TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# ÖLÜM ZAMANI TAYİNİNDE YENİ BİYOLOJİK BELİRTEÇLERİN TESPİTİ

**Emine Firdevs YILDIRIM**

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

**DANIŞMAN**
**Prof. Dr. Aslıhan AVCI**

**2016 - ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# ÖLÜM ZAMANI TAYİNİNDE YENİ BİYOLOJİK BELİRTEÇLERİN TESPİTİ

**Emine Firdevs YILDIRIM**

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

**DANIŞMANLAR**
**Prof. Dr. Aslıhan AVCI**
**2. Danışman Doç. Dr. Yeşim ER ÖZTAŞ**

**Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 15-L0-21-7002 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum ***"Ölüm Zamanı Tayininde Yeni Biyolojik Belirteçlerin Tespiti"*** 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: Emine Firdevs YILDIRIM

Tarih:…….

İmza:

2016 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü

Adli Bilimler Enstitüsü Adli Biyoloji Anabilim Dalında Emine Firdevs YILDIRIM tarafından hazırlanan "Ölüm Zamanı Tayininde Yeni Biyolojik Belirteçlerin Tespiti" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: / /2016

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

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

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER


| | Sayfa No: |
|---|---|
| **ETİK BEYAN** | **ii** |
| **KABUL VE ONAY** | **iii** |
| **İÇİNDEKİLER** | **iv** |
| **ÖNSÖZ** | **vi** |
| **SİMGELER ve KISALTMALAR** | **viii** |
| **ŞEKİLLER** | **x** |
| **ÇİZELGELER** | **xii** |
| **1. GİRİŞ** | **1** |
| 1.1. Genel Bilgiler | 1 |
| 1.1.1. Adli Otopsi | 1 |
| 1.1.2. Ölüm Zamanı | 2 |
| 1.1.3. Ölüm ve Ölüm Sonrası Değişiklikler | 3 |
| 1.1.4. Soğuma (Algor Mortis) | 3 |
| 1.1.5. Ölü Lekeleri (Livor Mortis) | 4 |
| 1.1.6. Ölü Sertliği (Rigor Mortis) | 4 |
| 1.1.7. Çürüme (Pütrefaksiyon) | 4 |
| 1.1.8. Göz İçi Sıvının Analizi | 5 |
| 1.1.9. DNA Degredasyonu | 5 |
| 1.1.10. Mide İçeriğinin Analizi | 6 |
| 1.2. Hücre Ölümü | 7 |
| 1.2.1. Nekroz | 7 |
| 1.2.2. Apoptoz | 8 |
| 1.2.2.1. Apoptoz Düzenleyicileri | 9 |
| 1.2.2.1.1. Kalsiyum | 9 |
| 1.2.2.1.2. Seramid | 10 |
| 1.2.2.1.3. P53 | 10 |
| 1.2.2.1.4. Sitokrom-C | 11 |
| 1.2.2.1.5. Kaspazlar (Sistein Aspartat Spesifik Proteazlar) | 11 |
| 1.2.2.1.6. Bcl-2 Ailesi | 13 |
| 1.2.2.1.6.1. Pro-Apoptotik Üyeler | 13 |
| 1.2.2.1.7. Anti-Apoptotik Üyeler | 14 |

1.2.2.2. İçsel Yolak 14
1.2.2.3. Dışsal Yolak 15
1.2.3. Otofaji 17
1.2.4. ER Stresi 19
**2. GEREÇ ve YÖNTEM 23**
2.1. Çalışma Grubunun Özellikleri 23
2.2. Örneklerin Toplanması 23
2.3. Protein İzolasyonu 24
2.3.1. Homojenizasyon 24
2.3.2. Protein Kaynatma 25
2.3.3. Western Blot 26
2.3.3.1. Jelin Hazırlanması ve Proteinlerin Yürütülmesi 27
2.3.3.2. Transfer 28
2.3.3.3. Bloklama 29
2.3.3.4. Antikor ile Muamele 29
2.3.3.5. Görüntüleme 30
2.3.3.6. Hesaplama 30
**3. BULGULAR 31**
3.1. Bcl-2 Western Blot Bulguları 31
3.2. Bax Western Blot Bulguları 32
3.3. Beclin-1 Western Blot Bulguları 33
3.4. Perk Western Blot Bulguları 33
3.5. Grp78 Western Blot Bulguları 34
3.6. İstatistiksel Analiz 35
3.6.1. Genel Grup Değerlendirmesi ve İstatistiksel Analiz Sonuçları 35
3.6.2. Kategorilerin Değerlendirmesi ve İstatistiksel Analiz Sonuçları 41
**4. TARTIŞMA 52**
**5. SONUÇ ve ÖNERİLER 59**
**ÖZET 62**
**SUMMARY 63**
**KAYNAKÇA 64**
**EKLER 70**
**ÖZGEÇMİŞ 72**

# ÖNSÖZ

Adli bilimler adli vakaların çözülmesine ve adaletin tesis edilmesine hizmet eden disiplinlerarası bir alandır ve tüm adli vakaların çözümü için ortak sorulardan biri olan "Ne Zaman" sorusunun cevabı aranır. Bu noktada soru ne zaman konu da ölüm olduğunda ölüm zamanının tespiti adli vakanın çözülmesinde ehemmiyet arz eder. Bu çalışmada ölüm zamanın tespiti için biyolojik olaylardan apoptoz, otofaji ve ER stres belirteçlerinin ifadesi ile zamana bağlı değişimleri, belirteçler arası ilişki araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasının başarıyla gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen, her adımda zengin akademik birikimiyle yol gösteren danışmanım Ankara Üniversitesi Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Aslıhan AVCI'ya,

Yüksek lisans eğitimi boyunca çalışma disiplininden yararlandığım, adli bilimler camiası ile tanışmamı sağlayan ve her zaman destek veren Sayın Prof. Dr. Hamit HANCI'ya,

Çalışmanın yürütülmesi için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarının kapısını açan, çalışmanın sorunsuz gerçekleşmesine akademik tecrübeleriyle destek veren Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na,

Tez için gerekli örneklerin toplanmasında sağladıkları destekten dolayı Sayın Dr. Sultan PEHLİVAN'a ve Sayın Uz. Dr. İrfan KORKUSUZ'a

Laboratuvar çalışmalarındaki destekleri ile kıymetli bilgi ve deneyimlerini paylaştığı için Sayın Dr. Yunus YÜKSELTEN'e,

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren engin bilgi ve deneyimleriyle destek veren ve katkı sağlayan isimlerini tek tek yazamadığım tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme,

En içten duygularımla teşekkür ederim.

# SİMGELER ve KISALTMALAR

| | | |
|---|---|---|
| % | : | Yüzde |
| °C | : | Santigrat derece |
| AİF | : | Apoptosis İndükleyici Faktör |
| APAF-1 | : | Apoptotik Peptidaz Aktive Edici Faktör-1 |
| ATF4 | : | Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4 |
| ATF6 | : | Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 |
| Atg | : | Otofaji İle Bağlantılı Genler |
| ATP | : | Adenozin Trifosfat |
| CHOP | : | Apoptoz Aktivatör Protein |
| CSF | : | Koloni Uyarıcı Faktörler |
| DISC | : | Ölüm Tetikleyici Sinyal Kompleksi |
| Dk | : | Dakika |
| DNA | : | Deoksi Ribonükleik Asit |
| EDEM | : | ER Degredasyon Arttırıcı 1,2 Mannozidaz Benzeri Protein |
| eIF2α | : | Translasyon Başlangıç Faktörü |
| ENDO-G | : | Endonükleaz G |
| ER | : | Endoplazmik Retikulum |
| ERAD | : | ER- İlişkili Degredasyon |
| ERp57 | : | Endoplazmik Retikulumda Yerleşik Protein 57 |
| Grp78 | : | Glikoz İlişkili Protein |
| IGF | : | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri |
| InsP3 | : | İnositol Trifosfat |
| IRE1 | : | İnozitol Gerektiren Kinaz 1 |
| JNK | : | C-Jun-N-Terminal Kinaz |

| | | |
|---|---|---|
| mg | : | Miligram |
| ml | : | Mililitre |
| NCCD | : | Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesi |
| NGF | : | Nöron Büyüme Faktörü |
| P53 | : | Tümör Protein 53 |
| PERK | : | Protein Kinaz RNA Benzeri ER Kinaz |
| PTEN | : | Fosfataz Ve Tensin Homoloğu |
| RNA | : | Ribonükleik Asit |
| ROS | : | Reaktif Oksijen Türleri |
| S1P | : | Konum-1 Proteaz |
| S2P | : | Konum-2 Proteaz |
| Sa | : | Saat |
| TNF | : | Tümör Nekroz Faktörleri |
| TNFR | : | Tümör Nekroz Faktör Reseptörü |
| TP | : | Tümör Protein |
| UGGT | : | Üridin difosfat glikoz-glikoprotein glikoziltransferaz |
| UPR | : | Katlanmamış Protein Cevabı |
| XBP-1 | : | X-Box Bağlayıcı Protein |

# ŞEKİLLER


**Sayfa No:**

**Şekil 1.1.** Apoptoz Düzenleyicileri 11

**Şekil 1.2.** Kaspaz Aracılığı ile Apoptoz Yolları 12

**Şekil 1.3.** Apoptoz İçsel Yolak 15

**Şekil 1.4.** Apoptoz Dışsal Yolak (a- Fas/Fas-L yolu, b- Granzim-perforin sistemi (www.bio.davidson.edu, 2015), c-Granzim B) 16

**Şekil 1.5.** Apoptoz Yolakları ve Basamakları 17

**Şekil 1.6.** Otofaji Çeşitleri 18

**Şekil 1.7.** Protein Katlanması 20

**Şekil 1.8.** UPR Yolakları ve ERAD Sistemi 22

**Şekil 2.1.** a. Well Plate Yerleşimi b. Standart Eğri Grafiği c. Absorbans Denklemi 26

**Şekil 2.2.** Western Blot Deney Düzeneği 27

**Şekil 2.3.** Membran Aktifleştirme ve Transfer İşlemi 28

**Şekil 2.4.** Bloklama, Antikor Bağlanması ve Işıma 29

**Şekil 2.5.** Kemiluminesans Görüntüleme Reaksiyonu 30

**Şekil 3.1.** Bcl-2 Western Blot Sonuçları 32

**Şekil 3.2.** Bax Western Blot Sonuçları 32

**Şekil 3.3.** Beclin-1 Western Blot Sonuçları 33

**Şekil 3.4.** Perk Western Blot Sonuçları 34

**Şekil 3.5.** Grp78 Western Blot Sonuçları 34

**Şekil 3.6.** Genel Grup Belirteç - 2. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi 36

**Şekil 3.7.** Genel Grup Belirteç - 3. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi 36

**Şekil 3.8.** Genel Grup Belirteç - Zaman Karşılaştırmalı Yoğunluk Kat İlişkisi 37

**Şekil 3.9.** Hastanede Yatanlar Grubu Belirteç - 2. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi 43

**Şekil 3.10.** Hastanede Yatanlar Grubu Belirteç - 3. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi 43

**Şekil 3.11.** Hastanede Yatanlar Grubu Belirteç - Zaman Karşılaştırmalı Yoğunluk Kat İlişkisi 44

**Şekil 3.12.** Ani Ölüm-1 Grubu Belirteç - 2. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi 46

**Şekil 3.13.** Ani Ölüm-1 Grubu Belirteç - 3. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi 46

**Şekil 3.14.** Ani Ölüm-1 Grubu Belirteç - Zaman Karşılaştırmalı Yoğunluk Kat İlişkisi 47

**Şekil 3.15.** Ani Ölüm-2 Grubu Belirteç - 2. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi 49

**Şekil 3.16.** Ani Ölüm-2 Grubu Belirteç - 2. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi 49

**Şekil 3.17.** Ani Ölüm-2 Grubu Belirteç - Zaman Karşılaştırmalı Yoğunluk Kat İlişkisi 50

**Şekil 4.1.** Genel Grup Zamana Bağlı Bcl-2 ve Bax/Bcl-2 İfadesi Kat Artışı (Kruskal Wallis Testi) 54

**Şekil 4.2.** Genel Grup Zamana Bağlı Perk ve Grp78 İfadesi Kat Artışı (T-Testi) 55

**Şekil 4.3.** Kontrol Grubunda Belirteçler Arası Korelasyon İlişkisi 56

**Şekil 4.4.** Zaman Aralıklarına Göre Belirteçler Arası Korelasyon İlişkisi 57

# ÇİZELGELER


| | | Sayfa No: |
|---|---|---|
| **Çizelge 1.1.** | Kaspaz Grupları | 12 |
| **Çizelge 1.2.** | Bcl-2 Ailesi Üyeleri | 13 |
| **Çizelge 2.1.** | SDS-PAGE Hazırlanması | 28 |
| **Çizelge 3.1.** | Zaman Aralıkları | 35 |
| **Çizelge 3.2.** | Analiz Kategorileri ve Özellikleri | 35 |
| **Çizelge 3.3.** | Genel Grup Değerlendirmesi | 37 |
| **Çizelge 3.4.** | Genel Grup Kruskal-Wallis Test Sonucu | 38 |
| **Çizelge 3.5.** | Genel Grubun Zaman Aralıklarına Göre Bcl-2 ve Bax/Bcl-2 Sonuçları | 38 |
| **Çizelge 3.6.** | Kontrol Grubunun Belirteçler Arası Korelasyon Sonuçları | 39 |
| **Çizelge 3.7.** | Örneklerin 2. Zaman Aralığında Belirteçler Arası Korelasyon Sonuçları | 39 |
| **Çizelge 3.8.** | Örneklerin 3. Zaman Aralığında Belirteçler Arası Korelasyon Sonuçları | 40 |
| **Çizelge 3.9.** | Belirteçlere Ait T-Test Genel Bilgileri | 40 |
| **Çizelge 3.10.** | Belirteçlere Ait T-Testi Sonuçları | 41 |
| **Çizelge 3.11.** | Kategorilerin Zamana Göre Mann-Withney Testi Sonuçları | 42 |
| **Çizelge 3.12.** | Hastane Yatış Öyküsü Bulunan Vakalara Ait T-Testi Genel Bilgileri | 44 |
| **Çizelge 3.13.** | Hastane Yatış Öyküsü Bulunan Vakalara Ait T-Testi Sonuçları | 45 |
| **Çizelge 3.14.** | Ani Ölüm-1 Vakalarına Ait T-Testi Genel Bilgileri | 47 |
| **Çizelge 3.15.** | Ani Ölüm-1 Vakalarına Ait T-Testi Sonuçları | 48 |
| **Çizelge 3.16.** | Ani Ölüm-2 Vakalarına Ait T-Testi Genel Bilgileri | 50 |
| **Çizelge 3.17.** | Ani Ölüm-2 Vakalarına Ait T-Testi Sonuçları | 51 |
| **Çizelge 4.1.** | 2005-2016 Yılları Arasında Adli Bilimler ve Ölüm Zamanı Konularında Yapılan Yayın Sayısı | 52 |
| **Çizelge 5.1.** | Ölüm Zamanı Tayininde Kullanılabilecek Belirteçler | 60 |

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Genel Bilgiler

Türkiye İstatistik Kurumu 2014 yılı ölüm istatistiklerine göre ülkemizde ortalama 1069 kişi/gün kaza, cinayet, intihar, ölümcül hastalıklar, ileri yaşa bağlı sağlık problemleri veya nedeni bilinmeksizin hayatını kaybediyor. Ölüm, ölümcül hastalığa ve ileri yaşa bağlı nispeten beklenen ölüm ile beklenmedik ölüm olmak üzere iki temel kategoride ele alınabilir. Takip edilecek tıbbi ve hukuku işlemler kategorileri dayalı olarak belirlenir.

Beklenmedik ve ani gelişen ölüm sebebinin ve zamanının belirlenmesi için latince kendi gözü ile görmek anlamına gelen otopsi yapılır. Adli otopsi, adli merciler tarafından adaletin sağlanmasında delil olarak kullanılan, usul ve esaslarının Ceza Muhakemeleri Kanununun 86-88 maddelerince belirlendiği Cumhuriyet Savcısı huzurunda ceset üzerinde hekim /hekimler tarafından yapılan tıbbi bir müdahaledir.

Bu çalışmanın amacı hekimler tarafından makroskopik yöntemlerle tayin edilen geniş ölüm zamanı aralığının daraltılması için hücre düzeyinde apoptoz, otofaji ve endoplazmik retikulum stres belirteçlerinin ölüm zamanına bağlı değişimini araştırmak ve bulgularımızı adli bilimler hizmetine sunmaktır.

### 1.1.1. Adli Otopsi

Ülkemizde ilk adli otopsi 1841-43 yıllarında yapılmıştır. Dünya'da adli otopsi tarihi 13.yy dek uzanmakta olmasına karşın bugün tanımlanan otopsinin tam teşekküllü olmasa da kısmı olarak ölüm sebebini araştırmak amacıyla dönemin hekimleri tarafından 13.yy'dan evvel de yapıldığına dair belgeler bulunmaktadır (Öztürel, 1979).

Adli otopsi, ölümle sonuçlanan bir olayın araştırılması ve aydınlatılması için adli bilimlerin diğer dallarıyla birlikte olay mekanizmasının çözümlenmesinde önemli role sahip tıbbi bir basamaktır ve sonucunda diğer adli bilim dallarına ışık tutacak veya doğrulayacak veriler sağlar. Adli otopsinin temel amaçları; kimliklendirme, postmortem bulguların saptanması, ölüm sebebinin ve zamanın belirlenmesidir (Hancı, 2002).

### 1.1.2. Ölüm Zamanı

İnsanoğlu için yaşarken servet kadar değerli olan zaman, yaşamın sona ermesi ile ehemmiyetini ölen kişi açısından olmasa da ölümünü araştıran kişiler için korur. Adli olsun olmasın herhangi bir olayın incelenmesinde bir gazetecilik terimi olan 5N1K (Ne? Ne zaman? Nerede? Nasıl? Neden? Kim?) soruları sorulur.

Ölüm zamanı, ölümün sebebi kadar önemlidir çünkü ölüm zamanın tespit edebilmesi, olaya göre değişkenlik göstermekle beraber olayın nerede, nasıl, neden ve kim tarafından gerçekleştirildiğine ilişkin bilgiler sağlayabilir. Öte yandan zaman tespitinin hızı adli işleyişinde hızını etkileyeceği için adaletin sağlanmasında zaman kaybının önlenmesine, araştırmada kullanılacak iş gücünün ve finansal kaynağın etkin kullanımına imkân sağlar.

