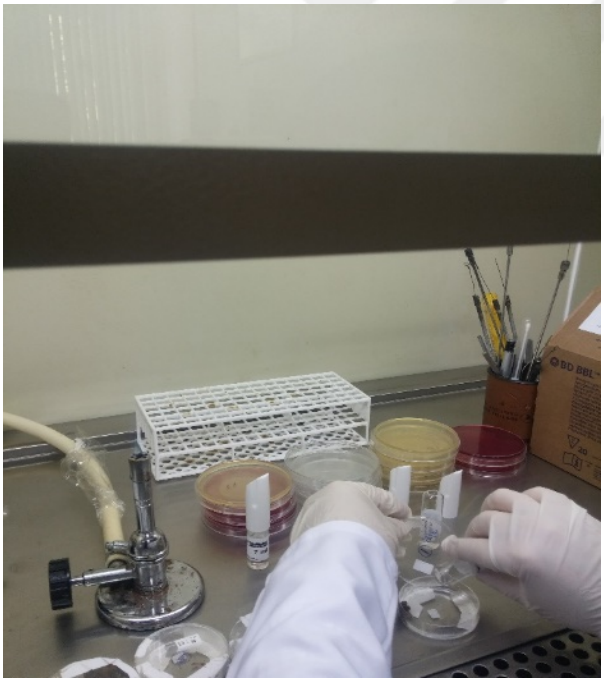
besiyeridir. İnkübasyondan sonra sıvı besi yerlerinden, zaman kaybetmeden kanlı agar'a eksiltme yöntemi ile ekim yapılmıştır (Şekil 8). Katı besiyeri kanlı agar dört eşit parçaya ayrılmıştır. Özeyi alevde steril ettikten sonra sıvı besi yerinden örnek alınmış ve besiyerindeki ilk bölüme zigzag şeklinde ekim yapılmıştır. Ekim yaptığımız bölgeden yine alevle sterilize edilmiş öze ile örnek alıp 2. bölüme zigzag şeklinde yayılmıştır. Aynı şekilde 2. bölümden 3. bölüme ve 3. bölümden 4. bölüme pasajlar yapılmıştır. (Şekil 9), (111). Kanlı agar zengin besin içeriği pek çok mikroorganizma (bakteri)nın gelişimine uygundur. Hemoliz için taze defibrine koyun kanı en uygundur. Koyun kanının varlığı sayesinde bakteriyal tanımlama testlerinin temelindeki hemoliz meydana gelir. Ekimler tamamlandıktan sonra kanlı agar 37ºC etüvde 48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 10, 11). Kanlı agarda mikroorganizmalar üredikten sonra tek koloni oluşturmak üzere kanlı agarlara pasajlar yapılmış ve bu pasajlarda MALDI-TOF MS analizi yöntemi ile bakteri tür cins tanımı yapılmak üzere dış laboratuvara gönderilmiştir (Şekil 12).



Şekil 4. Postmortem alınan doku örnekleri ve mikrobiyoloji kültür çalışmalarının yapıldığı ekim kabini



Şekil 5. Örneklerin TSB (Triptic Soy Broth) sıvı besiyerine aktarımı

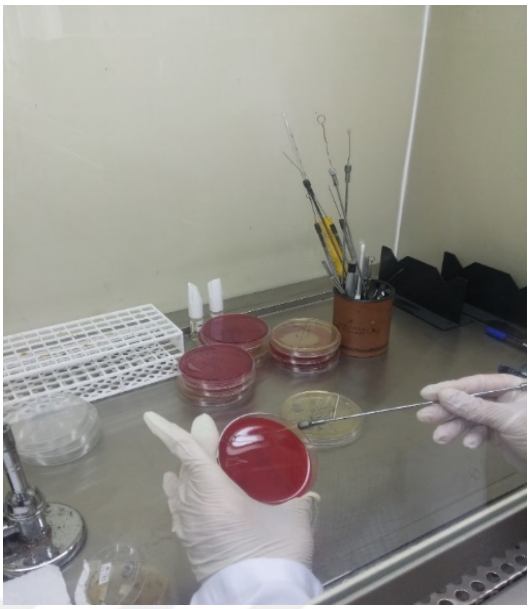


Şekil 6. TSB sıvı besiyerine pasajı



Şekil 7. 37ºC de etüvde inkübasyon

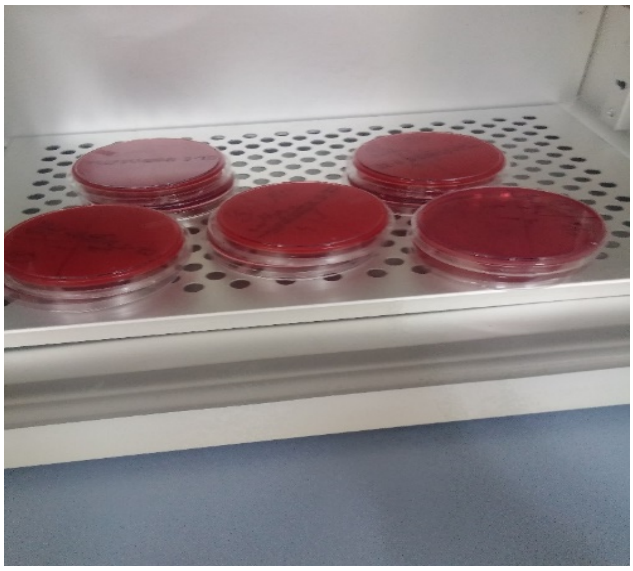




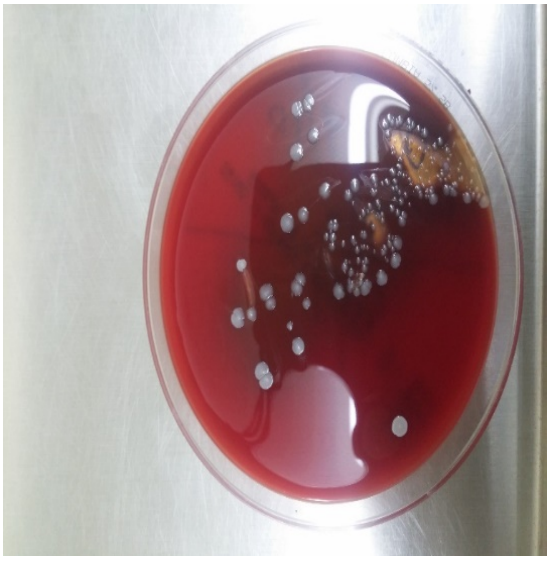
Şekil 8. İnkübasyonu tamamlanan TSB sıvı besi yerinden kanlı agar'a ekim işlemleri



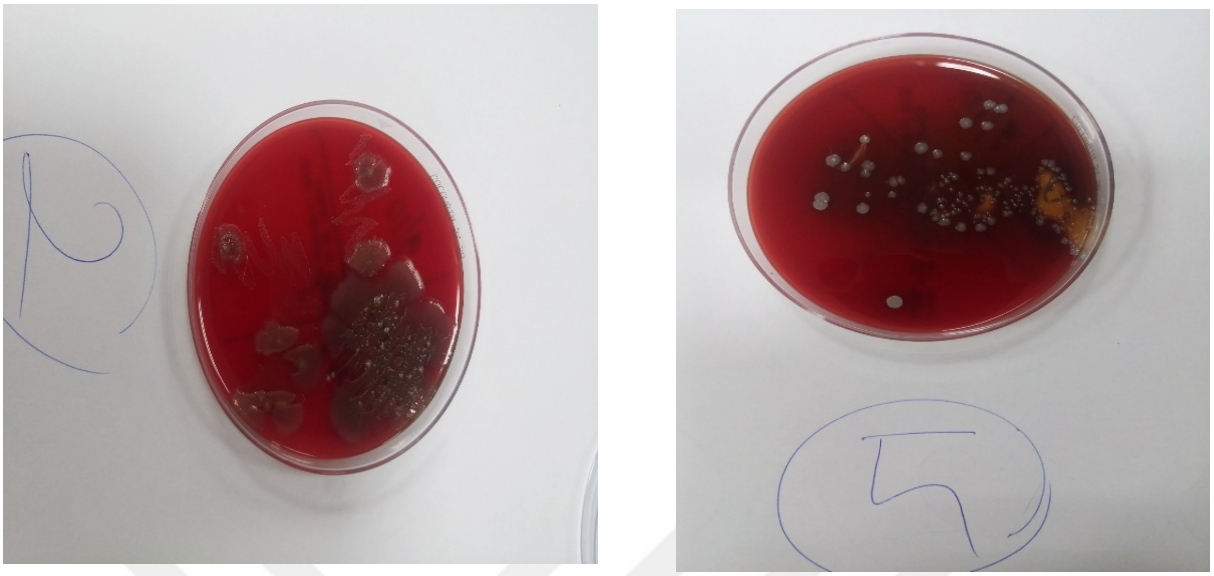
Şekil 9. Eksiltme (Azaltma) yöntemi ile besiyeri pasajı *(111)*



Şekil 10. Besiyerlerinin 37 ºC'de 24-48 saat etüvde inkübasyonu



Şekil 11. Kanlı agarda üreyen mikroorganizmalar



Şekil 12. 2 ve 5'nolu örnek plaklarında üreyen çeşitli mikroorganizmalar

3.3.2. MALDI-TOF MS Analiz Yöntemi

Kültürde üreyen bakterilerin tür tanımlaması için MALDI-TOF MS yöntemi ile çalışan Bruker Microflex LT cihazı kullanılmıştır (Şekil 13). Pasaj yaptığımız besi yerlerinde üreyen taze koloniler 96 kuyucuklu cilalı çelik hedef plakasına aktarıldı. Kuyucuklar 1 µL α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid matris solüsyonu ile kaplandı. Plaka havayla tamamen kurutulduktan sonra, Microflex LT cihazına yüklendi. Spektrumlar, 60 Hz frekanslı 337 nm nitrojen lazer kullanılarak oluşturuldu. Otomatik veri analizi MALDI Biotyper Realtime Classification ve Biotyper software version 3.0 (Bruker Daltonics) ile yapıldı. Elde edilen spektrumlar, standart ayar kullanılarak ham spektrumları Bruker kütüphanesinin spektrumları ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, üretici tarafından önerildiği gibi 0 ile 3 arasında değişen log (skor) değerleri olarak ifade edildi. 1.7'den büyük olan puan değerleri genel olarak cins düzeyinde ilişkileri ve 2.0'den büyük değerler genellikle tür düzeyindeki ilişkileri göstermektedir. En

yüksek puanlar tür tanımlanması için kullanılmıştır. Bruker kütüphanesi, 2.048 tür ve 385 cinsi kapsayan 80.000'den fazla spektrum içermektedir.

