



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİNDE KANTİTATİF
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU İLE HÜCRE DIŞI SERBEST DNA VE
miRNA ANALİZİ**

Duygu YAVUZ KILIÇASLAN

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİNDE KANTİTATİF
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU İLE HÜCRE DIŞI SERBEST DNA VE
miRNA ANALİZİ

Duygu YAVUZ KILIÇASLAN

DİSİPLİNLERARASI ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinasyon Birimi tarafından
22L0230005 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Postmortem İnterval Tayininde Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Hücre Dışı Serbest DNA ve miRNA Analizi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Duygu YAVUZ KILIÇASLAN

Tarih: 17.01.2023

İmza:

KABUL ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Adli Bilimler Anabilim Dalı'nda Duygu YAVUZ KILIÇASLAN tarafından hazırlanan "Postmortem İnterval Tayininde Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Hücre Dışı Serbest DNA ve miRNA Analizi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

17.01.2023

Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. H. Sinan SÜZEN

Ankara Ü. Eczacılık Fakültesi

Üye

Prof. Dr. Sait ÖZSOY

Sağlık Bilimleri Ü. Gülhane

Tıp Fakültesi

Üye

Prof. Dr. Nergis CANTÜRK

Ankara Ü. Adli Bilimler Enstitüsü

Üye

Doç. Dr. Cahit DOĞAN

Hacettepe Ü. Fen Fakültesi

Üye

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

Prof. Dr. Fügen Aktan

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Ölüm	3
1.1.2. Somatik Ölüm	3
1.1.3. Hücresel Ölüm (Sellüler Ölüm)	3
1.2. Ölüm Sınıflaması	4
1.2.1. Doğal Ölüm	4
1.2.2. Zorlamalı Ölüm	4
1.2.3. Yalancı Ölüm	5
1.3. Postmortem İnterval Tayini	5
1.3.1. Ölü Soğuması (Algor Mortis)	6
1.3.2. Ölü Morluğu (Livor Mortis)	7
1.3.3. Ölü Katılığı (Rigor Mortis)	9
1.3.4. Dekompozisyon	11
1.3.5. Plazma Çalışmaları ve Kan Hücreleri Değişiklikleri	14
1.3.6. Protein Çalışmaları	14
1.3.7. Vücut Sıvıları Çalışmaları	15
1.3.8. Göz Yapısı Değişiklikleri ve Vitroz Sıvı Çalışmaları	16
1.3.9. Mide Sindirimi ve Boşalma Hızı	18
1.3.10. Mikrobiyota Çalışmaları	18
1.3.11. Entomolojik Çalışmalar	19
1.3.12. Moleküler Çalışmalar	21
1.4. Hücre Dışı Serbest DNA	23
1.5. miRNA	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	33
2.1. Örneklem Yöntemi ve Sayısı	33
2.2. Serum Örneklerinin Toplanması	34
2.3. Hücre Dışı Serbest DNA Analizleri	35
2.3.1. Hücre Dışı Serbest DNA İzolasyonu	35
2.3.2. Hücre dışı serbest DNA'nın Gerçek Zamanlı kantitatif PZR (qPZR) Analizi	37
2.4. miRNA Analizleri	40
2.4.1. miRNA İzolasyonu	40
2.4.2. Özel Önceden Tasarlanmış miRNA Plaka Dizisi	43
2.4.2.1. miRNA'dan cDNA Sentezi	44
2.4.2.2. cDNA Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	45
2.5. Hücre Dışı Serbest DNA ve miRNA Relatif Kantitasyon Hesaplanması	46

2.6. İstatistik	47
3. BULGULAR	48
3.1. Hücre Dışı Serbest DNA qPCR Analiz Bulguları	48
3.2. miRNA Analiz Bulguları	51
4. TARTIŞMA	59
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
ÖZET	65
SUMMARY	66
KAYNAKLAR	67
EKLER	78
Ek-1. Etik Kurul Onayı	78
Ek-2. Etik Kurul Onayı devamı	79
ÖZGEÇMİŞ	80

ÖNSÖZ

Bu doktora tezi çalışmasında, farklı zaman aralıklarında ratlardan alınan serum örneklerinde, hücre dışı serbest DNA ve seçilen miRNA'ların düzeylerinin kantitatif analizleri yapılmış, ölüm sonrası geçen süre arasındaki olası korelasyon ile postmortem interval tayininin araştırılması yapılmıştır.

Doktora çalışmalarım boyunca beni yüreklendiren, her türlü desteğini bana sunan ve mesleki alanımda gelişmem için her türlü desteğini hissettiğim danışmanım Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN'a, tezimin deney hayvanları aşamasında bana desteklerini esirgemeyen Dr. Emrah EMİRAL'a, tüm akademik hayatım boyunca yanımda hissettiğim, adli bilimler yolunda desteğini hiç esirgemeyen Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü'nden Sayın Prof. Dr. Nergis CANTÜRK'e, ders dönemi ve tez döneminde manevi desteğini esirgemeyen Üsküdar Üniversitesi'nden Prof. Dr. Sevil ATASOY'A, destekleri için Atlas Biyoteknolojiye, istatistik aşamasında destekleri için Mustafa Agah TEKİNDAL'a

ve son olarak tüm hayatım boyunca olduğu gibi akademik hayatımın uzun ve zor döneminde de her türlü bana destek olan, her zaman yanımda olan babam İsmail YAVUZ, annem Sevim YAVUZ, kardeşim Batuhan YAVUZ ve eşim Enis Bahadır KILIÇASLAN'a

En içten duygularımla teşekkür ederim...

Duygu YAVUZ KILIÇASLAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ADP	Adenozin Difosfat
Ark.	Arkadaşları
ATP	Adenozin Trifosfat
Bç	Baz Çifti
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
cDNA	Komplementer DNA (Complementer DNA)
CIE	Uluslararası Aydınlatma Komisyonu (Commission Internationale de l'Eclairage)
Ct	Eşik Değeri (Threshold Cycle)
cTnI	Kaiyak Troponin I
cTnT	Kardiyak Troponin T
DGCR8	DiGeorge sendromu kritik bölge gen-8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8)
Dk.	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	DNA Nükleotid Bazları
DTT	Ditiotreitol
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
Gr	Gram
HMGB- 1	High Mobility Group Box-1
LPS	Lipopoli-sakkarit
m ²	Metrekare
MEF2C	Miyosite özgü güçlendirici faktör 2C (Myocyte-specific enhancer factor 2C)
miRNA	MikroRNA

ML	Mililitre
mRNA	Mesajcı RNA (Messenger RNA)
NK	Natural Killer
nm	Nanometre
PI3K	Fosfoinositid 3-kinazlar (Phosphoinositide 3-kinases)
Postmortem İnterval	PMİ
pre-miRNA	Prekürsör miRNA
pri-miRNA	Primer miRNA
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPZR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RISC	RNA kaynaklı susturma kompleksi (RNA-Induced Silencing Complex)
RNA	Ribonükleik Asit
RNAaz II	RNA polimeraz II
RNAaz III	RNA polimeraz III
RNaz	Ribonükleaz
Rpm	Dakikada devir sayısı (Revolutions Per Minute)
RT-PCR	Gerçek zamanlı PZR (Real Time PCR)
S	Saniye
SAGE	Gen Ekspresyonunun Seri Analizi (Serial analysis of gene expression)
SD	Standart Sapma
snRNA	Küçük Nükleer RNA (Small Nuclear RNA)
SREBP-1c	Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Protein-1 (Sterol Regulatory Element-binding Protein-1)
SRY	Cinsiyet Belirleyici Bölge Y Gen (Sex-Determining Region Y Gene)
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
XPO5	Exportin-5

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Henssge nomogramı	7
Şekil 1.2. Livor Mortis	8
Şekil 1.3. L*a*b* renk sistemi	9
Şekil 1.4. Rigor Mortis	11
Şekil 1.5. Pütrefikasyon	13
Şekil 1.6. Sabunlaşma	13
Şekil 1.7. Maserasyon	14
Şekil 1.8. Tache Noir	17
Şekil 1.9. Böceklerin gelişim evreleri	20
Şekil 1.10. miRNA Biyogenezi	26
Şekil 1.11. miR-122'nin genomik organizasyonu	28
Şekil 1.12. miR133'ün genomik organizasyonu	29
Şekil 1.13. miR-1-1'in genomik organizasyonu	30
Şekil 1.14. miR-1-2'nin genomik organizasyonu	30
Şekil 1.15. miR-16'nın genomik organizasyonu	31
Şekil 1.16. let-7e'nin genomik organizasyonu	32
Şekil 2.1.6., 12., 24. ve 48. saatler deney hayvanları gruplarının otopsi ile örneklerinin kan alınması	35
Şekil 2.2. Exgene Cell SV mini kit	36
Şekil 2.3. SYBR green qPZR	38
Şekil 2.4. QuantStudio™ 5 Gerçek zamalı PZR cihazı	40
Şekil 2.5. Hybrid-R miRNA mini test kiti	41
Şekil 2.6. Riboex ve kloroform eklenmiş serum örneği	42
Şekil 2.7. Kit içerisindeki iki farklı por özelliğindeki filtreli tüpler	42

Şekil 2.8. Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cyclers cihazı	45
Şekil 3.1. ACTB Ölçümlerinin Zamansal Değişimi	50
Şekil 3.2. GAPDH Ölçümlerinin Zamansal Değişimi	50
Şekil 3.3. ACTB ve GAPDH Ölçümlerinin Zamansal Değişimi	51
Şekil 3.4. miRNA'ların Ct ölçümlerinin zamansal değişimi	52
Şekil 3.5. Çalışma gruplarında U6 Ct ölçümlerinin zamansal değişimi	54
Şekil 3.6. miRNA çalışma gruplarında Δ Ct ölçümlerinin zamansal değişimi	55
Şekil 3.7. Çalışma Gruplarında $\Delta\Delta$ Ct Ölçümlerinin Zamansal Değişimi	57
Şekil 3.8. Çalışma Gruplarında Fold Change Ölçümlerinin Zamansal Değişimi	58

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Deney hayvanlarının 24°C sıcaklıkta postmortem süreye göre gruplaması	33
Çizelge 2.2. ACTB Gerçek zamalı qPZR için kullanılan mastermix bilgileri	38
Çizelge 2.3. GAPDH Gerçek zamalı qPZR için kullanılan mastermix bilgileri	39
Çizelge 2.4. GAPDH ve ACTB primer bilgileri	39
Çizelge 2.5. Gerçek zamanlı qPZR Reaksiyonu Koşulları	39
Çizelge 2.6. miRNA-cDNA Sentezi İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri	44
Çizelge 2.7. miRNA-cDNA Sentezi Reaksiyonu Koşulları	45
Çizelge 2.8. Gerçek zamalı qPZR İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri	46
Çizelge 2.9. Gerçek zamalı qPZR Reaksiyonu Koşulları	46
Çizelge 3.1. ACTB ve GAPDH Ölçümlerinin Zamanlara Göre Karşılaştırması	49
Çizelge 3.2. Let-7e, mir-1, mir-133a, mir-16, mir-122 genlerinin 0., 6., 12., 24. ve 48. Saatlerde Ct değerlerinin zamanlara göre karşılaştırması	52
Çizelge 3.3. Çalışma gruplarında U6 Ct ölçümlerinin zamanlara göre karşılaştırması	53
Çizelge 3.4. Çalışma gruplarında Δ Ct ölçümlerinin zamanlara göre karşılaştırması	55
Çizelge 3.5. Çalışma Gruplarında $\Delta\Delta$ Ct Ölçümlerinin Zamanlara Göre Karşılaştırması	56
Çizelge 3.6. Çalışma Gruplarında Fold Change Ölçümlerinin Zamanlara Göre Karşılaştırması	58

1. GİRİŞ

Adli vakalarda, ölüm zamanının bilinmesi olayların aydınlatılmasında büyük önem taşımaktadır. Ölüm sonrası geçen zaman dilimi postmortem interval (PMİ) olarak tanımlanmaktadır. Ölüm zamanı, adli olaylarda hem soruşturma hem de kovuşturma aşamasında olayların sonuçlanması, miras gibi yasal konuların çözülmesinde önemlidir. Adli tıp çalışmalarında ölüm zamanı tayini için araştırmalar son dönemlerde hızlanmış olup geleneksel yöntemlerin dışında teknoloji ve analiz metotlarının da gelişmesiyle birlikte farklı PMİ yöntemlerinde biyokimyasal değişimler, protein çalışmaları, vücut sıvılarının kullanılması, miRNA, RNA gibi genetik materyallerin kullanılması ve kızılötesi spektroskopisi çalışmaları araştırılmaya başlanmıştır (Aitkenhead-Peterson ve ark., 2021; Emiral ve ark., 2021; Peyron ve ark., 2021; Sabucedo ve Furton, 2003 ve Yang ve ark., 2018).

Postmortem değişiklikler, erken ve geç dönem olmak üzere iki ayrı grupta değerlendirilmektedir. Ölüm nedeni farklı olsa bile, ölüm sonrasında vücutta, algor mortis, rigor mortis, livor mortis ve pütrefikasyon gibi postmortem değişiklikler meydana gelmektedir. Adli Tıp'ta ölüm zamanı tayininde kanın donma derecesi, sakal ve kılların ölçümü, mide muhtevası, kan şekeri ölçümü, kemik iliği hücreleri, kan pH ölçümü gibi fizyolojik ve biyokimyasal değişimler geleneksel yöntemler olarak kullanılmaktadır (Arslan ve Koç, 2016; Koç ve Can, 2011). Postmortem değişimlerin son aşamalarından olan çürümenin toplam 4 dönemi bulunmaktadır. Çürümenin son evrelerinde postmortem değişimlerin zaman olarak değerlendirilememesi, mikroorganizma flora faaliyetleri nedeniyle biyokimyasal değişimlerin etkilenmesi PMİ tayininde güçlükler oluşturmaktadır bu da PMİ tayininde farklı yöntemlerin kullanılması için yeni araştırmalar gerektiğini göstermektedir.

Bu yöntemlerin dışında adli entomologlar böcek gelişim dönemleri olan yumurta, larva, pupa ve erişkin formlarının gelişim süreçlerini kullanarak ölüm sonrası minimum geçen zamanı tahmin edebilmektedirler (Lecheta ve Moura, 2019). Geleneksel yöntemler ve entomolojik veriler çevre şartlarından etkilenebilmekte ve

ölüm zamanı tayininde yanılığa neden olabilmektedir. Çevre şartlarında az etkilenen parametrelerin kullanılması bu alanda önem kazanmış ve bu doğrultuda çevre şartlarından daha az etkilenen genetik materyaller, son dönemlerde PMİ çalışmalarına dahil edilmiştir.

Ölümden sonra hücrelerde nekroz meydana gelir ve nekrozun sonucunda hücrelerde karbonhidrat, protein ve yağ parçalanmaları olur, hücrelerin biyokimyasal ve morfolojik yapıları bozulmaya başlar. Bu bozulmayla birlikte çekirdek ve hücre membranları ile korunmuş olan DNA (Deoksiribo nükleik asit) açığa çıkar. Ölümden sonra, hücre dışı serbest DNA miktarının zamana bağlı olarak kantitatif olarak belirlenmesi PMİ tayininde önemli bir parametre olma potansiyeli taşımaktadır. Hücre dışı serbest DNA ve PMİ ilişkisini 24 °C’de ve 4 °C’de kantitatif olarak araştırdığımız çalışmamızda, ilk üç saatte hücre dışı serbest DNA’nın arttığı, 72. saate kadar da konsantrasyonun düştüğü, 24 °C’de 4 °C’ye göre serumdaki hücre dışı serbest DNA’nın daha arttığı görülmüştür (Emiral ve ark., 2021). Literatürde hücre dışı serbest DNA’nın postmortem intervalde kantitatif olarak analiz edildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Teknolojik analizlerin gelişmesiyle birlikte PMİ çalışmalarında genetik belirteçlerin önemi de artmaktadır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde görevleri olan, kodlanmayan küçük RNA (Ribonükleik asit) bölgeleri olan mikroRNA’lar (miRNA); ribonükleaz tarafından kolayca parçalanamazlar ayrıca sıcaklık ve pH değeri gibi çevresel faktörlerdeki değişikliklere karşı da dirençlidirler (Jung ve Suh, 2014; Lv ve ark., 2014; Tu ve ark., 2018)

Bu çalışmada; farklı zaman aralıklarında ratlardan alınan serum örneklerinde, hücre dışı serbest DNA ve seçilen aday miRNA’ların (let-7e, mir-1, mir-133a, mir-16, mir-122) düzeylerinin kantitatif analizinin yapılması ve ölüm sonrası geçen süre arasındaki olası korelasyon ile PMİ tayininin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma, kantitatif hücre dışı serbest DNA ve miRNA verileri ve ölüm sonrası geçen süre arasındaki olası korelasyonun, adli tıp alanında postmortem interval tayininin konusunda moleküler çalışmaların önemini ve uygulanabilirliğini gösterme

potansiyeli yüksek bir çalışmadır. Kalitatif olarak yapılan tek çalışma olan Emiral ve ark. (2021)'nin çalışması ışığında 24 °C'de ilk 48 saatte hücre dışı serbest DNA'nın kantitatif araştırılması amaçlanmış olup, çalışmamız Postmortem interval tayininde hücre dışı serbest DNA'nın ve olası etkisi ile ilgili kantitatif yapılan ilk araştırma niteliğindedir.

1.1. Ölüm

Ölüm, hayati faaliyetlerin, canlılığın sona ermesidir. Fransız bilim insanı Emanuele Fodere ölümü tanımlamadan önce, 19. Yüzyıla kadar ölümün yeterli tanımlaması yapılamamıştır (Koç ve Can, 2011). Ölüm kavramı, somatik ve hücrel ölüm olarak tanımlanabilir. Hukuken ve yasal açıdan geçerli olan somatik ölüm tanısı olmakla birlikte, hücrel ölümün de önemi büyüktür.

1.1.2. Somatik Ölüm

Somatik ölümü Fransız bilim insanı Emanuele Fodere ilk kez tanımlamıştır. Fodere, somatik ölümü; spontan dolaşım, spontan solunum ve merkezi sinir sisteminin geri dönüşümsüz kaybı olarak tanımlamıştır (Koç ve Can, 2011). Hukuken geçerli olan ölüm kavramı somatik ölümdür. Ölüm tanısının konulmasına, ölüm tanısı kriterleri kapsamında biri nörolog veya beyin cerrahı, biri de anesteziyoloji ve reanimasyon veya yoğun bakım uzmanından oluşan iki hekim tarafından oy birliği ile karar verilir (Altınsoy ve ark., 2020; SHGM, 2014).

1.1.3. Hücrel Ölüm (Sellüler Ölüm)

Somatik ölüm gerçekleşikten sonra belli bir süre hücreler canlılığını sürdürmektedir. Bu süre farklı doku ve hücrelerde farklılık göstermekle birlikte, organ ve doku nakilleri için önemlidir. Hücrel ölüm genel olarak somatik ölümden sonra

gerçekleşse de, nükleer patlamalarda somatik ölüm ile aynı zamanda gerçekleşebilmektedir (Özderin, 2006).

1.2. Ölüm Sınıflaması

Ölüm tanısı konulduktan sonra her hekimin defin ruhsatı düzenleme yetkisi bulunmaktadır. Burada ölümün adli nitelikte olup olmaması, doğal mı yoksa zorlamalı bir ölüm mü olduğu hukuki prosedür için önemlidir. Bu nedenle ölümü, doğal ve doğal olmayan zorlamalı ölüm olarak ayırabiliriz. Bu iki kavramın dışında tıbbi ve hukuki olarak da sıkıntı olabilecek yalancı ölüm kavramı bulunmaktadır.

1.2.1. Doğal Ölüm

Normal yaşam sürelerini tamamlayan ya da hastalık sonucu ölümlere “doğal ölüm” denir. Ölümde bir şüphe yoksa defin ruhsatı alındıktan sonra cenazenin gömülmesine izin verilir. Ölüm, ani veya beklenmedik bir ölümse adli nitelik kazanabilir ve bu durumda adli süreç işlemesi gerekecektir.

1.2.2. Zorlamalı Ölüm

Doğal olmayan, zorlamalı ölümlere kaza, intihar, cinayet, ani ve beklenmedik ölümleri örnek olarak verebiliriz. Semptomların ortaya çıkmasından sonraki 24 saat içerisinde ölümün gerçekleşmesi ani ölüm; görünüşte sağlıklı olan bir kişinin birdenbire, çok kısa sürede ölmesi de beklenmedik ölümdür (Gülmen ve Meral, 2011). Ani ve beklenmedik ölümlerin adli tahkikattan geçmesi gerekmektedir. Türkiye’de ki ölümlerin çoğunluğunun adli nitelikte olduğu tahmin edilmektedir (Koç ve Can, 2011). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre, 2019 yılında 11606 kişi kaza; 3406 kişi intihar ve 810 kişi cinayet ve saldırı sonucu ölmüştür (TÜİK, 2020). Bu ölümler doğal olmamakla birlikte adli nitelik taşımakta ve bu vakalarda olay yeri

incelemesi, ceset muayenesi, otopsi ve postmortem incelemelerin yapılması gerekmektedir (Koç ve Can, 2011).

1.2.3. Yalancı Ölüm

Ölüm meydana gelmemesine rağmen, dolaşımın çok yavaş, solunumun yüzeyelleştiği, reflekslerin azaldığı durumlarda kişinin öldüğü kabul edilebilir buna “yalancı ölüm” denmektedir (Şener ve Kara, 2014). Yalancı ölümün gerçekleşmesinde farklı etmenler olabilir. Bunlardan birkaçı; kişinin çok kan kaybetmesi, bazı zehirlenmeler, şok durumu, suda boğulma, hipoksik anoksi, fazla doz merkezi sinir sistemi inhibitörleri alımı bunlara örnek verilebilir (Machado, 2010; Sabancı ve ark., 2008). Hekimlerin muayeneyi iyi yapmaları ve bulguları dikkatli değerlendirmesi gerekmektedir.

1.3. Postmortem İnterval Tayini

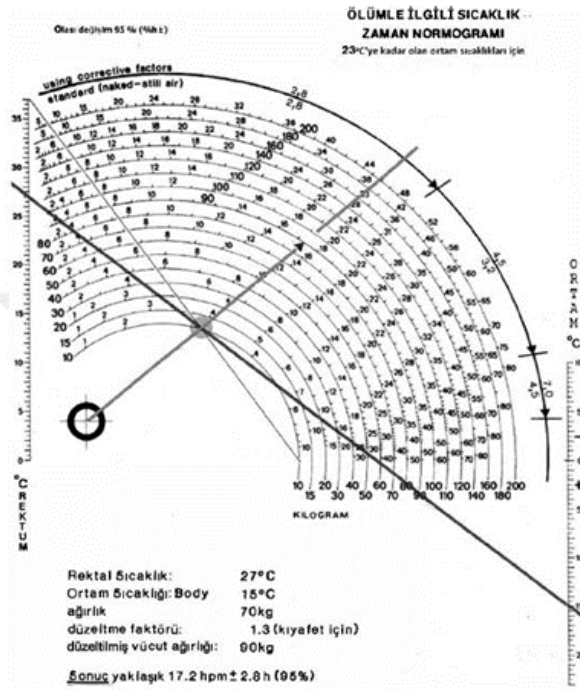
PMİ, adli olayların çözülmesinde önemli bir parametredir. PMİ tahminlerinde olaya tanık olan kişilerin ifadeleri, kamera kayıtları, telefon ve internet kayıtları, olay yeri inceleme bulguları kullanılmaktadır (Aksoy ve Turan Yurtsever, 2016; Kerman, 2019). Bu kaynakların dışında cesette meydana gelen postmortem değişimler PMİ tahmini için önem arz etmektedir. Cesedin taze ya da eski olma durumu ve meydana gelen değişikliklere göre PMİ için farklı yöntemler kullanılmaktadır (Lale ve ark., 2016).

Ölümden sonra vücutta fiziksel ve biyokimyasal değişiklikler olmaktadır. Günümüzde adli tıpta postmortem interval araştırmalarında sıklıkla, postmortem biyokimyasal, fizyolojik değişimler kullanılmaktadır. Bu değişimlere 2 ila 4 saat sonra başlayan rigor mortis, algor mortis ve livor mortis örnek verilebilir (Clark ve ark., 1997). Geç dönem cesetlerde ise iskeletleşme görülmekte ve PMİ için bu dönemde daha farklı yöntemler kullanılabilmektedir.

1.3.1. Ölü Soğuması (Algor Mortis)

Ölümden sonra ceset ısı kaybetmeye başlar. Ölümden sonraki cesedin ısı kaybedip, soğuması ilk kez 19. yüzyılda bildirilmiştir. Bu kayıp cesedin çevre ısisına eşitleninceye kadar devam eder. Isı kayıpları radyasyon, konveksiyon veya kondüksiyon yoluyla gerçekleşerek, her saatte 1,5 °C kayıpla, yaklaşık 24 saatte cesedin ısisı çevre ısisına eşitlenmiş olur (Alper ve ark., 1999; Koç ve Can, 2011).