Bugün kullanılan yöntemler ile nokta atışı ölüm zamanını belirlemek mümkün değildir ve işte bu sebeplerle literatürde ölüm zamanı yerine ölüm zaman aralığı ifadesi kullanılmaktadır. Kesin ölüm zamanı ancak hastane ortamında veya gözetim altında ölen kişiler için söylenebilir (Koç & Can, 2011).

Ölüm zaman aralığının tespiti ilk olarak ölü muayenesi aşamasında postmortem fiziksel değişiklikler doğrultusunda yapılırken detaylı incelemeler otopsi ve otopsi materyallerinin analizi ile yapılmaktadır.

### 1.1.3. Ölüm ve Ölüm Sonrası Değişiklikler

Ölüm, tüm canlılar için yaşamsal faaliyetlerin geriye dönüşümsüz olarak kaybıdır. Ölüm, somatik ölüm ve hücresel ölüm olmak üzere aşamalı olarak gerçekleşen ve eş zamanlı olmayan bir olaydır. Solunumun ve dolaşımın durması ile kontrol merkezlerinin yer aldığı beyin sapının geriye dönüşümsüz olarak hasar görmesiyle temel vücut fonksiyonlarının kaybı kısaca beyin ölümünün gerçekleşmesi somatik ölümdür (Hancı, 2002). Şüphesiz solunumun ve dolaşımın sonlanması hücre, doku ve organların da canlılık faaliyetlerinin devamlılığını etkiler ancak bu etki süreci zaman alır, ani gerçekleşmez ve işte bu sebeple somatik ölümünden sonra hücresel canlılık bir süre daha devam eder. Somatik ölümü müteakip olarak hücresel canlılığın süresi hücre ve dokulara göre değişkenlik göstermektir. Örneğin nöronlar için bu süre 3-4 dk iken böbrek ve prostat hücrelerinde 6-8 saat kadar doğal olarak sürebilirken kadavradan organ nakli yapılacaksa bu süre tıbbi destek ile 24-36 saate dek uzatılabilmektedir (Guibert & ark, 2011).

### 1.1.4. Soğuma (Algor Mortis)

Sağlıklı bir kişinin vücut ısısı 36°C – 37°C kabul edilir. Ayrıca vücut ısısının günlük bir ritmi vardır ve bu ritim göz önüne alındığında günün farklı saatlerinde yer yer 0,5-1°C'ye varan ısı farklılıkları görülür. Ölümle kişinin vücut ısısı bulunduğu ortam koşullarına, sağlık durumuna, üzerinde bulunan kıyafete ve daha birçok etkene bağlı olarak değişiklik gösterir. Vücut ısısını etkileyen bir hastalığa bağlı olmaksızın ölen bir kişinin vücut ısısı termodinamiğin 2. yasası olan ısı transferi gereğince bulunduğu ortam ısısı ile dengelenir. Vücut yüzeyinde ısı kaybı iç organlara nispeten daha hızlı gerçekleşir ve bu sebeple ölüm zamanının tespitinde vücudun ne kadar ısı kaybettiği / soğuduğunu hesaplanırken rektal ısı veya iç organ ısısı temel alınır. Cesedin 1-2°C/saat ısı kaybettiği yapılan araştırmalar doğrultusunda varsayılmaktadır (Hancı, 2002).

### 1.1.5. Ölü Lekeleri (Livor Mortis)

Ölü lekeleri, yer çekimine bağlı olarak, kanın akışkan olduğu süre içerisinde cesedin bulunduğu pozisyona göre bası görmeyen alt kısımlarında kalan kılcal damarlar ile toplardamarların akışkan kan ile dolması sonucu oluşur (Hancı, 2002). Ölü lekesi oluşum saati diğer ölüm sonrası değişikliklerde olduğu gibi kesin ifadesi mümkün olmayan bir husustur. Literatür bilgileri doğrultusunda yaklaşık ilk 3-6 saat içinde oluşan ölü lekelerinin zaman ilerledikçe renginde koyulaşma görülür. Ölü lekelerinin zaman tayininde ziyade cesedin pozisyonunu belirlemede önemli bir ipucu olduğu belirtilmektedir (Erkol, 1994).

### 1.1.6. Ölü Sertliği (Rigor Mortis)

Ölü sertliği ölen kişinin yaşına, vücut yapısına, ölüm sebebine, bulunduğu ortam sıcaklığına ve koşullarına bağlı olarak ölümü takiben 3-4 saat içinde başlayan ve 12. saatte son raddeye ulaşan kaslarda oluşan sertleşme / katılaşmadır. Sertleşme rotası alt çeneden başlayıp boyun, omuz, kol ve gövde doğrultusunda alt ekstremitelere doğru gelişir. Yapılan araştırmalarda ölü sertliğinin ölü sıkışması, sıcak ve soğuk sertliği ile karıştırılabileceği ayrıca cesedin biyolojik ve fiziksel özellikleri ile bulunduğu ortam özelliklerine bağlı olarak yukarıda verilen zaman aralıklarından önce veya sonra gelişebileceği vurgulanmaktadır.

### 1.1.7. Çürüme (Pütrefaksiyon)

Vücudun canlılık faaliyetlerinin devamlılığında rol alan mikroorganizmalar kişinin ölümüyle birlikte cesette varlıklarını korumanın ötesinde sayıca artış gösterir ve kokuşma ortamını hazırlar. Kokuşmaya başlayan cesede böceklerin gelmesiyle birlikte çürüme hız kazanır. Ölümün en son görülen değişimi çürüme; yumuşak doku bütünlüğünün bozulmasına ve uzun vadede cesedin yumuşak dokularının çürümesiyle iskeletleşmesine neden olur. Çürümenin başlama zamanı ortam

sıcaklığı, çevresel faktörler ve cesedin özelliklerine bağlı olarak 24-72 saatlik zaman diliminde görülmeye başlar.

### 1.1.8. Göz İçi Sıvının Analizi

Göz, korunaklı yapısı dolayısıyla ölüm sonra değişikliklerden ve kontaminasyondan en az etkilenen organdır. Göz sıvısı analiz sonuçları, kan analiz sonuçları ile senkron olması sebebiyle güvenilir bir parametredir. Gözün lens ve retinası arasındaki kısımda yer alan yaklaşık 4 ml olan vitröz sıvı, ilk kez 1963 yılında Sturner tarafından ölüm zamanı tayinde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir formül ile literatürde yer almaktadır (Mulla, 2005). Ölüm ile birlikte hücre zarında aşamalı olarak meydana gelen bozulma ve hücre iyon pompasının işlevini yerine getirememesine bağlı olarak potasyum, sodyum, magnezyum ve kalsiyum serbest kalır. Yapılan araştırmalar sonucunda ölüm sonrası sodyum/potasyum, magnezyum, amonyok, üre, kreatin, ürik asit miktarlarının değiştiği tespit edilmiştir. Ancak elde edilen bu değerlerdeki değişiminin tek başına güvenilir olmadığı, diğer biyokimyasal parametreler ile desteklenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Ahi & ark, 2011).

### 1.1.9. DNA Degredasyonu

Avery ve ark tarafından 1944 yılında yapılan çalışma ile DNA'nın genetik materyal olduğunu keşfedildi (Avery & ark, 1944). Bu çalışmayı; tekrar tekrar doğrulayan, DNA'nın özelliklerini, yapısını en ince ayrıntısına kadar gün yüzüne çıkaran araştırmalar hız kesmeden devam etmiştir ve etmektedir. 1985 yılında DNA adli bilimler alanında da kullanılmaya başlanmıştır. DNA analizine başvurulan adli inceleme sayısı her geçen gün artmakta ve elde edilen veriler adalete hizmet etmektedir. Öyle ki, günümüzde adli DNA incelemeleri bir rutin haline gelmiştir. Sadece cesedin kimliklendirilmesinde değil, ölüm zamanının tayininde de kullanılabilecek sonuçlar vaat etmektedir. Ölüm ile azalarak sonlanan hücresel faaliyet organizmanın sahip olduğu özellikleri belirleyen DNA'yı olumsuz yönle

etkiler. Postmortem süreçte katabolik enzimlerin etkisiyle beklenmedik hidroliz / oksidasyon meydana gelir ve DNA yapısında ki biyokimyasal bağlar zarar görür. Normal şartlarda DNA tamirinde ve gen regülasyonunda görevli nükleik asitleri kısmen/tamamen, kesen/parçalayan nükleazlar yardımıyla DNA zincirinde kırılmalar meydana gelir. Sonuçta ölümü takiben meydana gelen biyokimyasal faaliyetler DNA degredasyonuna neden olur. DNA degredasyon hızı ve başlama zamanı organlarda farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda; rat akciğer hücre DNA'sı 3. saatte ve karaciğer hücre DNA'sı 6. saatte, beyin hücre DNA'sı 24. saatte degrade olmaya başlamaktadır (El Harouny & ark, 2009). Oda sıcaklığında ki, postmortem insan beyin hücrelerinde DNA degredasyonun 24 saat içinde dalak ve karaciğer hücre DNA'larına göre daha önce başladığı bildirilmiştir (Tatlıcı, 2003). Ayrıca, karaciğer ve böbrek gibi organ dokularının enzimatik olarak diğer dokulara nazaran daha aktif olmaya yatkınlıkları sebebiyle DNA degredasyonun daha hızlı gerçekleştiği düşünülmektedir (Johnson & Ferris, 2002). Bu sonuçlarda gösteriyor ki; DNA degredasyon hızı sıcaklık gibi çevresel etkilerden etkilenmekte olup, doku ve organ bazında farklılıklar göstermesi sebebiyle tek başına güvenilir sonuç verememektedir.

### 1.1.10. Mide İçeriğinin Analizi

Mide içeriğinin analizi adli bir ölüm olayının araştırılmasında; kişinin tükettiği gıda türünün varsa kişisel hastalıklarına bağlı diyete uygun olup olmadığına, alerjik yapısına, düzenli olsun/olmasın kullandığı ilaca, aynı anda tükettiği gıdaların kimyasal etkileşim içinde olup olmadığına, alkol/narkotik madde ihtiva edip etmediğine, gıda zehirlenmesi/toksikolojik bir etki olup olmadığına ve sindirim durumuna bağlı olarak ölüm zamanına ilişkin bilgiler sağlar (Cox, 2009). Gıdanın yutulup mideye ulaşması 10dk, hafif gıdaların sindirimi 30dk- 2 saat, orta ağırlıkta gıda sindirimi 3-4 saat, ağır gıdaların sindirimi 4-6 saat ve sıvı gıda sindiriminin 2 saat kadar sürdüğüne ilişkin ortalama süreler hesaplanmış olsa da bu süreleri etkileyen gıdanın içeriği, pişirilme şekli ve iyi çiğnenmiş olup olmaması gibi pek çok etken mevcuttur (Kalın, 2014). İşte bu dış etkenler düşünüldüğünde mide içeriğinin

analizi ölüm zaman tayininde tek başına güvenilir sonuçlar sağlamak için yeterli değildir.

Bugün uygulamada geri plana düşen popülaritesini güvenilirlik, maliyet, iş yükü ve zaman gibi sebeplere bağlı olarak kaybetmiş ölüm zaman tayini için araştırılan; kan pH analizi, kanın donma derecesinin analizi, kan pıhtılaşma durumu, kan şekeri analizi, sakal-bıyık ve vücut kıl uzunluğu hesabı, tırnak uzunluğu hesabı gibi pek çok parametre bulunmaktadır.

## 1.2. Hücre Ölümü

Canlılık özelliği taşıyan, yapı ve görev bakımından canlının en küçük birimi olan hücre; büyür, gelişir, çoğalır ve bir dizi bölünme - çoğalma sürecini takiben ölür. Ölüm hücrenin, hücre içinden veya dışından gelen bilgilere verdiği cevaplardan sadece birisidir. Hücrenin verdiği cevapların daha iyi anlaşılabilmesi için hücre ölümü de eş zamanlı çalışılmalıdır (Choi & ark, 2015). Hücre ölümü; en yalın haliyle plazma membranının bütünlüğünü geriye dönüşümsüz olarak kaybetmesi olarak tanımlanabilir. Memelilerde hücre ölüm çeşitleri üç temel sınıfta incelenir; nekroz, apoptoz ve otofaji. Bununla birlikte NCCD tarafından tanımlanmış ve literatüre girmiş diğer ölüm mekanizmaları başlığı altında temel hücre ölüm çeşitlerinden herhangi birisine tam olarak dâhil olamayan hücre ölüm çeşitleri vardır ve komite tarafından araştırmalar doğrultusunda yeni öneriler de sunulmaktadır (Kroemer & ark, 2009).

### 1.2.1. Nekroz

Nekroz, ölü vücut ve ceset anlamına gelen Yunanca νεκρός kelimesinden türemiştir. Ayrıca yine aynı kökten türeyen nekrozis kelimesi ise ölüm durumunu açıklamak üzere kullanılmaktadır. Nekroz, hücrenin hasar yolu ile ölümü olarak kabul edilmesine binaen uzun yıllar ani gelişen düzensiz ve kontrol edilemez bir cevap

olarak programsız hücre ölümü sınıfında değerlendirilmiştir. Nekroz üzerine yapılan güncel çalışmalar nekrozun programlı, genetik, sinyal iletim yolakları ve katabolik mekanizmalar ile düzenlenebilen bir süreç olduğunu bildirmektedir (Hitomi & ark, 2008; Golstein & Kroemer, 2007 ve Festjens & ark, 2006).

Nekrozu tetikleyen dış faktörler; mekanik hasar, oksijen yokluğu, toksik madde etkisi iken iç faktörler; ATP noksanlığı, kalsiyum homeostazının kaybı ve serbest sitozolik kalsiyum, serbest radikaller, hasarlı zar geçirgenliği, mitokondriyal hasar ve sitoskeleton hasardır. Kısaca; fiziksel ve kimyasal uyaranlar hücrenin iyon dengesini bozar ve iç faktörler arasında da saydığımız ATP noksanlığına ve iyon pompası yetersizliğine yol açar; sonuçta hücre sıvı alır, organeller şişer, plazma membran bütünlüğü bozulur ve osmotik basınç sonucu hücre patlar. Hücre ölümünü müteakip olarak hücre içeriği, hücreler arası boşluğa salınarak nekrozun en önemli ve karakteristik özelliği olan inflamasyona sebep olur.

### 1.2.2. Apoptoz

Apoptoz, Yunanca'da ağaçların yapraklarını dökmesi anlamında kullanılan apoptōsis kelimesinden türemiştir. İlk kez 1972 yılında Kerr ve ark tarafından tip 1 programlı hücre ölümünü adıyla kullanılmıştır (Kerr & ark, 1972). Hücre intiharı olarak da adlandırılan apoptoz genlerle düzenlenen, RNA ve protein sentezi ile enerjiye ihtiyaç duyan ve genel olarak organizmada homeostazı koruyan hücre ölüm tipidir.

Apoptozun gerçekleşmesi yaşamın farklı evrelerinde, farklı koşullar altında ve farklı amaçlar içindir. Embriyonik dönemde apoptoz; fetusun parmakları arasındaki perdenin kaldırılması, göz kapakları arasındaki boşluğun şekillenmesi ve fetusun sinaptik ağ oluşumu gibi gelişim sürecinde organizasyonun tamamlanması için gerçekleşir. Postnatal dönemde apoptoz; kadınlarda menstrual döngüde endometriyal hücrelerin yıkımında, kemik iliğinde kan üretiminin dengede tutulmasında, bağışıklık sistemi homeostazında kritik rol alır (Su & Lenardo, 2008). Patolojik durumlarda apoptoz; virüs ile enfekte hücrelerin, DNA hasarı olan

hücrelerin ve kanser hücrelerinin organizmayı korumak için uzaklaştırılmasında gereklidir. Mitoz bölünme ile artan hücre sayısının organizmaya doğuracağı yan etkileri ortadan kaldırmak için apoptoz büyük öneme sahiptir. Çünkü insan vücudunda her saniye yüzlerce hücre mitoz ile artarken, apoptoz ile azalır ve böylece denge sağlanır. Bu dengenin sağlanamaması başta nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere kanser ve otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

Apoptoz sinyali bilinen 2 yol ile tetiklenir; içsel yolak (mitokondriyal sinyal yolağı), dışsal yolak (ölüm reseptör aracılı sinyal yolağı). Hücre içinde oluşturulan sinyaller ile tetiklenmesinde içsel yolak; hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri tarafından tetiklendiğinde ise dışsal yolak kullanılır.

#### 1.2.2.1. Apoptoz Düzenleyicileri

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, p53, sitokrom-c, kaspazlar ve Bcl-2 ailesi rol alır.

##### 1.2.2.1.1. Kalsiyum

Kalsiyum vücutta en çok bulanan, hücresel faaliyetlerde düzenleyici olarak rol alan, granülsüz endoplazmik retikulumda depolanan, kasın yapısında bulanan ve kasılmasını sağlayan, hücre içi mesajcı olarak adlandırılan bir mineraldir. Hücrede kalsiyum dengesi kritik öneme sahiptir çünkü hücre dışında, hücre içine oranla yaklaşık 10 000 kat fazla kalsiyum bulunur (Anderson & Garner, 1996).

Hücreye ihtiyacın üzerinde kalsiyum akını, kalsiyum kanalı ve hücre ölüm reseptörleri aracılığı ile hücre içine iletilir. Bu durum mitokondri zar geçirgenliğini değiştirir ve mitokondriden sitokrom-c salınır. Mitokondriden salınan sitokrom-c endoplazmik retikulumda InsP3 reseptörüne bağlanır, bu sayede ER'daki depodan daha fazla kalsiyum sitoplazmaya salınır. Sitoplazmada artan kalsiyum miktarı mitokondriden

sitokrom-c salınımı da artırır. Sonuç olarak apoptozom oluşumu için gerekli koşullar oluşmuş hücre apoptoz yoluna girmiş olur (Mattson & Sic, 2003) (Şekil 1.1).

#### 1.2.2.1.2. Seramid

Seramid, hücre zarının yapısında bulanan, ER'da sentezlenen bir lipid ailesidir. Membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonu ile seramid açığa çıkar, bu durum hücre zarı hasarına bir cevap olarak gelişir çünkü radyasyon ve ölüm reseptörleri gibi sinyaller ile aktive olan sfingomyelinaz, hücre zarında bulunan sfingomyelini seramid'e dönüştürür ve hücrede birikimine neden olur (Taha & ark, 2006). Seramid, birden fazla farklı yol ile apoptoza sebep olur; seramidaz ile sfingozine dönüşen formu Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyesi Bid yapımını arttırarak ve seramid ile p53, pro-apoptotic Bcl-2 ailesi üyesi olan Bax ifadesini artırıp mitokondriden sitoplazmaya sitokrom-c salınımını sağlayarak hücreyi apoptoza sürükler (Woodcock, 2006) (Şekil 1.1).