Sonucu 1.7'nin altında çıkan koloniler 1.5 mL vidalı kapaklı tüplere aktarıldı ve bu tüplerde 0.3 mL çift damıtılmış ultra saf su ile karıştırılarak ekstraksiyon yöntemi gerçekleştirildi. Tüplere 0.9 mL saf etanol eklenmiş ve vortekslendikten sonra 13.000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatan atılmasıyla dipte kalan pellet 50uL%70 sulu formik asit ile iyice karıştırıldı. 50 uL asetonitril ilave edildikten sonra karışım, 2 dakika boyunca 13,000 x g'de santrifüjlendi. Mikroorganizma ekstraktı süpernatantının bir mikrolitresi parlatılmış çeliğin üzerine yerleştirildi ve 1 uL CHCA matris solüsyonu ile kaplandı ve cihaza yüklendi.



Şekil 13. Bruker Microflex LT cihazı

3.4. Veri Analizi

Besiyeri plaklarındaki mikroorganizma (bakteri)lar üreme var/yok şeklinde değerlendirildi. Ayrıca Aritmetik ortalama, standart sapma, minumum, maksimum olarak, DNA Degredasyon Seviyeleri Skorlama Yöntemi ile bazı veriler ise frekans ve yüzde olarak değerlendirildi.

3.5. DNA Degredasyon seviyelerini skorlama yöntemi

DNA Degredasyon seviyeleri, Real Time PCR cihazı ile tespit edilen Human Quantitation-Large Autosomal Quantitation değerlerinin birbirine oranlamasıyla hesaplanmıştır.

Tablo I. DNA degredasyon skorlama tablosu (83)

	Degredasyon yok	**Ilımlı Degredasyon**	**Degredasyon Var**	**Yüksek Degredasyon**
Degredasyon indeksi (Human Quantitation */Large Autosomal* Quantitation*)*	0-1,5	1,5-4	4-10	>10

3.6. Çalışmada kullanılan cihazlar ve gereçler

3.6.1. Doku hazırlamada kullanılan sarf malzeme ve cihazlar

- Steril plastik petri kabı (Isolab)

- Bistürü (Easycut)

- Çeker ocak (Nüve)

-20 °C Derin Dondurucu (Arçelik)

- 2-8 °C Buzdolabı (Vestel)

3.6.2. Kültürde kullanılan sarf malzeme ve cihazlar

- Sıvı Besiyeri (Tryptic Soy Broth)

- Kanlı agar toz besiyeri (Merck)

- Defibrine koyun kanı (Becton Dickinson)

- Hassas tartı (Radwag)

- Öze (Orlab)

- Mikrobiyoloji ekim kabini (Nüve)

- Etüv (Nüve)

- Mikroskop (Olympus)

3.6.3. MALDI-TOF MS analizinde kullanılan sarf malzeme ve cihazlar

- 1,5 ml ependorf tüp (Axygen)

- Ultra saf su

- Etanol (Merck)

- Formik asit (Merck)

- α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matris solüsyonu

- MALDI-TOF MS cihazı (Bruker Microflex LT)

4. Bulgular

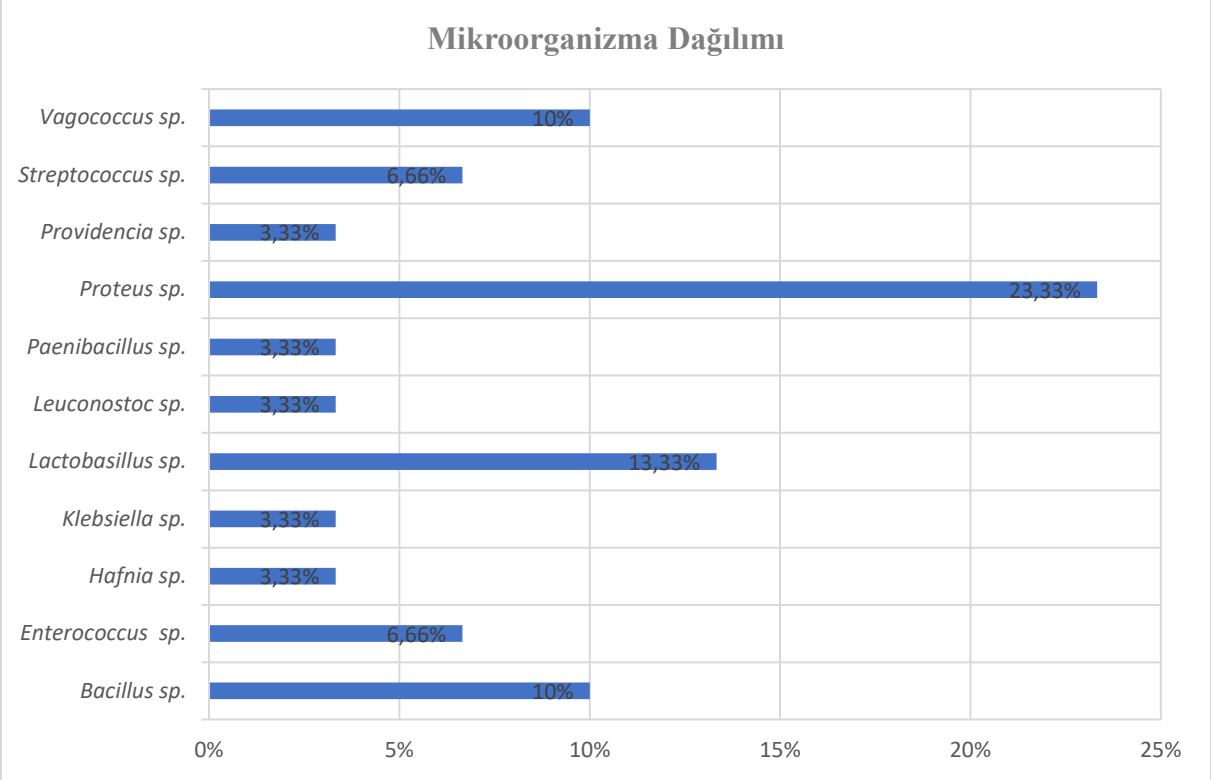
Bu bölümde çalışmamızda elde edilen verilerin analizleri yer almaktadır. Dokuların degredasyon seviyelerini belirlemek için Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesinde Real Time PCR cihazında Duo Kit kullanılarak tespit edilen "human kantitasyon/large otozomal kantitasyon" miktarlarının birbirine oranına göre degredasyon indeksleri hesaplandı. Ayrıca GeneMapper^{TM}Software programı ile belirlenen doku örneklerinin DNA profillerini gösteren elektrofereogramlarının değerlendirilmesi yapıldı. Her degredasyon seviyesini gösteren bir elektrofereogram örneği Ek-3'te sunulmuştur.

Klasik mikrobiyolojik analizlerinden olan kültür yöntemi ile bakterilerin çoğaltılması ve ön tanımlanması yapıldı. MALDI-TOF- MS yöntemi kullanılarak tür tayini yapıldı. Elde edilen identifikasyon sonuçları, tablolar haline getirilerek özetlendi. Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesinde, numaralandırılan dokulardan pasaj yapılarak kanlı besiyeri kültür ortamında ürettiğimiz bakterilerin MALDI-TOF MS yöntemi ile tür ve cins dağılımı grafik ve tablolarda sunulmuştur.

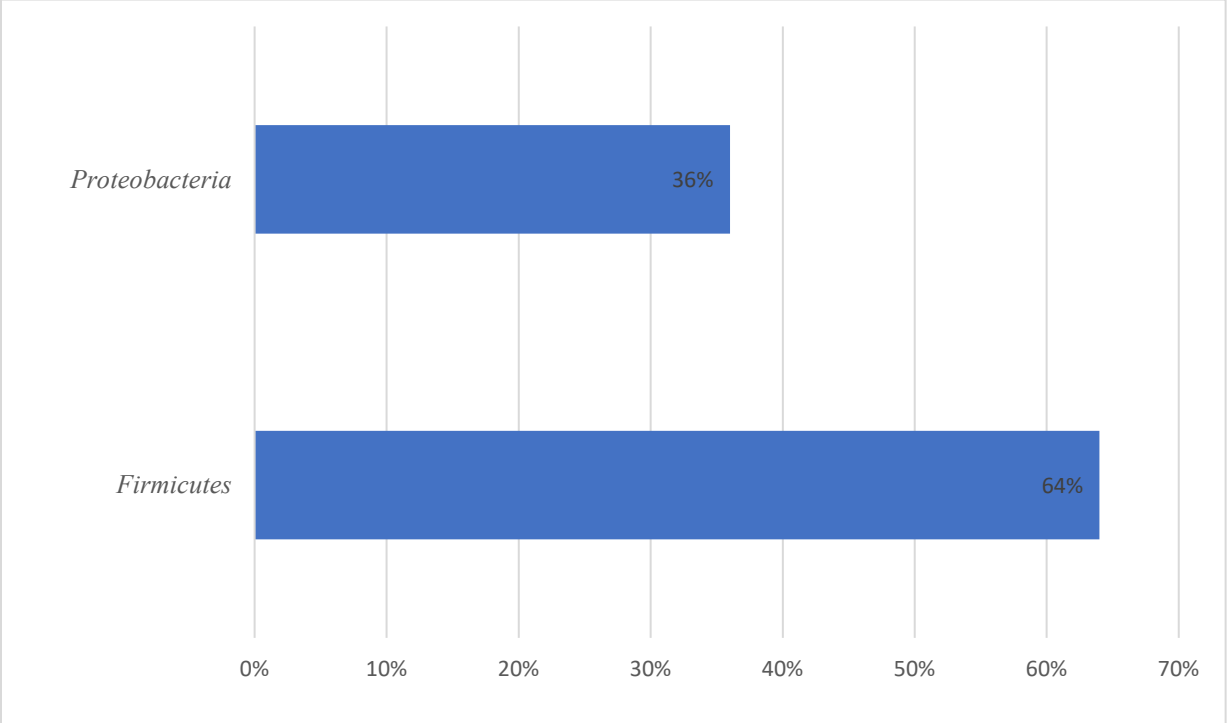
Tablo II: Kültür dokularında tespit edilen bakterilerin tür ve cins dağılımları