Olay yerinde cesedin muayenesinde cesedin sıcaklığı ölçülerek not edilir. Ölçüm için ideal bölgelerden biri de rektal ölçümdür. Normal vücut sıcaklığı ortalama 36-36,5 °C'dir. Rektal sıcaklık normal vücut sıcaklığından yaklaşık 0,5 °C kadar daha yüksek olmakla birlikte ortalama 36,5-37,5 °C arasındadır (Koç ve Can, 2011, s:28; Samadder ve ark., 2018). Henssge nomogram, rektal ısı ve çevre ısisını kullanarak PMİ tahmini yapan bir yöntemdir (Noor ve ark., 2018). Nomogramda rektal ısı ile çevre ısisı arasına bir çizgi çekilir. Nomogramı kestiği noktanın sol alt bölgesinde bulunan dairenin merkezinden ilk çizgiyi kesen başka bir çizgi çekilir (Şekil 1.1). Son çekilen çizginin vücut ağırlığını gösteren yarım daireyi kestiği noktadan ölüm zamanı tespit edilir (Emiral, 2016). Bu yöntem PMİ tahminlerinde sıklıkla kullanılsa da farklı ortam ve koşullarda sonuçların doğruluğu ile ilgili tartışmalar vardır (Abdulazeez ve Noordin, 2010).



Şekil 1.1. Henßge nomogramı (Henßge ve Madeab, 2004; Kerman, 2019)

Ölü soğuması, çevre şartlarından etkilenen bir parametredir. Cesedin bulunduğu ortam, giyinik olup olmaması, ölüm nedeni, suda ya da karada bulunuşu, vücut ağırlığı, hava veya suyun hareketi ve nemi, vücudun beslenme durumu ve gelişmesi algor mortisi etkilemektedir. Ölü soğumasından PMİ tayini yapılmak isteniyorsa olay yerinden ve muayeneden alınacak tüm çevresel ve fiziksel koşul bilgileri çok önemlidir. Bunun yanı sıra ölüm nedeni de vücut sıcaklığını etkilemektedir. Enfeksiyon, beyin kanaması ve kalp krizine bağlı ölümlerde vücut sıcaklığı daha yüksek olabilir (Koç ve Kolusayın, 2011). Vücut ısisının ve ölü soğumasının çevre şartlarına bağlı olarak değişim göstermesi PMİ tayininde kullanımın kısıtlı olduğunu göstermektedir.

1.3.2. Ölü Morluğu (Livor Mortis)

Ölü morluğu olarak da ifade edilen livor mortis; ölümden sonra kan dolaşımının durması ve yer çekimi etkisi ile kanın önce büyük damarlara, oradan da

küçük damarlara ve kılcal damarlarda toplanması, sonrasında eritrositlerin parçalanması ve oksijen alamamasından kaynaklı olarak da dokuların kırmızı mor renk olması ile oluşur (Şekil 1.2) (Arslan ve Koç, 2016).



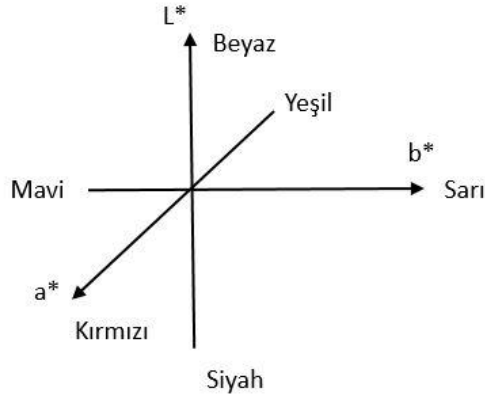
Şekil 1.2. Livor Mortis (Saukko ve Knight, 2004)

Ölü lekesi oluşumu fiziksel bir olaydır. Ölümden sonra 3-5 saatte başlar yaklaşık 12 saatte maksimuma ulaşır. Ölü lekelerinin oluşum zamanları, renkleri, dolaşımdaki kanın miktarına, kanın sıvı kalış süresine, kandaki hemoglobin miktarına, ölüm nedenine göre de değişiklik göstermektedir (Koç ve Can, 2011). Ayrıca cesedin pozisyonuna göre yer çekimi etkisiyle lekeler oluşacağından, cesedin pozisyonu hakkında bilgi vermektedir ancak lekeler fikse olduktan sonra cesedin pozisyonu değişse de lekelerin yeri değişmeyecektir bu süre yaklaşık 15. saatten sonraya denk gelmektedir (Alper ve ark., 1999).

Ölü lekeleri sadece dış muayenede değil, otopsi sırasında iç muayene ile de görülebilir. Özellikle akciğer olmak üzere pekçok organda da ölü lekeleri görülebilmektedir. Dış muayenede daha erken saatlerde görülen lekeler, iç organlarda yaklaşık 18-24. saatlerde görülmeye başlanır (Dimaio ve Dimaio, 2001, s:24; Şahinoğlu Güneş, 2020).

Ölü lekelerinin postmortem interval tayininde kullanılması için 1976 yılında Uluslararası Aydınlatma Komisyonu (CIE - Commission Internationale de l'Eclairage)

renk sisteminin kullanılması ile ilgili bir çalışma yapmıştır (Usumoto ve ark., 2010; Weatherall ve Cloombs, 1992). “ $L^*a^*b^*$ sistemi” veya “CIELAB renk uzayı” olarak adlandırılan bu sistemde ölü lekeleri spektrofotometrik olarak incelenmiştir (Şekil 1.3). $L^*a^*b^*$ sisteminde, L^* değeri aydınlık-karanlık; a^* değeri kırmızı-yeşil; b^* değeri ise mavi-sarı eksenini ifade eder (Usumoto ve ark., 2010).



Şekil 1.3. $L^*a^*b^*$ renk sistemi (Usumoto ve ark., 2010)

$L^*a^*b^*$ renk sistemi ile yapılan çalışmada sarı= $+b$, mavi= $-b$, kırmızı= $+a$, yeşil= $-a$ olarak formüle edilerek, kontrol deri rengi ile ölü lekeleri arasındaki farklılık “ Δ ” simgesiyle “ ΔE^*ab ” şeklinde; renksel parlaklık olan chroma da “ C^* ” şeklinde ifade edilmektedir (Kerman, 2019). ΔCC^* ve $\Delta CC^*/C_c^*$ parametrelerinin postmortem interval ile zayıf bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Kerman, 2019; Usumoto ve ark., 2010). $L^*a^*b^*$ renk sistemi çalışmasında da bildirildiği gibi ölü lekeleri ile PMİ tahmininde net bir sonuç alınamamakta ve ölü lekelerinin oluşumu fiziksel ve fizyolojik etkilere de bağlı olduğu göz önünde bulundurulduğunda PMİ tahmininde ölü lekelerinin kullanılmasında zorluk çıkabilmektedir.

1.3.3. Ölü Katılığı (Rigor Mortis)

Ölümünden yaklaşık 2-6 saat sonra küçük kaslarla birlikte yüz, boyun kasları, kol ve bacak kasları kasılmaya ve katılaşılmaya başlar (Şekil 1.4) (Erkol, 1994; Goff, 2009). Ölümün hemen ardından tüm istemli ve istemsiz kasların gevşediği bu duruma “primer

kas gevşemesi” denir. Rigor mortisde, ölümden sonra, kaslarda enerji kaynağı olan ATP (Adenozin trifosfat), ADP (Adenozin difosfat)’ye dönüşür bu da kasların sertleşmesine neden olur (Goff, 2009). Rigor mortis, dış muayene sırasında kontrol edilmelidir. Cesetin taşındığı, hareket ettirildiği sırada ölü katılığı bozulmuş olabilir, bu durumda yanılmamak için mutlak kol ve bacak eklemlerinin hepsini değerlendirmek önemlidir.

Rigor mortis, ölümden sonraki 12 saatte tamamen maksimuma ulaşır (Gorea, 2002). Rigorun tamamen çözünmesi 36 saatlik zaman aralığına kadar olabilir bu da postmortem değişiklikler içinde ölümden sonra en uzun zaman aralığını veren parametre olabileceğini gösterir (Shivpoojan, 2018).

Ölü katılığının oluşması, çözülmesi ve oluşma zamanı iç ve dış faktörlerden etkilenmektedir. Sıcaklık arttıkça kasların çözünme süresi azalırken 10 °C’nin altında rigor oluşmaz; kas kütlesi arttıkça katılaşma gecikir; Fetüsde rigor mortis erken başlar geç çözülür; ölmeden hemen önceki egzersiz gibi kas aktivitesi ölü katılığını hızlandırır (Krompecher, 1981; Özderin, 2006; Shkrum ve Ramsay, 2007). Ölüm nedeni de rigor mortisi etkilemektedir. Striknin zehirlenmeleri ve tetanozda çabuk başlar, uzun sürer; donmuş bir cesette de rigor oluşmaz ancak normal oda sıcaklığına getirildiğinde rigor yeni oluşmaya başlar bu da ölüm zamanı tayininde yanılgıya neden olabilir (Özderin, 2006).

Rigor mortisin karıştığı üç durum vardır. Bunlar; ölümün ani ve hızlı olduğu durumlarda ölmeden önce kullanılan kasların ani bir şekilde kasılması olan spazm kadaverik (ölü sıkışması); donma sertliği ve sıcak sertliği. Bu üç durum ölü sertliği ile karışmakta ve iyi analiz edilmezse PMİ de yanılgıya neden olabilmektedir.



Şekil 1.4. Rigor Mortis (Koç ve Can, 2011)

1.3.4. Dekompozisyon

Cesedin bozulması anlamına gelen dekompozisyon, dokuların enzimlerle parçalandığı otoliz ve çürüme basamaklarını kapsar. Canlıyken vücutta bulunan bakteriler, ölümden sonra da bir süre faaliyetlerine devam ederler. Mikroorganizmaların bu faaliyeti cesedin çürümesine neden olur. Normal sıcaklıklarda cesedin çürümesi 24-48 saatte yetişkinlerde batin sağ alt kadranda, yeni doğanlarda ağız, suda bulunan cesetlerde ise baş kısmından başlamaktadır.

Cesedin bulunduğu ortamın ısısı, nemi, hava-suyun hareketleri, ortam şartları çürümeyi etkiler. 10 °C den düşük sıcaklıklarda çürüme hızı azalır, 0 °C ye yakın ya da eksi derecede çürüme durur (Özderin, 2006).

Açık havada bulunan cesette hava rüzgârlı ve kuru ise çürüme yavaş olur; suda bulunan cesetlerde ise su durgunsa çürüme hızlı olur bu nedenle PMİ tayininde özellikle sıcaklık, nem gibi olay yerinden gelecek bilgiler oldukça önemlidir (Özderin, 2006).

Çürümenin 4 evresi bulunur. Birinci evre çürümenin başladığı ve karnın patlamasıyla son bulan kükürtlü hidrojen, fosforlu hidrojen, metan, karbondioksit, karbonmonoksit, amonyak gibi gazların oluştuğu evredir. İkinci evre, karnın çöktüğü ve iç organların çamurlaştığı evredir bu evreden sonra PMİ tayini güçleşmektedir (Şekil 1.5) (Koç ve Can, 2011). Üçüncü evrede karaciğer ayırt edilemezken, dördüncü evrede rahim tamamen kaybolduğundan cinsiyet belirlenmesi de zorlaşmaktadır.

Çürümeyi etkileyen sabunlaşma, maserasyon ve mumyalaşma durumları bulunmaktadır. Eğer ceset sıcak ve nemli bölgede ise sabunlaşma (Şekil 1.6); kuru bölgedeyse mumyalaşma, anne karnında ölen fetüslerde de maserasyon gerçekleşebilir (Şekil 1.7). Bunlar çürümeyi engelleyen durumlardır. Bu durumların görülmesi PMİ tayininde de yanılgıya neden olabilir.

Çürümeden sonraki aşama olan iskeletleşme, PMİ tayini için zorluklar bulundurmakta bu nedenle PMİ tahmini için farklı teknikler kullanılmaktadır. Literatürde kemiklerdeki mikroskobik değişimler, nitrojen ve aminoasit içeriği tespiti, kemik floresansı, sitrat analizi, immünolojik analizler kullanılarak, iskeletleşmiş vakalarda PMİ tahmini için çalışmalar yapılmıştır (Lale ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada 26-90 yıllık kemik örneklerinin nitrojen içerikleri analiz edilmiş ve PMİ ya bağlı olarak azalma olduğu bildirilmiştir (Knight, 1969; Lale ve ark., 2016). Ölüm zamanı bilinen 30 kemik kesitinin floresansının incelenmesi ile yapılan bir araştırmada PMİ ile floresan yüzeyinin alansal kapsamı arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Sterzik ve ark., 2016).



Şekil 1.5. Pütrefikasyon (Alper ve ark., 1999)



Şekil 1.6. Sabunlaşma (Alper ve ark., 1999)



Şekil 1.7. Maserasyon (Alper ve ark., 1999)

1.3.5. Plazma Çalışmaları ve Kan Hücreleri Değişiklikleri

Kan plazmasındaki madde konsantrasyonları ve kan proteinleri PMİ tahmini çalışmalarında kullanılan parametrelerdir. Literatürde üre, kreatinin, glukoz, demir, potasyum, kalsiyum, enzimler, pankreas beta hücrelerinde insülinin immünohistokimyasal tespiti, miyo-albümin fraksiyonu ve kalsiyum da PMİ araştırmalarında kullanıldığı görülmüştür (Gallois-Montbrun ve ark., 1988; Neis ve ark., 1999; Wehner ve ark., 1999).

Kan hücrelerinden olan lökositlerin hücresel değişikliklerinin, PMİ tahmininde 6-120 saatte faydalı olabileceği bildirilmiştir (Dokgöz ve ark., 2001). Lökosit, eritrosit, trombosit gibi kan hücrelerinin PMİ ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmada, lökosit sayılarındaki değişimlerin PMİ tahmininde kullanılabileceği bildirilmiştir (Arıcan ve ark., 2000). Kadavralarla yapılan farklı bir çalışmada ise; kandaki insülin seviyeleri ile PMİ arasında önemli ölçüde ilişki olduğu bildirilmiştir (Kumar ve Verma, 2016).

1.3.6. Protein Çalışmaları

Kan proteinleri, postmortem interval çalışmalarında kullanılan belirteçlerden biridir. cTnI (Kardiyak Troponin I) de bunlardan biridir. cTnT'ye (Kardiyak Troponin

T) özgü monoklonal antikorlar kullanılarak Western blot analizi yapılan çalışmalarda, geniş ölüm zamanı aralığında kullanılabilecek bir parametre olduğu bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2016; Sabucedo ve Furton, 2003). Makrofajlar, monositler, NK hücreleri, dendritik hücreler, endotel hücreleri ve trombositler, nekrotik, hasarlı hücreler, apoptotik hücrelerden salgılanan HMGB- 1 (High Mobility Group Box -1)'in +4 °C'de PMİ tayininde kullanılabileceği bildirilmiştir (Bianchi ve Agresti, 2005; Emiral ve ark., 2021). Yapılan başka bir çalışmada PP2A-C'yi kısa vadeli (24 saat ila 48 saat) PMİ tahmini için aday olabileceğini bildirilmiştir (Wang ve ark., 2020).

PMİ tayininde protein çalışmaları önemli katkıları olmakla birlikte bazı proteinler farklı memeli gruplarında farklı sonuç gösterebilmektedir (Kang ve ark., 2003; Poloz ve O'day, 2009). Bu nedenle çalışmaların daha stabil parametrelere yönlendirilmesi gerekmektedir. Protein degradasyonu çevre şartlarından, bakteri aktivitesinden etkilendiği için protein degradasyonunu PMİ için kullanmak çok uygun olmayacaktır (Dell'Aquila ve ark., 2021).

1.3.7. Vücut Sıvıları Çalışmaları

Postmortem çalışmalarda kullanılan diğer örnekler vücut sıvılarıdır. Perikardiyal sıvı, vitröz sıvı, BOS (beyin omurilik sıvısı) bunların bazılarıdır. Sinovyal sıvı, kasların ve eklemlerin hareketlerini sağlayan bursa keselerinde depolanan sıvıdır. Vitröz sıvının, postmortem biyokimyasal inceleme için bulunmadığı veya yetersiz olduğu durumlarda sinovyal sıvı bir alternatif olarak kullanılabilmektedir. Sinovyal sıvı da vitröz sıvı gibi kontaminasyon ve çürümeden daha az etkilenen bir örnektir. Yapılan bir çalışmada sinovial sıvıdaki potasyum ve glikoz seviyelerinin, vitröz sıvıdaki kadar belirleyici olduğunu bildirmiştir (Tumram ve ark., 2011). Başka bir çalışmada ise sinovyal sıvıdaki üre, ürik asit ve kreatinin seviyelerinin PMİ ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Srettabunjong ve ark., 2020).

Vitröz sıvının aksine perikardiyal sıvı örneklerinin daha kolay ulaşılabilir olmasından dolayı postmortem araştırmalarda da konu olan bir örnek olmuştur.

Perikardial sıvı örnekleriyle yapılan bir çalışmada K^+ , fosfatlar ve Na^+ konsantrasyonlarındaki değişikliklerin PMİ ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Balasooriya ve ark., 1984). Antemortem ve postmortem perikardiyal sıvıdaki kreatinin ve üre, nitrojenin karşılaştırıldığı, postmortem örneklerde antemortem örneklerle göre kreatinin seviyesinin çok yüksek olduğu, serum örneklerine göre ise çok düşük olduğu bildirilmiştir (Takasu ve ark., 2022). Postmortem perikardiyal sıvıda kreatin, nitrojenin ürik asit miktarlarının ölçüldüğü başka bir çalışmada da ölüm nedenini ve sürecini araştırmak için yararlı olacağı bildirmişlerdir (Zhu ve ark. 2007).

Koroid pleksuslardan salgılanan BOS, ölümden önce oluşan enfeksiyon ya da kan beyin bariyerini bozacak başka bir durum yoksa genellikle korunmaktadır. BOS örnekleriyle postmortem süreçte yapılan araştırmalar genellikle protein düzeyleri üzerine olmuştur. Yapılan başka bir çalışmada BOS'daki tau ve p-tau proteinlerinin, timpanik sıcaklık ile bağlantılı olarak, ölümden sonra geçen zamanın potansiyel biyobelirteçleri olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Peyron ve ark., 2021).

1.3.8. Göz Yapısı Değişiklikleri ve Vitröz Sıvı Çalışmaları

Ölüm sonrası makroskobik olarak gözde oluşan değişikliklerin PMİ ile ilişkisi araştırılmıştır. Ölümden sonraki 6 ila 12 saat arasında kadavraların yaklaşık yüzde 27'sinde göz kapaklarının açık olduğu, 36 saatte ise tamamen kapandığı, bazı kadavraların göz kapaklarının 4 günden sonra tekrar açıldığı buna bağlı olarak göz kapağı açık olan bir cesedin ya 36 saatten az ya da 4 günden fazla süredir ölü olabileceği bildirilmiştir (Suzutain ve ark., 1978).

Gözlerin açık kalmasından kaynaklı konjonktivada kuruma gerçekleşir. Ölümün erken döneminde olan kuruma sonucu skleradaki siyahımsı-kahverengi renk değişikliği olan “Tache Noir” de ölüm sonrasında geçen zaman ile ilişkisi araştırılan parametrelerdendir (Şekil 1.8). Korneanın iki tarafında üçgen bölge oluşur ve göz 2-3 saatte sarımsı; 8-10 saatte siyahımsı-kahverengi renk alır (Bardale, 2011). Cesette

korneal bulanıklık bulunmuyorsa ölümün üzerinden 8 saatten az zaman geçmiş olabileceği; ileri derecede bulanıklığın olması ise 12 saatten sonra görüldüğü bildirilmiştir (Kocatürk ve ark., 2007; Suzutain ve ark., 1978).



Şekil 1.8. Tache Noir (Goff, 2009)

Vitröz Sıvı ise, gözün içinin büyük bir kısmını dolduran jelatinöz yapıda, saydam bir maddedir. Postmortem incelemelerde kullanılan örneklerden bir tanesidir. %95'den fazlası sudan oluşan, 280-1360 µg/mL protein bulunduran vitröz sıvı, otopsi sırasında lateral kantustan ve skleradan enjektör yardımıyla alınır (Lale ve ark., 2017). Vitröz sıvı içerisinde albümin ve demiri tutan proteinler de bulunmaktadır (Lale ve ark., 2017). Bu sıvı, göz içerisinde korunaklı bir bölgede bulunmaktadır. Kontaminasyondan uzak olması ve stabil olması postmortem çalışmalarda önemini arttırmıştır.

Potasyum, sodyum, klorür, kalsiyum, magnezyum, fosfat, üre, kreatinin ve laktat gibi biyokimyasal belirteçler PMİ tayin çalışmalarında kullanılmıştır (Chandrakanth ve ark., 2013). Vitröz sıvıdaki potasyumun, PMİ tayininde aktif rol oynayabilceği pek çok araştırmada da bildirilmiştir (Jaffe, 1962; Naumann, 1959; Sturmer, 1963). Vitröz sodyum ve klorür konsantrasyonu ölümden sonra geçen sürede azalırken; vitröz sıvıdaki potasyum ölümden sonra geçen sürede artış gösterdiği bildirilmiştir (Chandrakanth ve ark., 2013). PMİ tayininde kullanılan birçok parametrede olduğu gibi vitröz sıvıda postmortem potasyum artışının yaş ve çevre sıcaklığından etkilendiği bildirilmiştir (Zilg ve ark., 2015).

Magnezyum, PMİ de kullanılan diğer parametrelerden biridir. Yapılan çalışmalarda magnezyumun PMİ tayininde kullanılması ile ilgili ortak bir sonuç bulunmamakla birlikte genel görüş magnezyumun PMİ ile korelasyon göstermediği üzerinedir (Farmer ve ark., 1985; Gregora ve ark., 1979; Mihailovic ve ark., 2014; Nowak ve Balabanova, 1989).

Potasyumla birlikte sodyum da PMİ çalışmalarında ön plana çıkmıştır. Sodyum konsantrasyonu ölüm sonrasında potasyumun aksine azalma eğiliminde olduğu bu eğilimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı pek çok çalışmada bildirilmiştir (Jashnani ve ark., 2010; Madea ve ark., 1994; Tumram ve ark., 2011).

1.3.9. Mide Sindirimi ve Boşalma Hızı

Midede gıdanın varlığı veya yokluğu otopsi için önemli bulgulardır. Sindirimin gerçekleşip gerçekleşmediği, mide muhtevasının içeriği otopsi sırasında incelenmektedir. Midenin normal sindirimi yaklaşık 2-6 saat arasındadır (Watson, 2010).

Kişinin ne yediği, çiğneme süresi, sıvı-alkol miktarı, genel fiziksel ve psikolojik durumu sindirimde etkili olduğu için sadece mide sindirimi ve boşalma hızını değerlendirerek PMİ tayini yapmak doğru olmayacaktır (Jaffe, 1989; Jayaram ve ark., 1997; Lipp ve ark., 1997; Phillips ve ark., 1997; Tomlin ve ark., 1993; Troncon ve ark., 1994; Watson, 2010).

1.3.10. Mikrobiyota Çalışmaları

Mikrobiyota, insanlarda bulunan mikroorganizmaların tamamına verilen addır. İnsanlarda olan tüm bakterilerin yüzey alanı 400 m²'dir (Altuntaş ve Batman, 2017). Postmortem süreçte intestinal mikroorganizmalar aktivitelerine bir süre daha devam ederler ve özellikle çürüme evresine büyük rol oynarlar. Postmortem süreçte ölüm

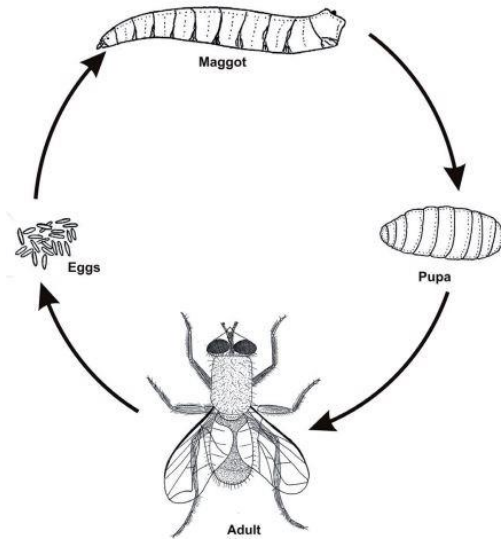
sonrası mikrobiyal aktivite, PMİ tayini, ölüm yeri ve nedeninin tespiti ve insan kimliğini belirlenmesinde yardımcı olmaktadır (Franzosa ve ark., 2015; Metcalf ve ark., 2017 ve Metcalf, 2019).