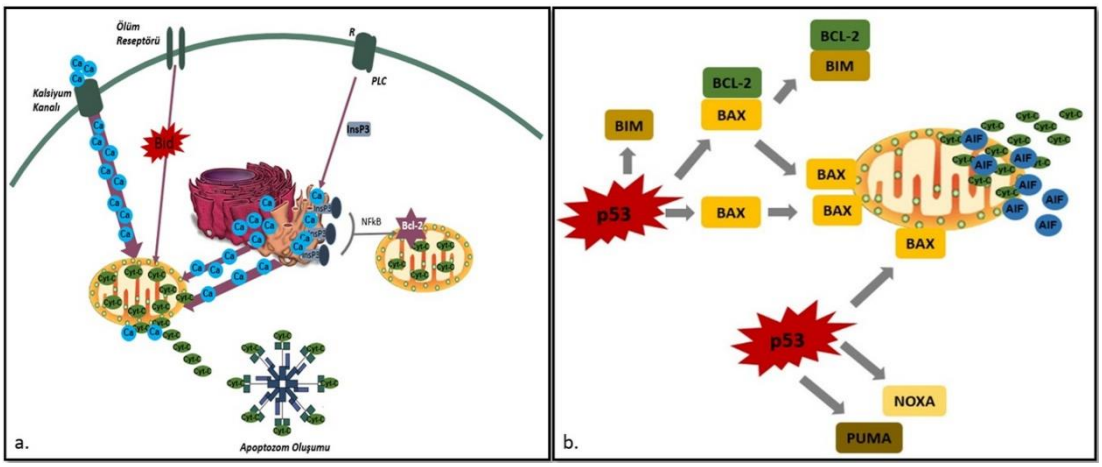
#### 1.2.2.1.3. P53

P53 hücre döngüsünü düzenleyen-kontrol eden, kanseri baskılayan, genom dengesini mutasyonları engelleyerek koruyan, DNA tamirinde görevli proteinleri aktive eden, tamiri mümkün olmayan hücrelerde apoptozu başlatan, insanda 17. kromozomun p13.1 bölgesinde bulunan ve TP geni tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür.

DNA hasarı tamir edilemediğinde p53, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinden Bax, Noxa ve Puma'yı aktive eder (Şekil 1.1). p53'ün ifadesinde ki artış Bax'ın da ifadesini arttırır böylece apoptoz varlığını teyit etmek için kullanılan parametrelerden Bax/Bcl-2 oranının artışı ile hücrede apoptozu başlatır (Cotter, 2009).

#### 1.2.2.1.4. Sitokrom-C

Sitokrom- c, mitokondri iç membranında bulunan ve mitokondrinin elektron taşıma zincirinde görevli, suda çözünürlüğü yüksek bir proteindir. İfadeleri artan Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri, bağlandıkları mitokondri zar geçirgenliğini değiştirerek zarda gözenek oluşumuna sebep olurlar. Oluşan bu gözeneklerden sitokrom-c ve apoptozu direk indükleyen AIF sitoplazmaya salınır. Sitoplazmaya salınan sitokrom-c, APAF-1'i aktive ederek prokaspaz 9 ve 3'ünde katılımıyla apoptozom kompleksini oluşturarak geri dönüşümü olmayan apoptozu başlatmış olur (Şekil 1.1).




**Şekil 1.1.** Apoptoz Düzenleyicileri

a. Kalsiyum ve Sitokrom-c'nin Rolü. b. p53'ün Bcl-2 Ailesi ile İlişkisi.

#### 1.2.2.1.5. Kaspazlar (Sistein Aspartat Spesifik Proteazlar)

Kaspazlar, aktif bölgelerinde bulunan sistein ile proteinlerin aspartik asitten sonraki peptit bağını kesen, hücrede inaktif formda bulunan ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştiren, hücre ölümü ve inflamasyonda rol alan, sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Memelilerde tanımlı 14 kaspaz bulunur ve bunlar 3 grup ayrılır (A.Goswami & ark, 2014) (Çizelge 1).

**Çizelge 1.1.** Kaspaz Grupları

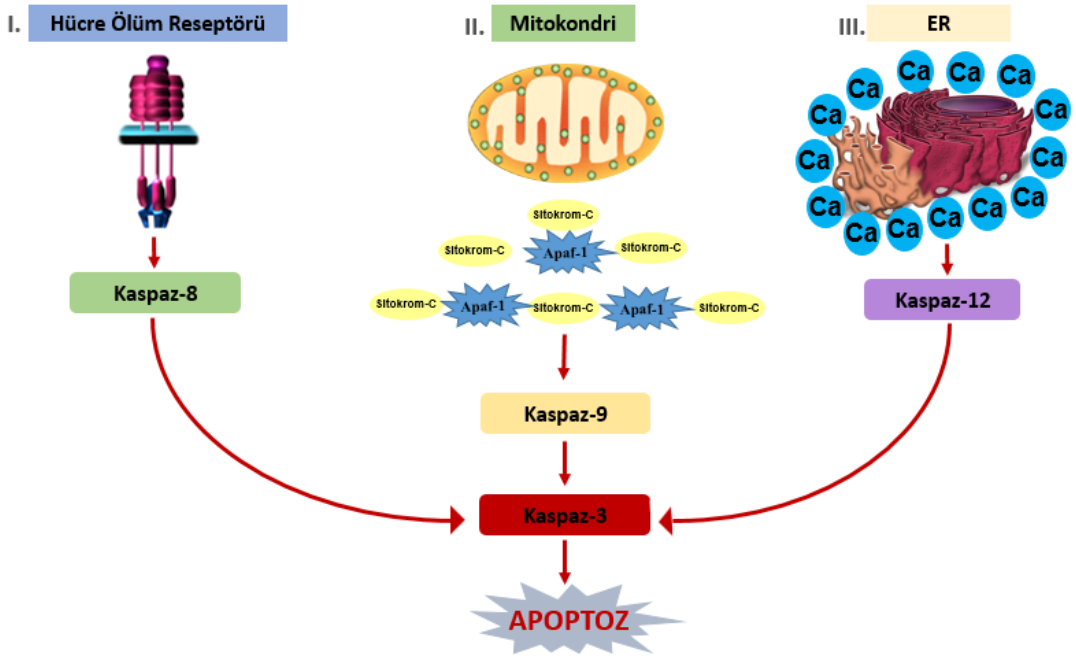
| | |
|---|---|
| 1.Başlatıcı Kaspazlar | 2, 8, 9 ve 10 |
| 2.Efektör Kaspazlar | 3, 6 ve 7 |
| 3.Enflamatuar Kaspazlar | 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 |

Kaspaz aracılığı ile apoptoz 3 yoldan gerçekleşir (Şekil 1.2).

1. Hücre yüzey reseptörlerine Fas-L veya TNF'nin bağlanması kaspaz 8 ve kaspaz 3'ün aktivasyonuyla

2. Mitokondriden sitokrom-c ve Apaf-1 salınımı ile aktive olan kaspaz 9 ve kaspaz 3 kaskadının aktifleşmesiyle

3. Hücre içi kalsiyum miktarının artması endoplazmik retikulum da bulunan prokaspaz-12'nin aktive olmasıyla kaspaz-3 üzerinden apoptozu tetikler.




**Şekil 1.2.** Kaspaz Aracılığı ile Apoptoz Yolları

#### 1.2.2.1.6. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi birbirine zıt özellikler taşıyan üyelerden oluşan bir protein ailesidir. Bu ailenin üyeleri mitokondri dış zar geçirgenliğinin düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar ki bu rol hücrenin apoptoza olan eğilimini belirler. Hücre içi sinyaller ile alınan apoptotik uyarı Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerince düzenlenir (Çizelge 1.2). Pro-apoptotik üyeler apoptozu indükler iken anti-apoptotik üyeler apoptozu baskılar. Bu proteinlerden hangisi/hangileri daha fazla ifade edilirse hücrenin akıbeti bu yönde ilerler.

**Çizelge 1.2.** Bcl-2 Ailesi Üyeleri

| **Bcl-2 Ailesi** | |
|---|---|
| **Pro-Apoptotik Proteinler** | **Anti-Apoptotik Proteinler** |
| Bax | Bcl-2 |
| Bak | Bcl-xl |
| Bad | Bcl-w |
| Bid | Bfl-1 |
| Bik | Mcl-1 |
| Bim | |
| Hrk | |
| Puma | |
| Noxa | |

##### 1.2.2.1.6.1. Pro-Apoptotik Üyeler

Pro-apoptotik proteinlerin fazla olmaları hücreyi apoptoza eğilimli yapar çünkü pro-apototik proteinler mitokondriden sitokrom-c ve AIF salınımını sağlar.

Bax (Bcl-2 İlişkili X Proteini), normalde sitozolde bulunur. Hücreye gelen apoptotik sinyal sonucu Bax, mitokondri yüzeyinde bulunan voltaj-bağımlı iyon kanallarının geçirgenliğinin artmasına neden olur.

Bid, hem Bcl-2 hem de Bax ile bağlanabilme özelliği taşıması açısından önemlidir. Bid'in Bcl-2'ye bağlanması Bcl-2'nin inaktive olmasına neden olurken; Bax ile bağlanması Bax'ın aktive olmasıyla sonuçlanır.

Bim, 3 izoformu bulunan ve Bcl-xl, Bcl-2, Bcl-w, Bax, Bak ile bağlanabilen bir pro-apoptotik üyedir. Bu bağlanma anti-apoptotik üyeleri inaktive ederken pro-apoptotik üyeleri aktive eder.

#### 1.2.2.1.7. Anti-Apoptotik Üyeler

Anti-apoptotik proteinler mitokondri dış membranında, endoplazmik retikulumda ve çekirdek zarında yer alırlar. Mitokondride gözenek oluşumunu sağlayıp iyon transportunu düzenleyerek kalsiyum oranını kontrol ederler böylece pro-apoptotik proteinlerin aksine sitokrom-c ve AIF salınımını engelleyerek apoptozu inhibe ettikleri için hücrede anti-apoptotik proteinlerin fazla olması apoptoza eğilimin az olduğu anlamına gelir.

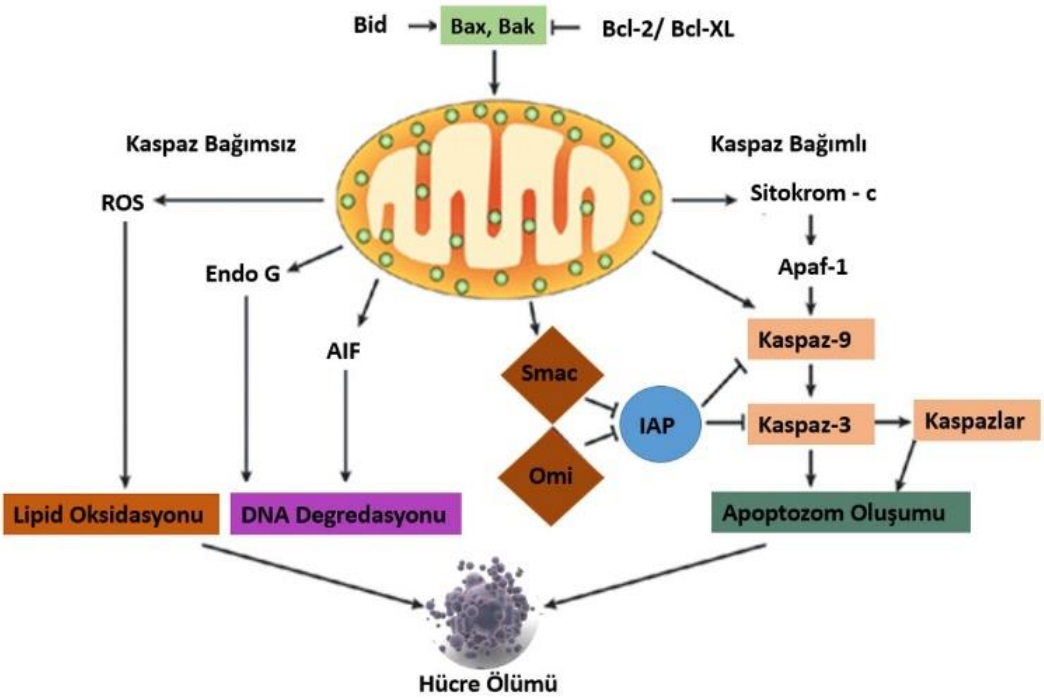
Hücrede Bcl-2 ve Bcl-xl mitokondri zar geçirgenliğini stabil tutarak mitokondri içeriğinin dışa salınımını ve kaspaz kaskadının aktivasyonunu engelleyen apoptoz inhibitörü proteinlerdir.

### 1.2.2.2. İçsel Yolak

İçsel yolak ile apoptoz; DNA hasarı, hücre içi kalsiyum artışı, pH azalışı, hipoksi, oksidatif stres, Er stresi, metabolik veya hücre döngüsü bozukları gibi hücre içi sinyaller aracılığı ile tetiklenir.

İçsel yolak ile alınan apoptoz sinyali ilgili düzenleyiciler aracılığıyla gerçekleşir. İçsel yolakta apoptoz kaspaz bağımlı veya bağımsız gerçekleşebilir. Kaspaz bağımsız

apoptozda Endo-G, AIF ve ROS direkt olarak kromatin yoğunlaşmasına, DNA degredasyonuna veya lipit oksidasyonuna sebep olur (Şekil 1.3).




**Şekil 1.3.** Apoptoz İçsel Yolak (www.premedhq.com, 2015)

### 1.2.2.3. Dışsal Yolak

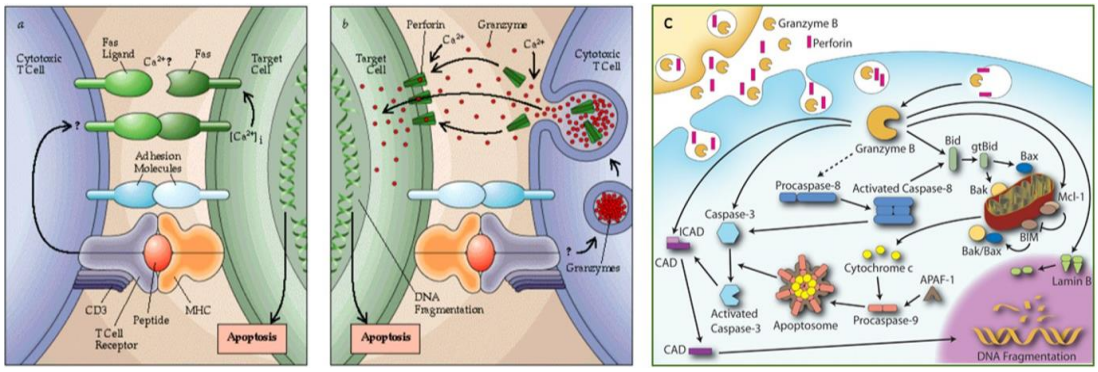
Hücre dışından apoptozu, TNF, CSF, NGF, IGF ve radyasyon uyarabilir.

Dışsal yolak ile apoptoz hücre zarında bulunan ve uçlarından biri hücre dışına diğeri hücre içine bakan ve uçlarına bağlanan ligandlar ile aktifleşen hücre ölüm reseptörleri ile başlar. TNFR süper gen ailesine üye olan Fas, TNFR1, TNFαR, DR3, DR4, DR5 bu reseptörlere bağlanan FasL, DAXX, TNF-alfa, Apo3L TRAIL ligandlarıyla trimerik yapı kazanır. Trimerik yapı reseptör-ligand kompleksinin adaptör moleküller ve prokaspazlar ile birleşerek DISC adı verilen ölüm tetikleyici sinyal kompleksini oluşturur. DISC aracılığı ile inaktif durumda ki başlatıcı kaspazlar (2,8,9,10) aktifleşir ve dolaylı olarak diğer efektör kaspazlarında aktifleşmesini sağlar. Dışsal yolak ile başlayan apoptoz sinyali Bid'i keserek içsel

yolakta rol alan kaspaz 3 ve 9'ün de aktifleşmesini sağlar. İçsel veya dışsal yolak ile aktive olan kaspaz 3, kaspaz aktive edici DNaz'ı aktifleştirir ve DNA'nın parçalara ayrılmasına sebep olur.

Dışsal yolakta bir diğer alternatif sfingolipid yoludur. Bu yol apoptoz düzenleyicilerinden seramid'in pro-apoptotik Bid yapımını arttırması ile gerçekleşir.

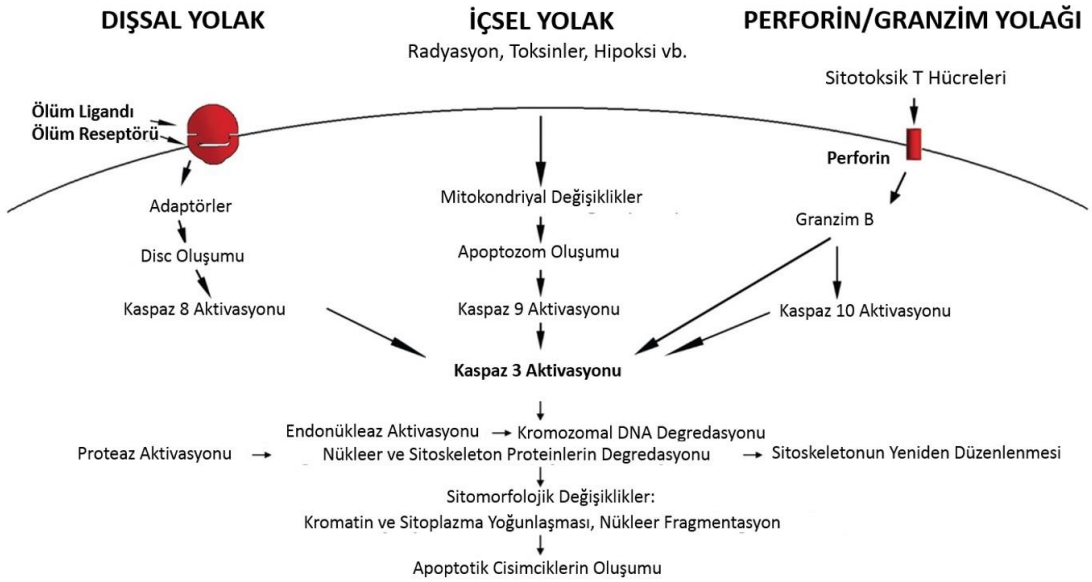
Ayrıca Sitotoksik T Lenfositleri ve doğal öldürücü hücreler aracılığı ile apoptoz 2 yoldan gerçekleşebilir; Fas/Fas-L ve granzim-perforin sistem. Fas/Fas-L yolu üzerinden hücre ölümü yukarıda bahsedilen dışsal yolak çerçevesinde gerçekleşir. Sitotoksik T hücrelerinin ve doğal öldürücü hücrelerin yüzeyinde bulunan Fas ligandının N terminali sitoplazmada iken C terminali hücre dışında yer alır ve öldürülmek üzere hedeflenen hücre zarında bulunan Fas reseptörü ile kompleks oluşturur ve dışsal yolak basamaklarını takip ederek apoptozu gerçekleştirir. Granzim-Perforin sisteminde ise Sitotoksik T hücreleri hedef hücrenin antijenini tanır ve perforin - granzim içeren granül içeriğini hedef hücreye aktarır. Perforinler, hücre yüzeyinde gözenek oluşturur bu gözeneklerden hücre içine kalsiyum girişi artar ve vezikülden granzim B'nin serbest kalır. Serbest kalan granzim B, Bid'i keserek Bax veya kaspazlar vasıtasıyla içsel yolak ile apoptozu gerçekleştirir (Şekil 1.4).