Örnek No:	Bakteri Türü	Bakteri Şubesi
1	*Bacillus sp.*	*Firmicutes*
2	*Bacillus sp.*	*Firmicutes*
3	*Alfa hemolitik streptekok*	*Firmicutes*
4	*Beta hemolitik streptekok*	*Firmicutes*
5	*Alfa hemolitik streptekok*	*Firmicutes*
6	*Enterococcus malodoratus*	*Firmicutes*
7	*Lactobacillus sakei*	*Firmicutes*
8	*Vagococcus lutrae*	*Firmicutes*
9	*Lactobacillus sakei, Enterococcus faecium*	*Firmicutes*
10	*Hafnia alvei*	*Proteobacteria*
11	*Proteus hauseri*	*Proteobacteria*
12	*Lactobasillus plantarum*	*Firmicutes*
13	*Proteus hauseri*	*Proteobacteria*
14	*Proteus vulgaris, Proteus rettgeri*	*Proteobacteria*
15	*Proteus hauseri*	*Proteobacteria*
16	*Lactobasillus paracasei*	*Firmicutes*
17	*Vagococcus fluvialis*	*Firmicutes*
18	*Vagococcus lutrae*	*Firmicutes*
19	*Bacillus muralis*	*Firmicutes*
20	*Leuconostoc mesenteroides*	*Firmicutes*
21	*Providencia rettgeri*	*Proteobacteria*
22	*Proteus hauseri, Klebsiella pneumoniae*	*Proteobacteria*
23	*Paenibacillus lautus*	*Firmicutes*
24	*Proteus hauseri*	*Proteobacteria*
25	*Proteus vulgaris*	*Proteobacteria*

Bakteri cinslerinin örnekler içindeki oranları Grafik 1 ve Grafik 2'de gösterilmiştir.



Grafik 1: Degrede dokularda üreyen bütün bakteri cinslerinin dağılım oranları



Grafik 2. Degrede dokularda üreyen bakterilerin şubelere göre dağılımları

Tablo III. Dokuların bulunduğu ortam ve üreyen bakterilerin şubelere göre dağılımı

Ortam	**Bakteri Şubesi**	
	Firmicutes	*Proteobacteria*
Kapalı Ortam	%40	%16
Dış Ortam	%16	%12
Sulu Ortam	%8	%8

Tablo IV. Bakterilerin bulunduğu ortam ve degredasyon düzeylerine göre dağılımları

Ortam	**Bakteri türü**	**Degredasyon Düzeyleri**
Kapalı Ortam (Bina ve araç içinde ölü bulunma…)	*Alfa hemolitik streptekok*	yok, yüksek
	Bacillus sp	yok, yüksek
	Lactobacillus sakei,	ılımlı
	Enterococcus faecium	ılımlı
	Proteus hauseri	yüksek
	Lactobasillus paracasei	normal
	Vagococcus lutrae	ılımlı
	Providencia rettgeri	yok
	Paenibacillus lautus	ılımlı
	Klebsiella pneumoniae	ılımlı
	Bacillus muralis	*normal*
	Hafnia alvei	*Yok*
Dış Ortam (Arazi, mezarlık…)	*Beta hemolitik streptekok*	*yüksek*
	Vagococcus lutrae	*ılımlı*
	Lactobasillus plantarum	*yok*
	Proteus hauseri	*yüksek*
	Proteus vulgaris,	*ılımlı*
	Proteus rettgeri	*hafif*
	Vagococcus fluvialis	*yüksek*
Sulu Ortam (Dere yatağı, deniz.)	*Enterococcus malodoratus*	*ılımlı*
	Leuconostoc mesenteroides	*ılımlı*
	Proteus hauseri	*normal*
	Proteus vulgaris	*ılımlı*

Tablo V. Bakterilerin bulunduğu ortama göre dağılımları

Bakteri Türleri	Kapalı Ortam	Dış Ortam	Sulu ortam
Bacillus Sp.	%8	---	----
Alfa hemolitik streptekok	%8	-----	-----
Beta hemolitik streptekok	----	%4	-----
Enterococcus	%4	-----	%4
Lactobacillus	%8	%4	----
Vagococcus	%4	%8	----
Hafnia	%4	-----	-----
Proteus	%4	%12	%8
Leuconostoc	-------	----	%4
Paenibacillus	------	%4	-------

Tablo VI. Doku Örneklerinde Real Time PCR yöntemi ile belirlenen degredasyon indeksleri

Örnek no	Small Kantitasyon ng/µL	Large otozomal kantitasyon ng/µL	Degredasyon indeksi
1	5.54	3.7	1.49
2	0,00173	2,9E-4	*67*
3	*0*	*0*	*0*
4	0,321	*0,084*	*38*
5	185	76	2,4
6	3,6	0,8	4,5
7	41,4	18,8	2,2
8	0,0143	-----	-----
9	1,2	0,4	3
10	direct	izolasyon	----
11	8,2	9e-4	>100
12	271	164	1,5
13	6,6	1,6E	>100
14	0,0049	0,0017	3
15	8,3	3,2	2,7
16	direct	izolasyon	----
17	0,19	0	>100
18	0,3	0	>100
19	0,025	0 ,0035	7,1
20	430	251	1,7
21	255	236	1
22	0,59	0,15	4
23	2,8	1.2	2,3
24	0,074	0,01	7
25	1,36	0,46	3

T**ablo VII.** Bakterilerin dokulardaki degredasyon oranına göre görülme oranları

Bakteri Türleri	Degredasyon yok	Ilımlı Degredasyon	Degredasyon Var	Yüksek Degredasyon
Bacillus Sp.	%4	---	%4	%4
Alfa hemolitik streptekok	----	%4	-----	%4
Beta hemolitik streptekok	----	----	-----	%4
Enterococcus	-----	%4	-----	-----
Lactobacillus	%4	%4	%4	------
Vagococcus	----	%4	%4	%4
Hafnia	%4	-----	-----	------
Proteus	------	%12	%8	%8
Leuconostoc	-------	%4	------	-------
Paenibacillus	------	%4	-------	------

Tablo VIII. Bakteri şubelerinin degrede dokuya göre görülme sıklığı

Bakteri Şubeleri	Degredasyon yok	Ilımlı Degredasyon	Degredasyon Var	Yüksek Degredasyon
Firmicutes	%8	%28	%12	%16
Proteobacteria	%8	%12	%4	%8

5. Tartışma

1980'lerin ortalarında tanımlanmasından bu yana, adli DNA testi olay yerinde bulunan biyolojik örneklerin DNA profilleri ile şahısların DNA profillerini karşılaştırarak suçluların tespitine ve masumun temize çıkarılmasında, nesep tayinlerinde, kitlesel felaketler ve diğer sebeplerle ölen kimliği belirlenemeyen cesetlerin kimliklendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (112). Olay yerinden adli laboratuvarlara gelen kimliği belirsiz cesetlerden alınan çoğu zaman kokuşmuş ve çürümekte olan doku numunelerine yapılan DNA analizlerinden yetersiz sonuçlar alınabilmektedir (113). Bu tez çalışmasında, postmortem kas dokularında üreyen mikroorganizmaların (bakteri) cins ve türleri belirlenerek dokulardaki DNA degredasyon seviyeleri tespit etmek istenilmiş ve iş gücü maliyeti düşük güncel hızlı yöntemlerden faydalanılmıştır. Ayrıca postmortem kas dokularında bulundukları ortama göre üreme yapan mikrobiyal türlerin analizi yapılmıştır.

Adli ve klinik mikrobiyoloji alanında karşılaşılan sorunların etkili yönetimi için örneklerden bakterlerin hızlı ve doğru tanımlanması önemlidir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, mikrobiyal tanımlama geleneksel olarak otomatik sistemler kullanılarak fenotipik ve biyokimyasal analizlerle yapılır (36). Bu analizler, söz konusu mikrobiyal türlere bağlı olarak birkaç saatten birkaç güne kadar zaman gerektirir. Daha hızlı ve doğru sonuçlar vermelerine rağmen moleküler yöntemler için iş yükü ve maliyet gereksinimleri, mikrobiyoloji laboratuvarındaki rutin işleri aksatabilmektedir (114). MALDI-TOF MS analiz yöntemi çok çeşitli mikroorganizmaları makul bir maliyetle, sadece bir kısmını veya tüm koloniyi ve bir damla matris çözeltisini kullanarak hızlı, doğru ve ekonomik bir şekilde tanımlayabilmektedir (115). Bizde çalışmamızda, yüksek maliyet ve iş gücü gerektirmeyen, hızlı ve doğru olarak tür tanımlaması yapabilen MALDI-TOF MS yöntemini kullandık.

Tablo II incelendiğinde, çalışılan dokularda *Klebsiella pneumoniae, Enterococcus malodoratus, Enterococcus faecium, Lactobacillus sakai, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus paracesi, Lactobacillus sacrimneri, Vagacoccus lutrae, Vagococcus fluvialis, Proteus hausari, Proteus vulgaris, Proteus rettgeri, Hafnia alvei, Leuconostoc mesenteroides, Providencia rettgeri*, *Paenibacillus lautus* türünde bakteriler ile *Alfa Streptekok, Beta Streptekok* ve *Basilius* cinsi bakteriler görülmüştür (Grafik 1).