Domuz cesetleriyle yapılan bir araştırmada deri ve ağızda bulunan bakteri florasının 5 gün boyunca tutarlı bir değişim gösterdiği bildirilmiştir (Pechal ve ark., 2014). Ancak deri ve ağızda bulunan mikroorganizmaların intestinal mikroorganizmalara göre çevresel şartlardan daha çok etkilenmesinden kaynaklı intestinal mikroorganizmaların PMİ tayini için daha uygun olduğu düşünülmektedir (Hu ve ark., 2021).

1.3.11. Entomolojik Çalışmalar

Adli entomoloji, böceklerin artropodolar ve artropodoların yaşam döngüleri, davranışları ve ekolojileri ile ilgili bilgilerin adli olaylarda ve hukuk davalarında kullanıldığı bilim dalıdır (Kökdener, 2016a; Kökdener ve Karapazarlıoğlu, 2013). İlk olarak 13. yüzyılda adli bir vakanın aydınlatılmasında suç aletinin tespitinde kullanılmıştır.

Böcekler ölüm gerçekleştikten hemen sonra gelen canlılardır bu nedenle farklı türlerin farklı gelişim zamanları olduğundan yapılan araştırmalar postmortem interval üzerine yoğunlaşmıştır. Böceklerin gelişimleri yumurta evresi, beslenmenin ve hareketliliğin en fazla olduğu larva evresi, beslenmenin bittiği gelişimin devam ettiği pupa evresi ve gelişimini tamamlamış ergin evre olarak 4 ana evreye ayrılmıştır (Şekil 1.9). Cesette bulunan entomolojik örneklerin morfolojik özellikleri ile tür teşhisi yapıldıktan sonra, bulunduğu ortam koşullarında laboratuvar ortamında yetiştirilip, bu dört yaşam siklusları kullanılarak cesedin bulunduğu andan itibaren geriye dönük hesaplama yapılarak PMİ tayininde bulunulabilmektedir (Ceylan, 2020).



Şekil 1.9. Böceklerin gelişim evreleri (Kaleka ve ark., 2019)

Böceklerle yapılan PMİ tahmini için pekçok metod vardır. Larval yaş ve böcek süksesyon evrelerinin kullanımı en çok kullanılan metotlardandır (Kökdener, 2016b). Ergin böcekler cesede yumurta bırakmak için ve beslenmek için gelmektedirler. Ölümden sonra birkaç dakika içinde yumurta bırakan ergin böcekler bulunmaktadır. Ölümün üzerinden 1 aydan daha kısa bir süre geçtiyse, ceset üzerinden beslenen böceklerin yaşam döngüleri kullanılarak minimum ölüm zamanı tayini yapılabilir (Amendt ve ark., 2004). Yumurtalar cesede bırakıldıktan sonra beslenme evresine yani larval döneme geçmektedir bu evrede gelişim aşamalarına bağlı olarak 1. İnstar larval dönem, 2. İnstar larval dönem ve 3. İnstar larval dönem olarak tamamlanır. Cesetteki en gelişmiş larva, erginin cesete ilk geldiği zaman hakkında bilgi sağlamaktadır (Amendt ve ark., 2006).

Larvanın yaşının hesaplamasında, larval süksesyon aşamaları, larvanın uzunluğu ve gen ekspresyonu kullanılarak PMİ tahmini yapılabilir (Kökdener, 2016a). Larval dönem tamamladığında ise beslenme evresini bitirir ve saklanarak gelişim evresine girer bu döneme pupa evresi denir. Pupa evresine girecek larvalar saklanma eğilimindedir bu dönem böcekleri halı altında, kıyafet kıvrımlarında veya toprak altına bulmak mümkün olmaktadır. Pupa evresinde gelişimini tamamlayan böcekler ise ergin döneme geçerler ve döngü bu şekilde tamamlanır. Böceklerin süksesyon evresinden tam olarak yararlanmak için cesede gelen böceklerin tür tayinin yapılması ve türe göre

süksesyon hesaplanmasının yapılması PMİ’de doğru zaman aralığı verebilmek için önemlidir.

Böceklerin gelişim evreleri soğukkanlı canlılar olduğundan sıcaklık ve nemle ilişkilidir. Cesedin bulunduğu bölgenin yeri, bitkisel durumu, toprak türü cesedin çürümmesine etki eder ve gelen böceklerin türüne de etki etmektedir (Kerman, 2019). Sıcaklığın veya nemin artması veya azalması gelişim evrelerini ve sürelerini etkileyebilmektedir bu nedenle PMİ tayininde kullanılırken bu parametrelere dikkat etmek önemlidir. Farklı bölgelerdeki gelişimsel verilerin karşılaştırılmasında “toplam derece saat yöntemi” veya “toplam gün derece yöntemi “ kullanılabilir (Kökdenler, 2016a).

Adli entomolojinin ana amacı postmortem interval olmakla birlikte ölümün gerçekleştiği yer, ölüm şekli, travma bölgesinin tespiti, ihmal ve istismar olgularının belirlenmesi de bu alanın konularıdır.

Son dönemde, entomolojik analizler ve teknolojik analizlerle birlikte genetik materyaller de PMİ çalışmalarında önemli hale gelmiştir.

1.3.12. Moleküler Çalışmalar

PMİ tayininde geleneksel yöntemlerin dışında teknolojinin gelişmesiyle birlikte moleküler çalışmalar önem kazanmıştır. Çalışmalar nükleik asitler üzerine yoğunlaşmış ve DNA-RNA değişimlerinin PMİ tayininde etkinliği ile ilgili araştırmalar yapılmıştır (Pérez-Martínez ve ark., 2017; Van Den Berge ve ark., 2016). Çevresel şartlardan etkilenebilen geleneksel yöntemlerin aksine DNA ve RNA gibi nükleik asitler hücre çekirdeğinde korunduğundan dış etkenlerden daha az hasar görürler bu nedenle de PMİ’nin daha kesin bir şekilde belirlenmesine yardımcı olabilecek parametrelerdir.

Parafinli ve donmuş dokularla yapılan çalışmada, 3 günün altında ölüm zamanı olan kadavralarda 1000 bç uzunluğunda fragmanlara ayrıldığı; 14 günden fazla ölüm zamanı olan kadavralarda yani dekompoze örneklerde 400 bç (parafinli doku) ve 600 bç (donmuş doku) uzunluğunda fragmanların amplifiye edildiği; ölüm süresi 3 güne kadar olan kadavralarda bazı seçilen mRNA'ların (mesajcı RNA) analiz edilebildiği gösterilmiştir (Hansen ve ark., 2014). Aynı çalışmada, ayrışmanın orta derecede olduğu kadavralardan alınan donmuş örneklerde, ölümden 7 gün sonra da RNA analizlerinin yapıldığı bildirilmiştir (Hansen ve ark., 2014). DNA ve PMİ arasındaki ilişkinin farklı dokular arasında araştırıldığı çalışmalarda bulunmaktadır. 21 °C ve 4 °C' de yapılan bir çalışmada, ölümden sonra geçen 96 saate kadar, PMİ tahmini için beyin dokusunun dalak dokusundan daha güvenilir örnekler olduğu bildirilmiştir (Williams ve ark., 2015). Kan serum örnekleriyle 24 °C ve 4 °C'de kalitatif olarak yapılan çalışmamızda ise, 4 °C'de 72. saate kadar hücre dışı serbest DNA miktarının arttığı, 24 °C'de ise 6. saate kadar arttığı sonrasında ise 72. saate kadar azalma gösterdiği görülmüştür (Emiral ve ark., 2021).

Erken dönemde kullanılan geleneksel yöntemlere ek olarak sınırlı RNA analizlerinin de PMİ tayininde kullanılabileceği bildirilmiştir (Heinrich ve ark., 2007). Kantitatif analizlerde seçilen referans RNA'ların ölümden sonra degrede olmaması ve stabilitesini koruması önemlidir. Genel olarak çalışmalarda referans gen olarak kabul edilen GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) ve ACTB seçilmektedir.

RNA molekülleri, mRNA ve miRNA'ları içerirler. Spesifik vücut sıvıları benzersiz mRNA ifade modelleri sunarken, vücut sıvılarının tanımlanmasında da miRNA'lar kullanılmaktadır (Li ve ark., 2021). Özellikle seminal plazmada diğer vücut sıvılarına göre daha fazla miRNA bulunduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2012). Genel olarak miRNA, mRNA'nın 3' UTR ucuna bağlanarak mRNA bozulmasını ve translasyon baskılanmasını indükler (O'Brien ve ark., 2018). Yeni çalışmalar ise PMİ ile miRNA ilişkisi üzerinedir.

1.4. Hücre Dışı Serbest DNA

Endojen kökenli hücre dışı serbest DNA, hücre nekrozu, apoptozu sonucunda dolaşıma katılan DNA'dır. İlk kez Mandel ve Metais tarafından 1948 yılında, kan plazmasında keşfedilmiştir. Plazma ve serum içerisinde elde edilebilen hücre dışı serbest DNA'nın, çift sarmallı, yaklaşık 10 bç-150 kbç uzunluğunda değişen, apoptoz ve nekrotik işlemler sonucu oluştuğu düşünülen yüksek sayıda fragmentli bir yapısı bulunmaktadır (Koçana ve ark., 2019; Pehlivan ve ark., 2010 ve Volik ve ark., 2016). Tüm hücre tiplerinden pasif bir şekilde apoptoz ve nekrozla, aktif şekilde sekresyonla salgılanmaktadır (Gahan ve ark., 2008; Salvi ve ark., 2016). Apoptoz sonucu oluşan hücre dışı serbest DNA'ların fragmentleri elektroforezde merdiven (ladder) şeklinde görülürler.

Hücre dışı serbest DNA sağlıklı bireylerin periferik dolaşımını az da olsa bulunmakta olup, kanserli hastalarda oldukça önemlidir. Kanserli hastaların plazma/serumlarındaki hücre dışı DNA tümörle ilişkili genetik değişiklikleri teşhis, prognoz ve hastalık izleme için de kullanılmaktadır (Xue ve ark., 2009). 1965'te yapılan bir araştırmada, hücre dışı serbest DNA'nın metastazda rol oynayabileceğini, kanser hastalarının plazmasında normal insanlara göre daha yüksek hücre dışı serbest DNA bulunduğunu bildirmişlerdir (Bendich ve ark., 1965).

Diğer bir kullanım alanı ise prenatal tanılardır. Annede fetüse ait hücre dışı serbest DNA analizleri yapılabilmektedir. İlk kez 1999'da Lo ve meslektaşları (1999), SRY geninin (cinsiyet belirleyici bölge Y gen- sex-determining region Y gene) gerçek zamanlı kantitatif PZR'nu kullanarak doğum sonrası anne kanındaki fetal hücre dışı serbest DNA'nın yarı ömrünü ölçmüşlerdir (Lo ve ark., 1999). Organ nakli, otoimmün hastalıklar, travma, miyokardial infarktüs gibi alanlarda da hücre dışı serbest DNA önemli bir parametredir.

Somatik ölüm gerçekleşmesinden sonra gerçekleşen hücresel ölümle ve nekrozla birlikte hücre dışı serbest DNA dolaşıma katılmaktadır. Kanda bulunan hücre dışı serbest DNA, histonla kaplı nükleozom halindedir bu da onların enzimatik

degradasyonlardan korunmasını sağlar (Grunt ve ark., 2018). Postmortem aralığın ilk 72 saati içinde, hücre nekrozundaki zamana bağlı artış, hücre dışı serbest DNA miktarında olası değişikliklere neden olabilir bu da PMİ çalışmaları için önemli bir parametre olabileceğini göstermektedir (Emiral ve ark., 2021).

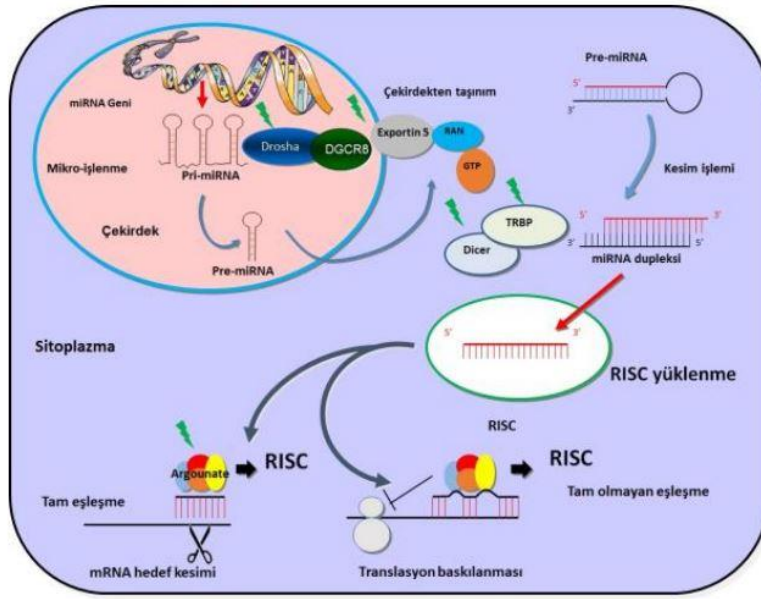
Hücre dışı serbest DNA tespiti için kullanılan PZR veya qPZR yöntemleri hem invaziv olmayan bir yöntem hem de uygun maliyetli olduğu için rutin hastalık teşhislerinde ve adli bilimler açısından önemlidir (Fleischhacker ve Schmidt, 2007). Kantitatif olarak yapılan ilk çalışma niteliğindeki çalışmamızda, qPZR yöntemi kullanılmıştır.

1.5. miRNA

miRNA'lar, ilk kez 1993 yılında iki farklı çalışmada *Caenorhabditis elegans*'da ekspresyonunun düzenleyicisi olarak bildirilmiştir (Hitit ve ark., 2015). İlk olarak Lin-4 olarak keşfedilmiş miRNA'lar, memeli, sinek ve solucan genlerinin %1-2'sini oluşturduğu bilinmektedir (Hitit ve ark., 2015). miRNA terimi ise ilk kez 2001 yılında kullanılmıştır. Mirbase veri tabanına göre şu an insan genomunda 1917 öncül ve 2654 adet olgun miRNA tanımlanmıştır. 19-25 nükleotit uzunluğunda olan miRNA'lar, hedef mRNA'ları ile etkileşime giren, translasyonu inhibe eden veya hedef mRNA'yı parçalayan, protein kodlamayan küçük RNA molekülleridir (Bagga ve ark., 2005; Muniategui ve ark., 2012). Memelide miRNA'larının yaklaşık %60-70'i intronlarda yer alır, az sayıda miRNA ise ekzondan işlenir. miRNA öncülleri genellikle genom üzerinde kümeler halinde bulunan, transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen moleküllerdir (Karagün ve ark., 2014).

miRNA'ların proliferasyon ve hematopoez gibi işlevleri de mevcuttur (Rana, 2007). Bazı miRNA'lar, apoptozda görevli p53 ailesini de kontrol etmektedir (Inui ve ark., 2010; Ory ve Ellisen, 2011). Yapılan son araştırmalar, miRNA'ların, çeviri hızını ve hatta transkripsiyonunu kontrol etmek için farklı hücre altı bölmeleri arasında hareket ettiğini bildirmektedir (Makarova ve ark., 2016; O'Brien ve ark., 2018).

MikroRNA'lar çekirdekte Drosha proteini ve sitoplazmada Dicer proteini tarafından çift sarmallı saç tokası öncülerinden toplam 3 adımda işlenirler (Şekil 1.10). miRNA'nın biyogenezinin ilk basamağında, çekirdek içerisinde RNAaz II (RNA polimeraz II) ile transkripsiyon başlar ve polyA-kuyruk dizisi içeren pri-miRNA (primer miRNA) oluşur. Pri-miRNA'ların "cap" ve "poli A" kuyrukları bulunmaktadır. RNAaz III (RNA polimeraz III) enzimi olan Drosha ile DGCR8/Pasha (DiGeorge sendromu kritik bölge gen-8) beraber Drosha-DGCR8 mikroişlemci kompleksini oluştururlar ve pri-miRNA'yı 60-70 nükleotid uzunluğunda keserek pre-miRNA (prekürsör miRNA) oluşumunu sağlarlar (Karabulut ve ark., 2018; Le Quesne ve Caldas, 2010). pre-miRNA, nükleer taşıma reseptörü olan XPO5 (Exportin-5) ile çekirdekten sitoplazmaya taşınarak sitoplazmada RNAaz III enzimlerinden biri olan Dicer tarafından kesilir. Bu kesimle pre-miRNA, 18-24 nükleotid uzunluğundaki miRNA dubleksine dönüşür (Çelik Aşçı ve ark., 2013). Dubleks yapıdaki bir iplik yıkılır, "klavuz iplik" adı verilen diğer ipliğe ise 5' ucuna AGO2 adı verilen argonot protein kompleksi yüklenir ve Dicer, RNA indüklenmiş susturma kompleksini RISC (RNA kaynaklı susturma kompleksi)'i oluşturur (Çelik Aşçı ve ark., 2013; Karabulut ve ark., 2018). Bu bağlanma sonucu miRNA ya hedef mRNA'nın açık okuma çerçevesi bölgesine bağlanarak mRNA'yı yıkar ya da mRNA'nın 3'ucundaki translasyona uğramayan bölgesine (3'UTR) bağlanarak translasyonel baskılanmasını oluşturur (Karagün ve ark., 2014). Bir miRNA'nın birden çok hedef geni olabilir aynı zamanda bir gen de birden çok miRNA tarafından düzenlenebilir (Sood ve ark., 2006).



Şekil 1.10. miRNA Biyogenezi (Hitit ve ark., 2015)

miRNA'lar pekçok hastalıkların tanımlanmasında da kullanılmaktadır (Paul ve ark., 2018). Kanser, obezite, diyabet, inflamasyon, nörolojik bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar veya otoimmün hastalıkların bir sonucu olarak miRNA'lar aşırı eksprese edildiği veya az regüle edildiğini bildirir çalışmalar bulunduğu hastalıkların tanımlanmasında oldukça önemlidir (Çelik Aşçı ve ark., 2013; Farazi ve ark., 2013; Jordan ve ark., 2011; Nelson ve ark., 2008 ve Urbich, ve ark., 2008). Normal doku ile karşılaştırıldığında, miRNA biyogenezinin tümör hücrelerinde baskılandığı bildirilmiştir (Lin ve Gergory, 2015; Thomson ve ark., 2006).

RNA adli araştırmalarda ilk kez, 1984 yılında ölüm sonrası dokularda sentezinin tanımlanmasıyla kullanılmıştır (Alshehhi ve Haddrill, 2019; Oehmichen ve Zilles, 1984). Son yıllarda ise adli tıp alanında da önemi artmış ve pek çok araştırmalara dahil edilmiştir. miRNA'ları ve mRNA'ları karşılaştırıldığında, nemli ortamlarda veya yüksek sıcaklıkta miRNA'ların stabilitesi mRNA'lardan nispeten daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2021). Başka bir çalışmada 6 ay boyunca ısı, nem ve güneş ışığına maruz bırakılan kan ve semen örnekleri, aynı süreçte oda sıcaklığı, düşük nem ve karanlığa maruz bırakılan kan ve semen örnekleri ile karşılaştırılmış mRNA'nın çalışma grubunda 30 günden sonra tespit edilemediği,

miRNA'nın ise çalışma süresi boyunca tüm test koşulları altında tespit edilebildiği bildirilmiştir (Mayes ve ark., 2019).

miRNA'ların küçük boyutları, parafine gömülü dokularda daha stabil olması ve proteine bağlanması sayesinde kötü çevre şartlarında daha az etkilendiği bildirilmiştir (Arroyo ve ark., 2011; Turchinovich ve ark., 2011 ve Vickers ve ark., 2011). Postmortem süreçte alınan vitröz sıvılarda ölümün gündüz ve gece gerçekleşmiş olan cesetler arasında miRNA seviyesinin anlamlı farklılık olduğunu bildirilmiştir (Odriozola ve ark., 2013). Literatürde, miRNA'ların hamileliğin 6. haftası kadar erken bir zamanda, plasentadan maternal ve fetal dolaşıma salınabileceğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Chang ve ark., 2017; Lorenzo-Almorós ve ark., 2019).

miRNA ve PMİ ilişkisi araştırmaları da son dönemde önem kazanmıştır. Kullanılan geleneksel yöntemler, erken dönem PMİ için tahmini sonuç vermektedir. Tekrarlanabilirliğinin kısıtlı olduğu geleneksel yöntemlerin dışında stabilitesi yüksek ve kararlı yapılar, PMİ tahmininde önemli birer belirteç olacaktır. Öncelikle bu çalışmalarda referans genlerin seçilmesi çok önemlidir. PMİ için kullanılacak referans genlerin postmortem süreçte kararlı ve stabil olması gerekmektedir (Lv ve ark., 2014). miRNA'nın da stabil ve kararlı yapısı, PMİ tahmininde kullanışlı olabileceğini göstermektedir. Beyin, kalp ve iskelet kaslarında miRNA'ların postmortem süreçte 96 saate kadar stabil olduğu yapılan çalışmada bildirilmiştir (Trotter ve ark., 2002; Yasojima ve ark., 2001).

Referans genlerin analizinde kalitatif ve kantitatif pek çok yöntem kullanılmaktadır. Northern blotlama, SAGE (gen ekspresyonunun seri analizi), Rnase koruma testleri, nanopartikül amplifikasyon metodu, konjuge-polimer bazlı yöntem, RT-PCR (Gerçek zamanlı PZR) son zamanlarda da qPZR ve mikroarray analizleri bunlardan bazılarıdır. Yöntemlerin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. SAGE, yüksek kaliteli RNA gerektiren, oldukça karmaşık ve zahmetli bir tekniktir. Northern blot analizi ve Rnase koruma deneyleri, bozulmamış RNA kullanımını gerektirmekle birlikte Northern blot analizi, miRNA konsantrasyonlarının yetersiz olduğu

durumlarda beklenen hassasiyeti göstermemekte aynı zamanda öncü ve olgun miRNA ayırımını yapmamaktadır (Jawad ve ark., 2020).

Bu yöntemlerin dışında miRNA analizleri için, ribozim amplifikasyon yöntemi, izotermal amplifikasyon, elektrokimyasal metotları da geliştirilmiştir (Süsgün ve ark., 2021). Ölümünden sonra RNA degradasyonu PMİ ile ilişkisinin araştırmalarında qPZR (Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu) ile kantitatif olarak analiz en iyi yöntem olarak düşünülmektedir (Tu ve ark., 2019).

miR-122, 18. kromozomda (18q21.31) bulunan bir miRNA'dır (Şekil 1.11). Bu miRNA'lar, translasyon düzeyinde hedef mRNA'lar ile etkileşime girerek gen ekspresyonunu düzenlerler. miR122 varyantları, karaciğerde bulunan miRNA popülasyonunun %72'sini oluşturmaktadır (Lagos-Quintana ve ark., 2002). miR-122, yüksek sıcaklığa duyarlı bir miRNA çeşididir. 35 °C'de 4 günden sonra degrade olabildiği bildirilmiştir (Lv ve ark., 2017).



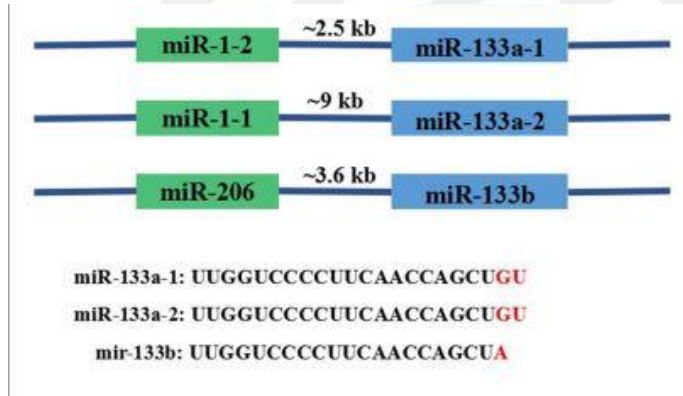
Şekil 1.11. miR-122'nin genomik organizasyonu (Gailius ve ark., 2014)

RNA degradasyonunun postmortem intervalde kullanımına yönelik bir çalışmada, vitroz sıvıda miR-122'nin referans olarak seçilebileceği belirtilmiştir (Lv ve ark., 2017).

miR-133, ilk kez farelerde keşfedilen bir miRNA'dır. İnsan genomunda miR-133'ün üç türü bulunmaktadır: miR133a-1, miR-133a-2 ve miR-133b. Bu RNA'lar sırasıyla 18, 20, 6. Kromozomda bulunurlar (Li ve ark., 2018). miR-133a-1 ve miR-133a-2 özdeş nükleotit dizilerine sahipken miR-133b, 3' ucundaki son 2 nükleotidde (GU→A) farklılık gösterir (Şekil 1.12). İnsülin, miR-133 ekspresyonunu etkilemektedir. İnsülin tedavisi, aktif SREBP-1c'nin (Sterol Düzenleyici Eleman

Bağlayıcı Protein-1) endoplazmik retikulumdan çekirdeğe translokasyonunu tetikler, bu da eşzamanlı olarak PI3K (Fosfoinositid 3-kinazlar) sinyal yolu yoluyla SREPB-1c ekspresyonunu indükler. Yüksek SREPB-1c seviyesi, miR-133'ün güçlendirici bölgesine bağlanan protein olan MEF2C'nin (Miyosite özgü güçlendirici faktör 2C) ekspresyonunu baskılar. Düşük MEF2C ekspresyonu da miR-133a'nın transkripsiyonu azaltır, kalp ve kasta olgun formlarının seviyelerinin azalmasına yol açar (Granjon ve ark., 2009; Li ve ark., 2018). miR-133a, anjiyogenez, apoptoz, kardiyak fibrozis ve hipertrofide kritik olarak yer alan kas açısından zengin bir miRNA'dır (Zhou ve ark., 2020). Bazı kanser türlerinde de miR-133'de düzensizlikler olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2016; Yang ve ark., 2017).