**Şekil 1.4.** Apoptoz Dışsal Yolak (a- Fas/Fas-L yolu, b- Granzim-perforin sistemi (www.bio.davidson.edu, 2015), c-Granzim B (Vitale & Pegoraro, 2015))

Sonuç olarak apoptoz farklı yolaklar ile başlasa da hücre içerisinde tüm yolakların kesiştiği kavşak kaspaz 3 aktivasyonudur.

Apoptoz sinyali alan hücre büzüşür, küçülür dolayısıyla komşu hücreler ile bağlantısı kopar, kromatin yoğunlaşır, tomurcuklanır akabinde apoptotik cisimcikler oluşur, plazma membran bütünlüğü kaybolur ve çevreye dağılan apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından fagosite edilirler (Şekil 1.5).




**Şekil 1.5.** Apoptoz Yolakları ve Basamakları (Bali & ark, 2013)

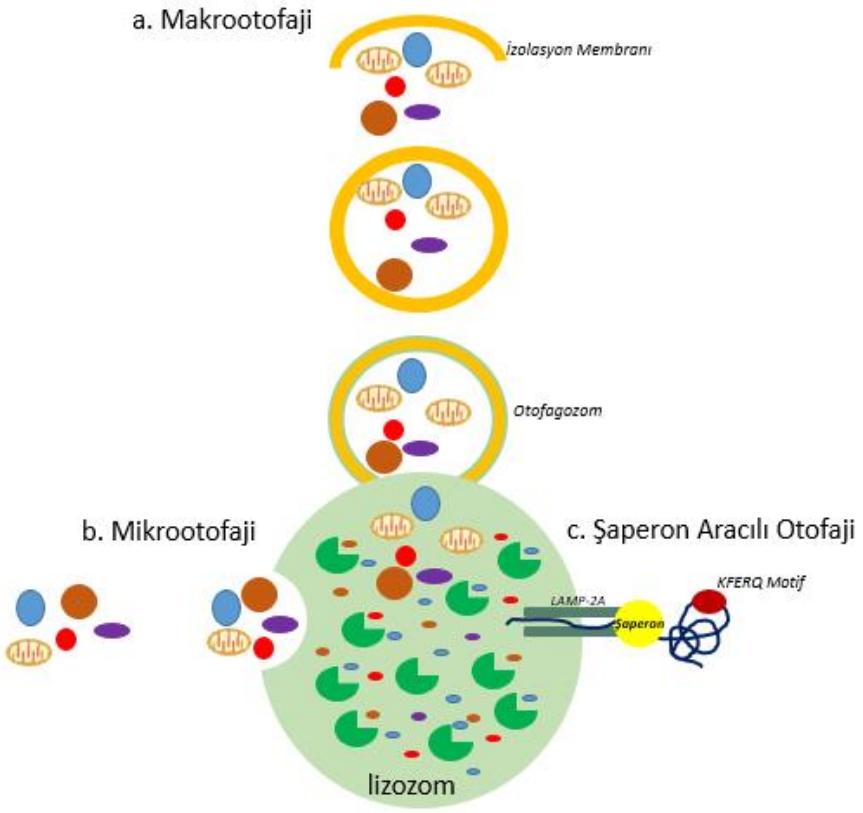
### 1.2.3. Otofaji

Otofaji, Yunanca auto (kendini) ve phagy (yemek) kelimelerinden türemiş tip 2 programlı hücre ölümüdür. Hücre açlık durumunda, içinde bulunduğu yoksunluğu en az zararla geçirebilmek için otofaji ile besin sağlar. Otofaji, hücrede ölümün yanı sıra farklılaşma, yaşlanma ve morfogenez amaçlarıyla gerçekleşebilir (Mizushima & ark, 2008).

Ökaryotik hücrelerde protein parçalanmasının iki yolu vardır; otofaji ve ubikütin-proteozom sistemi. Ubikütin - proteozom sisteminde kısa ömürlü proteinler

hızlıca parçalanırken; otofaji'de uzun ömürlü proteinler ve hücre organelleri parçalanır, açığa çıkan aminoasitler ve yağ asitleri hücre tarafından tekrar kullanılır (Kraft & ark, 2010).

Otofaji; makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere üç şekilde gerçekleşir. Hücrede protein ve organellerin izolasyon membranı ile çevrilerek otofagozom oluşturması ve otofagozomun lizozom ile birleşerek içeriğinin parçalanmasına makrootofaji denir (Feng & ark, 2014). Lizozom membranının içe çökmesi ile sitoplazmanın lizozom tarafından doğrudan ve içeriğinin lizozomun içinde parçalanması mikrootofajidir (Li & ark, 2012). KFERQ motifli proteinlerin lizozoma taşınmasına yardımcı olan şaperonun da dâhil olduğu otofaji şekline şaperon aracılı otofaji denir (Cuervo & Wong, 2014) (Şekil 1.6).




**Şekil 1.6.** Otofaji Çeşitleri

a. Makrootofaji b. Mikrootofaji c. Şaperon Aracılı Otofaji

İzolasyon membranının oluşumu ile ilgili en çok kabul gören yaklaşımlar; hücrede uygun koşullar altında yeni sentezlendiği veya ER ile golgi cisimciği aralarında var alan yapılar oluştuğudur. İzolasyon membranı sitoplazmada oluşur, birden çok katlı zar yapısı ile parçalanacak protein veya organeli çevreleyip, lizozomal enzimler tarafından parçalanmak üzere lizozoma iletir. Bu mekanizmada rol alan ER ve golgi cisimciğinin yanı sıra Atg gibi genler de vardır. Atg mayalarda yapılan çalışmalar ile keşfedilmiştir ve izolasyon membranı ve otofagozom oluşumunda rol almaktadır (Lamb & ark., 2013).

Hücre ölümü ile ilgili yapılan araştırmalar apoptoz ve otofaji arasında önemli bağlantılar olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu bağlantılardan en önemlisi anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xl proteinlerinin sadece apoptozu değil aynı zamanda otofajiyi de engellemesidir. Tümör oluşumunu inhibe eden, insanda 17. kromozomun q21.31 bölgesinde bulunan ve BECN 1 geni tarafından kodlanan otofagozom oluşumunda görevli Beclin-1 proteini Bcl-2 tarafından baskılanır (Levine & ark, 2008). Öte yandan apoptoz sürecinde ki hücrelerde kaspaz aktivasyonunun Beclin-1 ve ATG proteinlerini etkisizleştirdiği tespit edilmiştir (Norman & ark, 2010). Kaspazlar tarafından parçalanan otofaji proteinlerinin Bcl-2 ailesine homoloji gösteren protein parçaları mitokondri üzerinden pro-apoptotik aktivite gösterebilir (Yousefi & ark, 2006).

### 1.2.4. ER Stresi

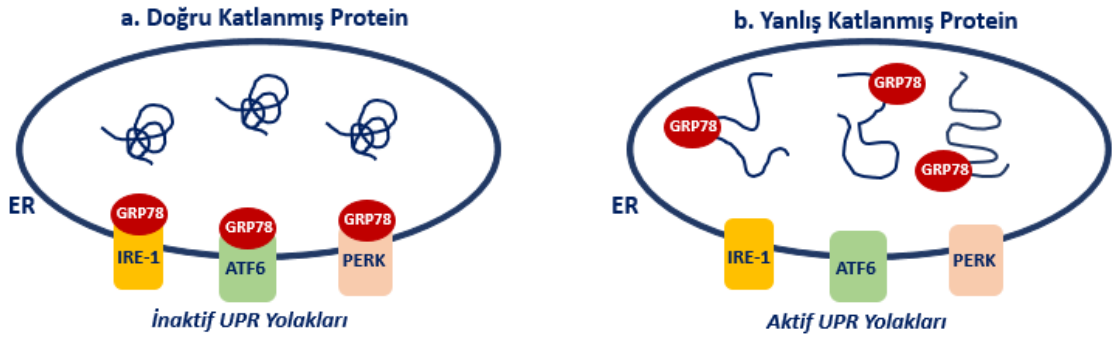
Endoplazmik retikulum, hücrede salgılanan ve kendi bünyesinde bulunan proteinlerin katlanma, olgunlaşma ve taşınmasından sorumlu kalsiyum depolayan organeldir. ER, katlanma kapasitesinin bozulması ya da yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi durumunda strese girer. ER stresinin hücre fonksiyonlarına zarar vermemesi için katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinler ERAD veya UPR ile giderilir.

Yeni sentezlenen proteinler katlanmak için ER'ye gelir. Katlanmamış proteine önce $Glc_1Man_9GlcNAc_2$ şekeri ve ardından şaperon bağlanır. Şaperon katlanmaya yardımcı proteindir ve hem şeker ile etiketlenen proteine hem de ERp57

veya Grp58 proteinine bağlanır. ERp57/Grp78 katlanmamış proteinde disülfit köprülerini oluşturarak proteinin katlanmasını sağlar. Katlanma sonrasında şaperon ayrılır ve protein işlevsel şeklini kazanmış olur. Protein doğru katlanmış ise ER'dan görevli olduğu yere gitmek için ayrılır. Protein yanlış katlanmış ise UGGT enzimi tarafından tespit edilerek glikoz eklemek suretiyle şaperonun yeniden bağlanmasını ve katlanma işleminin tekrarlanmasını sağlar. Katlanma işlemi tekrarlanmasına rağmen protein başarıyla katlanamazsa EDEM enzimi tarafından ER dışına çıkarılır, ERAD tarafından da ubikütinlenerek proteozomda parçalanır (Ni & Lee, 2007).

Katlanmamış protein cevabı ile amaç protein sentezinin azaltılması, katlanmamış protein birikiminin önlenmesi, şaperonlar ile katlama enzimlerinin ve protein parçalamada görevli enzimlerin arttırılmasıdır.

UPR'de üç sinyal yolağı vardır; ATF6, IRE1 ve PERK. Bu sinyal yolakları normal koşullar altında moleküler şaperon GRP78 (BİP) tarafından inaktif formda tutulur. GRP78; ER lümeninde bulunan ve katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlere bağlanarak UPR sinyal yolaklarının aktivasyonunu sağlayan ısı şok 70 protein ailesinin üyesi ATPaz'dır (Şekil 1.7).




**Şekil 1.7.** Protein Katlanması

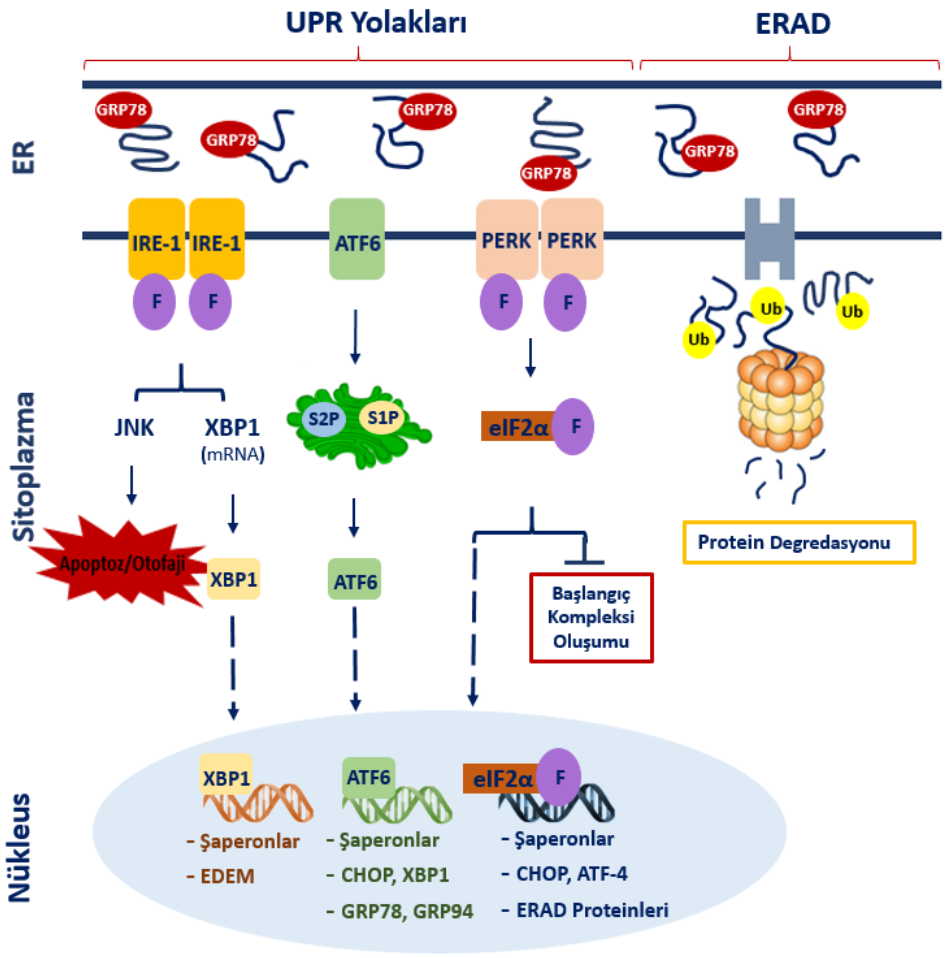
a. Doğru Katlanma b. Yanlış Katlanma

IRE-1 kinaz ve endoribonükleaz işlevi olan, ER'nin transmembran sensörü bir proteindir. Grp78'in yanlış katlanmış proteine bağlanması ile IRE-1'ler dimerizasyon yaparak fosforillenir ve aktive olurlar. JNK sinyal yolağının

aktivasyonuna sebep olabilirler ki bu durumda hücre apoptoza veya otofajiye doğru yol alır. IRE-1, endonükleaz aktivitesi ile mRNA kesimi yapabilir. Bunun en iyi örneği IRE-1'in XBP-1-mRNA'sından gerçekleştirdiği kesimdir. XBP-1-mRNA'sının ilk formu inaktiftir ve kesim sonrasında aktifleşerek protein sentezi gerçekleşir (Kadowaki & Nishitoh , 2013). XBP-1 proteini ER stresinin engellenmesinde rol alan şaperonların, protein katlanmasına yardımcı enzimlerin, EDEM gibi protein parçalanmasında görevli proteinlerinin gen ekspresyonunu uyarır (Chan & Brandizzi, 2013) (Şekil 1.8).

ATG6, ER moleküllerinin transkripsiyonunu aktive eden, normal şartlarda GRP78 tarafından inaktif formda tutulan transmembran transkripsiyon faktörüdür. GRP78'in ayrılması ile ATF6 golgi cisimciğine gider. S1P ve S2P enzimleri tarafından proteolitik kesime uğradıktan sonra aktive olur. Aktive olan ATF6 nükleusa giderek ER stresini gidermede görevli CHOP, XBP1, GRP78, GRP94 ve şaperonların gen ifadesini arttırarak ER stresini azaltır (Park & Ozcan, 2013) (Şekil 1.8).

PERK, ER'da GRP78 bağlı iken inaktif formda bulunan bir transmembran tirozin kinazdır. GRP78'in ayrılmasını takiben PERK proteinleri dimerizasyon ile sahip oldukları tirozin kinaz sayesinde fosforillenerek aktifleşir. Aktif PERK bir taraftan eIF2α'yı fosforiller ve fosforillenen eIF2α translasyon için gerekli başlangıç kompleksini oluşturamaz, protein sentezi gerçekleşemez. Öte yandan ATF-4, CHOP, ERAD proteinleri ve ER stresini azaltmakta rol alan şaperonların transkripsiyonunu uyarır (Sano & Reed, 2013) (Şekil 1.8).




**Şekil 1.8.** UPR Yolakları ve ERAD Sistemi

ER stresinin gerektiği gibi yönetilemediği ve sonlandırılamadığı durumda UPR yolaklarının aktivasyonu ile ifadesi indüklenebilen multifonksiyonel transkripsiyon faktörü CHOP, anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerin ifadesini baskılarken pro-apoptotik üyelerin ifadesini arttırır. CHOP'un Bcl-2 ailesi üyeleri ile olan bu ilişkisi hücreyi apoptoza yönlendirebilir. Yine UPR yolaklarının aktivasyonu ile aktive olan JNK sinyal yolağı ile hücre apoptoza veya otofajiye uğrayabilir.

# 2. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmanın hayata geçmesi için öncelikle etik kurul ve biyolojik materyal izni alınmıştır. Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi 30/06/2014 tarihli klinik araştırmalar etik kurulu toplantısında 99950669/215 sayılı etik kurul kararı (Bkz. Ek-1) ve Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Başkanlığının 09/09/2014 tarihli Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyon toplantısında 21589509/596 sayılı bilimsel çalışma onayı alınmıştır (Bkz. Ek-2).

## 2.1. Çalışma Grubunun Özellikleri

Çalışmada Adli Tıp Kurumundan alınan izin çerçevesinde Ankara Grup Başkanlığında yapılan 17'si erkek 4'ü kadın 21 otopsiden temin edilen psoas kası kullanılmıştır. Bilinen en genç vaka 15 en yaşlı vaka 71 yaşındadır. Ölüm sebepleri heterojen dağılım göstermektedir; ateşli silah, yüksekten düşmeye bağlı travma, trafik kazası, iş kazası, uçucu madde intoksikasyonu, yüksek akım, intihar. Ayrıca grup içerisinde kalp-damar hastalığı ve şizofreni tanısı alan vakalar bulunmaktadır.