Bell ve arkadaşlarının ölüm zamanı 6-58 saat arasında değişen 10 insan cesedinin kalp dokularının incelemeleri neticesinde *Firmicutes* ve *Proteobacteria* şubelerini diğer tüm şubeler arasında en yüksek miktarda bulmuşlardır (114). Bu mikroorganizma (bakteri) şubeleri dokular haricinde vücut sıvılarında da yaygın olarak bulunmaktadır (116). Bizde çalışmamızda Bell ve arkadaşlarının yaptığı araştırmayla uyumlu olarak, postmortem kas dokularda *Firmicutes ve Proteobacteria* şubelerine ait bakteri topluluklarının olduğunu tespit ettik (Grafik 2). *Firmicutes,* çürüyen cesetlerin yapısından kaynaklanır ve yereldir ancak *Proteobacteria* çevreden kaynaklanır ve Dünya'daki en bol şube olarak toprakta ve suda her yerde bulunur (117).

Yaptığımız tez çalışmasında Tablo III'te bakterilerin şube dağılımlarına göre, dış ortamda ve sulu ortamda bulunan cesetlerden tespit ettiğimiz *proteobacteria* şubesi oranları, iç ortamda bulunanlara göre daha yüksek oranda bulundu. Bu çalışma ile, bakteri cins ve şube dağılımlarına bakarak ölen şahısların bir yerden başka bir yere taşınıp taşınmadığı ve suda boğulup boğulmadığının belirlenebilmesi için ileriye yönelik araştırmalara yön verebileceği düşünülmektedir.

Tablo IV ve V incelendiğinde çalışmamızda dış ve sulu ortamda bulunan *Proteus* cinsi bakterilerin kapalı ortamdakilere göre dağılım ve oransal olarak yüksek olduğu görülmüştür.

DNA hasarına en çok neden olan etkenler cesedin kendi hücrelerinden salgılanan çeşitli enzimler, cesette ve çevrede bulunan mikroorganizmaların salgıladığı enzimlerdir. Mikroorganizmaların çoğaldığı postmortem bir biyolojik örneğe DNA analiz metotları uygulandığında degredasyondan dolayı doğru ve kesin sonuçların alınması zorlaşmaktadır. Mikrobiyal enzimler DNA'nın hasara uğramasına, PCR amplifikasyonunun yetersiz veya hiç olmamasına böylece DNA elekrofereogramındaki lokus alelleri pik seviyelerindeki düzensizliklere, anlamsız ve eksik piklerin görülmesine neden olmaktadır (118). Bir diğer deneysel çalışma ise çevre koşulları ve ısı sabit tutularak bakteri üremesi tespit edilen örneklerde DNA degredasyonu tespit edilmiştir (119). Bu tez çalışmasında da GeneMapper^{TM}Software programı ile DNA profillerini gösteren elektrofereogramlarda degredasyon seviyeleri gösterilmiştir (Ek-3).

Tablo VI'de yer alan örneklere ait degredasyon indeksleri incelendiğinde 5 örnekte "*degredasyon yok*", 10 örnekte "*ılımlı degredasyon", 3 örnekte "normal degredasyon"* ve 9 örnekte *"yüksek degredasyon"* tespit edilmiştir.

Tablo VII göre, *Proteus* cinsi bakterilerin postmortem dokudaki degredasyon seviyeleri incelendiğinde artışlar olduğu görüldü. Literatüre göre, *Proteus* bakterileri güçlü proteaz enzimleri sayesinde hücre ve dokuları sindirerek amino asitlere çevirmektedir. Bu hücre dışı enzimleri sayesinde çoğalmaları hızlanmaktadır. Bu enzimler dokuda çürümeyi arttırmakta DNA'nın korunaksız hale gelmesine neden olmaktadır. Nukleaz enzimleri ile DNA degredasyonuna neden olmaktadır (120). Bizde yaptığımız tez çalışmasında literatürle uyumlu veriler elde ettik.

Özellikle kimliği belli olmayan insan cesetlerini ve vücut parçalarını kimliklendirmek için adli biyoloji ve genetik laboratuvarlarında DNA elde edilebilmesi için en sık kullanılan yumuşak dokular kas dokusudur. Biyolojik numunelerde DNA bozunması, endojen nükleaz

aktivitesi ve hidrolitik saldırının neden olduğu DNA parçalanması ölümden sonra hızla başlar. Yumuşak kas dokusunda DNA'nın kalıcılığının, geçen zamana ve zaman içinde değişen hava sıcaklığına bağlı oluğu gösterilmiştir (121).

DNA bozunmasından sorumlu mekanizmaları anlamak, biyolojik örneklerde DNA koruma derecesini tahmin etmenin anahtarıdır, böylece bozunmuş değerli materyaller daha etkili yöntemlerle çalışılır ve aşırı derecede bozulmuş örneklerin zaman ve maliyet tüketen analizlerinden tasarruf sağlar (122).

Yaptığımız çalışmada, postmortem kas dokusunda kapalı ortam, dış ortam ve sulu ortamda şubelere göre mikroorganizmaların dağılım (Tablo III) ve degredasyon seviyelerinde (Tablo VIII) fark bulunamamıştır. Ancak aynı ortamda bulunan aynı bakteri türlerinin farklı derecede degredasyon yaptıkları sonucuna varılmıştır. Tablo IV incelendiğinde aynı ortam ve aynı cins bakterilerin farklı seviyede degredasyona sebep olduğu görüldü. Kapalı ortamda bulunan örneklerde *Alfa hemolitik streptekok ve Bacillus sp cinsi bakteriler degredasyon düzeylerine göre karşılaştırıldığında "degredasyon yok" ve "yüksek degredasyon" tespit edildi.* Ölüm zamanı ve ortamda bulunma süresinin bu farklılığa etkili olduğu düşünülmektedir. Bakteri cinslerinin sebep olduğu DNA degredasyon seviyelerinin ölüm zamanın belirlenmesindeki etkileri farklı çalışmalarda örneklem sayısının arttırılmasıyla araştırılabilir.

Çalışmamızda örneklerden anaerobik mikroorganizmalara yönelik bir araştırma yapamadık. Özel ortam ve koşul gerektiren bu mikroorganizmaların ortama saldıkları bazı kimyasalların bu ortamı etkileyebileceklerini düşünerek bunu söylemek mümkündür. Dolayısıyla postmortem dokularda mikrobiyal bozulma çeşitliliğini ortaya çıkarmak için pek çok yöntem mevcuttur. Ancak bunlar adli araştırma tekniği olarak kullanılabilecek kesin bir yöntem değildir. Adli mikrobiyolojik analizlerde tek bir moleküler yaklaşımın evrensel olarak

uygulanabilir olması da muhtemel değildir. Bu sebeple tüm yöntemler denenerek sonuçlandırılması gerekmektedir.

Söylemesi gereken diğer bir husus şu ki, bu süreçte tüm dünya Covid-19 global pandemiye karşı denk gelmiştir. Yaptığımız çalışma sonuçları daha önce yapılan benzer çalışmalara nazaran dönemdeki farklı ortam şartlarından dolayı değişiklik gösterebilir. Yaşanan süreç nedeniyle, laboratuvar çalışma sürelerindeki aksamalar bazı örneklerin çalışma kapsamından çıkarılmasına yol açmıştır, bu da örneklem sayısının azalmasına neden olmuştur.

Tez çalışmamıza benzer araştırmalar yapılırken Covid-19 pandemi sürecinin olmaması ve tam zamanlı çalışma sürecinde laboratuvarların tam teşekküllü çalışması, daha kapsamlı ve detaylı araştırmaların yapılabilmesine olanak sağlayacaktır. İlerleyen zamanlarda bizim çalışmamızın üzerine ek çalışmalar yapılabileceği gibi benzer konuda farklı araştırmaların yapılması da faydalı olacaktır.

DNA identifikasyonu Adli bilimlerde en çok kullanılan yöntem olmasına rağmen kontamine veya degrede örnek sorunlarına sıkça rastlanmaktadır ve bu nedenle değerlendirme için bazen yetersiz kalmaktadır. Bu gibi durumlarda aynı veya farklı delil materyalinin farklı yöntemle incelenmesi olayın açıklanabilmesi için yön vericidir. Bu nedenle suç soruşturmasında şüpheli şahısların mevcut olan bozunmuş, ya da yetersiz kaldığı durumlarda elde edilen DNA'nın mikrobiyal bozulmasında rol oynayan etkenlerin ne olduğunu bilerek bir sonuca ulaşmak önem arz etmektedir. Dolayısı ile bu çalışmayla adli bilimlere farklı bir bakış açısı kazandırmış bulunmaktayız.

6. Sonuç

Bu tez çalışmasında elde edinilen verilere göre, degrede dokularda MALDI-TOF MS yöntemi ile mikroorganizmaların tür ve cins yönünden tespiti başarılı olmuştur. Cesedin kendi mikrobiyatasından ve dış ortamdan kaynaklanan mikroorganizmalar ile ölüm zamanı ve çevresel koşulların DNA degredasyonunda birlikte etkili olduğu görülmüştür.

Örneklem sayılarının arttırılması ile DNA degredasyonunu etkileyen faktör ve süreçlerin araştırılması degrede doku örneklerinden doğru bir şekilde DNA elde edilebilmesi için protokollerin gelişmesine katkı sağlayacaktır.

Hüviyeti meçhul ceset ve parçalarından alınacak küçük miktarlarda kas dokusu örneklerinin DNA incelemeleriyle hızlı ve doğru bir şekilde kimliklendirme yapılabileceği gözlenmiştir. Ceset ve doku parçalarının yüzeyle teması olmayan derin ve çürümenin en az olduğu kısımlarından kas dokusu örneklerinin alınması; ayrıca olay yerinden toplanan her türlü biyolojik delilin mikrobiyal kontaminasyon ve çoğalmasını engelleyecek şekilde kuru bir ortamda ve soğuk zincirle laboratuvara ulaştırılmasının önemi tespit edilmiştir.

Bu verilere dayanarak delil toplama ve analiziyle görevli personelin düzenli aralıklarla hizmet içi eğitimlerde bilgi güncellemelerinin yapılması önemlidir. Bu sayede, laboratuvara uygun koşullarda teslim edilen örneklerin kimliklendirilmesi doğru ve hızlı bir şekilde yapılarak adli olayların çözümü kolaylaştıracaktır.