Miyokardium ve karaciğer dokularında yapılan çalışmada, miR-133a'nın 5 veya daha fazla güne kadar PMİ'dan etkilenmeyen optimum referans biyobelirteç olduğu bildirilmiştir (Lv ve ark., 2017).



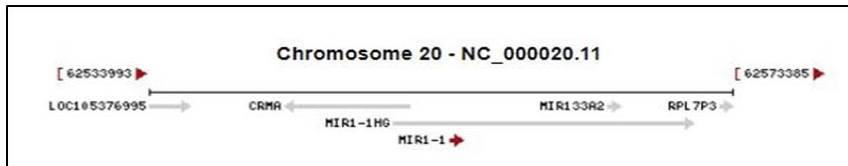
Şekil 1.12. miR133'ün genomik organizasyonu (Li ve ark., 2018)

miRNA ve PMİ ilişkisi ile ilgili araştırmalar çoğunlukla doku örnekleriyle yapılmıştır. Farklı örneklerde, ölüm sonrası geçen zamana göre stabilite değişebilmektedir. Yapılan bir araştırmada, ölüm sonrası geçen ilk 8 günde iskelet kası, kalp ve karaciğer dokularında miR-122 ve miR-133a stabiliteleri incelenmiştir. Bu çalışmaya göre miR-122 en fazla kas dokusunda, en az ise karaciğer dokusunda stabilite göstermiş; miR-133a bu üç dokuda en fazla karaciğer dokusunda stabilite gösterirken, diğer dokularda hemen hemen aynı veya daha düşük stabilite göstermiştir (Tu ve ark., 2018).

miR-1; hedef proteinin hücrede ekspresyonunu düzenleyen küçük bir prekürsör mikro RNA'dır. İnsanlarda iki farklı mikroRNA vardır. Bunlar 20. kromozomda bulunan miR-1-1 (Şekil 1.13) ve 18. kromozomda bulunan miR-1-2'dir (Şekil 1.14). miR-1 gen ailesi ve bu miRNA'ların kas dokularının gelişimi ve fizyolojisinde önemli rolleri vardır (Lv ve ark., 2016). MiR-1'in plazmadaki seviyeleri, miyokard enfarktüsü için biyobelirteç olarak da kullanılabileceği bildirilmiştir (D'Alessandra ve ark., 2010).

miR-1'nin 5 veya daha fazla güne kadar PMİ'dan etkilenmeyen optimum referans biyobelirteçler olduğu; hem insan hem farelerde seçilen referans genlerin (miR-133a ve miR-1) standart sapmalarının düşük olduğu bunun nedeninin ise PMİ aralığında ve sıcaklık altında yüksek kararlılığı olduğunu bildirmişlerdir (Lv ve ark., 2017). Postmortem süreçte farklı bölgelerden alınan kan örneklerinde miR-1 seviyelerinin örnekleme bölgesine göre farklılık göstererek dış iliak damar, alt vena kava ve koroner sinüsten alınan kanlarda miR-1 seviyelerinin artan bir eğilim sırası gösterdiği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2021).

miRNA'ları referans biyobelirteçler olarak değerlendiren bir çalışmada, ölümden sonra geçen 7 gün boyunca miR-1 Ct (eşik değeri) değerlerinin kararlılık gösterdiği belirtilmiştir (Li ve ark., 2014).



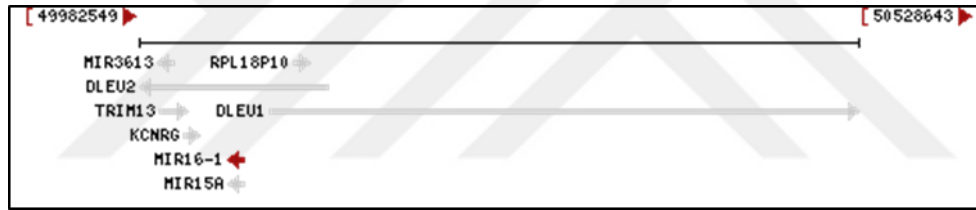
Şekil 1.13. miR-1-1'in genomik organizasyonu (National Library of Medicine, 2022a)



Şekil 1.14. miR-1-2'nin genomik organizasyonu (National Library of Medicine, 2022b)

miR-16, gen ekspresyonunu düzenleyen, ilgili küçük kodlamayan RNA genlerinin miRNA öncü bir grubudur. miR-16, 13. kromozomda bulunur (13q14.2) (Şekil 1.15) (Calin ve ark., 2002). Birçok hastalıkta miR-16'nın LPS (lipopoli-sakkarit) ile indüklenen inflamatuvar yanıtlarda ve hücre apoptozunda yer aldığı bildirilmektedir (Wang ve Zhang, 2021).

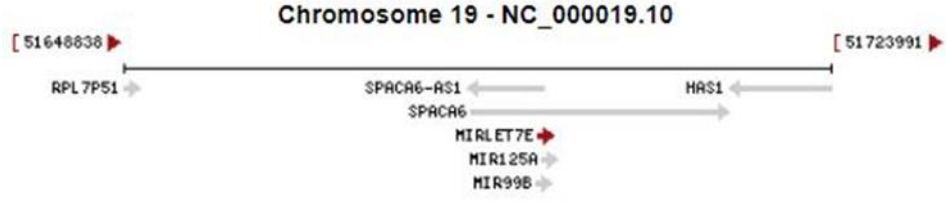
miR-16, nispi ekspresyon oranına göre diğer vücut sıvılarından ayırt edilmiş ve yapılan başka bir çalışmada ise postmortem süreçte farklı bölgelerden alınan kan örneklerinde MiR-16 seviyesinin örnekleme alanına göre değişiklik göstermediği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2021; Wang ve ark., 2012). miR-16, iskeletleşmiş cesetlerde de kullanılabilir. Postmortem süreçte kemik örnekleriyle yapılan çalışmada birkaç aylık süreç içerisinde miR-16 ekspresyon seviyesinin artan PMİ ile azaldığı ve miR-16'nın PMİ tahmininde kullanılabileceği bildirilmiştir (Na, 2020).



Şekil 1.15. miR-16'nın genomik organizasyonu (National Library of Medicine, 2022c)

let-7e, 19. kromozomda (19q13.41) bulunan bir miRNA'dır (Şekil 1.16). Let-7, ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'da gelişim düzenleyici olarak keşfedilmiş ve bilinen ilk iki mikroRNA'dan biri olmuştur. Let-7 insan dışında çok çeşitli türlerde de tanımlanmıştır.

Postmortem süreçte farklı bölgelerden alınan kan örneklerinde let-7e seviyesinin örnekleme alanına göre değişiklik göstermediği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2021). Başka bir çalışmada 1 aydan kısa süreli postmortem interval zamanına sahip olan grubun, seçilen miRNA'ların ekspirasyonlarında zamanın artmasına bağlı olarak düşme olduğu ve 1 aydan daha uzun süreli postmortem intervale sahip gruplara göre ekspresyon seviyelerinde ciddi farklılık olduğu görülmüştür (Na, 2020).



Şekil 1.16. let-7e'nin genomik organizasyonu (National Library of Medicine, 2022d)

Bu doktora tezi çalışmasında, farklı zaman aralıklarında ratlardan alınan serum örneklerinde, hücre dışı serbest DNA ve seçilen mir-1, mir-16, mir-122, mir-133a ve let-7e miRNA'ların düzeylerinin kantitatif analizleri yapılmış, ölüm sonrası geçen süre arasındaki olası korelasyon ile postmortem interval tayininin araştırılması yapılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 18/09/2019 tarih ve 2019-17-166 karar nolu izniyle yapılmıştır.

2.1. Örneklem Yöntemi ve Sayısı

Çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'nda üretilmiş ve serbest yemek ve su varlığında 12 saatlik gündüz/gece siklusu ile yetiştirilmiş, 230-260 gr arasındaki erişkin Wistar ratlar model olarak kullanıldı. Anestezi kloral hidrat (400mg/kg) intraperitoneal (İP) yolla yapılmış olup ardından ratlar, servikal dislokasyon ile sakrefiye edildi. Serumda araştırılacak olan hücre dışı serbest DNA ve miRNA deney sonuçlarının etkilenmemesi için servikal dislokasyon tercih edildi.

Çalışmada ratlar öncelikle 5 gruba ayrılarak postmortem bekleme süreci 24 °C olarak ayarlandı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Deney hayvanlarının 24 °C sıcaklıkta postmortem süreye göre gruplaması

Grup No	24 °C Postmortem Bekleme	Grup Başına Hayvan Adedi
1	0. saat	6
2	6. saat	6
3	12. saat	6
4	24. saat	6
5	48. saat	6

2.2. Serum Örneklerinin Toplanması

Ratlara anestezi yapıldıktan sonra servikal dislokasyon metoduyla sakrefiye edildi. Sakrefiye edilen ratlar her grupta 6 rat olacak şekilde beş gruba ayrılarak 24 °C’de postmortem beklemeye bırakıldı.

Postmortem süreçte bekletilen ratlardan birinci gruptan 0., ikinci gruptan 6., üçüncü gruptan 12., dördüncü gruptan 24., beşinci gruptan 48. saatlerde otopsi yapılarak intrakardiyak ve/veya büyük venlerden kanlar toplandı (Şekil 2.1). Kan alımının ardından, en kısa sürede, 15 dakikadan daha fazla bekletilmeden, 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar deneylerde kullanılabilecek kadar -80 °C’de bekletildi.



Şekil 2.1. 6., 12., 24. ve 48. saatler deney hayvanları gruplarının otopsi ile kan örneklerinin alınması

2.3. Hücre Dışı Serbest DNA Analizleri

Kan serum örnekleri 0., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde toplandıktan sonra -80 °C’de bekletildi ve ardından hücre dışı serbest DNA analizlerine geçildi.

2.3.1. Hücre Dışı Serbest DNA İzolasyonu

Servikal dislokasyon metoduyla sakrefiye edilen ratlardan 0., 6., 12., 24., 48. saatlerde alınan serum örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu için Exgene Cell SV mini kiti (GeneAll Biotechnology, 2012, Korea) kullanıldı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Exgene Cell SV mini kit (GeneAll Biotechnology, 2012, Korea)

DNA izolasyonu için izlenmiş olan protokol şu şekildedir:

1. 1.5 ml'lik tüpe öncelikle 200 ul serum örneği eklendi,
2. Örneğin üzerine 200 ul BL tamponu eklendikten sonra 25 ul proteinaz K koyuldu,
3. 56 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı,
4. Eppendorfdaki tüm örnek kitin içerisinde bulunan filtreli tüplere aktarıldı,
5. Filtreli tüpün üzerine 200 ul etanol eklendikten sonra 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi,
6. Tüpün üst kısmı filtre kısmı; alt kısmı ise üst kısımdan ayrılabilen kısımdır, santrifüj bittikten sonra filtre tüpün altında bulunan kısım dökülüp ve 600 ul BW tamponu eklendi,
7. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra alt tüp tekrar dökülüp 700 ul TW tamponu eklendi,
8. 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra alt tüp dökülüp tekrar santrifüj eklendi,
9. Tüplerin filtreli üst kısmı eppendorf tüplerin içerisine yerleştirildi ve üzerine 50 µl BE tamponu eklendi,
10. İçerisinde DNA bulunan eppendorf tüpleri – 20 °C'ye kaldırıldı.

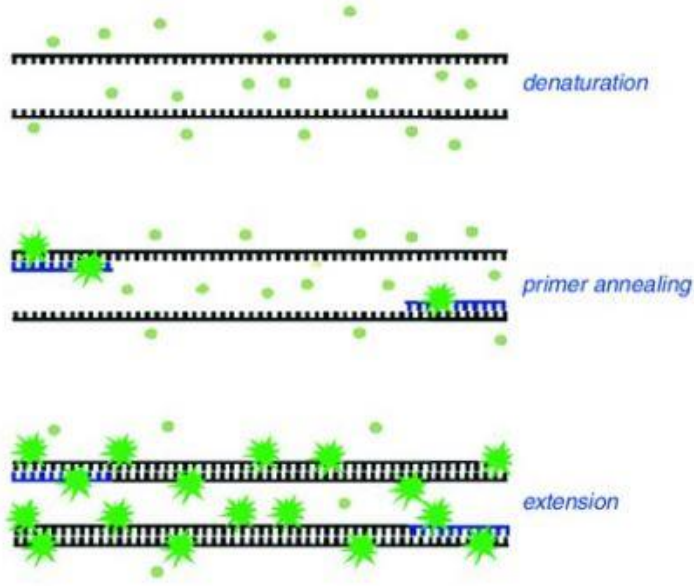
2.3.2. Hücre dışı serbest DNA'nın Gerçek Zamanlı kantitatif PZR (qPZR)

Analizi

qPZR, DNA ve mRNA örneklerinin çoğaltımını sağlayan, amplifikasyonu ve ürünlerin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen, hassas ve az sayıda hücreden DNA ve mRNA seviyelerini ölçebilen bir yöntemdir (Günel ve Aydın, 2009). Patojen tespiti, onkolojik çalışmalar, genotipleme, mutasyon analizleri, ilaç endüstrisi, metilasyon analizlerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır.

PZR ile PZR sonrası gerçekleştirdiğimiz analizleri bir araya getiren bu yöntem, spesifik olmayan amplifikasyonlardan etkilenmez ve PZR sonrası ikinci bir analiz işlemine gerek olmadan hücre dışı serbest DNA analizini sunmaktadır. Ayrıca çok az sayıda hücreden, az miktarda biyolojik sıvılardan bile analiz yapmak mümkündür (Tzimagiorgis ve ark., 2011). Geleneksel PZR de amplifikasyon sonrası elektroforez yöntemi kullanılması gerekirken, gerçek zamanlı qPZR'da DNA miktarı ölçümünde amplifikasyon sonrası çoğalan moleküllerin sayısı ile orantılı olarak artan floresan sinyali gözlemlenir. Amplifikasyon ve analiz tek bir tüpte içerisinde gerçekleştiğinden kontaminasyon riski de oldukça azalır.

Gerçek zamanlı qPZR yönteminde, hibridizasyon, hidrolizasyon problemleri ya da DNA'ya bağlanan boyalar kullanılır. Çalışmamızda 497 nm dalga boyunda yükseltgenen, 520 nm dalga boyunda indirgenen, DNA'nın çift-zincirine bağlanabilen, hassasiyeti nedeniyle de gerçek zamanlı qPZR'da tercih edilen bir boya olan SYBR green kullanıldı (Günel, 2007). SYBR green, primerler bağlandıktan sonra çift zincire bağlanan boya miktarı arttıkça floresan ışık yayan bir boyadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. SYBR green qPCR (Fraga ve ark., 2008)

Hücre dışı serbest DNA izolasyonları yapılan örneklerin Gerçek zamanlı qPCR aşamasında GeneAll RealAmp™ SYBR qPCR Master miks kullanıldı. Serumda hücre dışı serbest DNA tayini için referans genler olan GAPDH ve ACTB genleri hedef dizi olarak seçildi. Plate yüklemesi yapılmadan önce 30 örnek için GAPDH ve ACTB için ayrı ayrı master mikslar hazırlandı (Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3). Ekspresyon analizi için kullanılan primer bilgileri tabloda verilmiştir (Çizelge 2.4)

Çizelge 2.2. ACTB Gerçek zamanlı qPCR için kullanılan mastermix bilgileri

MasterMiks Bileşenleri	Hacim
SYBR boya	5 µl
İleri Primer (10 µM)	0,5 µl
Ters Primer (10 µM)	0,5 µl
DNA	2 µl
RNaz'sız Distile su	2 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 2.3. GAPDH Gerçek zamanlı qPZR için kullanılan mastermiks bilgileri

MasterMiks Bileşenleri	1 reaksiyon Hacim
SYBR Boya	5 µl
İleri Primer (10 µM)	0,8 µl
Ters Primer (10 µM)	0,8 µl
DNA	2 µl
RNaz'sız Distile su	1,4 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 2.4. GAPDH ve ACTB primer bilgileri

Primer Adı	Primer Dizisi
GAPDH-F	AGTGCCAGCCTCGTCTCATA
GAPDH-R	GGTAACCAGGCGTCCGATAC
ACTB-F	CCCGCGAGTACAACCTTCTT
ACTB-R	AACACAGCCTGGATGGCTAC

Mastermiksler hazırlandıktan sonra, plate düzenine göre her kuyucuğa 8 µl mastermiks ve 2 µl DNA eklenip kapatılarak gerçek zamanlı qPZR reaksiyonuna geçildi. Gerçek zamanlı qPZR için kullanılan reaksiyon koşulları tabloda belirtilmiştir (Çizelge 2.5). Gerçek zamanlı qPZR reaksiyonu, QuantStudio™ 5 Gerçek zamanlı PZR cihazında gerçekleştirildi (Şekil 2.4).

Çizelge 2.5. Gerçek zamanlı qPZR Reaksiyonu Koşulları

PZR basamakları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95	10 dk	1
Denatürasyon	95	15 s	40
Bağlanma	60	60 s	
Erime Eğrisi	95	15 s	1



Şekil 2.4. QuantStudio™ 5 Gerçek zamanlı PZR cihazı

2.4. miRNA Analizleri

Çalışmada miR-122, miR-133, miR-1; miR-16, let-7e hedef miRNA olarak seçilmiştir.

2.4.1. miRNA İzolasyonu

Servikal dislokasyon metoduyla sakrefiye edilen ratlardan 0., 6., 12., 24., 48. saatlerde alınan serum örneklerinden miRNA izolasyonu yapıldı. miRNA izolasyonu için Hybrid-R miRNA mini test kiti (GeneAll Biotechnology, 2011, Korea) kullanıldı (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Hybrid-R miRNA mini test kiti (GeneAll Biotechnology, 2011, Korea)

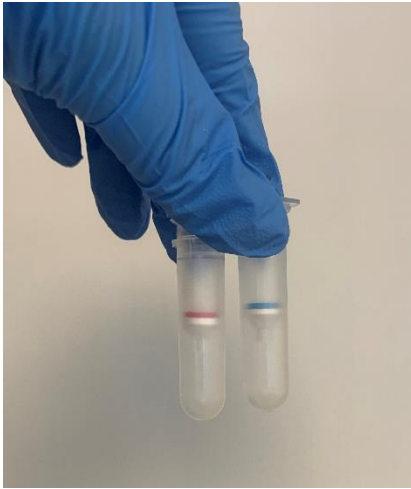
miRNA izolasyonu için izlenmiş olan protokol şu şekildedir:

1. 1.5 ml'lik tüpe öncelikle 200 ul serum örneği eklendi,
2. Örneğin üzerine 500 ul Riboex eklendi,
3. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 100 ul kloroform eklenip tüp alt üst edildi. Riboex içerisinde fenol ve guanidin tuzu bulunmaktadır, kloroform eklenmesiyle fenolle tepkimeye girerek ph değişikliğine neden olmakta ve pembe renge dönüştürmektedir (Şekil 2.6).
4. Oda sıcaklığında 2 dakika tekrar inkübe edilerek 12000 rpm'de 15 dakika +4 °C'de santrifüj edildi,
5. Tüpün süpernatant kısmı alınarak yeni tüpe aktarıldı ve üzerine 500 ul %50'lik etanol eklendi.



Şekil 2.6. Riboex ve kloroform eklenmiş serum örneği

1. Kit içerisinde biri büyük porlu kırmızı renk; diğeri küçük porlu mavi renk iki filtreli tüp bulunmaktadır (Şekil 2.7). Eppendorf tüp içerisindeki örnek alınarak kırmızı filtreli tüpe aktarıldıktan sonra 11000 rpm’de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi,



Şekil 2.7. Kit içerisindeki iki farklı por özelliğindeki filtreli tüpler

2. Tüp içerisine 700 ul %100’lük etanol eklendi.
3. Karışım mavi filtreli tüpe aktarıldı

4. Tüpün üst kısmı filtre kısmı; alt kısmı ise üst kısımdan ayrılabilen kısımdır. 11000 rpm’de 1 dakika santrifüj bittikten sonra filtre tüpün altında bulunan kısım döküldü ve 500 ul RBW eklendi.
5. 11000 rpm’de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra tüpün alt kısmı dökülüp, 500 ul RNW eklenerek birinci yıkama yapıldı,
6. Tüp, 11000 rpm’de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra tüpün alt kısmı döküldü ve ikinci yıkama için tekrar 500 ul RNW eklendi,
7. 11000 rpm’de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilip altı döküldü ve aynı şekilde tekrar santrifüj edildi,
8. Santrifüj bittikten sonra tüplerin filtreli üst kısmı eppendorf tüplerin içerisine yerleştirildi ve üzerine 40 µl RNA’sız su eklendi,
9. Tekrar 11000 rpm’de 1 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra içerisinde miRNA bulunan eppendorf tüpleri – 20 °C’ye kaldırıldı.

2.4.2. Özel Önceden Tasarlanmış miRNA Plaka Dizisi

Özel önceden tasarlanmış miRNA plaka dizisi kullanımı, hassas ve özgün miRNA miktar tayini sağlayan bir yöntemdir. Her 96 kuyucuklu plak, 96 çift PZR primeri içerir (ileri: miRNA'ya özgü gövde-döngü primer; ters: evrensel primer). qPZR dizilerinde kullanılan her miRNA'ya özgü primer, tek bir ayrışma eğrisi tepe noktası vermek ve hedeflenen miRNA için doğru boyutta tek bir amplifikasyon oluşturmak için deneysel olarak doğrulanmıştır. Özel Önceden Tasarlanmış miRNA Plaka Dizisi miRNA'ları kantitatif olarak ölçmek için gerçek zamanlı PZR teknolojisini kullanır. Deneysel prosedür iki ana basamak içerir. Birinci basamak, miRNA’dan cDNA (Komplementer DNA-Complementer DNA) Sentezidir. Bu basamakta miRNA'nın ters transkripsiyonu için önceden tasarlanmış miRNA'ya özgü kök-döngü primerini içeren miR-cDNA Sentez Plakası kullanılır. Diğer basamak ise, qPZR analizidir. Bu basamakta ise, spesifik olarak ters kopyalanmış miRNA'yı tespit etmek için miRNA'ya özgü ileri primer, evrensel ters PZR primeri kullanılarak miRqGreen MasterMiks içeren miR-qPZR MasterMiks Plakası kullanılır.

2.4.2.1. miRNA'dan cDNA Sentezi

miRNA'dan cDNA sentezi için A.B.T.TM miR cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Örnekler cihaza yüklenmeden önce 30 örnek için mastermiks hazırlandı. Mastermix ve örnek miktarı Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. miRNA-cDNA Sentezi İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri

MasterMiks Bileşenleri	1 reaksiyon Hacim
10X Reaksiyon tamponu	2 µl
Kök-döngü primer (miRNA spesifik)	0,5 µl
20X dNTP (DNA nükleotid bazları) miks	1 µl
RNAaz Enzim	1 µl
Su	2.5 µl
DTT	2 µl
M-MLV	1 µl
Toplam	10 µl

Mastermiksler hazırlandıktan sonra, plate düzenine göre her kuyucuğa 4 µl mastermiks ve 2 µl miRNA eklenip, sealing ile kapatılarak reverse transkripsiyon reaksiyonuna geçildi. Reverse transkripsiyon reaksiyonu için Applied Biosystems VeritiTM Thermal Cycler cihazı kullanıldı (Şekil 2.8). Reaksiyon koşulları tabloda belirtilmiştir (Çizelge 2.7).



Şekil 2.8. Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler cihazı

Çizelge 2.7. miRNA-cDNA Sentezi Reaksiyonu Koşulları

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	-

2.4.2.2. cDNA Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA elde edildikten sonra Gerçek zamalı qPZR aşamasına geçildi. Analiz için A.B.T.™ Custom Predesigned miRNA Plate Array kullanıldı. Aday miRNA'lar olan miR-122, miR-133a, miR-16, let-7e ve miR-1 için uygun primerler seçildi. Örnekler yüklenmeden önce 30 örnek için mastermiks hazırlandı. Mastermix ve örnek miktarı Çizelge 2.8'de verilmiştir.