Vaka öykülerine bağlı olarak 4 farklı gruplandırma yapılmıştır. İlk grup tüm vakaların dâhil olduğu 21 kişiden oluşmaktadır. İkinci grupta ölüm öncesi 2-67 gün hastanede yatan 7 kişi vardır. Üçüncü grup aynı gün ölen kişiler oluşur ancak bu grup kalp-damar hastalığı olan kişilerin dâhil olduğu 13 kişilik ve hariç oldukları 10 kişilik 2 alt grupta incelenmiştir.

## 2.2. Örneklerin Toplanması

Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığında Eylül-Kasım 2014 tarihlerinde yapılan otopsilerden toplanan psoas kas dokuları -80°C dondurucuda saklandı. Çalışma

grubunun dokuları toplandıktan sonra soğuk zincir ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına taşındı.

## 2.3. Protein İzolasyonu

Laboratuvara soğuk zincir ile taşınan postmortem dokulardan steril koşullarda analiz için 1x1x1 $cm^3$'lik parçalar alındı. Kalan dokular -80°C dondurucuda (Scancool, SCL50P) saklandı. Öncelikle analiz için ayrılan dokuların homojenizasyonu, ardından protein eldesi için proteinleri birincil yapılarına getirmek üzere kaynatma işlemi ve akabinde elektroforetik yöntem ile saflaştırma yapıldı.

### 2.3.1. Homojenizasyon

1. 50ml falkon tüplere alınan dokular 1ml PBS (fosfat buffer tampon çözeltisi) ile yıkandı.

2. Hazır olarak temin edilen 1x RIPA lysis buffer (22µl) ve 1x proteinaz (220µl) inhibitörü dokular üzerine eklendi.

3. Tüpler buz üzerine alınarak dokular homojenizatör (Isolab) ile parçalandı.

4. Parçalama işleminin ardından 1dk vorteks (Labnet), 20dk santrifüj (eppendorf centrifuge 5415R, Almanya) ve 1dk vorteks yapıldı.

5. Homojenizasyon işlemi tamamlandıktan sonra örnekler -80°C dondurucuda bir sonraki işleme kadar saklandı.

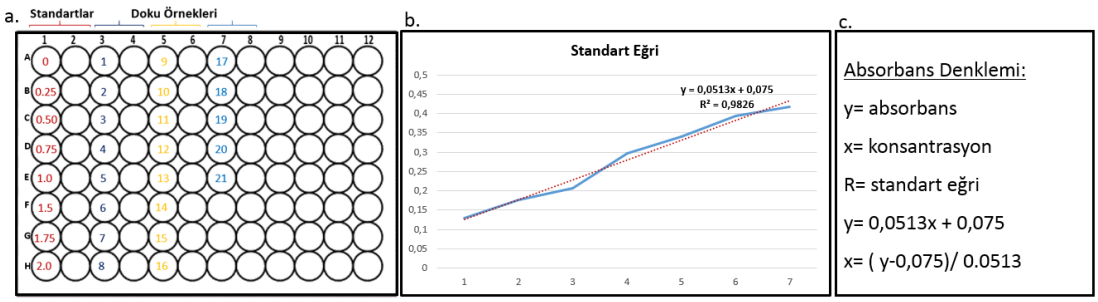
### 2.3.2. Protein Kaynatma

Homojenize edilen örneklerin -80°C dondurucudan çıkarılıp buz üzerinde çözülmesi beklendi.

1. Örnekler çözüldükten sonra 1dk vortekslendi ve 16000 rcf'de 15dk +4°C'de santrifüj edildi.
2. Süpernatant yeni tüpe alınırken pelet kısmı ihtiyaç halinde tekrar kullanılmak üzere -80°C dondurucuda saklandı.

Yeni tüpe alınan süpernatantlarda Bradford yöntemiyle protein miktar tayini yapıldı. Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue boyası ile örnek arasındaki bağlanma kapasitesine bağlı olarak protein miktarı tayini için kullanılan bir yöntemdir.

Tayin için önceden hazırlanmış farklı konsantrasyonlarda standartlar kullanıldı. Standart hazırlamak için BSA (bovin serum albümin) ve $dH_2O$ kullanıldı. Kullandığımız standartlar 0 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.50 mg/ml, 0.75 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1.75 mg/ml, 2.0 mg/ml konsantrasyon aralıklarındadır. 96'lik well plate'in her bir kuyusuna 98µl Coomassie Brilliant Blue ve 2µl standart/örnek karışımı eklendi. Well plate yerleşim şekli standartlardan başlayarak örnekler ile devam etti ve ölçümün kendi içinde sağlamasını yapmak için her bir örnek hemen yanındaki kuyucuğa da ikinci kez yüklendi. İşlem sonrası well plate alüminyum folyo ile kapatılarak karanlık ortam sağlandı ve 15 dk çalkalayıcıda (biosan multi bio 3D, Letonya) inkübe edilir. İnkübasyonun ardından spektrofotometre (Epoch, Biotek) ile 595nm'de absorbans değeri ölçüldü ve standart eğrisi çizilerek absorbans denklemi elde edildi (Şekil 2.1). Elde edilen R değeri 1'yakınlığı ölçüsünde güvenilir kabul edilmektedir. Bu çalışmada R=0,9912 olarak hesaplanmıştır.




**Şekil 2.1.** a. Well Plate Yerleşimi b. Standart Eğri Grafiği c. Absorbans Denklemi

Proteinleri eşit konsantrasyonlarda kaynatabilmek için protein miktar tayininde elde ettiğimiz sonuçları kullanarak kaynatma işlemi öncesinde total karışımın 40 µg olması için kullanılacak protein, $dH_2O$, LSB (Laemmli 2x sample buffer, Sigma) ve β-Merkaptoetanol (2-Mercaptoethanol, Sigma) miktarı hesaplandı. Karışımlar kısaca vortekslendi ve 95°C'de ısı bloğunda (grant QBD2,) 7dk kaynatıldı. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra proteinler -80°C dondurucuda saklandı.

Protein kaynatma işleminin amacı proteinlerin jel içinde eşit ve kolay yürümeleri için denatüre edilerek primer yapıda olmalarını sağlamaktır. Bu sebeple ikincil yapı oluşumuna neden olan disülfit bağlar LSB ve β-Merkaptoetanol ile indirgenir. Proteinler, negatif yük ile yüklenir ve primer yapı korunmuş olur.

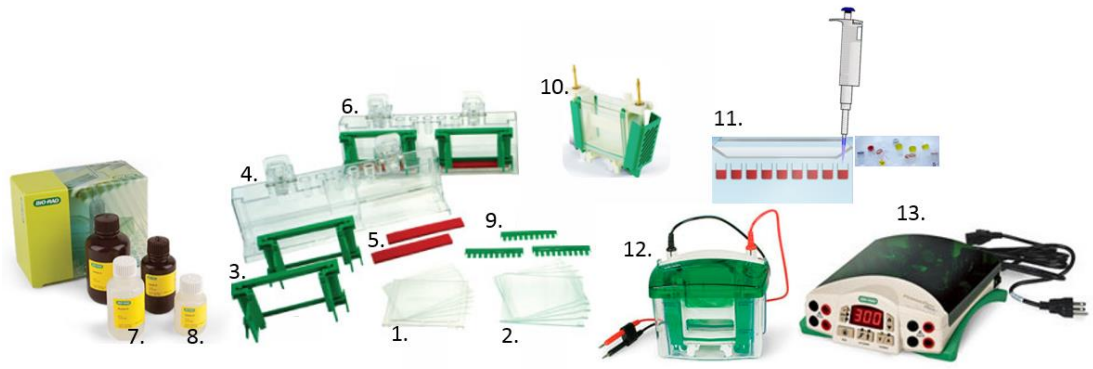
### 2.3.3. Western Blot

Western blot moleküler biyoloji tekniklerinin önemli bir üyesidir. Keşfi üzerinden geçen 36 yıl içinde tekniğin önemi ve sunduğu bilginin değeri kullanıldığı araştırmaların bilim dünyasında edindiği yerden anlaşılmaktadır.

Western blot özgün bir proteinin analiz yöntemidir. Bu yöntem ile analiz edilen bir çok proteini içeren hücre / dokuda özgün bir proteinin varlığı ve miktar kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilir.

### 2.3.3.1. Jelin Hazırlanması ve Proteinlerin Yürütülmesi

Deney için gerekli ön hazırlık aşaması tamamlandıktan sonra deney düzeneği hazırlandı (Şekil 2.2). İnce cam önde kalın cam arkada olacak şekilde camlar bir araya getirilerek çerçeveye yerleştirilip ve sabitlendi. Standa önce şerit tamponlar yerleştirildi sonra stantta bulunan klipsler ile çerçeveler standa oturtturuldu. Resolving ve stacking solüsyonlarından oluşan hazır jel kiti (Bio-rad TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit %10, USA) kullanılarak jeller hazırlandı (Çizelge 2.1). Hazırlanan resolving jel camlar arası boşluğa döküldü, üzerine jelin pürüzsüz donması ve hava kabarcığı oluşmaması için izopropanol dökülüp jelin donması beklendi. Ardından stacking jel hazırlanıp donmuş resolving jel üzerine döküldü ve taraklar yerleştirip jelin donması beklendi. Jel donduktan sonra çerçevelerden çıkarılan camlar tank kasetinin iki yüzüne yerleştirildi, sabitlendi ve tanka yerleştirildi. Tank içine ve kasette ki camlar arasında kalan boşluğa 1x running buffer (Çizelge 2.1) kondu, taraklar kuyucuklara zarar vermeden çıkarıldı. İlk kuyucuğa 3,5µl marker (color protein standard broad range, Biolabs) diğer kuyucuklara da buz üzerinde çözdürülen örneklerden 15µl yüklenir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra tankın kapağı kapatıldı ve tank elektrik kaynağına bağlanarak proteinler 30dk 190v'da yürütüldü.




**Şekil 2.2.** Western Blot Deney Düzeneği

1. İnce cam, 2. Kalın cam, 3. Çerçeve, 4. Stand, 5. Şerit tampon, 6. Jel dökmek üzere standa yerleştirilmiş çerçeveler, 7. Resolving A ve B solüsyonu, 8. Stacking A ve B solüsyonu, 9. Tarak, 10. Tank kaseti, 11. Örneklerin kuyucuklara yüklenmesi, 12. Tankın kapatılması, 13. Elektrik kaynağına bağlanması.

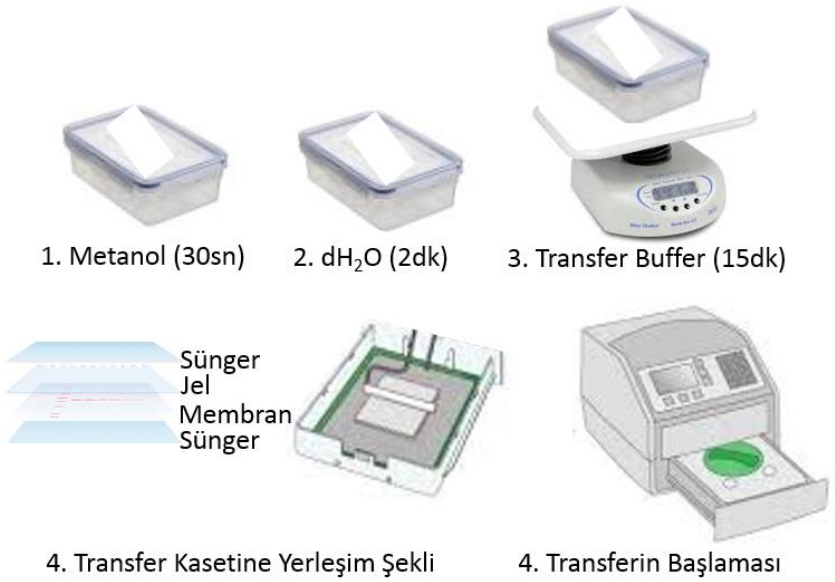
**Çizelge 2.1.** SDS-PAGE Hazırlanması

| a. Resolving Jel (%10) | b. Stacking Jel (%10) | c. 10x Running Buffer | d. Transfer Buffer |
|---|---|---|---|
| 10ml Resolver A | 3,5 ml Stacker A | 10.8 g SDS | 225ml dH2O |
| 10ml Resolver B | 3,5 ml Stacker B | 30.3 g Tris | 75ml Metanol |
| 100 µl APS(%10) | 35 µl APS(%10) | 144 g Glisin | 5,4 gr Glisin |
| 10 µl TEMED | 7 µl TEMED | 1L'ye kadar $dH_2O$ | 1,14 gr Tris |

(a ve b), Running Buffer Hazırlanması (c), Transfer Buffer Hazırlanması(d)

### 2.3.3.2. Transfer

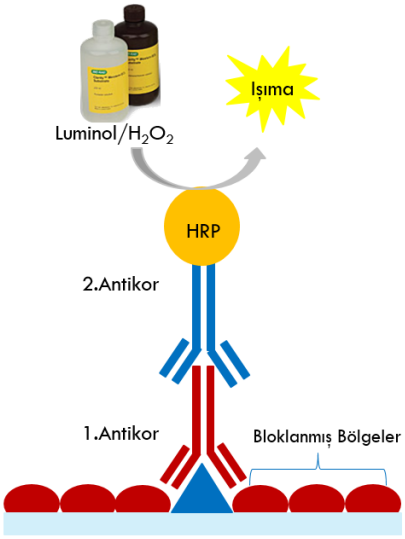
Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinlerin antikor ile işaretlenebilmesi için proteinler jelden nitroselüloz membrana (Biorad) transfer edildi. İlk olarak transfer buffer hazırlandı (Çizelge 2.1). Ardından membranlar aktifleştirildi (Şekil 2.3) Membranlar aktifleştirildikten sonra transfer cihazının (trans-blot turbo, Bio-rad) kasetine alttan üste sırasıyla sünger, membran, camlar arasından itinayla çıkarılan jel ve sünger sandviç şeklinde yerleştirildi. Kasetin kapağı kapatılıp kaset cihaza yerleştirilerek 30 dk 2,5A 25V'ta jelde ki proteinlerin membrana transferi sağlandı.




**Şekil 2.3.** Membran Aktifleştirme ve Transfer İşlemi

### 2.3.3.3. Bloklama

Transfer işleminin başarıyla gerçekleşmesini müteakip olarak özgün olmayan bağlanma bölgelerinin bloklanması gerekir. Bloklama işleminin amacı antikorların yanlış bağlanmasını engellemektir. Bloklama için 1gr yağsız süt tozu- 40ml 1x TBST karışımı kullanıldı. Membranın kurumasına fırsat vermeden 7ml süt tozu-1x TBST karışımı içerisine kondu ve bloklanması için 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi (Şekil 2.4).




**Şekil 2.4.** Bloklama, Antikor Bağlanması ve Işıma

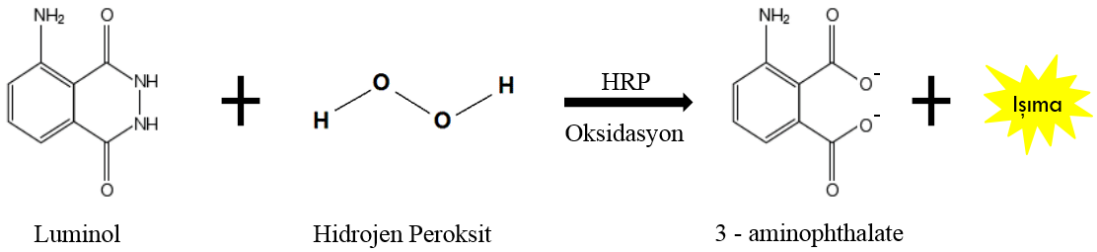
### 2.3.3.4. Antikor ile Muamele

Bloklama işlemini takiben 1/1000 oranında primer antikor ile süt tozu-1x TBST karışımı hazırlandı. Membranlar primer antikor ile hazırlanan bu karışım içerisinde gece boyu +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Bu işlem ile özgün proteine primer antikor bağlandı (Şekil 2.4). Ertesi gün oda sıcaklığında primer antikor karışımı membranlardan uzaklaştırılıp, yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi 1x TBST ile 3 kez 10'ar dakika veya 4 kez 5'er dakika ara ile yapıldı. Yıkama işleminin amacı özgün proteine bağlanmamış ortamda bulunan fazla antikorların uzaklaştırılmasıdır. Ardından membranlar 1/5000 oranında hazırlanan sekonder

antikor ile süt tozu-1x TBST karışımında 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve sekonder antikor primer antikora bağlandı. İnkübasyonun ardından 1x TBST ile 3 kez 10'ar dakika veya 4 kez 5'er dakika ara ile yıkama yapıldı ve bağlanmamış sekonder antikor ortamdan uzaklaştırıldı.

### 2.3.3.5. Görüntüleme

Görüntüleme için Clarity Western ECL-substrate luminol/enhancer solüsyonları (Bio-rad) kullanıldı. Kullandığımız bu kit kemiluminesans yöntem ile görüntü sağladığı için bu basamaktaki tüm işlemler karanlık ortamda yapıldı. 1x TBST içinden alınan membran üzerine 1000 µl ECL solüsyonu döküldü ve 2,5 dk ışıma verecek HRP - Hidrojen Peroksit - Luminol arasındaki kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi beklendi (Şekil 2.5). Membranlardaki proteinler ChemiDoc-Mp görüntüleme sistemi (bio-rad) ile görüntülendi. Sonuç olarak özgün proteinin membrandaki yeri, yoğunluğu bant olarak açığa çıktı.




**Şekil 2.5.** Kemiluminesans Görüntüleme Reaksiyonu

### 2.3.3.6. Hesaplama

Görüntüleme ile elde ettiğimiz bantların hesaplaması Image Lab (Bio-rad) programı kullanılarak yapıldı. Hesaplama işleminin amacı bandı oluşturan protein miktarının rakamsal olarak ifadesini elde etmektir.

# 3. BULGULAR

Çalışmada ölüm ile otopsi işlemine kadar geçen zaman dikkate alınmıştır. Ölüm üzerinden geçen ilk 12 saatlik dilimde bulunan 3 vaka kontrol olarak kabul edilmiş ve diğer vakalar en erken saatten başlayarak en geç saate doğru sıralanıp analiz edilmiştir. Ayrıca her bir membranda kontrol grubu örnekleri düzenli olarak çalışılmış ve kontrole göre karşılaştırmanın kolay olması amaçlanmıştır. Ölüm zaman bilgilerine analize başladıktan sonra ulaştığımız 3 vakaya ait örnekler örnek serisinin en sonunda çalışılmıştır.