7. Kaynaklar

1. "Alakoç YD. Adli bilimlerde DNA analizleri. Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi 2010; 9(2): 1-8."

2. "Adams J. Paternity testing: Blood types and DNA. Nature education 2008; 1(1): 146."

3. "Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition—a review. Forensic Science International: Genetics 2012; 6(3): 297-305."

4. "Jakubowska J, Maciejewska A, Pawowski R. Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation, International J.Legal Medicine 2011; 126(1): 173-178."

5. "Piccinini A, Betti F, Capra M, Cattaneo C. The identification of the victims of the Linate air crash by DNA analysis. International Congress Series 1261, 2004; 39– 41"

6. "Dash HR., Das, S. Microbial degradation of forensic samples of biological origin: potential threat to human DNA typing. Molecular biotechnology 2018; 60(2): 141-153."

7. "Hansen J., Lesnikova I., Funder AMD., Banner, J. DNA and RNA analysis of blood and muscle from bodies with variable postmortem intervals. Forensic science, medicine, and pathology 2014, 10(3): 322-328."

8. "Çetli E., Tatar D., Özkoçak V. Adli bilimlerde DNA parmak izine adli genetik ve adli antropolojik bakış. Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 2014, 8(4): 1545-1556."

9. "Duncan GT., Tracey ML. Serology and DNA Typing. Ed. Eckert WG, Introduction to Forensic Sciences. New York: CRC Press, 1992; 233–294"

10. "Frumkin D, Wasserstrom A, Davidson A, Grafit A. Authentication of forensic DNA samples. Forensic Sci Int Genet 2010; 4: 95-103."

11. "Borovko SR, Korban VV, Kritskaya SV, Yeumenenka SA. Missing people: Problems of identification of unknown bodies using DNA database. Forensic Science International: Genetic Supplement Series 2009; 2(1): 260-262."

12. "İmamoğlu Ö, Karapirli M, Akboyun N. Diş Örneklerinden DNA Elde Edilme Metotlarının Karşılaştırılması ve Adli Bilimler Açısından Değerlendirilmesi, Adli Tıp Dergisi 2012; 26(1): 38-49"

13. "Eckert WG. Introduction to the forensic sciences. Ed. Eckert WG Introduction to Forensic Sciences. New York: CRC Press, 1992; p. 1–10"

14. "Budowle B., Wilson MR., Burans JP., Breeze R.G., Chakraborty R. Microbial forensics. Microbial forensics. Academic Press, 2005; p. 1-25.

15. "Karol S, Suludere Z, Ayvalı C. Biyoloji Terimleri Sözlüğü. Ankara: Türk Dil Kurumu Yayınları, 1998; 444"

16. "Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA. Microorganisms and Microbiology In: Brock biology of microorganisms, 13th ed. San Francisco, NY: Pearson; 2010. p.1-24."

17. "Parks DH, Chuvochina M, Chaumeil PA, Rinke C, Mussig AJ, Hugenholtz P. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. Nature biotechnology 2020; 38(9): 1079-1086."

18. "Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, Sattley WM, Stahl DA. The Microbial World. In: Brock Biology of Microorganisms. 15th ed. New York, NY: Pearson; 2018. p. 399–428."

19. "Rizzatti, G., Lopetuso, L. R., Gibiino, G., Binda, C., & Gasbarrini, A. (2017). Proteobacteria: a common factor in human diseases. BioMed research international, 2017; Article ID 9351507, 1-8, https://doi.org/10.1155/2017/9351507."

20. "Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. Trends Biotechnol 2015; 33: 496–503."

21. "Çevik FE, Çakan H. Adli mikrobiyal genetik. Gündoğmuş Ü., editör. Adli Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020; 32- 8."

22. "Metcalf JL, Xu ZZ, Bouslimani A, Dorrestein P, Carter DO, Knight R. Microbiome tools for forensic science. Trends Biotechnol. 2017 Sep; 35(9): 814–23."

23. "Bulut Ö, Bol S, Karakuş O. Adli vakalara ait iskelet buluntuları için saha prosedürü ve standartları. Polis Bilim Derg. 2013;15(3): 1–22."

24. "Tuğ A. Adli bilimler ve mikrobiyoloji. Adli Tıp Dergisi 2009; 23(1): 47-55."

25. "NIH HMP Working Group ve ark. The NIH Human Microbiome Project. Genome Res. 2009; 19: 2317–2323."

26. "Shrivastava P, Jain T, Gupta MK. Microbial forensics in legal medicine. SAS J Med 2015: 1: 33-40."

27. "Price PB, Sowers T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. Proceedings of the National Academy of Sciences 2004; 101(13): 4631-4636."

28. "Javan GT, Finley SJ, Tuomisto S, Hall A, Benbow ME, Mills D. An interdisciplinary review of the thanatomicrobiome in human decomposition. Forensic Science, Medicine and Pathology 2019; 15(1): 75-83."

29. "Can I, Javan GT, Pozhitkov AE, Noble PA. Distinctive thanatomicrobiome signatures found in the blood and internal organs of humans. J. Microbiol. Methods 2014; 106: 1–7."

30. "Gunn A. Pitt S.J. Microbes as forensic indicators. Trop Biomed 2012; 29: 311–330.

31. "Corry JEL. Possible sources of ethanol ante- and post-mortem: its relationship to the biochemistry and microbiology of decomposition. J Appl Bacteriol 1978; 44:1–56."

32. "Paczkowski S, Schütz S. Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011; 91: 917–935."

33. "Vass AA, Barshick SA, Sega G, Caton J, Skeen JT, Love JC, Synstelien JA. Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. Journal of Forensic Science 2002; 47(3): 542-553."

34. "Powers RH. The decomposition of human remains. J. Rich, D. E. Dean, and R. H. Powers editörler, Forensic Medicine of the Lower Extremity , The Humana Press Inc., Totowa, NJ, Humana Press 2005: 3-15"

35. "Vass AA. Beyond the grave-understanding human decomposition. Microbiology today 2001; 28: 190-193."

36. "Çakan H, Kocazeybek B, Öz V. Hastane ve hastane dışı otopsi olgularında bronşial mukus ve kalp kanında postmortem olarak saptanan gram negatif çomakların sayısı ile morgda kalma sürelerinin karşılaştırılması. The Bulletin of Legal Medicine 1996; 1(2): 68-73."

37. "Na, JY, Park JH, Kim SH, Park JT. Bacteria as normal flora in postmortem body fluid samples. Korean Journal of Legal Medicine 2017; 41(4): 87-93."

38. "Ungria MCAD. Forensic DNA analysis in criminal investigations. Philippine Journal of Science 2003; 132: 13–19."

39. "Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F ve ark. An estimation of the number of cells in the human body. Annals of Human Biology 2013; 40: 463–471."

40. "Lindahl T. The Croonian Lecture: endogenous damage to DNA. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 1996; 351(1347): 1529-1538."

41. "Jorde LB, Wooding SP. Genetic variation, classifcation and 'race'. Nature Genetics 2004; 36: S28–S33."

42. "Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature 1985; 316(6023): 76-79."

43. Jobling MA., Gill P. Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis. Nature Reviews. 2004; 5: 739-751."

44. "Shrivastava P, Jain T, Trivedi VB. DNA fngerprinting: A substantial and imperative aid to forensic investigation. European Journal of Forensic Science 2016; 3: 23–30."

45. "Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase chain reaction (PCR): a short review. Anwer Khan Modern Medical College Journal 2013; 4(1): 30-36."

46. "Sensabaugh GFPD, Von Beroldingen CPD. The polymerase chain reaction: application to the analysis of biological evidence. Mark A. Farrley, James J. Harrington, editörler, Foresic DNA Technology (pp. 63-82). Boca Raton FL: CRC Press., 2019.

47. "Jeong S, Lim J, Kim MY, Yeom J, Cho H, Lee H ve ark. Portable low-power thermal cycler with dual thin-film Pt heaters for a polymeric PCR chip. Biomedical microdevices 2018; 20(1): 1-8."

48. "Ulusoy DÖİA, Görgül G. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve endodontik mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2006; 2006(2): 61-65."

49. "Kula D. Gökpınar, S. Polimeraz zincir reaksiyonu PZR inhibitörleri. Animal Health Production and Hygiene 2018; 7(2): 599-604"

50. "Radstrom P ve ark. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR- compatible samples, Molecular Biotechnology 2004; 26(2): 133-46."

51. "Hoff-Olsen S, Jacobsen B, Mevag B. Olaisen, Microsatellite stability in human post-mortem tissues, Forensic Sci. Int. 2001; 119: 273–778."

52. "Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008; 9(4): 297–308."

53. "Levy-Booth DJ, Campbell RG, Gulden RH, Hart MM, Powell JR, Klironomos JN ve ark. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. Soil Biol Biochem. 2007; 39: 2977–2991."

54. "Saito T, Doi H. Degradation factors of environmental DNA evaluated by experiments and meta-analysis. In ARPHA Conference Abstracts 2021; 6.

55. "Bender K, Farfán MJ, Schneider PM. Preparation of degraded human DNA under controlled conditions. Forensic science international 2004; 139(2-3): 135-140."

56. "Lat ham KE, Madonna ME. DNA survivability in skeletal remains. Pokines J, Symes SA, editors. Manual of forensic taphonomy. Boca Raton (FL): CRC Press; 2014; 403-425."

57. "Dickson GC, Poulter RT, Maas EW, Probert PK, Kieser JA. Marine bacterial succession as a potential indicator of postmortem submersion interval. Forensic science international 2011; 209(1-3): 1-10."

58. "Batebi H, Dragelj J, Imhof P. Role of AP-endonuclease (Ape1) active site residues in stabilization of the reactant enzyme-DNA complex. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 2018; 86(4): 439-453."

59. "Poinar HN, Stankiewicz BA. Protein preservation and DNA retrieval from ancient tissues. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 8426–8431."

60. "Ballantyne J. Assessment and in vitro repair of damaged DNA templates. Florida: University of Central Florida, National Center for Forensic Science, National Institute of Justice Forensic DNA Research and Development Final Report 1/31/06, 2006."