Çizelge 2.8. Gerçek zamalı qPZR İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri

MasterMix Bileşenleri	Hacim
SYBR Boya (2X)	5 µl
miRNA Spesifik İleri Primer (5 µM)	0,2 µl
miRNA Evrensel Ters Primer (5 µM)	0,2 µl
cDNA	2 µl
RNaz'sız Distile su	2,6 µl
TOPLAM	10 µl

Mastermixler hazırlandıktan sonra, plate düzenine göre her kuyucuğa 8 µl mastermix ve 2 µl cDNA eklenip kapatılarak qPZR reaksiyonuna geçildi. qPZR için kullanılan reaksiyon koşulları tabloda belirtilmiştir (Çizelge 2.9). Gerçek zamalı qPZR reaksiyonu QuantStudio™ 5 Gerçek zamalı PZR cihazında gerçekleştirildi.

Çizelge 2.9. Gerçek zamalı qPZR Reaksiyonu Koşulları

PZR basamakları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95	10 dk	1
Denatürasyon	95	15 s	40
Bağlanma	60	60 s	
Erime eğrisi	95	15s	1

2.5. Hücre Dışı Serbest DNA ve miRNA Relatif Kantitasyon Hesaplanması

Hücre Dışı Serbest DNA için GAPDH ve ACTB referans olarak kullanıldı ve teknik tekrarlı çalışmalarda Ct değerlerinin ortalaması alınarak hesaplamaya devam edildi; miRNA ekspresyonları kantitasyonu için snRNA (Small nuclear RNA-küçük nükleer RNA) U6 referans olarak kullanıldı ve kontrol grubuna göre normalize edildi. Relatif kantifikasyon hesaplamalarında “ $\Delta\Delta Ct$ Yöntemi” kullanıldı. Bu yöntemde öncelikle hedef grup ve referans grup için her bir örneğin Gerçek zamanlı PZR sonucunda Ct değerleri elde edildi. Hedef grupta Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak hedef grup ΔCt değerleri elde edildi. ΔCt , kararlı kontrol belirteci

ve diğer miRNA belirteçleri arasındaki Ct değerlerindeki farkları temsil ederken; $\Delta\Delta Ct$ kontrol grubu ve diğer zaman noktaları arasındaki ΔCt değerlerindeki farklılıkları temsil eder (Lv ve ark., 2014). Referans grupta Ct değerinden, referans Ct değeri çıkarılarak referans grup ΔCt değerleri elde edildi. Daha sonra hedef grup ΔCt değerlerinden referans grup ΔCt değerleri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değerleri elde edilmiş oldu. $\Delta\Delta Ct$ değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ şeklinde işleme alınarak kat değişimi (Fold Change) hesaplanması yapıldı. Fold Change değeri 1'in üzerinde olması durumunda hedef grubun ekspresyonunun referans grubun ekspresyonuna göre relatif olarak artış gösterdiği; Fold Change değeri 1'in altında olması durumunda ise hedef grubunun ekspresyonunun referans grubun ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlandı.

2.6. İstatistik

Veriler IBM SPSS Statistics Standard Concurrent User V 26 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) istatistik paket programında değerlendirildi. Tekrarlı testler küresellik varsayımı Mauchly testi ile kontrol edildi. Küresellik sağlandığı durumda Sphericity Assumed testi, sağlanmadığı durum için epsilon değerine bakılarak 0,75'ten büyük olduğu durumlarda Huynh-Feldt testi, küçük olduğu durumlarda ise Greenhouse Geisser testi sonuçları değerlendirildi. Analizimizde tekrarlı ölçümler ve rat grupları arasında genel bir değerlendirme yapmak için karışık düzen (mixed design) varyans analizi ve çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni-Dunn testi, zamanlar için de Bonferroni-Dunn testi kullanılmıştır. Etki büyüklüğü karışık düzen varyans analizi için eta-kare (η^2) değeri ile belirlenmiştir. Etki büyüklükleri, Cohen'in (1988) etki büyüklüğü sınıflandırmasına göre değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ düzeyi istatistik olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Otopsi sırasında alınan kanların hemolizli olduğu, 12. saatte alınan kan örneklerinde serum miktarında azalma olduğu gözlemlendi. 48. saatte yapılan otopsilerde ise dokularda yumuşama olduğu gözlemlendi.

3.1. Hücre Dışı Serbest DNA qPCR Analiz Bulguları

Hücre dışı serbest DNA için kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında alınan referans genlerimiz olan GAPDH ve ACTB değerleri hesaplanmıştır.

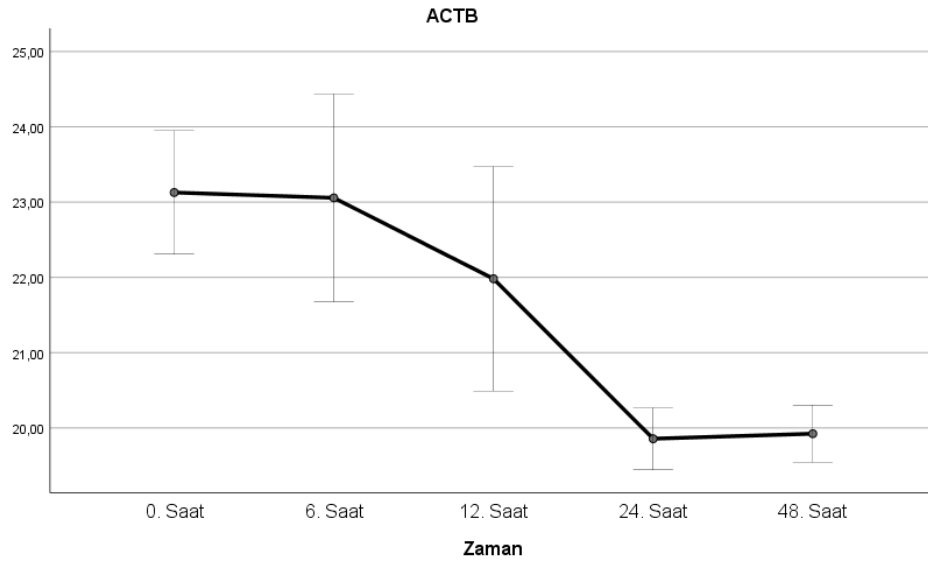
ACTB ve GAPDH ölçümleri için istatistikler analizler yapılmış olup, Başlangıç, 6. saat ve 12. saatte alınan ölçüm ortalamaları 24. saat ve 48. saatte alınan ölçüm ortalamalarından istatistiksel olarak daha yüksekti (Çizelge 3.1).

ACTB ve GAPDH ölçümlerinin 0 ile 48 saat aralığında değişimleri incelendiğinde, ACTB ve GAPDH ortalaması zaman içinde azalmaktadır (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).

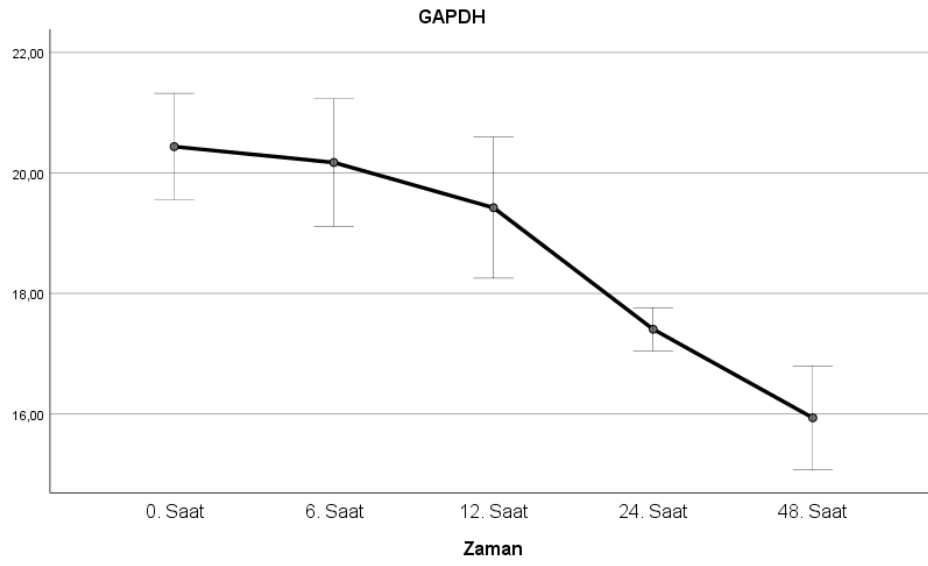
Çizelge 3.1. ACTB ve GAPDH Ölçümlerinin Zamanlara Göre Karşılaştırması

	İstatistikler
ACTB	
0. Saat	23,13±0,78
6. Saat	23,06±1,31
12. Saat	21,98±1,42
24. Saat	19,86±0,39
48. Saat	19,92±0,36
Test İstatistikleri [¥]	F=14,566; p=0,001; $\eta^2=0,744$
GAPDH	
0. Saat	20,44±0,84
6. Saat	20,17±1,01
12. Saat	19,42±1,11
24. Saat	17,41±0,34
48. Saat	15,93±0,82
Test İstatistikleri [¥]	F=30,298; p=0,001; $\eta^2=0,858$

F: Tekrarlı Ölçümlerde varyans analizi, η^2 : Etki Büyüklüğü, [¥]Grup içi karşılaştırma, Özet istatistikler *ortalama ± standart sapma* değer olarak verilmiştir. Koyu olarak belirlenen bölümler istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).

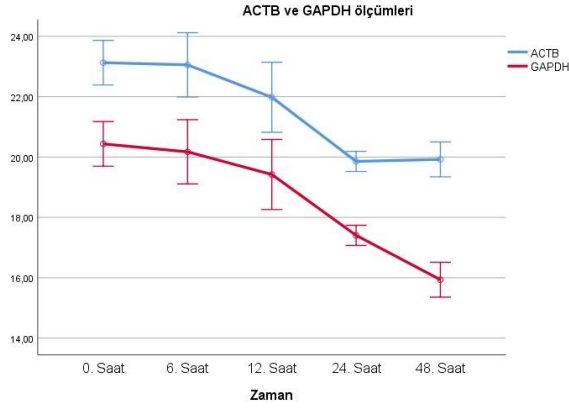


Şekil 3.1. ACTB Ölçümlerinin Zamansal Değişimi



Şekil 3.2. GAPDH Ölçümlerinin Zamansal Değişimi

0 ile 48 saat aralığında, GAPDH ve ACTB ölçümleri beraber değerlendirildiğinde her ikisinin de ortalamalarının zaman içinde azalışı görülmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. ACTB ve GAPDH Ölçümlerinin Zamansal Değişimi

3.2. miRNA Analiz Bulguları

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında alınan let-7e, mir-1, mir-133a, mir-16, mir-122'nın referans gen olan U6 ile birlikte Ct, Δ Ct, $\Delta\Delta$ Ct ve fold change (değişim katsayıları) değerleri hesaplanmıştır. Her bir miRNA için Ct ölçümlerinin zamanlara göre karşılaştırması sonucunda Ct ölçümleri için zaman ve çalışma gruplarının etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Çizelge 3.1). Başlangıç (0. saat) alınan ölçümlerde mir-16 ve mir-122 diğer gruplardan istatistiksel olarak daha düşük ortalama sahipti ($F=25,804$ $p=0,001$). 6. Saat, 12. Saat ve 24. Saatlerde alınan ölçümlerde de aynı durum geçerliydi ($F=14,185$ $p=0,001$; $F=6,824$ $p=0,001$; $F=12,029$ $p=0,001$). 48. Saat alınan ölçümlerde mir-16'da elde edilen Ct ölçüm ortalamaları mir-1, let-7e, ve mir-133a'dan istatistiksel olarak daha düşük; mir-122 ise let-7e'den istatistiksel olarak daha düşüktü ($F=11,343$ $p=0,001$).

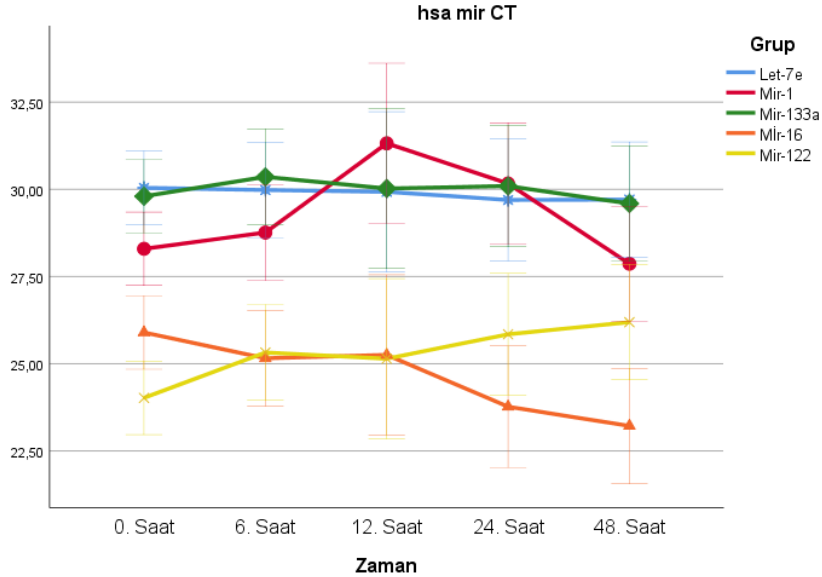
let-7e, mir-133a, mir-16, mir-122'de zamansal ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmazken ($F=0,04$ $p=0,997$; $F=0,387$ $p=0,815$; $F=1,978$ $p=0,133$; $F=1,311$ $p=0,297$) mir-1'de 12. saatte alınan ölçüm ortalamaları 48. saatte alınan ölçüm ortalamalarından istatistiksel olarak daha yüksektir ($F=4,156$ $p=0,012$).

Tüm zamanlara bakıldığında mir-16 ve mir-122'de diğer gruplara göre daha düşük Ct ortalaması ölçülmüştür (Şekil 3.4).

Çizelge 3.2. Let-7e, mir-1, mir-133a, mir-16, mir-122 genlerinin 0., 6., 12., 24. ve 48. saatlerde Ct değerlerinin zamanlara göre karşılaştırması

	Çalışma Grupları					Test İstatistikleri [†]	
	let-7e n=6	mir-1 n=6	mir-133a n=6	mir-16 n=6	mir-122 n=6	F	p
hsa mir CT							
0. Saat	30,04±0,92	28,29±2,09	29,80±0,82	25,90±0,86	24,02±1,11	25,804	0,001
6. Saat	29,98±1,42	28,76±1,83	30,36±1,19	25,16±1,63	25,32±1,99	14,185	0,001
12. Saat	29,93±0,87	31,32±4,90	30,02±1,65	25,25±3,10	25,14±0,55	6,824	0,001
24. Saat	29,69±1,18	30,17±1,68	30,09±3,06	23,77±1,60	25,84±2,31	12,029	0,001
48. Saat	29,71±1,27	27,87±2,36	29,59±0,95	23,22±1,48	26,19±3,02	11,343	0,001
Test	F=0,04;	F=4,156;	F=0,387;	F=1,978;	F=1,311;		
İstatistikleri [‡]	p=0,997	p=0,012	p=0,815	p=0,133	p=0,297		
Grup etkisi: F=54,37; p=0,001; $\eta^2=0,897$; Zaman etkisi: F=1,082; p=0,369; $\eta^2=0,041$							
Grup x Zaman etkisi: F=1,254; p=0,242; $\eta^2=0,167$							

F: Karışık Düzen varyans analizi, η^2 : Etki Büyüklüğü, [†]Gruplar arası karşılaştırma, [‡]Grup içi karşılaştırma, Özet istatistikler *ortalama ± standart sapma* değer olarak verilmiştir. Koyu olarak belirlenen bölümler istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 3.4. miRNA'ların Ct ölçümlerinin zamansal değişimi

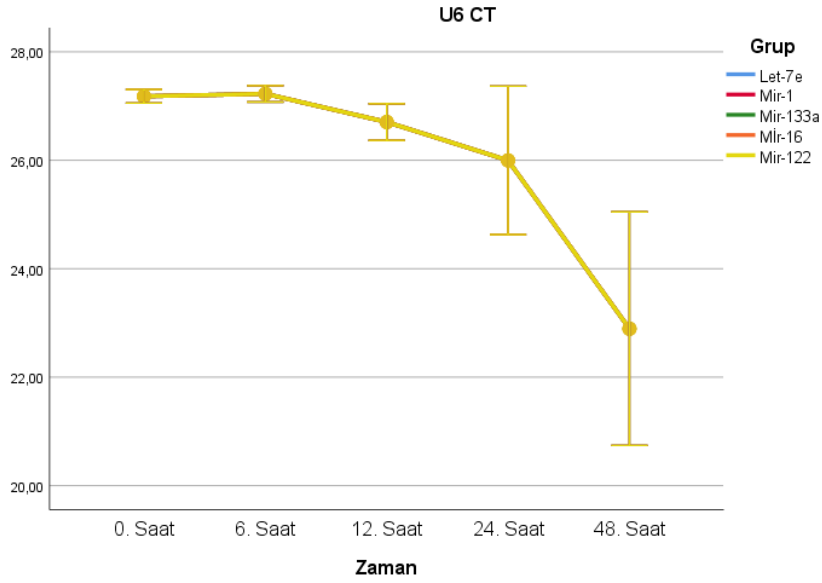
miRNA analizlerimizde referans gen olarak U6 seçilmiş olup, gruplar arasında farklılık olup olmadığı analiz edilmiştir. Analizlere göre, U6 Ct ölçümleri için zaman ve çalışma gruplarının etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi ($F=0,001$ $p=0,999$). Başlangıç, 6. Saat, 12. Saat ve 48. Saat sonunda alınan ölçümlerde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($F=0,001$ $p=0,999$). İlgili aynı saat dilimlerinde alınan ölçümler tüm gruplarda aynı U6 Ct ölçüm ortalamasına sahipti (Çizelge 3.2). Referans örnekler, her dokuda ve her hücrede iç ve dış etkenlerden etkilenmeyen bağımsız genlerdir o nedenle çalışmamızda her saat için referans genimizin eksprese olması beklenmiştir. Aynı saat dilimlerinde aynı Ct ölçümleri vermesi bu beklentimizi desteklemiştir.

Tüm gruplarda 0, 6 ve 12. saatlerde alınan ölçüm ortalamaları 48. saatte alınan ölçüm ortalamalarından istatistiksel olarak daha yüksek 6. saatte alınan ölçüm ortalamaları da 12. saatte alınan ölçüm ortalamalarından istatistiksel olarak daha yüksekti ($F=3964,075$ $p=0,001$). Bu sonuçlar U6'nın doğru bir referans gen seçimi olduğunu, 0., 6. ve 12. saatlerde daha kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Tüm gruplarda 0 ile 48 saat aralığında aynı U6 CT ortalaması ölçüldü ve tüm grupların U6 CT ortalaması zaman içinde azalmaktaydı (Şekil 3.5).

Çizelge 3.3. Çalışma gruplarında U6 Ct ölçümlerinin zamanlara göre karşılaştırması

	Çalışma Grupları					Test İstatistikleri †	
	let-7e n=6	mir-1 n=6	mir-133a n=6	mir-16 n=6	mir-122 n=6	F	p
U6 CT							
0. Saat	27,18±0,15	27,18±0,15	27,18±0,15	27,18±0,15	27,18±0,15	0,001	0,999
6. Saat	27,23±0,18	27,23±0,18	27,23±0,18	27,23±0,18	27,23±0,18	0,001	0,999
12. Saat	26,70±0,40	26,70±0,40	26,70±0,40	26,70±0,40	26,70±0,40	0,001	0,999
24. Saat	26,00±1,63	26,00±1,63	26,00±1,63	26,00±1,63	26,00±1,63	0,001	0,999
48. Saat	22,89±2,56	22,89±2,56	22,89±2,56	22,89±2,56	22,89±2,56	0,001	0,999
Test	F=3964,075;	F=3964,075;	F=3964,075;	F=3964,075;	F=3964,075;		
İstatistikleri ‡	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001		
Grup etkisi: $F=0,001$; $p=0,999$; $\eta^2=0,001$; Zaman etkisi: $F=58,763$; $p=0,001$; $\eta^2=0,702$							
Grup x Zaman etkisi: $F=0,001$; $p=0,999$; $\eta^2=0,001$							

F : Karışık Düzen varyans analizi, η^2 : Etki Büyüklüğü, † Gruplar arası karşılaştırma, ‡ Grup içi karşılaştırma, Özet istatistikler *ortalama $\pm$ standart sapma* değer olarak verilmiştir. Koyu olarak belirlenen bölümler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).



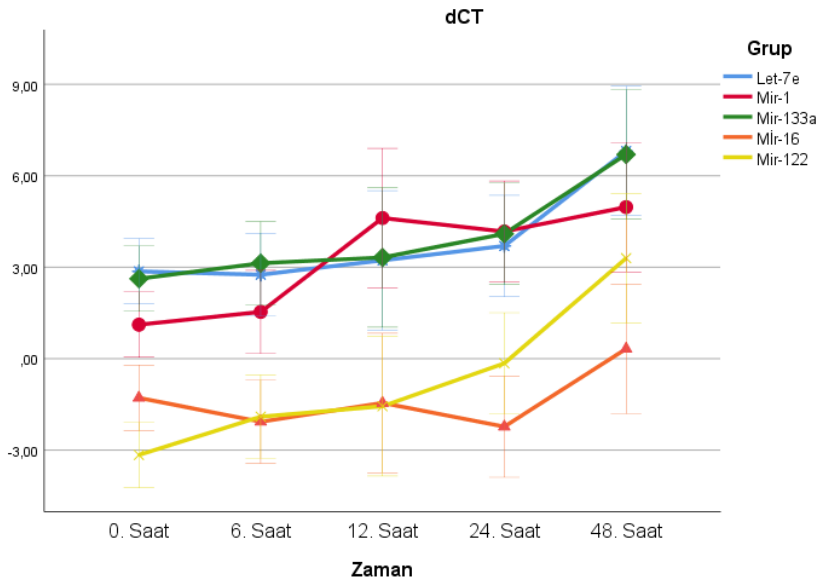
Şekil 3.5. Çalışma gruplarında U6 Ct ölçümlerinin zamansal değişimi

Her bir miRNA'nın Δ Ct ölçümlerinde zaman ve çalışma gruplarının etkisi inceledi ve Δ Ct ölçümleri için zaman ve çalışma gruplarının etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($F=1,023$ $p=0,440$). Başlangıç (0. saat) alınan ölçümlerde mir-16 ve mir-122 diğer gruplardan istatistiksel olarak daha düşük ortalamaya sahipti ($F=24,991$ $p=0,001$). 6. saat, 12. saat ve 24. saatlerde alınan ölçümlerde de aynı durum geçerliydi ($F=14,441$ $p=0,001$; $F=6,898$ $p=0,001$; $F=13,278$ $p=0,001$). 48. saatte alınan ölçümlerde mir-16'da elde edilen Δ Ct ölçüm ortalamaları diğer gruplardan istatistiksel olarak daha düşüktü (Çizelge 3.3). mir-133a ve mir-16'da elde edilen zamansal ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmazken ($F=2,469$ $p=0,075$; $F=2,583$ $p=0,065$); let-7e, mir-1 ve mir-122'de başlangıç ve 6. saatte alınan ölçüm ortalamaları 48. saatte alınan ölçüm ortalamalarından istatistiksel olarak daha düşüktü ($F=3,422$ $p=0,025$; $F=4,264$ $p=0,011$; $F=5,687$ $p=0,003$).

Tüm zamanlar değerlendirildiğinde, mir-16 ve mir-122’de diğer gruplara göre tüm zamanlarda daha düşük ΔCt ortalaması ölçüldü (Şekil 3.6).