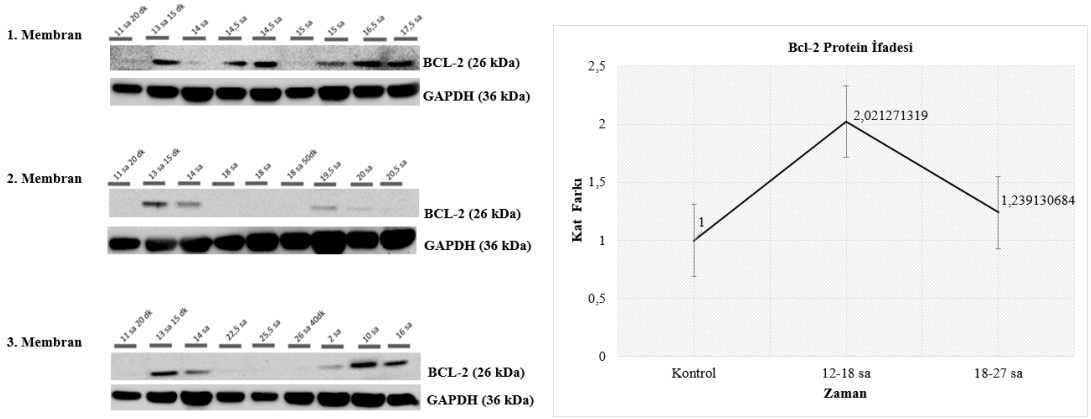
Membranda protein varlığını kontrol etmek için GAPDH çalışılmıştır. GAPDH glikozun pirüvata kadar yıkımı olan glikoliz olayının ara ürünü bir dehidrogenazdır. GAPDH'in kontrol amaçlı kullanımı huosekeeping gen olması dolayısıyla gen ürün miktarının organizmanın tüm hücrelerinde sabit olmasıdır.

Örneklerde Bcl-2, Bax, Beclin-1, Perk ve Grp78 belirteçlerinin ekspresyonları 3 biyolojik tekrar yapılarak analiz edilmiştir.

## 3.1. Bcl-2 Western Blot Bulguları

Bcl-2 protein ekspresyonunun tespiti için Bcl-2 (N-19): sc-492 (Santa Cruz Bıotechnology) primer antikoru ve goat anti-rabbit IgG H&L (HRP, Santa Cruz Bıotechnology) sekonder antikoru kullanıldı.

Bcl-2 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre 2. zaman olan 12-18 saat aralığında 2 kat artarken 3. zaman aralığı 18-27 saatlerinde 1,2 kat artmaktadır. 2. zamana göre Bcl-2 protein ekspresyonu 3. zamanda 1,6 kat azalmaktadır (Şekil 3.1).

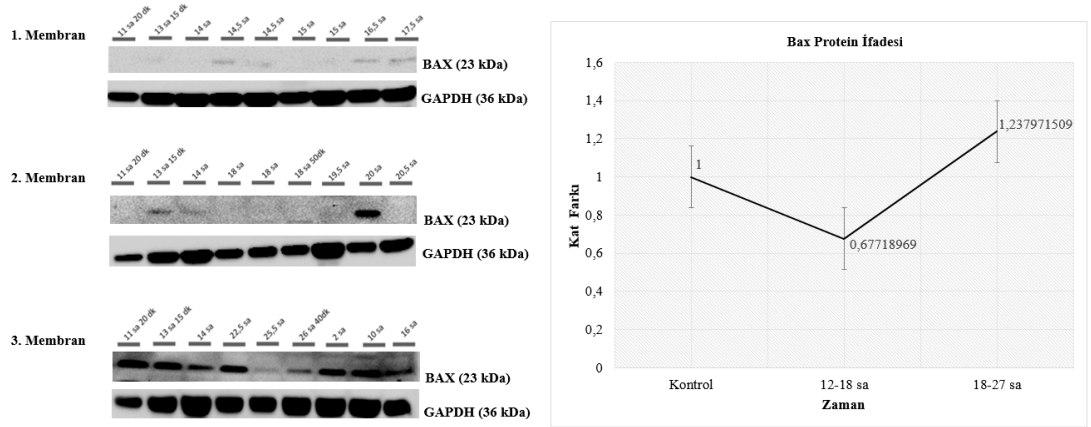



**Şekil 3.1.** Bcl-2 Western Blot Sonuçları

### 3.2. Bax Western Blot Bulguları

Apoptoz indikatörü Bax proteinin tespiti için Bax (P-19): sc-526 (Santa Cruz Bıotechnology) primer antikoru ve goat anti-rabbit IgG H&L (HRP, Santa Cruz Bıotechnology) sekonder antikoru kullanıldı.

Bax protein ekspresyonu şekil 3.2'de görüldüğü gibi kontrol grubuna göre 2. zamanda 1,5 kat azalırken 3. zamanda 1,2 kat artmaktadır. 2. zamana göre Bax protein ekspresyonu 3. zamanda 1,8 kat artmaktadır.

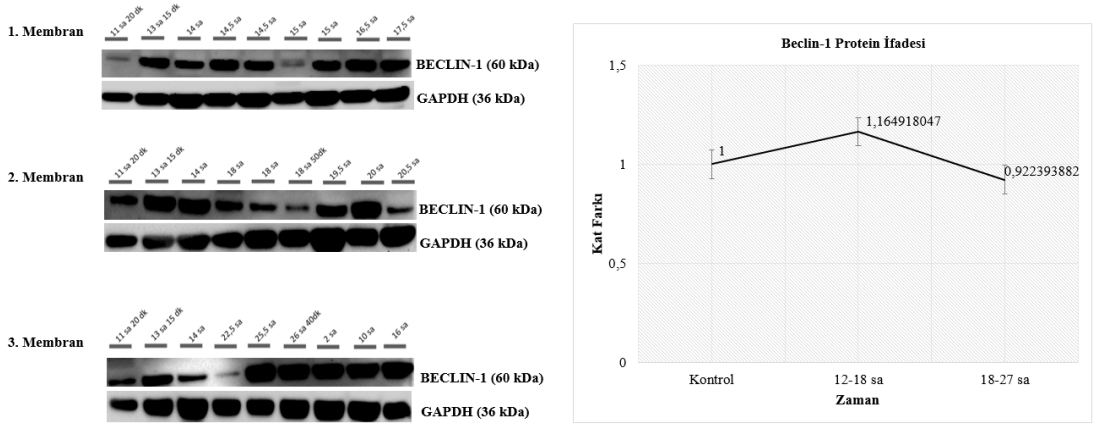



**Şekil 3.2.** Bax Western Blot Sonuçları

### 3.3. Beclin-1 Western Blot Bulguları

Otofaji belirteci Beclin-1 protein ekspresyonunun analizi için BECN1 (H-300): sc-11427 (Santa Cruz Bıotechnology) primer antikoru ve goat anti-rabbit IgG H&L (HRP, Santa Cruz Bıotechnology) sekonder antikoru kullanıldı.

Beclin-1 protein ifadesi kontrol grubuna göre 2. zamanda 1,16 kat artarken 3. zamanda 1,08 kat azalmaktadır. Beclin-1 2. zamana göre 3. zamanda 1,26 kat azalmaktadır (Şekil 3.3).

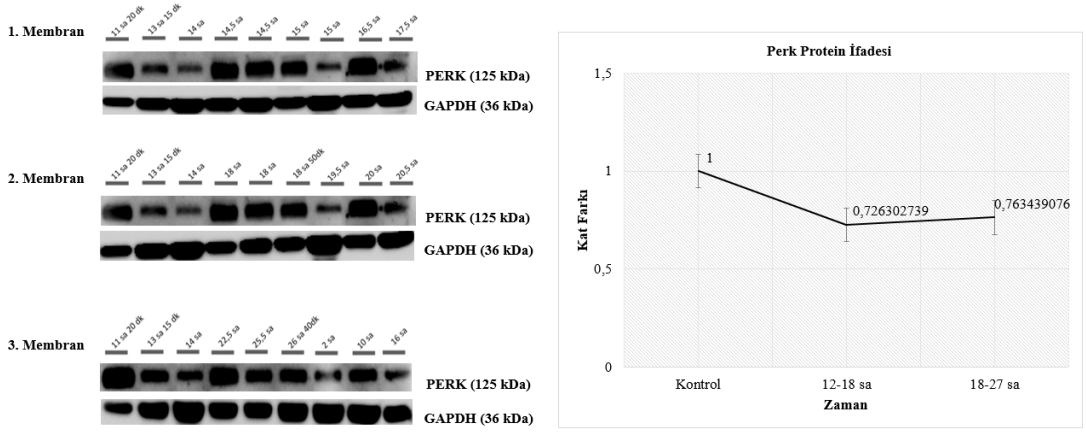



**Şekil 3.3.** Beclin-1 Western Blot Sonuçları

### 3.4. Perk Western Blot Bulguları

Perk protein ekspresyonunu saptamak için PERK (H-300): sc-13073 (Santa Cruz Bıotechnology) primer antikoru ve goat anti-rabbit IgG H&L (HRP, Santa Cruz Bıotechnology) sekonder antikoru kullanıldı.

Perk protein ifadesi kontrol grubuna göre 2. zamanda 1,38 kat 3. zamanda 1,31 kat azalmaktadır. 2. zamana göre Perk protein ifadesi 3. zamanda 1,05 kat artmaktadır (Şekil 3.4).

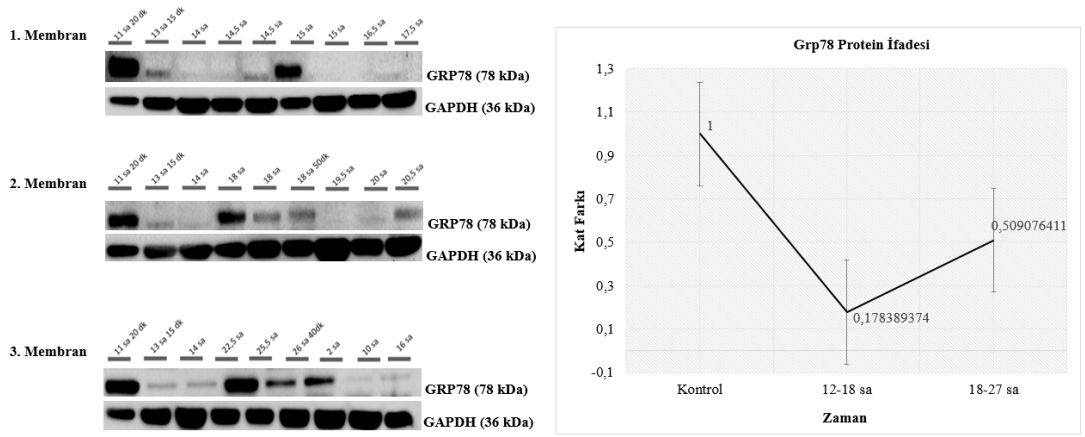



**Şekil 3.41.** Perk Western Blot Sonuçları

### 3.5. Grp78 Western Blot Bulguları

ER Stress belirteçlerinden biri olan Grp78 ekspresyonunun tespiti için GRP 78 (N-20): sc-1050 (Santa Cruz Bıotechnology) primer antikoru ve goat anti-rabbit IgG H&L (HRP, Santa Cruz Bıotechnology) sekonder antikoru kullanıldı.

Grp78 protein ifadesi şekil 3.5'te görüldüğü gibi kontrol grubuna göre 2. zamanda 5,88 kat 3. zamanda 2 kat azalmaktadır. 2. zamana göre Grp78 protein ifadesi 3. zamanda 2,94 kat artmaktadır.




**Şekil 3.5.** Grp78 Western Blot Sonuçları

### 3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS paket programı kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıkları incelemek için parametrik olmayan Kruskal-Wallis Testi ve Mann Whitney Testi, belirteçlerin zaman aralıklarında ki ifade farkı parametrik tek yönlü varyans analizi ANOVA ve T Testi uygulanmıştır. Test sonuçlarında $p \leq 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Post mortem doku örnekleri 3 zaman aralığında (Çizelge 3.1) ve 4 farklı kategoride incelenmiştir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.1.** Zaman Aralıkları

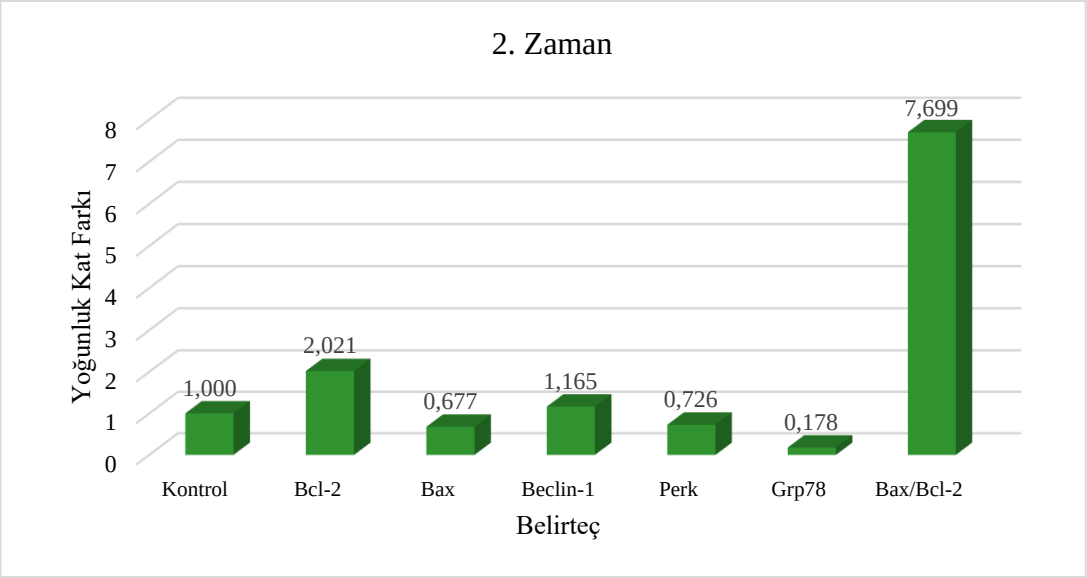
| Zaman Aralığı | Kontrol (ilk 12 saat) | 1.Zaman: 12-18 saat | 2.Zaman: 18-27 saat |
|---|---|---|---|
| **Vaka Sayısı** | 3 | 9 | 9 |

**Çizelge 3.2.** Analiz Kategorileri ve Özellikleri

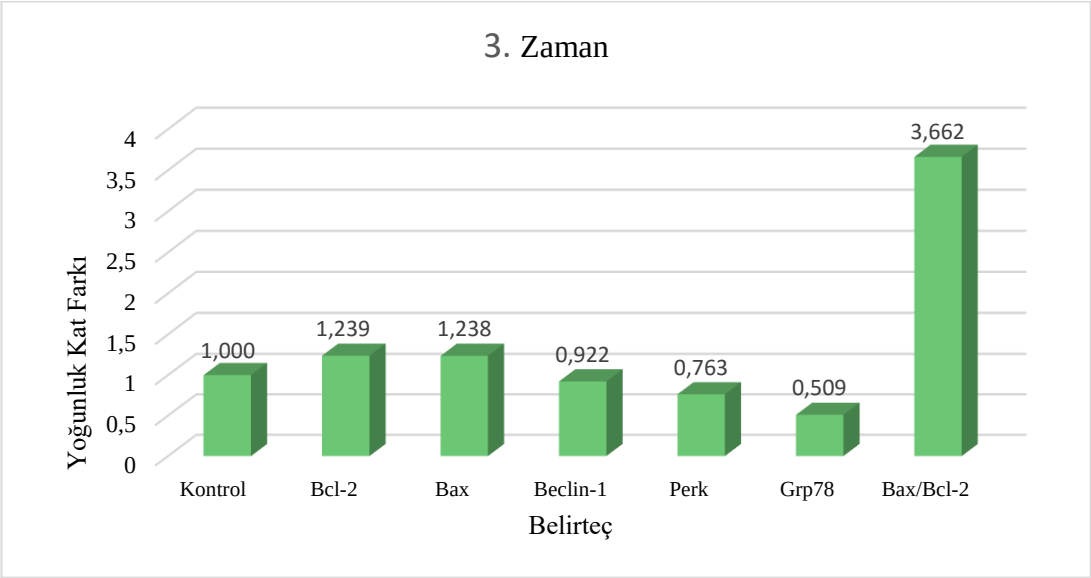
| Kategorileri | Özellikleri |
|---|---|
| **1.Genel Grup** | 21 vaka |
| **2.Hastanede Yatanlar** | 2-67 gün hastanede yatan 7 vaka |
| **3.Ani Ölüm-1** | Kalp damar hastalığı tanısı olan 13 vaka |
| **4.Ani Ölüm-2** | Kalp damar hastalığı tanısı olmayan 10 vaka |

#### 3.6.1. Genel Grup Değerlendirmesi ve İstatistiksel Analiz Sonuçları

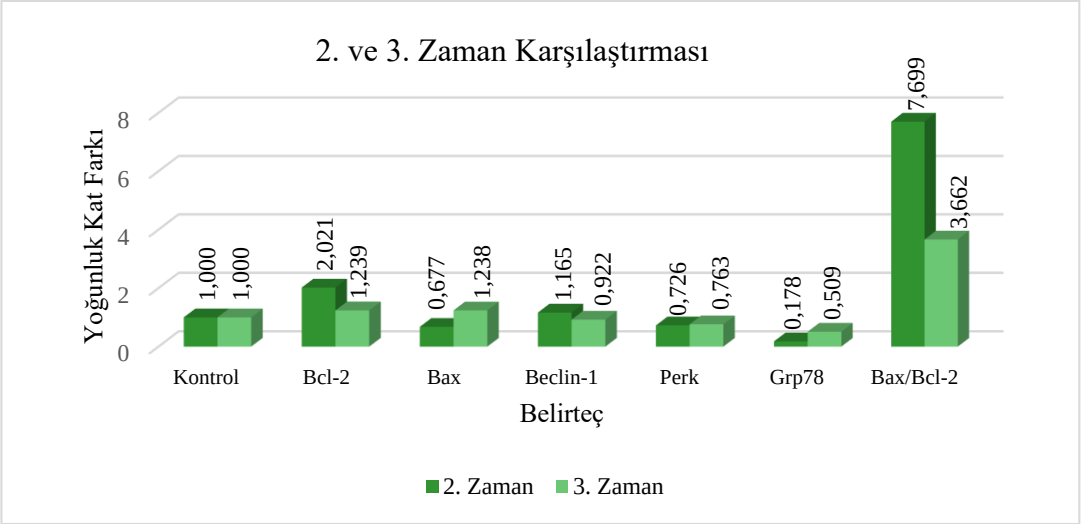
Belirteçlere ait western blot ile elde ettiğimiz bantlardaki protein yoğunluğunun kontrole ve zamana bağlı kat farkları tespit edilmiş 2. zaman verileri şekil 3.6'da, 3. zaman verileri şekil 3.7'de, 2. ve 3. zaman karşılaştırması şekil 3.8'de verilmiştir.