61. "Mishra S, Imlay JA. An anaerobic bacterium, B acteroides thetaiotaomicron, uses a consortium of enzymes to scavenge hydrogen peroxide. Molecular microbiology 2013; 90(6): 1356-1371."

62. "Williams GM, Jeffrey AM. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2000; 32(3): 283-292."

63. "Goodsell DS. The molecular perspective: ultraviolet light and pyrimidine dimers. The oncologist 2001; 6(3): 298-299."

64. "Nielsen KM, Johnsen PJ, Bensasson D, Daffonchio D. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. Environmental Biosafety Research 2007; 6(1-2): 37-53."

65. "Watson RJ, Blackwell B. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. Canadian journal of microbiology 2000; 46(7): 633-642."

66. "Carrión O, Curson, AR, Kumaresan D, Fu Y, Lang AS, Mercadé E, Todd JD. A novel pathway producing dimethylsulphide in bacteria is widespread in soil environments. Nature communications 2015; 6(1): 1-8."

67. "Raut S, Sen SK, Kabir NA, Satpathy S, Raut S. Isolation and characterization of protease producing bacteria from upper respiratory tract of wild chicken. Biotransformation 2012; 8: 326–330."

68. "Shahzad MS, Bulbul O, Filoglu G, Cengiz M, Cengiz S. Effect of blood stained soils and time period on DNA and allele drop out using Promega 16 Powerplex kit. Forensic Sci Int Genet Supp Ser. 2009; 2(1): 161–162"

69. "Kawane K, Motani K, Nagata S. DNA degradation and its defects. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2014; 6(6): a016394."

70. "Krysko DV, Berghe TV, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. Methods 2008; 44(3): 205-221."

71. Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, Haeseler Av A, Paabo S. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA, Nucleic Acids Res. 2001; 29(23): 4793–4799."

72. "Dogan NA, Akman YE, Rayimoglu G, Yukseloglu EH. Using DNA typing methods to identify dental specimens exposed to different environmental conditions. Rom. J. Leg. Med 2017; 25: 99-103."

73. "Allentoft ME, Collins M, Harker D, Haile J, Oskam CL, Hale ML ve ark. The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 2012; 279(1748): 4724-4733."

74. "Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Paabo S, Ancient DNA, Nat. Rev. Genet. 2001; 2(5): 353–359."

75. "Bär W, Kratzer A, Mächler M, Schmid W. Postmortem stability of DNA. Forensic Sci Int. 1988; 39: 59–70."

76. "Thakar MK, Joshi B, Shrivastava P, Raina A, Lalwani S. An assessment of preserved DNA in decomposed biological materials by using forensic DNA profiling. Egyptian Journal of Forensic Sciences 2019; 9(1): 1-9."

77. "Latil M, Rocheteau P, Châtre L, ve ark. Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. Nat Commun. 2012; 3: 903."

78. "Bulbul O, Filoglu G. Development of a SNP panel for predicting biogeographical ancestry and phenotype using massively parallel sequencing. Electrophoresis 2018; 39(21): 2743-2751."

79. "Frumkin D, Wasserstrom A, Davidson A, Grafit A. Authentication of forensic DNA samples. Forensic Sci Int Genet 2010; 4: 95-103."

80. "Nicklas, JA, Noreault-Conti T, Buel E. Development of a real-time method to detect DNA degradation in forensic samples. Journal of forensic sciences 2012; 57(2): 466-471."

81. "Kim H, Cho Y, Kim J, Lee JH, Kim HS, Kim E. Validation of Reduced-volume Reaction in the PowerQuant® System for human DNA Quantification. Biomedical Science Letters 2020; 26(4): 275-287."

82. "Price EP, Dale JL, Cook JM, Sarovich DS, Seymour ML, Ginther JL, ve ark. Development and validation of Burkholderia pseudomallei-specific real-time PCR assays for clinical, environmental or forensic detection applications. PloS one 2012; 7(5): e37723."

83. "Vernarecci S, Ottaviani E, Agostino A, Mei E, Calandro L, Montagna P. Quantifiler® Trio Kit and forensic samples management: a matter of degradation. Forensic Science International: Genetics 2015; 16: 77-85."

84. "Scientific TF. Quantifiler HP and trio DNA quantification kits user guide 2017: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4485354.pdf. adresinden ulaşılmıştır (Son Erişim Tarihi 25.05.2021)"

85. "Zeyfeoğlu Y, Hancı H. İnsanlarda Kimlik Tespiti. Türk Tabipleri Birliği Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi 2001; 10: 375-377."

86. "Çöloğlu AS. Adli Olaylarda Kimlik Belirlemesi. In: Soysal Z, Çakalır C; eds. Adli Tıp Cilt 1.1. baskı, İstanbul: İ.Ü. Tıp Fak. Yayınları 1999; 73-92."

87. "Turingan RS, Brown J, Kaplun L, Smith J, Watson J, Boyd DA, ve ark. Identification of human remains using Rapid DNA analysis. International journal of legal medicine 2020; 134(3): 863-872."

88. "Tsokos M, Lessig R, Grundmann C, Benthaus S, Peschel O. Experiences in tsunami victim identification. Int J Leg Med 2006; 120:185–187."

89. "Alvarez-Cubero MJ, Saiz M, Martinez-Gonzalez LJ, Alvarez JC, Eisenberg AJ, Budowle B, Lorente JA. Genetic identification of missing persons: DNA analysis of human remains and compromised samples. Pathobiology 2012; 79(5): 228-238."

90. "Butler JM, Shen Y, McCord BR. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. J Forensic Sci 2003; 48(5): 1054–64."

91. "Westen AA, Gerretsen RR, Maat GJ. Femur, rib, and tooth sample collection for DNA analysis in disaster victim identification (DVI). Forensic science, medicine, and pathology 2008; 4(1): 15-21."

92. "de Boer HH, Maat GJ, Kadarmo DA, Widodo PT, Kloosterman AD, Kal AJ. DNA identification of human remains in Disaster Victim Identification (DVI): An efficient sampling method for muscle, bone, bone marrow and teeth. Forensic science international 2018; 289: 253-259."

93. "Prinz, M. ve ark. DNA commission of the International Society for Forensic Genetics, Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification. Forensic Science International: Genetics 2007; 1(1): 3-12."

94. ICRC, M. P. (2009). Missing peaople DNA analysis and ıdentification of human remains: a guide to best practice in armed conflicts and other situations of armed violence. https://www.icrc.org/en/publication/4010-missing-people-dna-analysis-and-identification-human-remains-guide-best-practice adresinden ulaşılmıştır (Son Erişim Tarihi 25.05.2021)"

95. "Yüksel H, Kaplan İ, Dal T, Kuş S, Toprak G, Evliyaoğlu O. İdrar kültürü testi gerekliliğini öngörmede tam otomatik idrar analizi sonuçlarının performansı. Journal of Clinical & Experimental Investigations 2014; 5(2): 286-289."

96. "Aras Z. Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2011; 68(2): 97-104."

97. "Shimizu D, Miyazaki D, Ehara F, Shimizu Y, Uotani R, Inata K ve ark. Effectiveness of 16S ribosomal DNA real-time PCR and sequencing for diagnosing bacterial keratitis. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 2020; 258(1): 157-166."

98. "Emery DC, Shoemark DK, Batstone TE, Waterfall CM, Coghill JA, Cerajewska TL ve ark. 16S rRNA next generation sequencing analysis shows bacteria in Alzheimer's post-mortem brain. Frontiers in aging neuroscience 2017; 9: 195."

99. "Stevenson LG, Drake SK, Murray P.R. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology 2010; 48(2): 444-447".

100. "http://www.chm.bris.ac.uk/ms/maldi-ionisation.xhtml (Son Erişim Tarihi 25.05.2021)"

101. "https://biruni.com.tr/e-kutuphane/bilimsel-bultenler/mikrobiyolojik-tanimlamada-maldi-tof-ms (Son Erişim Tarihi 25.05.2021)"

102. "Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012; 36(2): 380-407)."

103. "Bilecen K, Yaman G, Ciftci U, Laleli YR. Performances and reliability of Bruker Microflex LT and VITEK MS MALDI-TOF mass spectrometry systems for the identification of clinical microorganisms. BioMed research international 2015;Article ID 516410, 1-1."

104. "Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clinical microbiology reviews 2013; 26(3): 547-603."

105."Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in microbiology 2015; 6: 791."

106."Jeverica S, Nagy E, Mueller-Premru M, Papst L. Sample preparation method influences direct identification of anaerobic bacteria from positive blood culture bottles using MALDI-TOF MS. Anaerobe 2018; 54: 231-235."

107."Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. Journal of clinical microbiology 2010; 48(3): 900-907."

108."Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porras-Guerra I, García-García MI, García-Sánchez JE, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clinical microbiology and infection 2011; 17(4): 546-551."

109."Timperio AM, Gorrasi S, Zolla L, Fenice M. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. PloS one 2017; 12(7): e0181860."

110."Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnosticsidentification of microorganisms and beyond. Appl Microbiol Biotechnol. 2012; 93(3): 965-74."

111."http://megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Kat%C4%B1%20Besiyerine%20Ekim.pdf (Son Erişim Tarihi 25.05.2021)"

112."Butler JM. The future of forensic DNA analysis. Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences 2015; 370: 1674."

113."Bajželj M, Pajnič IZ. Missing persons genetic identification. Zdravniski Vestnik 2017; 86: 7-8."

114."Bell CR, Wilkinson JE, Robertson BK, Javan GT. Sex-related differences in the thanatomicrobiome in postmortem heart samples using bacterial gene regions V1-2 and V4. Letters in applied microbiology 2018; 67(2): 144-153."

115."Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day, N, Dauphin B, Beretti JL ve ark. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. Clinical biochemistry 2011; 44(1): 104-109."

116."Rostamkhil Z. Tükürük Mikrobiyotasının Adli Bilimlerde Kimliklendirme Açısından Önemi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü; 2021."

117."Damann FE, Williams DE, Layton AC. Potential use of bacterial community succession in decaying human bone for estimating postmortem interval. Journal of forensic sciences 2015; 60(4): 844-850."