Çizelge 3.4. Çalışma gruplarında ΔCt ölçümlerinin zamanlara göre karşılaştırması

	Çalışma Grupları					Test İstatistikleri [†]	
	let-7e n=6	mir-1 n=6	mir-133a n=6	mir-16 n=6	mir-122 n=6	F	p
dCT							
0. Saat	2,86±0,97	1,12±2,03	2,62±0,94	-1,28±0,94	-3,16±1,13	24,991	0,001
6. Saat	2,75±1,50	1,54±1,81	3,13±1,24	-2,07±1,55	-1,90±1,91	14,441	0,001
12. Saat	3,23±0,96	4,61±4,93	3,32±1,68	-1,45±2,86	-1,56±0,87	6,898	0,001
24. Saat	3,70±1,19	4,17±1,97	4,10±1,88	-2,23±2,19	-0,15±2,43	13,278	0,001
48. Saat	6,81±2,59	4,97±2,31	6,70±2,42	0,32±3,12	3,30±2,07	6,880	0,001
Test	F=3,422;	F=4,264;	F=2,469;	F=2,583;	F=5,687;		
İstatistikleri [‡]	p=0,025	p=0,011	p=0,075	p=0,065	p=0,003		
Grup etkisi: $F=95,091$; $p=0,001$; $\eta^2=0,938$; Zaman etkisi: $F=15,205$; $p=0,001$; $\eta^2=0,378$							
Grup x Zaman etkisi: $F=1,023$; $p=0,440$; $\eta^2=0,141$							



Şekil 3.6. miRNA çalışma gruplarında ΔCt ölçümlerinin zamansal değişimi

Her bir miRNA’nın $\Delta\Delta Ct$ ölçümlerinde zaman ve çalışma gruplarının etkisi incelendi. $\Delta\Delta Ct$ ölçümleri için zaman ve çalışma gruplarının etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($F=1,023$ $p=0,440$). Başlangıç, 6. saat ve 12. saatte alınan ölçümlerde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır

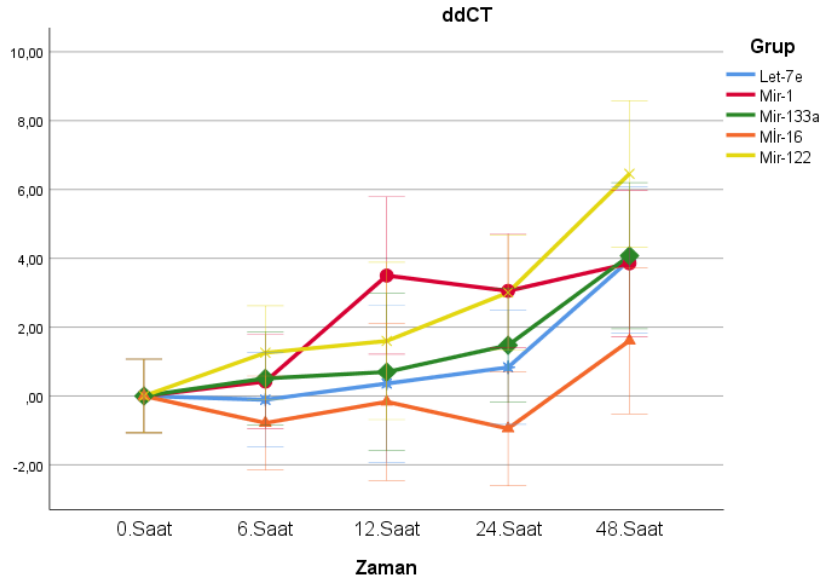
($F=0,001$ $p=0,999$; $F=1,317$ $p=0,291$; $F=1,679$ $p=0,186$). 24 ve 48. saatte alınan ölçümlerde mir-16'dan elde edilen $\Delta\Delta Ct$ ölçüm ortalamaları mir-122'den istatistiksel olarak daha düşüktür ($F=4,279$ $p=0,009$; $F=2,770$ $p=0,049$) (Çizelge 3.4).

mir-133a ve mir-16'da elde edilen zamansal ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmazken ($F=2,469$ $p=0,075$; $F=2,583$ $p=0,065$); Let-7e, mir-1, mir-122'de başlangıç, 6. saat ve 12. saatte alınan ölçüm ortalamaları 48. saatte alınan ölçüm ortalamalarından istatistiksel olarak daha düşüktür ($F=3,422$ $p=0,025$; $F=4,264$ $p=0,011$; $F=5,687$ $p=0,003$).

Tüm zamanlar değerlendirildiğinde, mir-16 diğer gruplara göre 24 ve 48. saatte daha düşük $\Delta\Delta Ct$ ortalaması ölçülmüştür (Şekil 3.7).

Çizelge 3.5. Çalışma Gruplarında $\Delta\Delta Ct$ Ölçümlerinin Zamanlara Göre Karşılaştırması

	Çalışma Grupları					Test İstatistikleri [†]	
	let-7e	mir-1	mir-133a	mir-16	mir-122	<i>F</i>	<i>p</i>
	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6	<i>n</i> =6		
ddCT							
0. Saat	0,00±0,97	0,00±2,03	0,00±0,94	0,00±0,94	0,00±1,13	0,001	0,999
6. Saat	-0,11±1,50	0,42±1,81	0,51±1,24	-0,78±1,55	1,26±1,91	1,317	0,291
12. Saat	0,36±0,96	3,50±4,93	0,70±1,68	-0,17±2,86	1,60±0,87	1,679	0,186
24. Saat	0,83±1,19	3,05±1,97	1,47±1,88	-0,95±2,19	3,01±2,43	4,279	0,009
48. Saat	3,95±2,59	3,86±2,31	4,08±2,42	1,61±3,12	6,46±2,07	2,770	0,049
Test	<i>F</i>=3,422;	<i>F</i>=4,264;	<i>F</i> =2,469;	<i>F</i> =2,583;	<i>F</i>=5,687;		
İstatistikleri [‡]	<i>p</i>=0,025	<i>p</i>=0,011	<i>p</i> =0,075	<i>p</i> =0,065	<i>p</i>=0,003		
Grup etkisi: <i>F</i> =13,924; <i>p</i> =0,001; η^2 =0,690; Zaman etkisi: <i>F</i> =15,205; <i>p</i> =0,001; η^2 =0,378							
Grup x Zaman etkisi: <i>F</i> =1,023; <i>p</i> =0,440; η^2 =0,141							



Şekil 3.7. Çalışma Gruplarında $\Delta\Delta Ct$ Ölçümlerinin Zamansal Değişimi

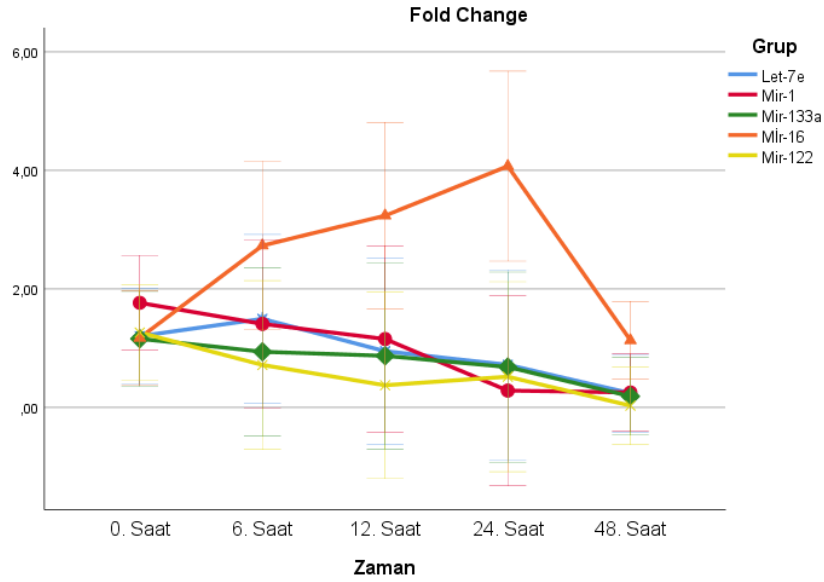
Her bir miRNA'nın Fold Change ölçümleri için zaman ve çalışma gruplarının etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi ($F=0,948$; $p=0,518$). Başlangıç, 6. saat 12. saat ve 48. saatte alınan ölçümlerde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($F=0,434$ $p=0,783$; $F=1,279$ $p=0,305$; $F=2,109$ $p=0,110$; $F=1,875$ $p=0,146$). 24 saatte alınan ölçümlerde mir-16'da elde edilen Fold Change ölçüm ortalamaları diğer gruplardan istatistiksel olarak daha yüksek ($F=4,139$ $p=0,010$).

Tüm gruplardan elde edilen zamansal ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmazken ($F=1,101$ $p=0,381$; $F=1,806$ $p=0,164$; $F=0,934$; $p=0,463$; $F=1,365$; $p=0,278$). mir-16'da başlangıç, 48. saatte alınan ölçüm ortalamaları 24. saatte alınan ölçüm ortalamalarından istatistiksel olarak daha düşüktü ($F=10,390$ $p=0,001$) (Çizelge 3.5).

Tüm zamanlar değerlendirildiğinde, mir-16'da diğer gruplara göre 24. saatte daha yüksek Fold Change ortalaması ölçülmüştü (Şekil 3.8).

Çizelge 3.6. Çalışma Gruplarında Fold Change Ölçümlerinin Zamanlara Göre Karşılaştırması

	Çalışma Grupları					Test İstatistikleri †	
	let-7e n=6	mir-1 n=6	mir-133a n=6	mir-16 n=6	mir-122 n=6	F	p
Fold Change							
0. Saat	1,2±0,78	1,76±1,53	1,16±0,59	1,17±0,68	1,26±0,88	0,434	0,783
6. Saat	1,49±0,94	1,41±1,93	0,94±0,74	2,73±2,96	0,72±0,64	1,279	0,305
12. Saat	0,95±0,71	1,15±2,08	0,87±0,53	3,24±3,52	0,37±0,18	2,109	0,110
24. Saat	0,72±0,48	0,28±0,44	0,68±0,83	4,07±4,00	0,52±1,05	4,139	0,010
48. Saat	0,24±0,41	0,25±0,50	0,19±0,29	1,13±1,59	0,03±0,05	1,875	0,146
Test	F=1,101;	F=1,806;	F=0,934;	F=10,390;	F=1,365;		
İstatistikleri ‡	p=0,381	p=0,164	p=0,463	p=0,001	p=0,278		
Grup etkisi: F=33,491; p=0,001; $\eta^2=0,843$; Zaman etkisi: F=2,100; p=0,086; $\eta^2=0,077$							
Grup x Zaman etkisi: F=0,948; p=0,518; $\eta^2=0,132$							



Şekil 3.8. Çalışma Gruplarında Fold Change Ölçümlerinin Zamansal Değişimi

4. TARTIŞMA

Klinik araştırmalarda miRNA ve hücre dışı serbest DNA analizleri yaygındır ancak adli alanda kullanımı henüz yaygınlaşmamış olup araştırmalar devam etmektedir. miRNA'lar, mRNA'lardan daha kararlı yapıda olması PMİ tayinin çalışmalarında öne çıkmıştır. Genel olarak, RNA'nın DNA ve proteinden bozulmaya daha duyarlı olduğu düşünölmekteyse de, uzun süreli ölüm sonrası RNA stabilitesi birçok adli tıp laboratuvarı tarafından onaylanmıştır. Bu nedenle RNA kullanımı uzun dönem PMİ'de de daha etkin olacaktır. miRNA'larla ilgili araştırmalar genel olarak biyolojik sıvıların kimliklendirilmesi üzerinedir (Glynn, 2020).

Adli tıbbın en önemli sorularından biri olan ölümden sonra geçen zaman tayini için kullanılan geleneksel yöntemlerdeki parametrelerin ileri dönemde tekrar kullanılması ve analizlerin yenilenmesi mümkün değıldir. Geleneksel yöntemlerde kullanılan parametreler ölümden sonra ilk 24 saatte olan değışimlerdir ve daha uzun sürelerde kullanılması güçtür o nedenle moleküler parametrelerin kullanılması bu sınırlamayı kaldıracaktır. PMİ'de henüz moleküler çalışmalar az bulunmaktadır. Farklı örneklerde ve zamanlarda stabilitesini koruyabilen miRNA'lar ölümden sonra geçen zamanın tayin edilmesi açısından umut vaad etmektedir.

1985'de Allec Jeffrey'in DNA parmakizini keşfi ile DNA profilleme, kimliklendirme için kullanılmaktadır. DNA tek yumurta ikizleri hariç herkesde farklı profil verdiğıinden kimliklendirme için uygundur. DNA aynı kişinin farklı örneklerinde de aynı profili vermektedir. RNA ise farklı dokularda farklı seviyede ekspre edildiğıinden farklı dokuların karşılaştırılması çalışmalarında daha uygun bir referans olacaktır. Seçilen dokuların önemiyle beraber miRNA'ların kullanımında sıcaklık da önemli bir parametredir. Çalışmamızda kan örnekleri ile çalışılmış ve 24 °C sıcaklık olarak seçilmiştir. Bu sıcaklıkta farklı sürelerde olası miRNA miktar değışikliğıin PMİ tayininde araştırılması planlanmıştır. Karaciğerde yüksek sıcaklıklarda miR-122'nin degrede olduğu; karaciğerin miyokardiuma göre daha hızlı bozunmaya uğradığı da bildirilmiştir (Lv ve ark., 2017). Bu nedenle kan örneklerinin

ve diğer dokuların da farklı sıcaklıklarda kantitatif çalışmaların yapılması önemli olacaktır.

2013 ve 2020 yılları arasında miRNA ve PMİ tayini üzerine yapılan tüm yayınları derleyen bir çalışmada, sıçanlar/fareden alınan serum örnekleriyle hiçbir çalışma yapılmadığı; hayvanlar üzerinde yapılan araştırmaların da az olduğu belirtilmiştir (Montanari ve ark., 2021). Aynı çalışmada 18 cesetten alınmış insan kan örnekleriyle çalışma yapıldığı ancak sonuçların desteklenmesi için daha fazla örneklem sayısı ile çalışılması gerektiği vurgulanmıştır (Corradini ve ark., 2015). Biz çalışmamızda rat deney hayvanı modeli kullanarak ve bu sayıyı genişleterek 30 örneklemle deneyi tamamladık. Gerçek adli vakalar üzerine yapılan çalışmalarda çevresel ve diğer dış değişkenleri kontrol etmek zor olduğundan standart biyobelirteç bulmak için yapılan çalışmaların ilk olarak hayvanlarda denenmesi daha doğru sonuçlar sağlayacaktır. Bu da rat serum örnekleriyle yapılan çalışmamızın önemini göstermektedir. Örneklem olarak önce ratlarla yapılan bir çalışmada doğrulama için insanlarla da çalışılmış ve 5,6 saatlik hesaplama hatası olduğu gösterilmiştir (Lv ve ark., 2017). Bu nedenle yapılan hayvan çalışmalarının sonrasında insanlarla doğrulanması da ayrı bir önem arz etmektedir (Montanari ve ark., 2021).

Referans seçimi de ayrıca önemlidir. Genel olarak referans olarak kullanılan GAPDH, ACTB, U6'nın beyin, karaciğer, dalak, kalp ve iskelette zaman geçtikçe bozunmaya uğradığı görülmüştür. Çalışmamızda miRNA analizlerinde referans olarak seçilen U6'nın tüm gruplarda 0 ile 48 saat aralığında aynı U6 CT ortalamasının olduğu ve tüm grupların ortalamasının zaman içinde azaldığı görülmüştür. Tüm gruplarda aynı ortalamaya sahip olması kan örnekleri ile yapılan çalışmalarda uygun bir referans olduğunu göstermiştir (Lv ve ark., 2014; Nagy ve ark., 2015 ve Tu ve ark., 2018).

Çalışmamızda let-7e, mir-1, mir-133a, mir-16, mir-122 çalışılmış olup artan PMİ ile ekspresyonlarının istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ancak kan serum örnekleriyle yapılan nadir bir çalışma olduğundan bu alanda önemli bir adım olmuştur. let-7e, mir-1 ve mir-16 ile PMİ tayini ile ilgili literatürde kan serum örnekleriyle yapılan tek çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada farklı bölgelerden

alınan kan örnekleriyle PMİ ilişkisi araştırılmıştır, mir-16 ve let-7e'nin farklı bölgelerden alınan kan örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamış; mir-1 de ise ayrı bölgelerde farklılık göstermiş ancak bunun PMİ ile ilişkisi bulunmadığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2021). Bu çalışma, kanda let-7e, mir-1 ve mir-16 ile PMİ arasındaki korelasyonun araştırıldığı nadir çalışmalardandır. Çalışmamızda otopsi sırasında alınan kan örneklerinin let-7e, mir-1 ve mir-16 çalışmaları için kullanılabilir potansiyelde olduğu görülmüştür. Kemik örnekleriyle yapılan bir çalışmada ise artan PMİ let-7e ve mir-16 ile negatif korelasyon göstermiştir (Na, 2020). Çalışmamızda tüm zamanlar değerlendirildiğine, mir-16'nın 24 ve 48. saatlerde istatistiksel olarak daha düşük $\Delta\Delta C_t$ ortalaması olduğu; let-7e'nin de başlangıç ve 6. saatte alınan ölçüm ortalamaları 48. saatte alınan ölçüm ortalamalarından istatistiksel olarak daha düşük $\Delta\Delta C_t$ ortalaması olduğu görülmüştür.

mir-122'nin karaciğer dokularında yüksek sıcaklıklarda degrade olduğu bildirilmiştir (Lv ve ark., 2017). Kan serum örnekleriyle yapılan çalışmamızda, 24 °C'lik sıcaklıkta hiç bir grupta degrade olmadığı görülmüştür.

mir-1, farklı bölgelerden alınan kan örneklerinde farklı nicel seviyeler olduğu bildirilmiş ancak artan PMİ ile istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır (Kim ve ark., 2021). Çalışmamızda artan PMİ ile mir-1 ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmamakla birlikte, 0. ve 6. saatlerde, 48. saate göre istatistiksel olarak daha düşük ΔC_t ortalaması olduğu görülmüştür. İleride yapılacak çalışmalarda kas dokusuna daha spesifik olan mir-1'in; karaciğer dokusuna daha spesifik mir-122'nin, kalp dokusuna daha spesifik mir-1'in farklı bölgelerden alınan kan örnekleri ile spesifik olduğu dokulardaki ekspresyonunun karşılaştırılması sonuçların yorumlanması için daha doğru olacaktır (Kim ve ark., 2021).

MiRNA'ların çoğunluğu mRNA'ların 3' UTR bölgelerine bağlanarak iş görürler. Yapılan araştırmaya göre mRNA'nın 3'-ucuna yakın bulunanların bozunma hızı, 5'-ucuna yakın bulunanlara göre daha yavaştır (Bauer ve ark., 2003). Bu nedenle hedef miRNA seçimlerinde 3'-ucuna yakın bulunanları seçmek daha uygun olacaktır (Heng ve ark., 2013).

1948 yılında Mandel and Metais tarafından keşfedilen hücre dışı serbest DNA, gebelik, organ nakli ve kanser gibi fizyolojik veya patolojik durumlarda, dokulardan periferik dolaşıma salınabilmektedir (Yan ve ark., 2021). Tükürük, idrar, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveolar lavaj sıvısı, amniyotik sıvı ve diğer vücut sıvılarından da elde edilmesi açısından ayrıca analizleri de invaziv olması ve az maliyetli olması açısından avantajlı bir PMİ parametredir.

Hücre dışı serbest DNA'nın metilasyonu 1999 yılında keşfedilmiştir ve son yıllarda yapılan çalışmalarda metillenmiş hücre dışı serbest DNA'nın 24 saatten daha uzun sürede, metile olmayan hücre dışı serbest DNA'nın 6 saatte ortadan kaybolduğu, tümör bulunanlarda hem metillenmiş hem de metillenmemiş hücre dışı serbest DNA'nın 24 saatten daha uzun sürede tespit edilebildiği gösterilmiştir (Bartak ve ark., 2018). Zamana bağlı tespit değişimlerinden yararlanarak metillenmiş ve metillenmemiş hücre dışı serbest DNA'nın PMİ tayini çalışmalarında ayrıca değerlendirilmesi çalışmaları arttıracaktır.

Hücre dışı serbest DNA kaynaklarından biri olan nekrozis, ekstrem çevre şartlarıyla da redükte olabilmektedir (De Miranda ve ark., 2021). Ölüm zamanı tayininde kullanılan geleneksel yöntemler çevre şartlarından etkilenmekte ve PMİ de hatalı hesaplamalara neden olabilmekteyken, nekrozisin ekstrem şartlarda hücre dışı serbest DNA'nın oluşumunu redükte etmesi ile hücre dışı serbest DNA'nın PMİ'de daha güvenilir bir parametre olduğunu söyleyebiliriz.

Hücre dışı serbest DNA'nın ölüm sonrası geçen zamanla ilgili kantitatif olarak çalışma bulunmamaktadır. Kalitatif analiz olarak grubumuz tarafından yapılan tek çalışmada, hücre dışı serbest DNA'nın ilk saatlerde hızlı olmasından kaynaklı, hücre dışı serbest DNA'nın ilk 3-9 saatte hızla arttığı bildirilmiş ve 24 °C'de hücre dışı serbest DNA'nın 6. saatte en yüksek seviyede olduğu, 72. saate kadar da konsantrasyonun düştüğü bildirilmiştir (Emiral ve ark., 2021). Aynı çalışmada hem 24 °C'de hem de 4 °C'de analizler ayrı ayrı yapılmış ve postmortem dönemde sıcaklık arttıkça nekrozun daha hızlı olduğunu ve serumdaki hücre dışı serbest DNA'nın arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmadan yola çıkarak çalışmamızda 24 °C'de 48. saate kadar gözlem yapılmış ve

Emiral ve ark. (2021)'nın çalışmasına ek olarak çalışmamızda referans olarak seçilen ACTB ve GAPDH ölçüm ortalamalarının zaman içinde azaldığı, 0., 6. saat ve 12. saatte alınan ölçüm ortalamalarının 24. saat ve 48. saatte alınan ölçüm ortalamalarından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuç özellikle kantitatif olarak ilk 12 saatte hücre nekrozunun daha hızlı olduğu, zamanla istatistiksel olarak azaldığını göstermiştir. Erken dönem belirtilerinin çevresel şartlardan etkilendiği göz önünde bulundurulduğunda ilk 48 saatlik süreçte hücre dışı serbest DNA tayinin kantitatif analizinin kullanılması önem arz etmektedir. Kalitatif olarak yapılan çalışmanın kantitatif olarak da tekrarlanması hücre dışı serbest DNA'nın PMİ tayininde kullanılmasına ilişkin çalışmaların önünü açmıştır. Hem miRNA hem de hücre dışı serbest DNA'nın PMİ ile ilişkisinin incelendiği bu çalışmada moleküler analizlerde kullanılan qPZR kullanılmıştır. Bu yöntemin hassas ve güvenilir bir yöntem olması da kalitatif olarak yapılan çalışmanın desteklenmesini sağlamaktadır.

Postmortem süreçte moleküler analizler için alınabilecek en iyi örnek kandır. Otopside rutin olarak alınan örneklerden biri de kan örnekleridir o nedenle postmortem interval tayini analizlerinde kan örneğine dayalı güvenilir analizlerin olması önemlidir (Dokgöz ve ark., 2001). Çalışmaların kan örneği üzerinde yoğunlaşması ve daha fazla biyobeliteçin değerlendirilmesi yapılan çalışmaları destekleyecektir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Moleküler çalışmalar günümüzde her alanda artmaya başlamıştır. Bu alanlardan biri de adli tıptır. Adli tıpta soruşturma ve kovuşturma aşamasında oldukça önemli olan pekçok konuda çalışmalar artık moleküler analizlere yönelmiştir. Adli tıp alanında önemli olan konulardan biri de ölümden sonra geçen zamanın bilinmesidir. Ölümden sonra geçen zamanın tam ve kesin olarak belirlenmesi geleneksel yöntemlerle yapılamamaktadır. Geleneksel yöntemler ölüm zamanı ile ilgili aralık bir zaman vermekte ayrıca çevresel şartlardan da etkilenebilmektedir. Bu nedenlerden dolayı ölüm zamanı hakkında kesin bilgi verecek ve çevresel şartlarında etkilenmeyecek parametrelere ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda seçilen miRNA'larla ilgili çalışmalar literatürde bulunmaktadır ancak uzun yıllar yapılan çalışmalarda genellikle dokular ve kemikler tercih edilmiş kan örnekleriyle yapılan çalışmalar ise sınırlı kalmıştır. Çalışmamız, diğer dokularda çalışılmış ancak kan serum örneklerinde yeterli çalışma yapılmamış miRNA'ların seçimi ile bu alanda önemli bir adım olmuştur. Hücre dışı serbest DNA'nın ise postmortem interval tayininde yapılan kalitatif olarak çalışılmış bir yayın vardır ve çalışmamız kantitatif olarak yapılmış ilk çalışma niteliğine sahiptir.

Bu çalışmanın en önemli sınırlaması az sayıda örneklem olmasıdır. Çalışmamızın ışığında daha fazla sayıda örnekleme çalışılması ve çalışmalarda hayvan çalışmalarının sonuçlarının insan çalışmalarında da yapılarak sonuçların doğrulanması daha iyi olacaktır. Bu tarz çok etkenli çalışmalarda tek bir belirteç yeterli olmayıp farklı biyobelirteçleri birlikte değerlendirmek daha kesin sonuçlar sağlayacaktır.