**Şekil 3.6.** Genel Grup Belirteç - 2. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi




**Şekil 3.7.** Genel Grup Belirteç - 3. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi




**Şekil 3.8.** Genel Grup Belirteç - Zaman Karşılaştırmalı Yoğunluk Kat İlişkisi

Grubun analiz edilen belirteçlere göre genel değerlendirmesi çizelge 3.3'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Genel Grup Değerlendirmesi

| Gruplar | | BCL-2 | Bax | Bax/Bcl-2 | Beclin-1 | PERK | GRP78 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **0-12 saat** | Ortalama | ,075±,020 | ,130±,100 | ,903±,583 | ,495±,190 | ,509±,436 | ,242±,336 |
| | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | Minimum | ,053 | ,061 | ,536 | ,279 | ,238 | ,0225 |
| | Maksimum | ,094 | ,246 | 1,575 | ,642 | 1,013 | ,629 |
| **12-18 saat** | Ortalama | ,152±,060 | ,088±,084 | 6,955±6,211 | ,577±,197 | ,370±,259 | ,043±,020 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| | Minimum | ,059 | ,027 | 1,210 | ,178 | ,125 | ,022 |
| | Maksimum | ,242 | ,284 | 16,969 | ,849 | 1,009 | ,075 |
| **18-27 saat** | Ortalama | ,093±,081 | ,161±,074 | 3,306±7,339 | ,456±,400 | ,389±,160 | ,123±,080 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| | Minimum | ,027 | ,045 | ,236 | ,112 | ,085 | ,019 |
| | Maksimum | ,298 | ,269 | 22,805 | 1,251 | ,617 | ,223 |
| **Total** | Ortalama | ,116±,072 | ,125±,085 | 4,528±6,504 | ,513±,294 | ,398±,241 | ,106±,136 |
| | N | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 | 21 |
| | Minimum | ,027 | ,027 | ,236 | ,112 | ,085 | ,019 |
| | Maksimum | ,298 | ,284 | 22,805 | 1,251 | 1,013 | ,629 |

Genel gruba Kruskal-Wallis testi uygulandığında Bcl-2 (p=0,037) ve Bax/Bcl-2 (p=0,012) belirteçlerinde anlamlı fark saptanmıştır (Çizelge 3.4).

**Çizelge 3.4.** Genel Grup Kruskal-Wallis Test Sonucu

| | BCL-2 | Bax | Bax/Bcl-2 | Beclin-1 | PERK | GRP78 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Anlamlılık (Asymp. Sig.) | **,037*** | ,091 | **,012*** | ,478 | ,542 | ,074 |

Anlamlılık tespit edilen Bcl-2 ve Bax/Bcl-2 belirteçlerinin zaman aralıklarına göre karşılaştırılması yapılmıştır. Bcl-2'nin 2. ve 3. zaman aralıklarında (p=0,020), Bax/Bcl-2'nin 1. ve 2. zaman aralıkları (p=0,044) ile 2. ve 3. zaman aralıklarında (p=0,006) anlamlı fark bulunmuştur (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5.** Genel Grubun Zaman Aralıklarına Göre Bcl-2 ve Bax/Bcl-2 Sonuçları

| | **Zaman** | **Anlamlılık** |
|---|---|---|
| **Bcl-2** | 1 – 2 | ,064 |
| | 1 – 3 | ,830 |
| | 2 – 3 | **,020*** |
| **Bax/Bcl-2** | 1 – 2 | **,044*** |
| | 1 – 3 | ,957 |
| | 2 – 3 | **,006*** |

Zaman aralıklarına göre belirteçlerin ilişki derecesini ölçmek için Spearman's Rho testi uygulanarak belirteçlerin korelasyonları hesaplandı. Elde edilen korelasyon katsayıları (r) -1 ile +1 arasında olup sonucun -1'e yakın olması güçlü negatif ilişkinin varlığını, +1'e yakın olması ise güçlü pozitif ilişkinin varlığını göstermektedir.

Kontrol grubu olan 1.zaman aralığında Beclin-1'in, Bcl-2 ve Grp78 ile kuvvetli negatif ilişkisi Grp78'in, Bax ile kuvvetli pozitif ilişkisi Bax'ın, Bax/Bcl-2 ile kuvvetli negatif Perk ile kuvvetli pozitif ilişkisi ve Perk ile Bax/Bcl-2 arasında kuvvetli negatif ilişki olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.6).

**Çizelge 3.6.** Kontrol Grubunun Belirteçler Arası Korelasyon Sonuçları

| GRUP | | BCL-2 | Bax | Bax/Bcl-2 | Beclin-1 | Perk | Grp78 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BCL-2** | r | 1,000 | ,500 | -,500 | **-1,000**** | ,500 | **1,000**** |
| | p | . | ,667 | ,667 | . | ,667 | . |
| | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| **Bax** | r | ,500 | 1,000 | **-1,000**$^{**}$ | -,500 | **1,000**** | ,500 |
| | p | ,667 | . | . | ,667 | . | ,667 |
| | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| **Bax/Bcl-2** | r | -,500 | **-1,000**$^{**}$ | 1,000 | ,500 | **-1,000**$^{**}$ | -,500 |
| | p | ,667 | . | . | ,667 | . | ,667 |
| | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| **Beclin-1** | r | **-1,000**$^{**}$ | -,500 | ,500 | 1,000 | -,500 | **-1,000**** |
| | p | . | ,667 | ,667 | . | ,667 | . |
| | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| **Perk** | r | ,500 | **1,000**$^{**}$ | **-1,000**$^{**}$ | -,500 | 1,000 | ,500 |
| | p | ,667 | . | . | ,667 | . | ,667 |
| | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| **Grp78** | r | **1,000**$^{**}$ | ,500 | -,500 | **-1,000**$^{**}$ | ,500 | 1,000 |
| | p | . | ,667 | ,667 | . | ,667 | . |
| | N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

r: korelasyon katsayısı, p: 2 kuyruklu anlamlılık, N: örnek sayısı, **p değerinin 0.01 düzeyindeki anlamlı korelasyonunu göstermektedir.

2.zaman aralığında Bcl-2 ile Grp78 arasında kuvvetli negatif ilişki tespit edilmiştir (Çizelge 3.7).

**Çizelge 3.7.** Örneklerin 2. Zaman Aralığında Belirteçler Arası Korelasyon Sonuçları

| GRUP | | BCL-2 | Bax | Bax/Bcl-2 | Beclin-1 | Perk | Grp78 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BCL-2** | r | 1,000 | -,350 | ,067 | -,167 | -,317 | **-,833**** |
| | p | . | ,356 | ,865 | ,668 | ,406 | ,005 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| **Bax** | r | -,350 | 1,000 | -,517 | ,133 | ,000 | ,600 |
| | p | ,356 | . | ,154 | ,732 | 1,000 | ,088 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| **Bax/Bcl-2** | r | ,067 | -,517 | 1,000 | -,117 | ,450 | -,050 |
| | p | ,865 | ,154 | . | ,765 | ,224 | ,898 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| **Beclin-1** | r | -,167 | ,133 | -,117 | 1,000 | -,283 | ,117 |
| | p | ,668 | ,732 | ,765 | . | ,460 | ,765 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| **Perk** | r | -,317 | ,000 | ,450 | -,283 | 1,000 | ,533 |
| | p | ,406 | 1,000 | ,224 | ,460 | . | ,139 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| **Grp78** | r | **-,833**$^{**}$ | ,600 | -,050 | ,117$^{**}$ | ,533 | 1,000 |
| | p | ,005 | ,088 | ,898 | ,765 | ,139 | . |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |

3.zaman aralığında Beclin-1 ile Grp78 arasında negatif ilişki tespit edilmiştir (Çizelge 3.8).

**Çizelge 3.8.** Örneklerin 3. Zaman Aralığında Belirteçler Arası Korelasyon Sonuçları

| GRUP | | BCL-2 | Bax | Bax/Bcl-2 | Beclin-1 | Perk | Grp78 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BCL-2** | r | 1,000 | ,400 | ,250 | -,100 | -,117 | -,400 |
| | p | . | ,286 | ,516 | ,798 | ,765 | ,286 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| **Bax** | r | ,400 | 1,000 | -,550 | -,417 | ,283 | ,417 |
| | p | ,286 | . | ,125 | ,265 | ,460 | ,265 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| **Bax/Bcl-2** | r | ,250 | -,550 | 1,000 | -,083 | -,333 | -,383 |
| | p | ,516 | ,125 | . | ,831 | ,381 | ,308 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| **Beclin-1** | r | -,100 | -,417 | -,083 | 1,000** | -,283 | **-,667*** |
| | p | ,798 | ,265 | ,831 | . | ,460 | ,050 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| **Perk** | r | -,117 | ,283 | -,333 | -,283 | 1,000** | ,500 |
| | p | ,765 | ,460 | ,381 | ,460 | . | ,170 |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| **Grp78** | r | -,400 | ,417 | -,383 | **-,667*** | ,500 | 1,000 |
| | p | ,286 | ,265 | ,308 | ,050 | ,170 | . |
| | N | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |

*p değerinin 0.05 düzeyindeki anlamlı korelasyonunu göstermektedir.

Ayrıca belirteç/kontrol oranları T-Test ile analiz edilmiş ve genel bilgileri çizelge 3.9'da verilmiştir.

**Çizelge 3.9.** Belirteçlere Ait T-Test Genel Bilgileri

| Belirteç | Zaman Aralığı | N | Ortalama |
|---|---|---|---|
| **BCL-2** | 12-18 Sa | 9 | 2,021±,797 |
| | 18-27 Sa | 9 | 1,239±1,077 |
| **Bax** | 12-18 Sa | 9 | ,677±,643 |
| | 18-27 Sa | 9 | 1,237±,569 |
| **Bax/Bcl-2** | 12-18 Sa | 9 | 7,698±6,875 |
| | 18-27 Sa | 9 | 3,662±8,123 |
| **Beclin-1** | 12-18 Sa | 9 | 1,164±,397 |
| | 18-27 Sa | 9 | ,922±,809 |
| **Perk** | 12-18 Sa | 9 | ,726±,508 |
| | 18-27 Sa | 9 | ,763±,315 |
| **Grp78** | 12-18 Sa | 9 | ,178±,085 |
| | 18-27 Sa | 9 | ,509±,330 |

T-Testi sonuçlarına göre 2. zaman aralığında Bcl-2 (p=0,005), Bax / Bcl-2 (p=0,019) ve Grp78 (p=0) belirteçlerinde, 3. zaman aralığında Perk (p=0,055) ve Grp78 (p=0,002) belirteçlerinde anlamlı fark tespit edilmiştir (Çizelge 3.10). 3. zaman aralığında tespit edilen p=0,055 Perk değeri sınırda olması dolayısıyla anlamlı kabul edilmiştir.

**Çizelge 3.10.** Belirteçlere Ait T-Testi Sonuçları

| Belirteç | | Test Değeri=1 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 Kuyruklu Anlamlılık | Ortalama Fark | 95% Güven Aralığı | |
| **BCL-2** | 12-18 Sa | **,005*** | 1,021 | ,408 | 1,634 |
| | 18-27 Sa | ,524 | ,239 | -,588 | 1,067 |
| **Bax** | 12-18 Sa | ,171 | -,322 | -,817 | -,172 |
| | 18-27 Sa | ,245 | ,237 | -,199 | -,675 |
| **Bax/Bcl-2** | 12-18 Sa | **,019*** | 6,698 | 1,413 | 11,983 |
| | 18-27 Sa | ,354 | 2,662 | -3,581 | 8,906 |
| **Beclin-1** | 12-18 Sa | ,249 | ,164 | -,140 | -,470 |
| | 18-27 Sa | ,781 | -,077 | -,699 | -,544 |
| **Perk** | 12-18 Sa | ,145 | -,273 | -,664 | ,116 |
| | 18-27 Sa | **,055*** | -,236 | -,478 | ,005 |
| **Grp78** | 12-18 Sa | **,000*** | -,821 | -,887 | -,756 |
| | 18-27 Sa | **,002*** | -,490 | -,744 | -,237 |

### 3.6.2. Kategorilerin Değerlendirmesi ve İstatistiksel Analiz Sonuçları

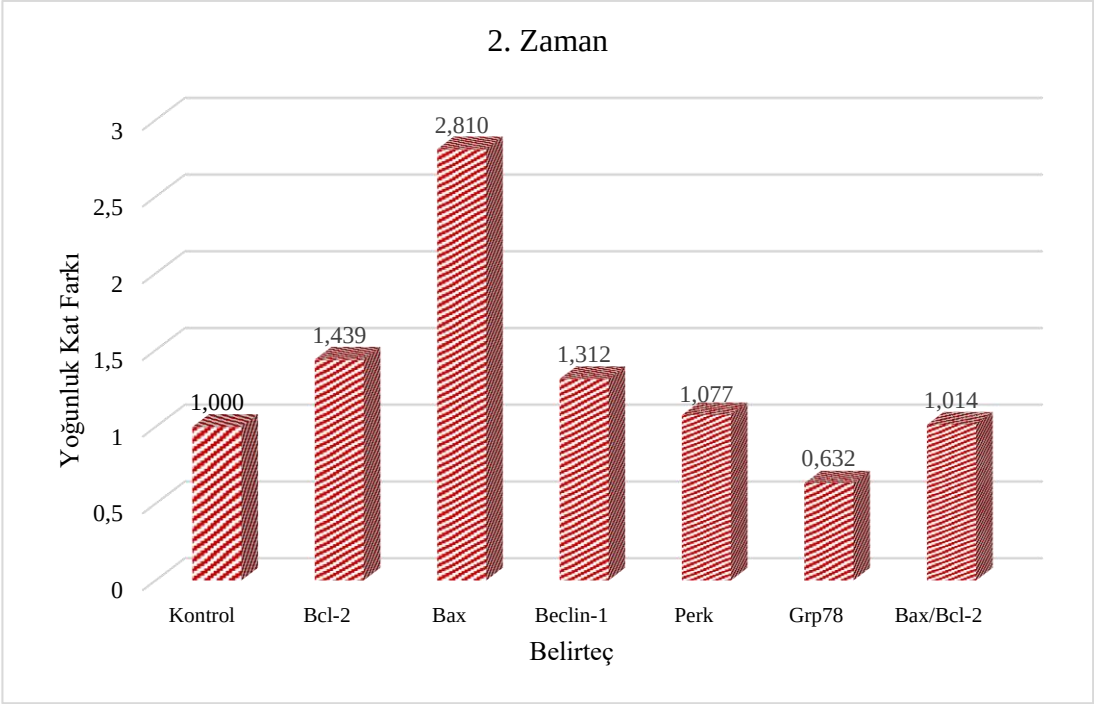
Genel Değerlendirmeyi takiben hastanede yatanlar ile ani ölüm-1 ve ani ölüm-2 kategorileri Mann-Whitney Testinde zaman aralıklarına göre karşılaştırmalı olarak incelendi ve anlamlı sonuç tespit edilemedi (p > 0,005) (Çizelge 3.11).

**Çizelge 3.11.** Kategorilerin Zamana Göre Mann-Withney Testi Sonuçları

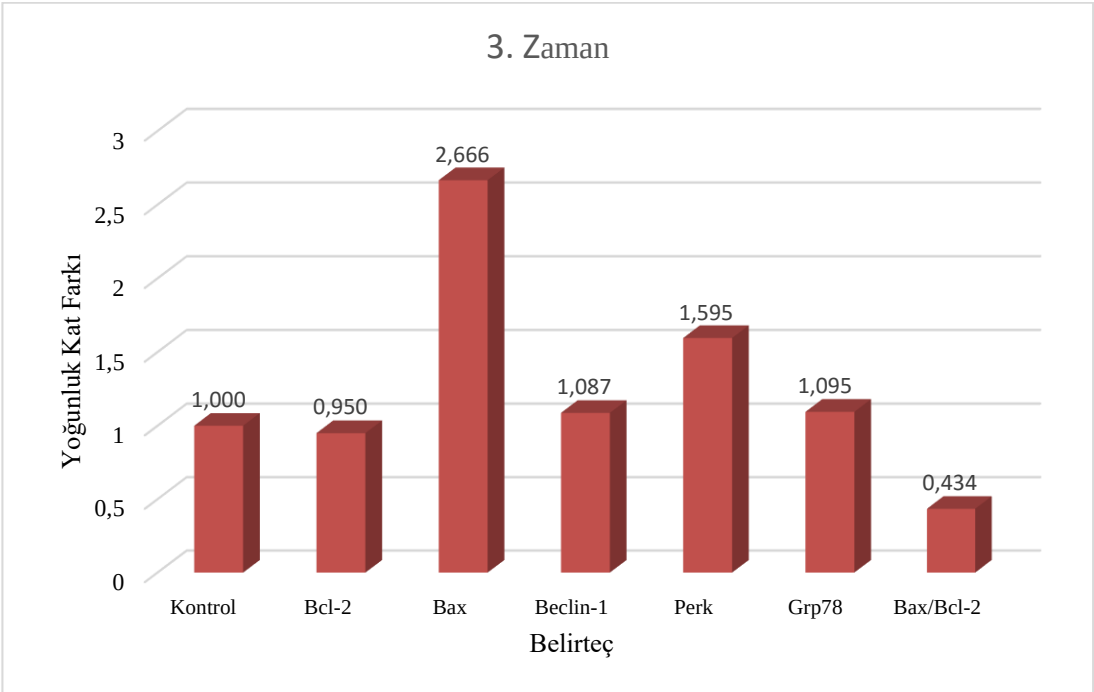
| Kategori ve Zaman Aralığı | | | Bcl-2 | Bax | Bax/Bcl-2 | Beclin-1 | Perk | Grp78 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hastanede Yatan ve Ani Ölüm-1 | Mann-Whitney U | 2,000 | 2,000 | ,000 | 1,000 | 5,000 | 2,000 |
| | | Wilcoxon W | 5,000 | 23,000 | 3,000 | 22,000 | 8,000 | 23,000 |
| | | Z | -1,333 | -1,333 | -2,000 | -1,667 | -,333 | -1,333 |
| | | 2 Kuyruklu Anlamlılık | ,182 | ,182 | ,046 | ,096 | ,739 | ,182 |
| | | Kesin Anlamlılık [2*(1-tailed Sig.)] | **,286[c]** | **,286[c]** | **,071[c]** | **,143[c]** | **,857[c]** | **,286[c]** |
| | Hastanede Yatan ve Ani Ölüm-1 | Mann-Whitney U | 9,000 | 10,000 | 6,000 | 5,000 | 9,000 | 5,000 |
| | | Wilcoxon W | 24,000 | 25,000 | 16,000 | 20,000 | 19,000 | 15,000 |
| | | Z | -,245 | ,000 | -,980 | -1,225 | -,245 | -1,225 |
| | | 2 Kuyruklu Anlamlılık | ,806 | 1,000 | ,327 | ,221 | ,806 | ,221 |
| | | Kesin Anlamlılık [2*(1-tailed Sig.)] | **,905[c]** | **1,000[c]** | **,413[c]** | **,286[c]** | **,905[c]** | **,286[c]** |
| | Hastanede Yatan ve Ani Ölüm-2 | Mann-Whitney U | 2,000 | 1,000 | ,000 | 1,000 | 3,000 | 2,000 |
| | | Wilcoxon W | 5,000 | 11,000 | 3,000 | 11,000 | 6,000 | 12,000 |
| | | Z | -,926 | -1,389 | -1,852 | -1,389 | -,463 | -,926 |
| | | 2 Kuyruklu Anlamlılık | ,355 | ,165 | ,064 | ,165 | ,643 | ,355 |
| | | Kesin Anlamlılık [2*(1-tailed Sig.)] | **,533[c]** | **,267[c]** | **,133[c]** | **,267[c]** | **,800[c]** | **,533[c]** |
| | Hastanede Yatan ve Ani Ölüm-2 | Mann-Whitney U | 9,000 | 10,000 | 6,000 | 5,000 | 9,000 | 5,000 |
| | | Wilcoxon W | 24,000 | 25,000 | 16,000 | 20,000 | 19,000 | 15,000 |
| | | Z | -,245 | ,000 | -,980 | -1,225 | -,245 | -1,225 |
| | | 2 Kuyruklu Anlamlılık | ,806 | 1,000 | ,327 | ,221 | ,806 | ,221 |
| | | Kesin Anlamlılık [2*(1-tailed Sig.)] | **,905[c]** | **1,000[c]** | **,413[c]** | **,286[c]** | **,905[c]** | **,286[c]** |

Kategorilerin 2. ve 3. zaman aralıklarında belirteç/kontrol oranı T-Test ile analiz edildi.