118."Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review. Forensic science international: genetics 2010; 4(3): 148-157."

119."Phuengmongkolchaikij S, Panvisavas N, Bandhaya A. Alcohols as solution for delaying microbial degradation of biological evidence on cotton swabs. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2017; 6: e539-e541."

120."Drzewiecka D. Significance and roles of Proteus spp. bacteria in natural environments. Microbial ecology 2016; 72(4): 741-758."

121."Larkin B, Iaschi S, Dadour I, Tay GK. Using accumulated degree-days to estimate postmortem interval from the DNA yield of porcine skeletal muscle. Forensic science, medicine, and pathology 2010; 6(2): 83-92."

122."Prüfer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S ve ark. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. Nature 2014; 505(7481): 43-49."

8. Ekler

Ek 1: Adli Tıp Kurumu Çalışma İzni

Ek 2: Etik Kurul Kararı

İÜC Tarih ve Sayı: 12/03/2019-23079

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
Adli Tıp Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı :86669574-302.14.06-
Konu :Özgür SEVİM'in Tez Çalışmasının
Etik Açıdan Değerlendirilmesi

Özgür SEVİM

Fen Bilimleri Anabilim Dalımızın 2822150009 numaralı öğrencisi Özgür SEVİM'in "Postmortem Dokularda Mikrobiyal DNA Degredasyonu" konulu tez çalışması 05.03.2019 tarihinde toplanan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup alınan karar benzeri ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Faruk AŞICIOĞLU
Enstitü Müdürü

EK :
1

DAĞITIM
Gereği:
Özgür SEVİM

Bilgi:
Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanlığı

Doğrulamak İçin:http://dogrulama.istanbulc.edu.tr/enVision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BELM0JHFP
Ayrıntılı bilgi için irtibat : Sema SARIOĞLU ÜNAL Dahili : 22833
İ.Ü.C. Adli Tıp Enstitüsü 34098 Cerrahpaşa/İSTANBUL
Tel : (0212) 414 30 00 Faks : (0212) 588 00 11
e-posta : adlitipens@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbulc.edu.tr

İÜC Tarih ve Sayı: 11/03/2019-39564

* B E 8 R 0 J A 7 8 *

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı :59491012-604.01.02-
Konu :Doktora Öğrencisi Özgür SEVİM'in etik kurul kararı A-48

ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi :15.02.2019 tarih, 86669574-302.14.06-27214 sayılı yazı

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi **Doç.Dr.Hüseyin ÇAKAN'ın** danışmanlığında **Doktora Öğrencisi Özgür SEVİM'in** yürütücülüğünde **"Postmortem Dokularda Mikrobiyal DNA Degredasyonu"** başlıklı Doktora Tezi çalışması hakkında ilgi yazınız ve ekleri **05 Mart 2019** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup;Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

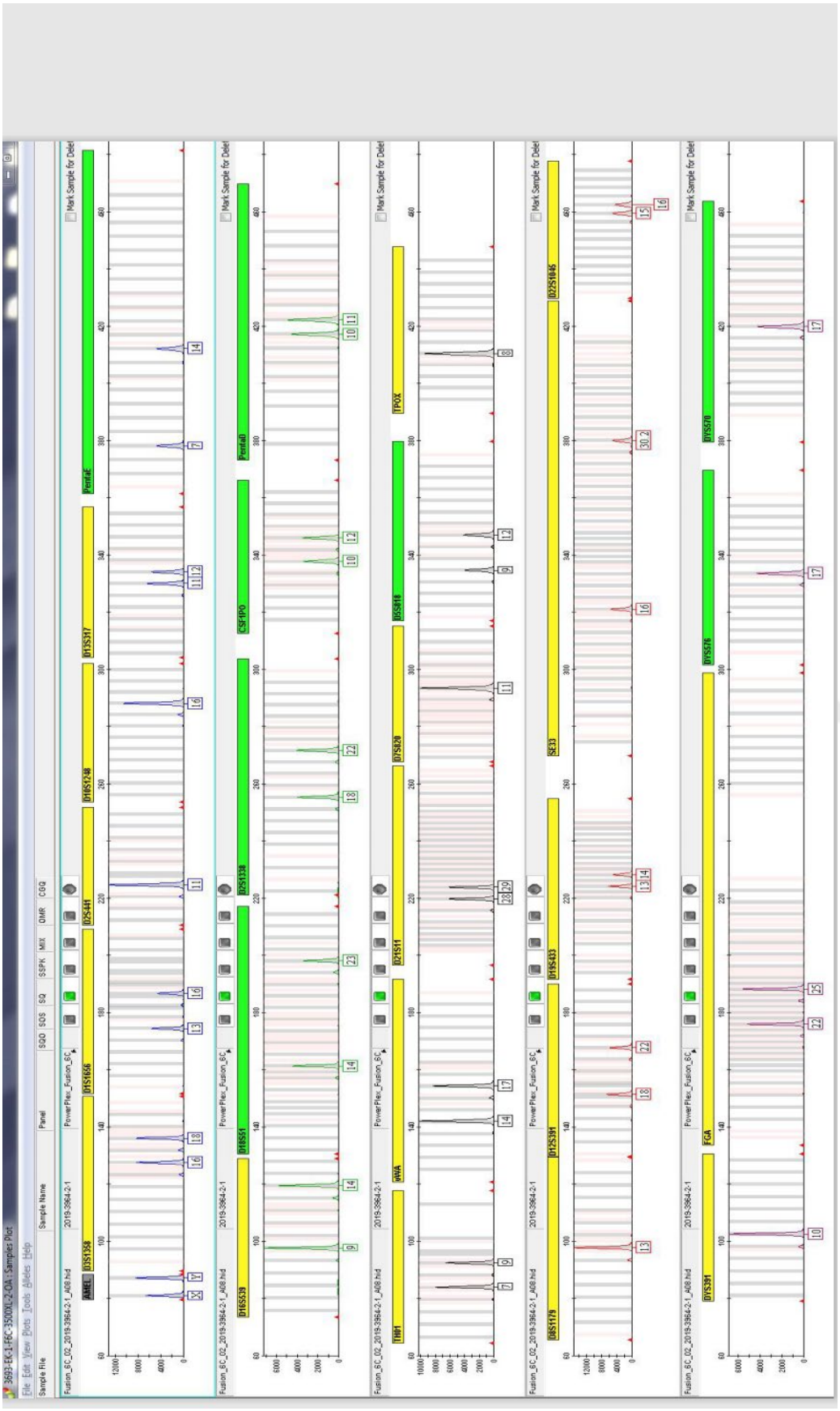
e-İmzalı
Prof. Dr. Muhlis Cem AR
Dekan a.
Dekan Yardımcısı

NOT:Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

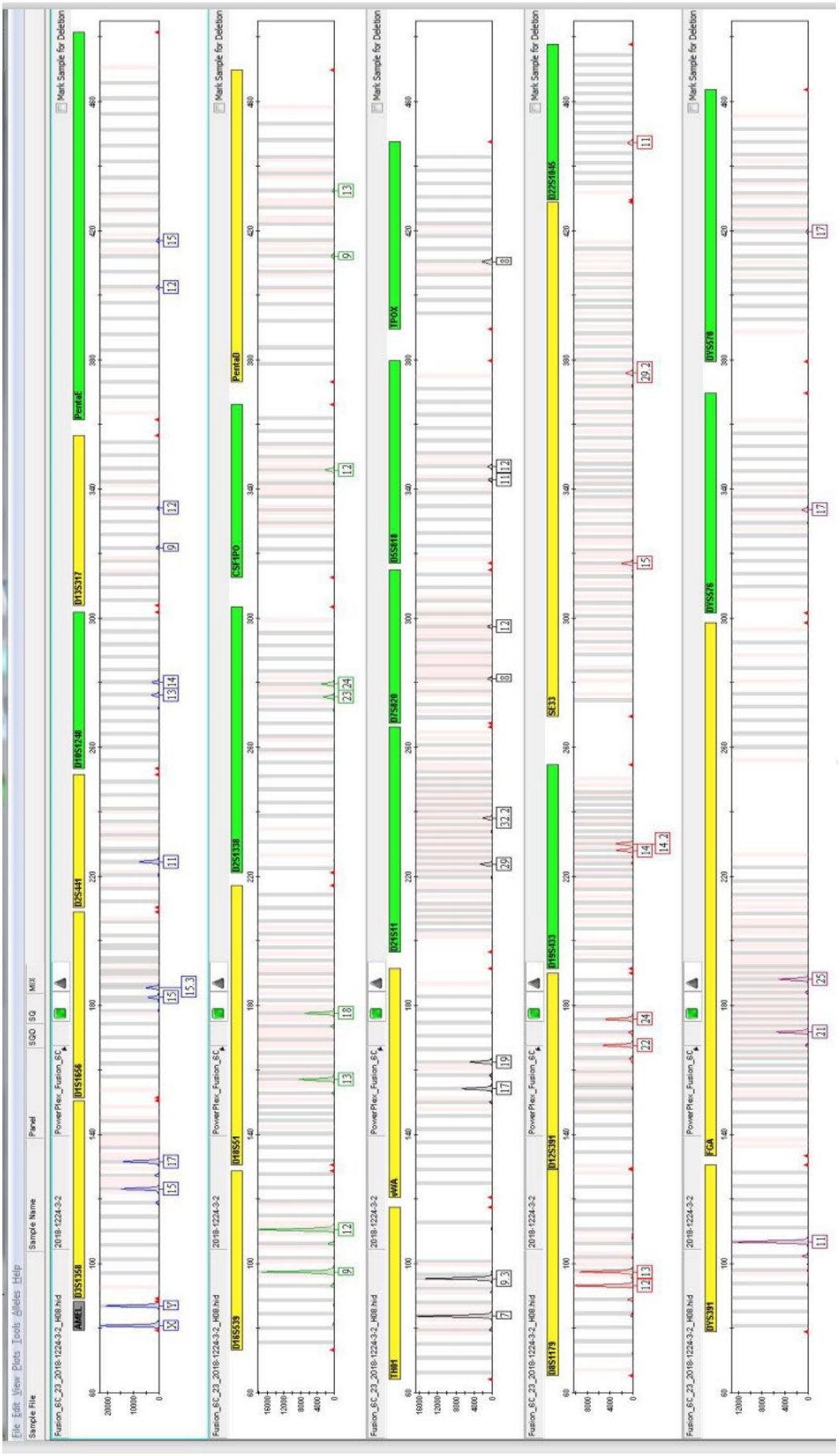
EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak İçin:http://dogrulama.istanbulc.edu.tr/enVision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE8R0JA78
Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbulc.edu.tr