ÖZET

Postmortem İnterval Tayininde Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Hücre Dışı Serbest DNA ve MiRNA Analizi

Fransız bilim insanı Emanuele Fodere ilk olarak ölümün tanısını somatik ölüm olarak adlandırmış ve spontan dolaşım, spontan solunum ve merkezi sinir sisteminin geri dönüşümsüz olarak kaybı olarak tanımlamıştır. Ölüm sonrası geçen zaman ise postmortem interval (PMİ) olarak tanımlanmaktadır. Ölüm zamanının bilinmesi adli vakalarda olayların aydınlatılmasında büyük önem taşımaktadır. Postmortem değişiklikler genel olarak erken ve geç dönem olmak üzere iki ayrı grupta değerlendirilmektedir. Farklı nedenlerle gerçekleşen ölüm sonrasında vücutta algor mortis, rigor mortis, livor mortis ve pütrefikasyon gibi benzer değişiklikler meydana gelmektedir. Adli Tıp'ta ölüm zamanı tayininde kanın donma derecesi, sakal ve kılların ölçümü, mide muhtevası, kan şekeri ölçümü, kemik iliği hücreleri, kan pH sınırın ölçümü gibi fizyolojik ve biyokimyasal değişimler geleneksel yöntemler olarak kullanılmakta ayrıca da adli entomoloji alanın da kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemler ve entomolojik veriler çevre şartlarından etkilenebilmekte ve ölüm zamanı tayininde yanılgıya neden olabilmektedir. Çevre şartlarından daha az etkilenen genetik materyaller, son dönemlerde PMİ çalışmalarına dahil edilmiştir. Bu doktora tezi çalışmasında, farklı zaman aralıklarında ratlardan alınan serum örneklerinde, hücre dışı serbest DNA ve seçilen miR-122, miR-133, miR-1; miR-16, let-7e düzeylerinin kantitatif analizleri yapılmış, ölüm sonrası geçen süre arasındaki olası korelasyon ile postmortem interval tayininin araştırılması yapılmıştır. Analiz sonuçları Ct, Δ Ct ve $\Delta\Delta$ Ct ve fold change ayrı ayrı değerlendirilmiş olup mir-16 ve mir-122'nin diğer miRNA'lara göre istatistiksel olarak tüm zamanlarda daha düşük Δ Ct ortalamasına sahip olduğu; mir-16'nın 24. ve 48. saatlerde daha düşük $\Delta\Delta$ Ct ortalamasına sahip olduğu; fold chage değişimlerinde ise mir-16'nın 24. saatte en yüksek ortalamaya sahip olduğu görülmüştür. Ölüm sonrası geçen zamanla birlikte hücre dışı serbest DNA tayini için yapılan çalışmada referans genlerimiz olan GAPDH ve ACTB'nin zamanla azaldığı, 0., 6., ve 12. saatlerde, 24 ve 48. saatlere göre istatistiksel olarak daha yüksek ortalamaya sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışma postmortem interval tayininde hücre dışı serbest DNA'nın olası etkisi ile ilgili kantitatif olarak yapılan ilk araştırma niteliğindedir.

Anahtar Sözcükler: Hücre dışı serbest DNA, mikroRNA, Ölüm zamanı, Postmortem interval, qPZR

SUMMARY

Cell Free DNA and MiRNA Analysis by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction in Postmortem Interval Determination

For the first time, French scientist Emanuelle Fodere named the diagnosis of death as somatic death and defined it as irreversible loss of spontaneous circulation, spontaneous breathing and central nervous system. The time after death is defined as the postmortem interval (PMI). Knowing the time of death is important in forensic cases. Postmortem changes are evaluated in two separate groups as early and late period. After death due to different reasons, similar changes occur in the body such as algor mortis, rigor mortis, livor mortis and putrefication. Physiological and biochemical changes such as the degree of freezing of the blood, measurement of beard and hair, measurement of stomach content, blood sugar measurement, bone marrow cells, measurement of blood pH and also used in the field of forensic entomology are used as traditional methods in forensic medicine. Traditional methods and entomological data can be affected by environmental conditions and cause errors in the determination of time of death. Genetic materials that are less affected by environmental conditions have been included in PMI studies recently. In the study, quantitative analyzes of the levels of extracellular free DNA and selected miRNAs were made in serum samples taken from rats at different time intervals, and the possible correlation between the postmortem period and the postmortem interval determination were investigated. Analysis results Ct, Δ Ct and $\Delta\Delta$ Ct and fold change were evaluated separately, and mir-16 and mir-122 had a statistically lower Δ Ct mean than other miRNAs at all times; mir-16 had lower mean $\Delta\Delta$ Ct at 24 and 48 hours; In the fold change changes, it was observed that mir-16 had the highest mean at the 24th hour. In the study conducted for the elapsed time after death and extracellular free DNA determination, it was observed that our reference genes, GAPDH and ACTB, decreased over time and had a statistically higher mean at 0, 6, and 12 hours than at 24 and 48 hours. This study is the first quantitative study on the possible effect of extracellular free DNA in postmortem interval determination.

Keywords: Extracellular free DNA, microRNA, Time of death, Postmortem interval, qPCR

KAYNAKLAR

- ABDULAZEEZ IO, NOORDIN MM (2010). Algor mortis pattern in dogs, a guide to estimation of time of death. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, **33**: 105–111.
- AITKENHEAD-PETERSON JA, FANCHER JP, ALEXANDER MB, HAMILTON MD, BYTHEWAY JA, WESCOTT DJ (2021). Estimating postmortem interval for human cadavers in a sub-tropical climate using UV-Vis-near-infrared spectroscopy. *J Forensic Sci* 66:190–201.
- AKSOY ME, TURAN YURTSEVER N (2016). Ölüm zamanı belirlenmesi. *Türkiye Klinikleri Adli Tıp-Ölüm Özel Konusu*, **2**: 20-23.
- ALPER B, AZMAK D, ÇEKİN N, GÜLMEN MK, KOÇ S, SALAÇIN S (1999). Adli otopsiler ve adli patoloji. Erişim adresi: [<https://www.ttb.org.tr/eweb/adli/3.html>]. Erişim Tarihi: 4/8/2021
- ALSHEHHI S, HADDRILL PR (2019). Estimating time since deposition using quantification of RNAdegradation in body fluid-specific markers. *Forensic Sci Int.*, **298**: 58–63.
- ALTINSOY S, ÖZDEMİR EŞ, BARAN İ, KAVAK AKELMA F, ARSLAN MT, ERGİL J (2020). Beyin ölümü tanısı alan hastaların değerlendirilmesi ve yeni yönetmeliğin tanı süresine etkisinin araştırılması. *Turk J Intensive Care.*, **18**: 21-27.
- ALTUNTAŞ Y, BATMAN A (2017). Mikrobiyota ve metabolik sendrom. *Turk Kardiyol Dern Ars.*, **45**: 286–296.
- AMENDT J, CAMPOBOSSO CP, GAUDRY E, REITER C, LE BLANC HN, HALL MJR (2006). Best practice in forensic entomology – standards and guidelines. *Int J Legal Med.*, **121**: 90-104.
- AMENDT J, ZEHNER R, KRETTEK R (2004). Forensic entomology. *Naturwissenschaften.*, **91**: 51–65.
- ARICAN N, DOKGÖZ H, YORULMAZ C, ELMAS İ, FİNCANCI ŞK (2000). İn vitro kan değişimleri ve postmortem interval. *Adli Tıp Bülteni.*, **5**: 83-7.
- ARROYO JD, CHEVILLET JR, KROH EM, RUF IK, PRITCHARD CC, GIBSON DF, MITCHELL PS, BENNETT CF, POGOSOVA-AGADJANYAN EL, STIREWALT DL, TAIT JF, TEWARI M (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108**: 5003–5008.
- ARSLAN MN, KOÇ S (2016). Ölüm belirtileri. *J Foren Me.*, **2**: 12-9.
- BAGGA S, BRACHT J, HUNTER S, MASSIRER K, HOLTZ J, EACHUS R, PASQUINE AE (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell.*, **122**: 553–563.
- BALASOORIYA BA, ST HILL CA, WILLIAMS AR (1984). The biochemical changes in pericardial fluid after death. An investigation of the relationship between the time since death and the rise or fall in electrolyte and enzyme concentrations and their possible usefulness in determining the time of death. *Forensic Sci Int.*, **26**: 93–102.
- BARDALE R (2011). Death and changes after death. *Principles of Forensic Medicine and Toxicology*. Ed.: Saxena R, JP Medical Ltd., p: 132-66.
- BARTÁK BK, NAGY ZB, SPISÁK S, TULASSAY Z, DANK M, IGAZ P, MOLNÁR (2018). In vivo analysis of circulating cell-free DNA release and degradation. *Orv Hetil.*, **159**: 223-33.

- BAUER M, GRAMLICH I, POLZIN S, PATZELT D (2003). Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Leg Med.*, **5**: 220–7.
- BENDICH A, WILCZOK T, BORENFREUND E (1965). Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science.*, **148**: 374–6.
- BIANCHI ME, AGRESTI A (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev.*, **15**: 496–506.
- CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCH E, ALDLER H, RATTAN S, KEATING M, RAI K, RASSENTI L, KIPPS T, NEGRINI M, BULLRICH F, CROCE CM (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **99**: 15524–9.
- CEYLAN AZ (2020). Adli önemi olan diptera türlerinin mtdna COI gen analizi ile genetik teşhisi. Ankara Üniversitesi, Yüksek lisans tezi.
- CHANDRAKANTH H, KANCHAN T, BALARAJ BM, VIRUPAKSHA H, CHANDRASHEKAR TN (2013). Postmortem vitreous chemistry—An evaluation of sodium, potassium and chloride levels in estimation of time since death (during the first 36 h after death). *J Forensic Leg Med.*, **20**: 211-6.
- CHANG G, MOUILLET J-F, MISHIMA T, CHU T, SADOVSKY E, COYNE CB, PARKS WT, SURTI U, SADOVSKY Y (2017). Expression and trafficking of placental microRNAs at the feto-maternal interface. *Faseb J.*, **31**: 2760–2770
- CLARK MA, WORRELL MB, PLESS JE (1997). *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate Of Human Remains*. In: postmortem changes in soft tissues, Ed.: Haglund WD, Sorg MH., CRC Boca Raton, Fla. Chapter 5.
- CORRADINI B, ALÙ M, RADHESHI E, GABBOLINI V, FERRARI F, SANTUNIONE AL, SILINGARDI E (2015). Estimation of the time of death through the analysis of clock miRNAs expression in blood and vitreous humor. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.*, **5**: e204-e206.
- ÇELİK AŞÇI D, KOŞAR ASLAN P, ÖZÇELİK N (2013). MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*, **20**: 121-127.
- D'ALESSANDRA Y, DEVANNA P, LIMANA F, STRAINO S, DI CARLO A, BRAMBILLA PG, RUBINO M, CARENA MC, SPAZZAFUMO L, DE SIMONE M, MICHELI B, BIGLIOLI P, ACHILLI F, MARTELLI F, MAGGIOLINI S, MARENZI G, POMPILIG, CAPOGROSSI MC (2010). Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal.*, **31**: 2765–73.
- DE MIRANDA FS, BARAUNA VG, DOS SANTOS L, COSTA G, VASSALLO PF, CAMPOS LCG (2021). Properties and application of cell-free dna as a clinical biomarker. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**: 9110.
- DELL'AQUILA M, DE MATTEIS A, SCATENA A, COSTANTINO A, CAMPOREALE MC, DE FILIPPIS A (2021). Estimation of the time of death: where we are now?. *Clin Ter.*, **172**: 109-112
- DiMaio VJ, DiMaio D (2001). Time of death. *Forensic pathology*, Ed.: Geberth VE, Boca Raton: CRC Press, United States, Chapter 2.
- DOKGÖZ H, ARICAN N, ELMAS I, FİNCANCI SK (2001). Comparison of morphological changes in white blood cells afterdeath and in vitro storage of blood for the estimation ofpostmortem interval. *Forensic Science International.*, **124**: 25-31.

- EMİRAL E, KILICASLAN YAVUZ D, HANCI İH, SATIROĞLU TUFAN NL (2021). Role of cell free DNA and HMGB-1 in postmortem interval determination. *Rom J Leg Med.*, **29**: 1-7.
- EMİRAL E (2016). Postmortem interval tayininde hücre dışı serbest DNA ve HMGB-1'in rolü. Ankara Üniversitesi, *Tıpta uzmanlık tezi*.
- ERKOL Z (1994). Ölüm zamanı tayini. *Gaziantep Tıp Fakültesi Dergisi.*, **5**: 112-122.
- FARAZI TA, HOELL JI, MOROZOV P, TUSCHL T (2013). MicroRNAs in human cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **774**: 1–20.
- FARMER JG, BENOMRAN F, WATSON AA, HARLAND WA (1985). Magnesium, potassium, sodium and calcium in postmortem vitreous humour from humans. *Forensic Sci Int*; **27**: 1–13.
- FLEISCHHACKER M, SCHMIDT B (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey. *Biochim Biophys Acta.*, **1775**: 181–232.
- FRAGA D, MEULIA T, FENSTER S (2008). Real-time pcr. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Ed.: Gallagher SR, Wiley EA., New York, p: 10.1: 10.3.1–10.3.34
- FRANZOSA EA, HUANG K, MEADOW JF, GEVERS D, LEMON KP, BOHANNAN BJM, HUTTENHOWER C (2015). Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **112**: 2930–2938.
- GAHAN PB, ANKER P, STROUN M (2008). Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA?. *Ann N Y Acad Sci.*, **1137**: 7-17.
- GAILIUS J, PINEL D, WILSON J, THIBAUT P (2014). Mir122 (microRNA 122). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*; **18**: 470-479.
- GALLOIS-MONTBRUN FG, BARRES DR, DURIGON M (1988). Postmortem interval estimation by biochemical determination in birds muscle. *Forensic Sci. Int.*, **37**: 189-92
- GLYNN CL (2020). Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA.*, **26**:1–9.
- GOFF ML (2009). Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. *Exp Appl Acarol.*, **49**: 21–36.
- GOREA RK (2002). Study of postmortem interval from rigor mortis. *Journal of Punjab Academy of Forensic Medicine & toxicology.*, **2**: 1-5
- GRANJON A, GUSTIN MP, RIEUSSET J, LEFAI E, MEUGNIER E, GULLER I, CERUTTI C, PAULTRE C, DISSE E, RABASA-LHORET R, LAVILLE M, VIDAL H, ROME S (2009). The microRNA signature in response to insulin reveals its implication in the transcriptional action of insulin in human skeletal muscle and the role of a sterol regulatory element-binding protein-1c/myocyte enhancer factor 2C pathway. *Diabetes.*, **58**: 2555–2564.
- GREGORA Z, KRATOCHVİL J, VAVROVA J, OPLISTIL L (1979). Sodium and magnesium levels in the vitreous body. *Soud Lek*; **24**: 51–4.
- GRUNT M, HILLEBRAND T, SCHWARZENBACH H (2018). Clinical relevance of size selection of circulating DNA. *Transl Cancer Res.*, **7**: 171-184.
- GÜNEL T (2007). Gen anlatımının kantitatif analizi “real-time PCR”. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.*, **27**: 763-767.

- GÜNEL T, AYDINLI K (2009). Real-time pcr” ve uygulama alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi.*, **2**: 43-45.
- HANSEN J, LESNIKOVA I, FUNDER AMD, BANNER J (2014). DNA and RNA analysis of blood and muscle from bodies with variable postmortem intervals. *Forensic Sci Med Pathol.*, **10**: 322–8.
- HEINRICH M, MATT K, LUTZ-BONENGEL S, SCHMIDT U (2007). Successful RNA extraction from various human postmortem tissues. *Int J Legal Med.*, **121**: 136–142.
- HENG Z, PING Z, KAI-JUN M, YE-HUI L, WEN-CAN L, D, CHENG-LIANG L, LI-LIANG L, YI-WEN S, MENG H, JIE-QING J, LONG C (2013). The selection of endogenous genes in human postmortem tissues. *Sci Justice.*, **53**: 115–120.
- HENßGE C, MADEA B (2004). Estimation of the time since death in the earlypost-mortem period. *Forensic Sci Int.*, **144**: 167–175.
- HİTİT M, KURAR E, GÜZELOĞLU A (2015). MikroRNA biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, **10**: 211-218.
- HU L, XING Y, JIANG P, GAN L, ZHAO F, PENG W, LI W, TONG Y, DENG S (2021). Predicting the postmortem interval using human intestinal microbiome data and random forest algorithm. *Sci Justice.*, **61**: 516–527.
- INUI M, MARTELLO G, PICCOLO S (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **11**: 252-63.
- JAFFE F (1962). Chemical postmortem changes in the intraocular fluid. *J Forensic Sci.*, **7**: 231-7.
- JAFFE FA (1989). Stomach contents and the time of death. Reexamination of a persistent question. *Am. J. For. Med. Pathol.*, **10**: 37-41.
- JASHNANI KD, KALE SA, RUPANI AB (2010). Vitreous humor: biochemical constituents in estimation of postmortem interval. *J Forensic Sci.*, **55**: 1523-7.
- JAWAD M, NOREEN S, ASHRAF MF, ASIF M, ASIF HM, ALI S, RAKHA A (2020). Application of ribonucleic acid (RNA) in forensic sciences. *Biomedica*; **36**: 232-247.
- JAYARAM A, BOWEN MP, DESHPANDE S, CARP HM (1997). Ultrasound examination of the stomach contents of women in the postpartum period. *Anesth. Analg.*, **84**: 522-6.
- JORDAN SD, KRUGER M, WILLMES DM, REDEMANN N, WUNDERLICH FT, BRONNEKE HS, MERKWURTH C, KASHKAR H., OLKKONEN VM, BOTTGER T, BRAUN T, SEIBLER J, BRUNING JC (2011). Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat. Cell Biol.*, **13**: 434–446.
- JUNG HJ, SUH Y (2014). Circulating miRNAs in ageing and ageing-related diseases. *J Genet Genomics.*, **41**: 465–72.
- KALEKA AS, KAUR K, BALI GK (2019). development, morphology, physiology and behavior of larvae. *Larval Development and Molting*, Ed.: Mikkola H., Intech Open, London, p: 1-20
- KANG S, KASSAM N, GAUTHIER ML, O'DAY DH (2003) Post-mortem changes in calmodulin binding proteins in muscle and lung. *Forensic Sci Int.*, **131**: 140–147.
- KARABULUT S, KORKMAZ BAYRAMOV K, GÖLGELİ A (2018). Belleğin epigenetik düzenlenmesi: mikrona’ların rolü. *Sağlık Bilimleri Dergisi.*, **27**: 87-94.

- KARAGÜN BŞ, ANTMEN B, ŞAŞMAZ İ, KILINÇ Y (2014). Mikro RNA ve kanser. *Türk Klinik Biyokimya Derg.*, **12**: 45-56.
- KERMAN E (2019). Ratlarda postmortem mRNA degradasyon düzeylerinin araştırılması ve postmortem interval tayinindeki yeri. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıpta uzmanlık tezi.
- KIM SY, JANG SJ, JUNG YH, NA JY (2021). Difference in microRNA levels in the post-mortem blood from different sampling sites: A proof of concept. *J Forensic Leg Med.*, **78**: 102-124.
- KNIGHT B (1969). Methods of dating skeletal remains. *Med Sci Law.*, **9**: 247-252
- KOCATÜRK BK, BALCI Y, BAL C (2007). Ölüm zamanı bilinen 200 olguda makroskopik göz bulgularının postmortem interval açısından değerlendirilmesi. *J Foren Med.*, **4**: 102-105.
- KOÇ S, CAN M (2011). Birinci Basamakta Adli Tıp. In: ölüm kavramı ve ölü muayenesi, Ed.: KOÇ S, CAN M., Türkiye, p: 18-37.
- KOÇ S, KOLUSAYIN Ö (2011). Adli Tıp Ders Kitabı. In: ölüm belirtileri, İstanbul Üniversitesi Yayınları, p: 51-67.
- KOÇANA CÇ, TOPRAK SF, YAŞA B, HEKİMOĞLU H, TOKDEMİR SS (2019). Hücre dışı dna ve genomastaz. *Experimed.*, **9**: 69-74.
- KÖKDENER M (2016a). Ölüm zamanı tayininde adli entomolojik delillerin kullanımı. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.*, **5**: 105-110.
- KÖKDENER M (2016b). Application of entomology in forensic sciences. *Türk. entomol. bült.*, **6**: 269-275.
- KÖKDENER M, KARAPAZARLIOĞLU (2013). Adli Entomoloji. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.*, **3**: 24-28.
- KROMPECHER T (1981). Experimental evaluation of rigor mortis. v. effect of various temperatures on the evolution of rigor mortis. *Forensic Sci. Int.*, **17**: 19-26.
- KUMAR S, ALI W, SINGH US, KUMAR A, BHATTACHARYA S, VERMA AK, RUPANİ R (2016). Temperature-dependent postmortem changes in human cardiac troponin-t (cTnT): an approach in estimation of time since death. *J Forensic Sci.*, **61**: 241-5.
- KUMAR S, VERMA AK (2016). Estimation of postmortem interval using the data of insulin level in the cadaver's blood. *Data in Brief.*, **7**: 354-356.
- LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, YALCIN A, MEYER J, LENDECKEL W, TUSCHI T (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.*, **12**: 735-739.
- LALE A, BALSEVEN ODABAŞI A, AKÇAN R, HEYBET ER, TÜMER AR (2016). İskeletleşmiş cesetlerde postmortem interval tayini. *J For Med.*, **30**: 71-76.
- LALE A, YILDIRIM MS, AKÇAN R, BALSEVEN ODABAŞI , TÜMER AR (2017). Geçmişten günümüze göz içi sıvısı analizi ile postmortem interval tayini. *J For Med.*, **31**: 26-35.
- LE QUESNE J, CALDAS C (2010). Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular Oncology.*, **4**: 230-41.
- LECHETA MC, MOURA MO (2019). Estimating the age of forensically useful blowfly, *sarconesia chlorogaster* (diptera: calliphoridae), using larval length and weight. *Journal of Medical Entomology.*, **56**: 915-920.

- LI H, HUANG S, GUO C, GUAN H, XIONG C (2012). Cell-free seminal mRNA and microRNA exist in different forms. *PLoS One [Electronic Journal]*., **7**: 345-66. <https://journals.plos.org/plosone/>
- LI N, ZHOU H, TANG Q (2018). miR-133: A suppressor of cardiac remodeling?. *Front. Pharmacol.*, **9**: 903.
- LI WC, MA KJ, LV YH, ZHANG P, PAN H, ZHANG H, WANG HJ, MA D, CHEN L (2014). Postmortem interval determination using 18S-rRNA and microRNA. *Sci Justice.*, **54**: 307-310.
- LI Z, CHEN D, WANG Q, TIAN H, TAN M, PENG D, TAN Y, ZHU J, LIANG W, ZHANG L (2021). mRNA and microRNA stability validation of blood samples under different environmental conditions. *Forensic Science International: Genetics.*, **55**: 102-567.
- LIN S, GREGORY RI (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer.*, **15**: 321-333.
- LIPP RW, SCHNEDL WJ, HAMMER HF, KOTANKO P, LEB G, KREJS GJ (1997). Evidence of accelerated gastric emptying in longstanding diabetic patients after ingestion of a semisolid meal. *J. Nucl. Med.* **38**: 814-8.
- LO YM, ZHANG J, LEUNG TN, LAU TK, CHANG AM, HJELM NM (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*; **64**: 218–24.
- LORENZO-ALMORÓS A, HANG T, PEIRÓ C, SORIANO-GUILLÉN L, EGIDO J, TUÑÓN J, LORENZO O (2019). Predictive and diagnostic biomarkers for gestational diabetes and its associated metabolic and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Diabetol.*, **18**: 140.
- LV YH, MA JL, HENG P, ZHANG H, LI WC, XUE AM, WANG HJ, MA KJ, CHEN L (2016). RNA degradation as described by a mathematical model for postmortem interval determination. *Journal of Forensic and Legal Medicine.*, **44**: 43e5244.
- LV YH, MA JL, PAN H, ZENG Y, TAO L, ZHANG H, LI WC, MA KJ, CHEN L (2017). Estimation of the human postmortem interval using an established rat mathematical model and multi-RNA markers. *Forensic Sci Med Pathol.*, **13**: 20–27.
- LV YH, MA K, ZHANG H, HE M, ZHANG P, SHEN Y, JIANG N, MA D, CHEN L (2014). A time course study demonstrating mRNA, microRNA, 18S rRNA, and U6 snRNA changes to estimate PMI in deceased rat's spleen. *J Forensic Sci.*, **59**: 1286-1294.
- MACHADO C (2010). Diagnosis of brain death. *Neurol Int [Electronic Journal]*., **2**: 2. <https://www.pagepress.org/journals/index.php/ni/article/view/ni.2010.e2>
- MADEA B, KÄFERSTEIN H, HERMANN N, STICHT G (1994). Hypoxanthine in vitreous humor and cerebrospinal fluid—a marker of postmortem interval and prolonged (vital) hypoxia? Remarks also on hypoxanthine in SIDS. *Forensic Sci Int*; **65**: 19-31.
- MAKAROVA JA, SHKURNIKOV MU, WICKLEIN D, LANGE T, SAMATOV TR, TURCHINOVICH AA, TONEVITSKY AG (2016). Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry.*, **51**: 33–49.
- MAYES C, HOUSTON R, SEASHOLS-WILLIAMS S, LARUE B, HUGHES-STAMM S (2019). The stability and persistence of blood and semen mRNA and miRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples. *Leg. Med.*, **38**: 45–50.
- METCALF JL (2019). Estimating the postmortem interval using microbes: Knowledge gaps and a path to technology adoption. *Forensic Sci. Int. Genet.*, **38**: 211–218.

- METCALF JL, XU ZZ, BOUSLIMANI A, DORRESTEIN P, CARTER DO, KNIGHT R (2017). Microbiome tools for forensic science. *Trends Biotechnol.*, **35**: 814–823.
- MIHAILOVIC Z, ATANASIJEVIC T, POPOVIC V, MILOSEVIC MB (2014). The role of vitreous magnesium quantification in estimating the postmortem interval. *J Forensic Sci*; **59**: 775-8.
- MONTANARI E, GIORGETTI R, BUSARDÒ FP, GIORGETTI A, TAGLIABRACCI A, ALESSANDRINI F (2021). Suitability of miRNA assessment in postmortem interval estimation. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.*, **25**: 1774-1787
- MUNIATEGUI A, PEY J, PLANES JF, RUBIO A (2012). Joint analysis of miRNA and mRNA expression data. *Briefings In Bioinformatics.*, **14**: 263-278.
- NA JY (2020). Estimation of the post-mortem interval using microRNA in the bones. *J Forensic Leg Med.*, **75**: 102049.
- NAGY C, MAHEU M, LOPEZ JP, VAILLANCOURT K, CRUCEANU C, GROSS JA, ARNOVITZ M, MECHAWAR N, TURECKI G (2015). Effects of postmortem interval on biomolecule integrity in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol.*, **74**: 459-469.
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (2022a). Erişim Adresi: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406904]. Erişim Tarihi: 18/8/2022
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (2022b). Erişim Adresi: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406905]. Erişim Tarihi: 18/8/2022
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (2022c). Erişim Adresi: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406950]. Erişim Tarihi: 18/8/2022
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (2022d). Erişim Adresi: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406887]. Erişim Tarihi: 18/8/2022
- NAUMANN HN (1959). Postmortem chemistry of the vitreous body in man. *Arch Ophthalmol.*, **62**: 356-63.
- NEIS P, HILLE R, PASCHKE M, PILWAT G, SCHNABEL A, NEISS C, BRATZKE H (1999). Strontium90 for determination of time since death. *Forensic Sci. Int.* **99**: 47–51
- NELSON PT, WANG WX, RAJEEV BW (2008). MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol.*, **18**: 130–138.
- NOOR NMM, NUBLİ AHA, MOHEMAD R, BAKAR ZA (2018). Hybrid algorithm in estimating underwater postmortem interval: idepis. *J Forensic Sci & Criminal Inves.*, **9**: 555768.
- NOWAK R, BALABANOVA S (1989). Determination of calcium and magnesium in postmortem human vitreous humor as a test to ascertain the cause and time of death. *Z Rechtsmed*; **102**: 179–83.
- O'BRIEN J, HAYDER H, ZAYED Y, PENG C (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology.*, **9**: 402.
- ODRIOZOLA A, RIANCHO JA, DE LA VEGA R, AGUDO G, GARCÍA-BLANCO A, DE COS E, FERNÁNDEZ F, SAÑUDO C, ZARRABEITIA MT (2013). miRNA analysis in vitreous humor to determine the time of death: a proof- of- concept pilot study. *Int J Legal Med.*, **127**: 573-578.
- OEHMICHEN M, ZILLES K (1984). Postmortem DNA and RNA synthesis. Preliminary studies in human cadavers. *Z Rechtsmed.*, **91**: 287-94.

- ORY B, ELLISEN LW (2011). A microRNA-dependent circuit controlling p63/p73 homeostasis: p53 family cross-talk meets therapeutic opportunity. *Oncotarget.*, **2**: 259-64.
- ÖZDERİN M (2006). Ölüm. Adli Tıp Ders Notları. Erişim adresi: [http://adlitip.blogspot.com/2006/10/5-lm.html]. Erişim Tarihi: 03/08/2021
- PAUL P, CHAKRABORTY A, SARKAR D, LANGTHASA M, RAHMAN M, BARI M, SANAMACHA SINGHA RK, MALAKAR AK, CHAKRABORTY S (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol.*, **233**: 2007–2018
- PECHAL JL, CRIPPEN TL, BENBOW ML, TARONE AM, DOWD S, TOMBERLIN JK (2014). The potential use of bacterial community succession in forensics as described by high throughput metagenomic sequencing. *Int J Legal Med.*, **128**: 193–205.
- PEHLİVAN S, AVCI S, SEVER T, BAYRAM A, OĞUZKAN BALCI S (2010). Dolaşımdaki serbest dna ve önemi. *Gaziantep Tıp Dergisi.*, **16**: 75-80.
- PÉREZ-MARTÍNEZ C, PÉREZ-CÁRCELES MD, LEGAZ I, PRIETO-BONETE G, LUNA A (2017). Quantification of nitrogenous bases, DNA and collagen type I for the estimation of the postmortem interval in bone remains. *Forensic Sci Int.* **281**: 106–12.
- PEYRON PA, HIRTZ C, BACCINO E, GINESTET N, TIERS L, MARTINEZ AY, LEHMANN S, DELABY C (2021). Tau protein in cerebrospinal fluid: a novel biomarker of the time of death?. *International Journal of Legal Medicine.*, **135**: 2081–2089.
- PHILLIPS WT, SALMAN UA, MCMAHAN CA, SCHWARTZ JG (1997). Accelerated gastric emptying in hypertensive subjects. *J. Nucl. Med.*, **38**: 207-11.
- POLOZ YO, O'DAY DH (2009) Determining time of death: temperature-dependent postmortem changes in calcineurin a, MARCKS, CaMKII, and protein phosphatase 2A in mouse. *Int J Legal Med.*, **123**: 305–314.
- RANA TM (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **8**: 23–36.
- SABANCI PA, KARASU A, KARADERELER S, BARLAS O (2008). Beyin ölümü tanısı. *Sinir Sistemi Cerrahisi Derg.*, **1**: 81-85.
- SABUCEDO AJ, FURTON KG (2003). Estimation of postmortem interval using the protein marker cardiac troponin I. *Forensic Science International.*, **134**:11–16.
- SAĞLIK BAKANLIĞI ORGAN, DOKU NAKLİ VE DİYALİZ HİZMETLERİ DAİRE BAŞKANLIĞI (2014). Organ Ve Doku Alınması, Saklanması, Aşılması Ve Nakli Hakkında Kanun. Erişim adresi: [https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=2238&MevzuatTur=1&MevzuatTertip=5]. Erişim Tarihi: 03/08/2021
- SALVI S, GURIOLI G, DE GIORGI U, CONTEDECA V, TEDALDI G, CALİSTRI D, CASADIO V (2016). Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets Ther.*, **9**: 6549-59.
- SAMADDER SK, LALWANI M, PANDEY RK (2018). A study of algor mortis in relation to cause and manner of death in hospitalised/non-hospitalised cases in tropical climate of central India. *Indian Journal of Forensic and Community Medicine.*, **5**: 107-109.
- SAUKKO P, KNIGHT B (2004). Knight's Forensic Pathology. In: The pathophysiology of death, Ed.: Saukko P, Knight B, A Hodder Arnold Publication, London, p. 52-97.

- SHIVPOOJAN K (2018). Time since Death from Rigor Mortis: Forensic Prospective. *J Forensic Sci & Criminal Inves*; **9**: 555-771.
- SHKRUM MJ, RAMSAY DA (2007). Postmortem changes. *Forensic Pathology of Trauma* Ed.: Thau A, Humana Press Inc., Totowa Chapter 2.
- SOOD P, KREK A, ZAVOLAN M, MACINO G, RAJEWSKY N (2006). Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA*; **103**: 2746–51.
- SRETTABUNJONG S, THONGPHAP W, CHITTAMMA A (2020). Urea, uric acid, and creatinine in postmortem blood, vitreous humor, and synovial fluid: a comparative and correlation study. *J Forensic Sci.*, **65**: 128-133.
- STERZIK V, JUNG T, JELLINGHAUS K, BOHNERT M (2016). Estimating the postmortem interval skeletal remains. *Int J Legal Med.*, **130**: 1557–1566
- STURNER WQ (1963). The vitreous humour: Postmortem potassium changes. *Lancet.*, **281**: 807-8.
- SUZUTAIN T, ISHIBASHI H, TAKATORI T (1978). Studies on The Estimation of The Postmortem Interval, 4. Spontaneous opening and closing of the eyelids after death. *Hokkaido Igaku Zasshi.*, **53**: 1-6.
- SÜSGÜN S, KARACAN İ, YÜCESAN E (2021). Tek basamaklı ters transkripsiyon kantitatif PZR yönteminin miRNA ekspresyon analizleri için optimizasyonu. *Experimed.*; **11**: 113-119.
- ŞAHİNOĞLU GÜNEŞ T (2020). İnsan diş pulpasında görülen postmortem histolojik değişikliklerin postmortem intervalin tespiti açısından değerlendirilmesi. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, *Uzmanlık Tezi*.
- ŞENER MT, KARA Ç (2014). Adli nitelikli ölümlerin belirlenmesi ve izlenecek yol. *Genel Tıp Derg.*, **24**: 58-61.
- TAKASU S, MATSUMOTO S, KODAMA S, SAKAMOTO K, SHIMMURA S, IWADATE K (2022). Accuracy of urea nitrogen and creatinine measurements in postmortem serum and pericardial fluid compared with antemortem data. *Am J Forensic.*, **1**: 33-39.
- THOMSON JM, NEWMAN M, PARKER JS, MORIN-KENSICKI EM, WRIGHT T, HAMMON SM (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & Development.*, **20**: 2202–2207.
- TOMLIN J, BROWN N, ELLIS A, CARLSSON A, BOGENTOFT C, Read NW (1993). The effect of liquid fibre on gastric emptying in the rat and humans and the distribution of small intestinal contents in the rat. *Gut.*, **34**: 1177-81.
- TRONCON LE, BENNETT RJ, AHLUWALIA NK, THOMPSON DG (1994). Abnormal intragastric distribution of food during gastric emptying in functional dyspepsia patients. *Gut.*, **35**: 327-32.
- TROTTER SA, BRILL LB, BENNETT JP (2002). Stability of gene expression in postmortem brain revealed by cDNA gene array analysis. *Brain Res*; **942**: 120–3.
- TU C, DU T, YE X, SHAO C, LIU Z, LI L, SHEN Y (2018). Evaluating the potential of housekeeping genes, rRNAs, snRNAs, microRNAs and circRNAs as reference genes for the estimation of PMI (2018). *Forensic Science, Medicine and Pathology.*, **14**: 194–201.
- TU C, DU T, YE X, SHAO C, XIE J, SHEN Y (2019). Using miRNAs and circRNAs to estimate PMI in advanced stage. *Legal Medicine.*, **38**: 51–57.

- TUMRAM NK, BARDALE RV, DONGRE AP (2011). Postmortem analysis of synovial fluid and vitreous humour for determination of death interval: a comparative study. *Forensic Sci Int.*, **204**: 186-90.
- TURCHINOVICH A, WEIZ L, LANGHEINZ A, BURWINKEL B (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.*, **39**: 7223–7233.
- TÜİK (2020). Ölüm ve ölüm nedeni istatistikleri, 2019. Erişim adresi: [<https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710>]. Erişim Tarihi: 03/0872021
- TZIMAGIORGIS G, MICHAILIDOU EZ, KRITIS A, MARKOPOULOS AK, KOUIDOU S (2011). Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids. *Cancer Epidemiology.*, **35**: 580–589.
- URBICH C, KUEHBACHER A, DIMMELER S (2008). Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc. Res.*, **79**: 581–588.
- USUMOTO Y, HIKIJI W, SAMESHIMA N, KUDO K, TSUJI A, IKEDA N (2010). Estimation of postmortem interval based on the spectrophotometric analysis of postmortem lividity. *Leg Med.*, **12**: 19–22.
- VAN DEN BERGE M, WISKERKE D, GERRETSEN RRR, TABAK J, SIJEN T (2016). DNA and RNA profiling of excavated human remains with varying postmortem intervals. *Int J Legal Med.* **130**: 1471–80.
- VICKERS KC, PALMISANO BT, SHOUCRI BM, SHAMBUREK RD, REMALEY AT (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.*, **13**: 423–433.
- VOLIK S, ALCAIDE M, MORIN RD, COLLINS C (2016). Cell-free DNA (cfDNA): clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies. *Mol Cancer Res*; **14**: 898-908.
- WANG J, CHEN G, QIAN H, SHANG Q, XIAO J, LIANG M, GAO B, LI T, LIU X (2020). PP2A-C may be a promising candidate for postmortem interval estimation. *International Journal of Legal Medicine.*, **135**: 837–844
- WANG Y, LI J, CHEN H, MO Y, YE H, LUO Y, GUO K, MAI Z, ZHANG Y, CHEN B, ZHOU Y, YANG Z (2016). Down-regulation of miR-133a as a poor prognosticator in non-small cell lung cancer. *Gene.*, **591**: 333–337.
- WANG Y, ZHANG Y (2021). LncRNA CAIF suppresses LPS-induced inflammation and apoptosis of cardiomyocytes through regulating miR-16 demethylation. *Immun Inflamm Dis.*, **9**: 1468–1478
- WANG Z, LUO H, PAN X, LIAO M, YIPING H (2012). A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.*, **6**: 419–423.
- WATSON JW (2010). DNA Degradation as an indicator of post-mortem interval. PhD Thesis, University of North Texas
- WEATHERALL IL, COOMBS BD (1992). Skin color measurements in terms of CIELAB color space values. *J Invest Dermatol.*, **99**: 468–73.
- WEHNER F, WEHNER HD, SCHIEFFER MC, SUBKE J (1999). Delimitation of the time of death by immunohistochemical detection of insulin in pancreaticb-cells. *Forensic Sci. Int.*, **105**: 161–169

- WILLIAMS T, SONI S, WHITE J, CAN G, JAVAN GT (2015). Evaluation of DNA degradation using flow cytometry. *Am J Forensic Med Pathol.*, **36**: 104–10.
- XUE X, TEARE MD, HOLEN I, ZHU YM, WOLL PJ (2009). Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clinica Chimica Acta.*, **404**: 100–104.
- YAN Y-Y, GUO Q-R, WANG F-H, ADHIKARI R, ZHU Z-Y, ZHANG H-Y, ZHOU W-M, YU H, LI J-Q AND ZHANG J-Y (2021) Cell-Free DNA: Hope and Potential Application in Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**: 639233.
- YANG D, ZHAO D, CHEN X (2017). MiR-133b inhibits proliferation and invasion of gastric cancer cells by up-regulating FBN1 expression. *Cancer Biomark.*, **19**: 1–12.
- YANG MZ, ZHANG, LI HJ, YANG TT, DING ZJ, LIU Q (2018). Research Progress on postmortem interval estimation by vitreous humor. *Fa Yi Xue Za Zhi*; **34**(2), 165-170.
- YASOJIMA K, MCGEER EG, MCGEER PL (2001). High stability of mRNAs postmortem and protocols for their assessment by RT-PCR. *Brain Res Brain Res Protoc.*, **8**: 212–8.
- ZHOU Y, CHEN Z, CHEN A, MA J, QIAN J, GE J (2020). Elevated serum miR-133a predicts patients at risk of periprocedural myocardial injury after elective percutaneous coronary intervention. *Cardiol J.*, **14**: 194–201.
- ZHU BL, ISHIKAWA T, MICHIEUE T, TANAKA S, ZHAO D, LI D, QUAN L, ORITANI S, MAEDA H (2007). Differences in postmortem urea nitrogen, creatinine and uric acid levels between blood and pericardial fluid in acute death. *Leg Med*; **9**: 115–122.
- ZILG B, BERNARD S, ALKASS K, BERG S, DRUID H (2015). A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. *Forensic science international.*, **254**: 158-66.

EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onayı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 18/09/2019
TOPLANTI NO : 2019-17
DOSYA NO : 2019-102
KARAR NO : 2019-17-166

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN'ın yaptığı; araştırmacı olarak Duygu YAVUZ'un katıldığı "Postmortem İnterval Tayininde Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeaz Zincir Reaksiyonu İle Hücre Dışı Serbest DNA ve miRNA Analizi" başlıklı çalışmaya Kurulumuzun 04/09/2019 tarihli toplantısında alınan 2019-16-140 sayılı kararı uyarınca düzeltilmiş şekli ile yeniden değerlendirilmiş ve Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarih ve 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sığır
Hayvan Sayısı : 30
Geçerlilik Süresi : 01/01/2020-01/01/2022

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viropoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatih CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	

Ek-2. Etik Kurul Onayı devamı

Dr. Vet. Hek. Gülbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E
Uzm. Vet. Hek. Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Duygu
Soyadı : Yavuz Kılıçaslan

II- Eğitim

2016-2023: Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Kriminalistik Doktora
2013-2016: Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Adli Biyoloji Yüksek Lisans
2008-2013: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
2003-2007: 75. Yıl Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)
1995-2003: Avni Akyol İlköğretim Okulu

Yabancı Dil: İngilizce

III- Ünvanlar

2008: Biyolog
2016: Adli Biyoloji Uzmanı
2017: Öğretim Görevlisi

IV- Mesleki Deneyim

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

-Seroloji laboratuvarı stajı
-Bakteriyoloji laboratuvarı stajı
-Tüberküloz laboratuvarı stajı
-Parazitoloji laboratuvarı stajı

Gazi Üniversitesi Hastanesi

-Tüp bebek laboratuvarı stajı

Ankara Anadolu Lisesi

-Pedagojik formasyon stajı

Üsküdar Üniversitesi

1. Otopsi Yardımcılığı Öğretim Görevlisi - Program Başkanı

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Adli Bilimler Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan posterler

1. **Yavuz D**, Sen F, Dinc JN, Canturk N. Safety Blood Transfusion. *1st International Forensic Biology and Genetics Congress*. 27-28 November 2014. Poster Presentation. Book of Abstract: 51. Ankara. 21-25 August 2017.
2. **Yavuz D**, Dinc JN, Şeker K, Sağduyu U, Açıkgöz HN. How Did They Poison Me?. *1st International Congress And Workshop Of Forensic Toxicology*. Poster Presentation. Ankara. 29-30 November 2014.
3. Sengul HA, Canturk N, **Yavuz D**. Evaluation of the children for crimes against property. *21st Triennial Meeting of the International Association of Forensic Sciences*. Poster Presentation. Book of Abstract: 147. Toronto, Canada. 21-25 August 2017.
4. Emiral E, **Yavuz D**, Hancı IH, Tufan NLS. Putative role of cell free DNA and HMGB1 in postmortem interval. *Erciyes Medical Genetics Days*. Poster Presentation. Book of Abstract: 14. Kayseri. 11-13 May 2017.
5. **Yavuz D**, Ünsal T, Atasoy S. Education and training for forensic autopsy technicians in Turkey. *8th European Academy of Forensic Science*. Poster Presentation. Lyon, France. 27-31 August 2018.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan posterler

1. Yavuz D. Suçluluğun biyolojik kökenleri. Adli Bilimler Günleri. 3-5 Haziran 2016. Sivas. Poster Bildiri.
2. Yavuz D, Dinc JN. Organ bağışi ve naklinde ortaya çıkan sorunlar. 2. *Sağlık Hukuku Kongresi*. 23-25 Nisan 2015. Gaziantep. Poster Bildiri.
3. Akcay S, Yavuz D. Gıda zehirlenmelerinde adli deliller. 6. *Gıda Güvenliği Kongresi*. 3-4 Mayıs 2018. İstanbul. Poster Bildiri.
4. Yavuz D, Ünsal T, Yilancioğlu K, Atasoy S. 15. Adli genetik incelemelerde polimorfik bölge analizinde yeni yaklaşım: KASP sistemi. *Adli Bilimler Kongresi*. 12-15 Nisan 2018. Antalya. Poster Bildiri.
5. Ünsal T, Ertem Ü, Yavuz D, Tezbasan İY, Atasoy S. Üsküdar Üniversitesi'nde şiddet mağdurlarına yönelik bir kriz merkezi. *Adli Bilimler Kongresi*. 12-15 Nisan 2018. Antalya. Poster Bildiri.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler

1. **Yavuz D**, Multidisipliner Bir Yaklaşım: Adli Bilimler. 3. *Uluslararası Bilimsel Çalışmalar Kongresi*. Sözlü sunum. Antalya, Türkiye. 14-16 Ekim 2019.
2. **Yavuz D**, Cumaogullari O, Yilmaz NT, Canturk N, Oncu B, Ozdag H, Tufan NLS. Investigation of polymorphic variants of SCL6A4, Tph-1 and Tph-2 genes in completed suicide. *5th International Conference on Forensic Research and Technology*. 31 October- 2 November 2016. San Francisco, USA, Oral presentation. pp: 52

Uluslararası makaleler

1. Canturk N, Oskavi A, Canturk G, Yavuz D. Maternal death caused by uterine vein rupture in first trimester: A case report. *J Cases Obstet Gynecol*, (2017); 4(2): 49-51. ISSN: 2148-3531, Index: Directory of Research Journal Indexing (DRJI), Index Copernicus

2. Eldem I, **Yavuz D**, Cumaogulları O, Ileri T, Ince EU, Ertem M, Erdogan BD, Bindak R, Ozdag H, Şatiroglu-Tufan NL, Uysal Z. SLCO1B1 polymorphisms are associated with drug intolerance in childhood leukemia maintenance therapy. J Pediatr Hematol Oncol 2018;00:000–000.
3. Emiral E, **Kilicaslan DY**, Hanci IH, Satiroglu-Tufan NL. Role of cell free dna and HMGB-1 in postmortem interval determination. Rom J Leg Med 2021; [29] 1-7.
4. **Kilicaslan DY**, Cumaogullari O, Emiral E, Tezer N, Oncu B, Ozdag H, Canturk N, Tufan NLS, Satiroglu L. Investigation of polymorphic variants of SLC6A4, TPH-1, and TPH-2 genes in cases of completed suicide. J Mens Health 2022; 18 1-9.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeler

1. SCL6A4, TPH-1, TPH-2 genlerine ait polimorfik varyantların tamamlanmış intihar olgularında araştırılması. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Yüksek lisans tez projesi, Araştırmacı, 2015-2016.

Konferans ve seminerler

1. Hacettepe Üniversitesi, Evrim Kongresi, ANKARA
2. Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, "**Suçluluğun Biyolojik Kökenleri**" başlıklı semineri
3. Ankara Anadolu Lisesi, "**Adli Entomoloji**" semineri
4. Ankara Anadolu Lisesi, "**Kan ve Kan Transfüzyonu**" konulu ders
5. Ankara Üniversitesi, 1. Adli Psikoloji Kongresi, ANKARA
6. Ankara Üniversitesi, 2. Ulusal Felaket Kurbanlarının Kimliklendirilmesi Kongresi, ANKARA
7. Ankara Üniversitesi, Uluslararası Adli Genetik ve Biyoloji Kongresi, ANKARA
8. Ankara Üniversitesi, Uluslararası Adli Toksikoloji Kongresi, ANKARA
9. Ankara Üniversitesi, Adli Psikoloji Kongresi, AYDIN
10. 2. Sağlık Hukuku Kongresi, GAZİANTEP

11. Ayaş Adli Bilimler Sempozyumu, ANKARA
12. Anadolu Adli Bilimler Kongresi, BAYBURT
13. Tıp Hukuku Kongresi, KASTAMONU
14. Adli Bilimler Sempozyumu, Hacettepe Üniversitesi, ANKARA
15. Divriği Adli Bilimler Günleri, SİVAS
16. 21st Triennial Meeting of the International Association of Forensic Sciences, Toronto, CANADA
17. 8th European Academy of Forensic Science, Lyon, FRANCE
18. 6. Gıda Güvenliği Kongresi, İSTANBUL
19. Adli Bilimler Kongresi, ANTALYA
20. 3. Uluslararası Bilimsel Çalışmalar Kongresi, ANTALYA
21. 5th International Conference on Forensic Research and Technology, San Francisco, USA

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri

1. Adli Hemşirelik Kursu, "Cinsel Saldırılarda Biyolojik Deliller" adlı dersi verdim.
2. Turnitin Originality Check ve iThenticate'e Giriş, 16.05.2022
3. Bilimsel Araştırmanın Planlanması Ve Proje Yazma Eğitimi, 05.03.2021
4. Moleküler Genetik Uygulamalarında Çözelti Çeşitleri ve Çözelti Hazırlama Teknikleri Webinarı, 15.01.2021

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

1. Mobil Dünyada Çocuk ve Gençlerin Güvenliği Sempozyumu
2. Ankara Üniversitesi, Uluslararası Adli Toksikoloji Kongresi, ANKARA
3. Üsküdar Üniversitesi, "Suç ve Siyah Sayılar" başlıklı seminer, İSTANBUL

Diğer üyelikleri

Eğitim Programı Haricinde Kurslar

- Hacettepe Üniversitesi ileri salsa grubu
- Karadenizliler Derneği, horon kursu