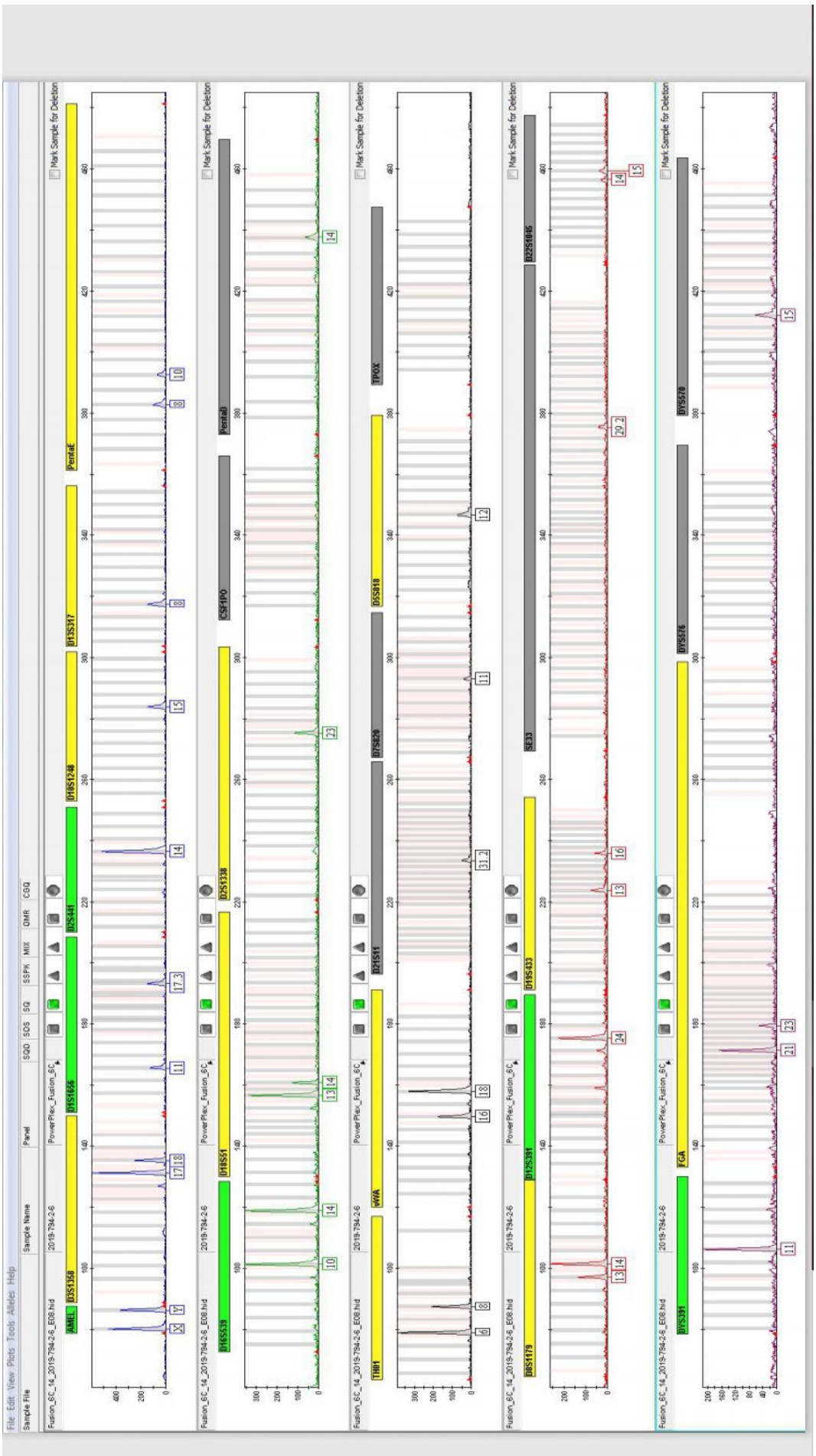
Ek-3: Farklı degredasyon seviyelerine yönelik elektrofereogram örnekleri



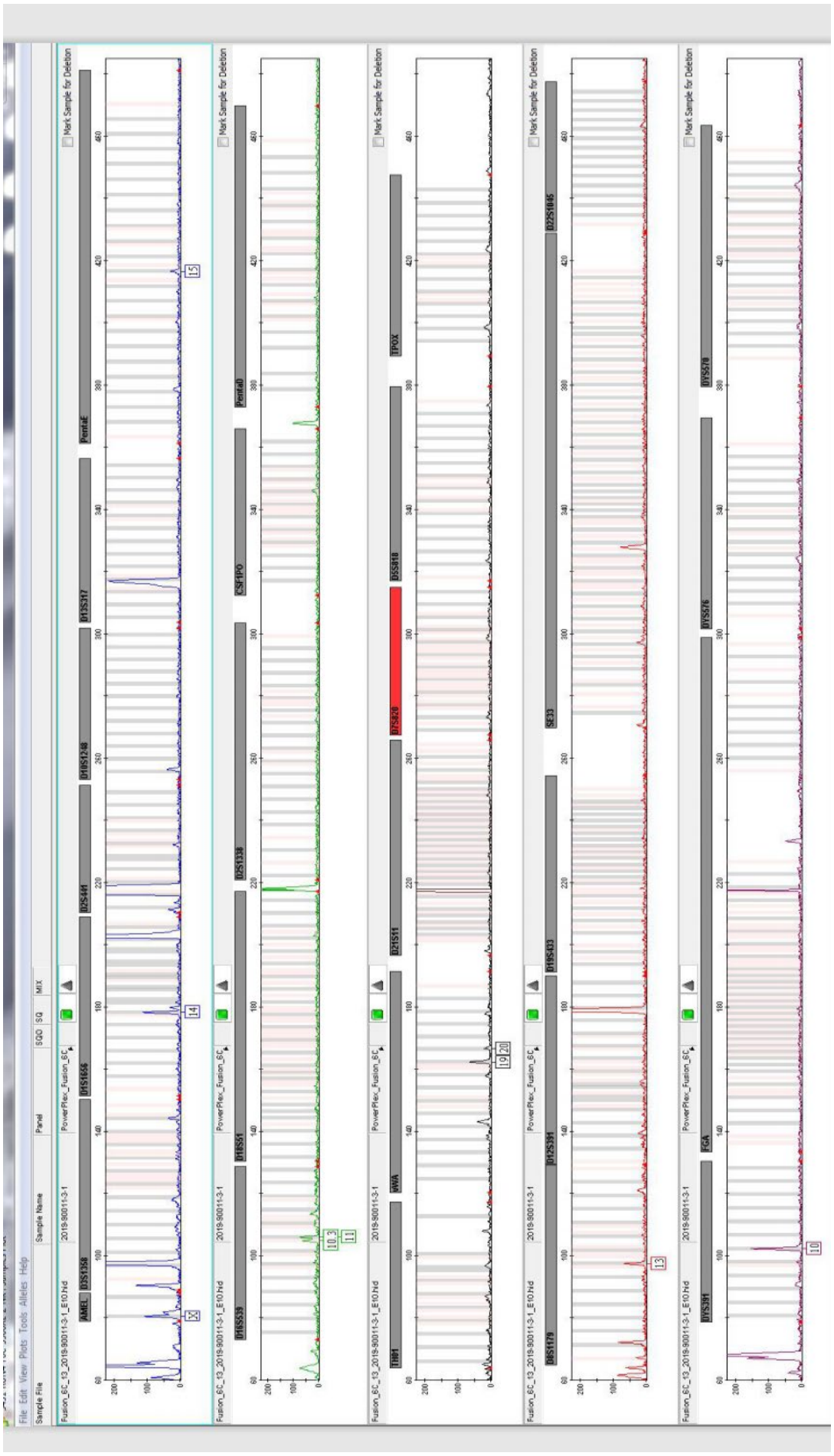
* Tüm DNA profili tespit edildi. DNA degredasyonu tespit edilmedi.



* Tam DNA profili tespit edildi. Pik boylarında düzensizlikler. hafif degredasyon gözlendi.



* Eksik DNA profil elde edildi. heterozigot pik seviyelerinde aşırı düzensizlik tespit edildi. DNA degredasyonu tespit edildi



* DNA inceleme çalışmalarına cevap vermedi. Yüksek oranda DNA degradasyonu tespit edildi.

9. Özgeçmiş

A. Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Özgür SEVİM

Doğum tarihi:

Yabancı dil: İngilizce

Görev yeri: Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, Biyoloji İhtisas Dairesi 1997-Devam

e-posta adresi:

Telefon:

B. Eğitim bilgileri

Yüksek Lisans: İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü (1996-2003)

Tez Konusu: Alkoliklerde Keton cisimleri ve Ketoasidozdan Ölümler Arasındaki İlişki

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Müjgan CENGİZ

Lisans: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü 1992-1996

C. Bilimsel Yayınlar

Özgür SEVİM, Gönül FİLOĞLU. 1. Uluslararası TURAZ Adli Tıp ve Patoloji Kongresi. Mt-DNA Analizi ve Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi. Ekim 2016, Bakü (Poster Sunumu)

Hüseyin ÇAKAN, Özgür SEVİM. 8. European Academy of Forensic Science Conference. Determination of Infection Factors and Microbial Risk Distribition in the Ambiant Air of Autopsy Rooms. August 2018, Lyon (Poster Sunumu)

Bestami ÇOLAK, Özgür SEVİM. 16. Adli tıp Günleri. Karışık Örneklerde Differansiyel Lysis Yöntemi ile Mağdur Epiteli ile Şüpheli Sperminin Ayrıştırılması. Ekim 2018, Antalya (Poster Sunumu)