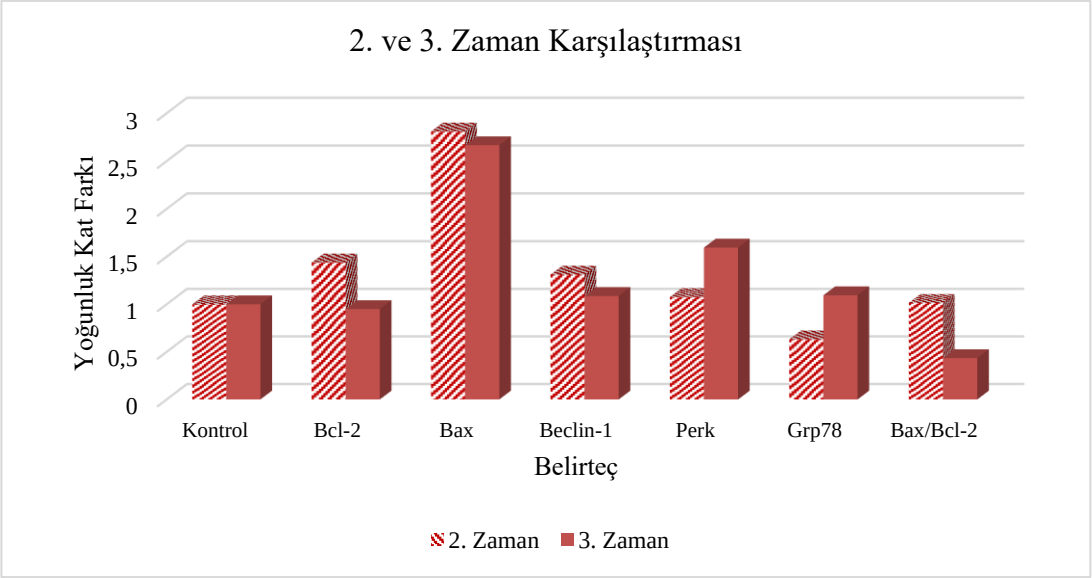
Hastanede yatanlar grubuna ait belirteçlerin western blot bantlarındaki protein yoğunluğunun kontrole ve zamana bağlı kat farkları tespit edilmiş 2. zaman verileri şekil 3.9'da, 3. zaman verileri şekil 3.10'da, 2. ve 3. zaman karşılaştırması şekil 3.11'de verilmiştir.




**Şekil 3.9.** Hastanede Yatanlar Grubu Belirteç - 2. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi




**Şekil 3.10.** Hastanede Yatanlar Grubu Belirteç - 3. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi




**Şekil 3.11.** Hastanede Yatanlar Grubu Belirteç - Zaman Karşılaştırmalı Yoğunluk Kat İlişkisi

Hastane yatış öyküsü bulunan vakalara ait T-Testi genel bilgileri çizelge 3.12'de verilmiştir.

**Çizelge 3.12.** Hastane Yatış Öyküsü Bulunan Vakalara Ait T-Testi Genel Bilgileri

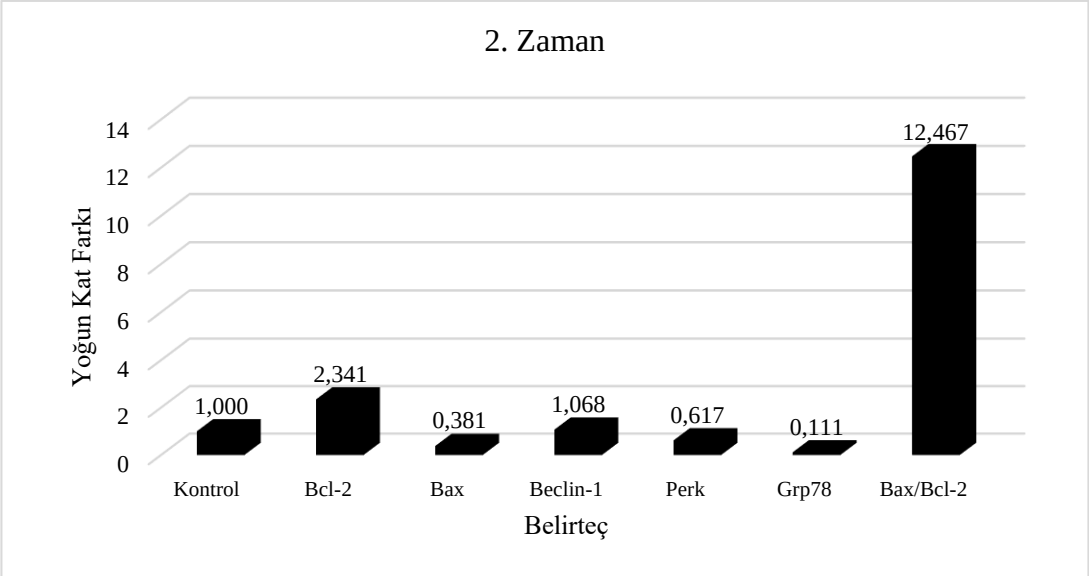
| Belirteç | Zaman Aralığı | N | Ortalama |
|---|---|---|---|
| **BCL-2** | 12-18 Sa | 2 | 1,495±,393 |
| | 18-27 Sa | 4 | ,986±,430 |
| **Bax** | 12-18 Sa | 2 | 1,326±1,208 |
| | 18-27 Sa | 4 | 1,258±,345 |
| **Bax/Bcl-2** | 12-18 Sa | 2 | 1,769±,608 |
| | 18-27 Sa | 4 | ,757±,433 |
| **Beclin-1** | 12-18 Sa | 2 | 1,495±,309 |
| | 18-27 Sa | 4 | 1,238±1,048 |
| **Perk** | 12-18 Sa | 2 | ,503±,364 |
| | 18-27 Sa | 4 | ,746±,245 |
| **Grp78** | 12-18 Sa | 2 | ,197±,009 |
| | 18-27 Sa | 4 | ,341±,201 |

Hastane yatış öyküsü bulunan vakaların T-Testi sonuçlarında 2. zaman (p=0,05) ve 3. zaman (p=0,07) aralığında kontrole göre Grp78 belirtecinde anlamlı fark tespit edilmiştir (Çizelge 3.13).

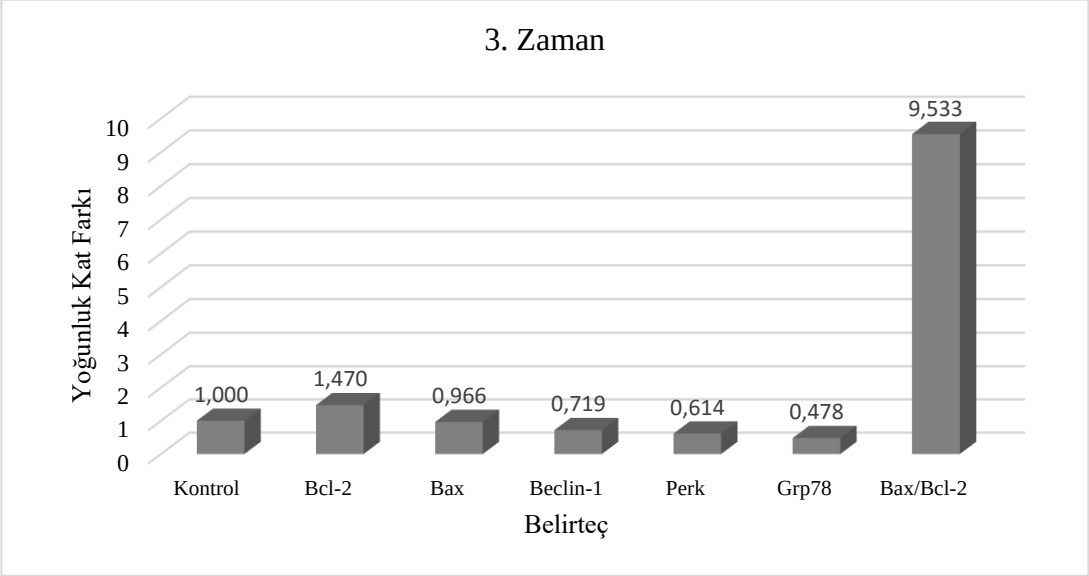
**Çizelge 3.13.** Hastane Yatış Öyküsü Bulunan Vakalara Ait T-Testi Sonuçları

| Belirteç | | Test Değeri=1 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 2 Kuyruklu Anlamlılık | Ortalama Fark | 95%Güven Aralığı |
| **BCL-2** | **12-18 Sa** | ,326 | ,495 | -3,035 _ 4,026 |
| | **18-27 Sa** | ,954 | -,013 | -,697 _,670 |
| **Bax** | **12-18 Sa** | ,768 | ,326 | -10,527 _ 11,179 |
| | **18-27 Sa** | ,231 | ,258 | -,290 _,807 |
| **Bax/Bcl-2** | **12-18 Sa** | ,325 | ,769 | -4,696 _ 6,234 |
| | **18-27 Sa** | ,345 | -,242 | -,932 _,447 |
| **Beclin-1** | **12-18 Sa** | ,265 | ,495 | -2,288 _ 3,278 |
| | **18-27 Sa** | ,680 | ,238 | -1,429 _ 1,907 |
| **Perk** | **12-18 Sa** | ,305 | -,496 | -3,767 _ 2,774 |
| | **18-27 Sa** | ,131 | -,253 | -,644 _,136 |
| **Grp78** | **12-18 Sa** | **,005*** | -,802 | -,888 _ -,716 |
| | **18-27 Sa** | **,007*** | -,658 | -,979 _ -,337 |

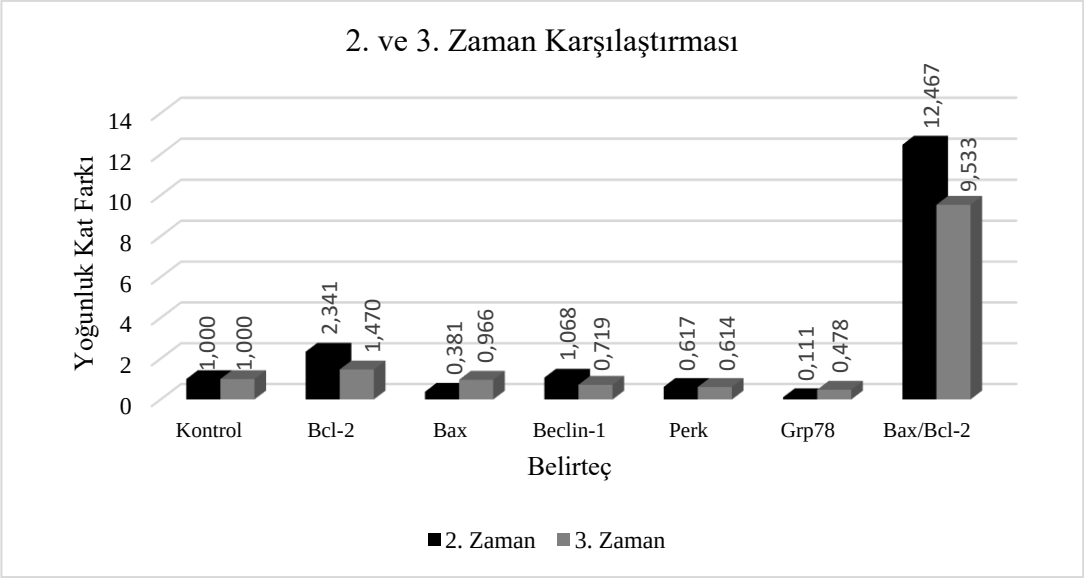
Ani ölüm-1 grubuna ait belirteçlerin western blot bantlarındaki protein yoğunluğunun kontrole ve zamana bağlı kat farkları tespit edilmiş, 2. zaman verileri şekil 3.12'de, 3. zaman verileri şekil 3.13'de, 2. ve 3. zaman karşılaştırması şekil 3.14'de verilmiştir.




**Şekil 3.12.** Ani Ölüm-1 Grubu Belirteç - 2. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi




**Şekil 3.13.** Ani Ölüm-1 Grubu Belirteç - 3. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi




**Şekil 3.14.** Ani Ölüm-1 Grubu Belirteç - Zaman Karşılaştırmalı Yoğunluk Kat İlişkisi

Ani ölüm-1 vakalarına ait T-Testi genel bilgileri çizelge 3.14'de verilmiştir.

**Çizelge 3.14.** Ani Ölüm-1 Vakalarına Ait T-Testi Genel Bilgileri

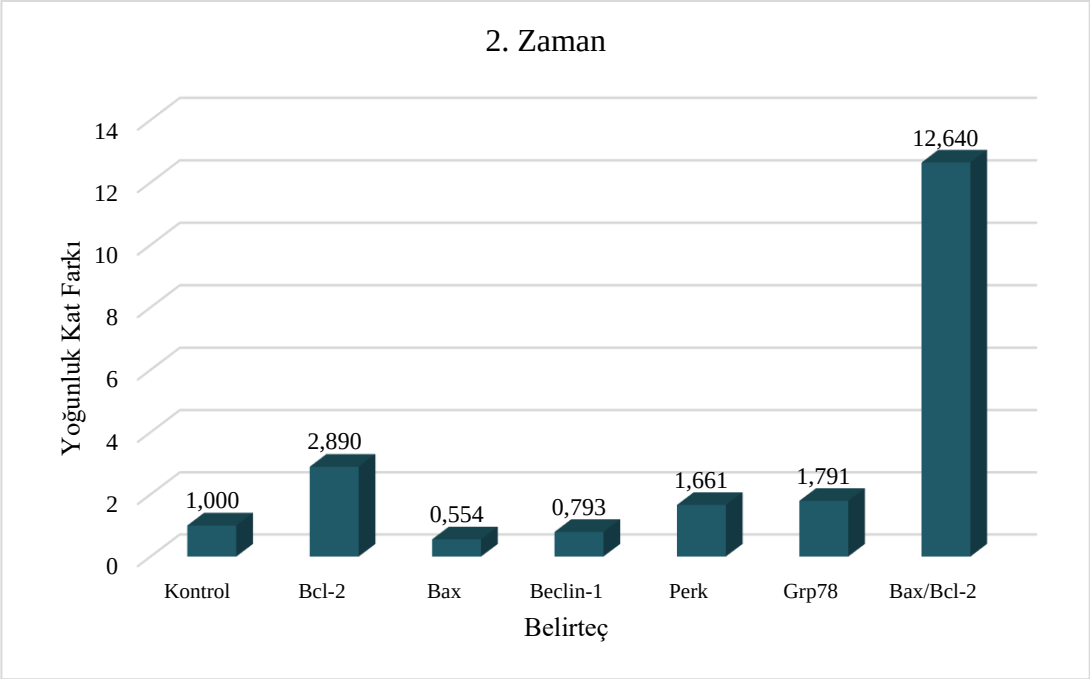
| Belirteç | Zaman Aralığı | N | Ortalama |
|---|---|---|---|
| **BCL-2** | 12-18 Sa | 6 | 2,295±,846 |
| | 18-27 Sa | 5 | 1,441±1,437 |
| **Bax** | 12-18 Sa | 6 | ,481±,392 |
| | 18-27 Sa | 5 | 1,221±,746 |
| **Bax/Bcl-2** | 12-18 Sa | 6 | 7,828±6,075 |
| | 18-27 Sa | 5 | 5,986±10,800 |
| **Beclin-1** | 12-18 Sa | 6 | ,993±,358 |
| | 18-27 Sa | 5 | ,669±,552 |
| **Perk** | 12-18 Sa | 6 | ,780±,600 |
| | 18-27 Sa | 5 | ,777±,391 |
| **Grp78** | 12-18 Sa | 6 | ,149±,082 |
| | 18-27 Sa | 5 | ,642±,370 |

Ani ölüm-1 vakalarına ait T-Testi sonuçlarına göre 2. zaman aralığında Bcl-2 (p=0,013), Bax (p=0,033), Bax/Bcl-2 (p=0,040) ve Grp78 (p=0) belirteçlerinde anlamlı fark bulunmuştur (Çizelge 3.15).

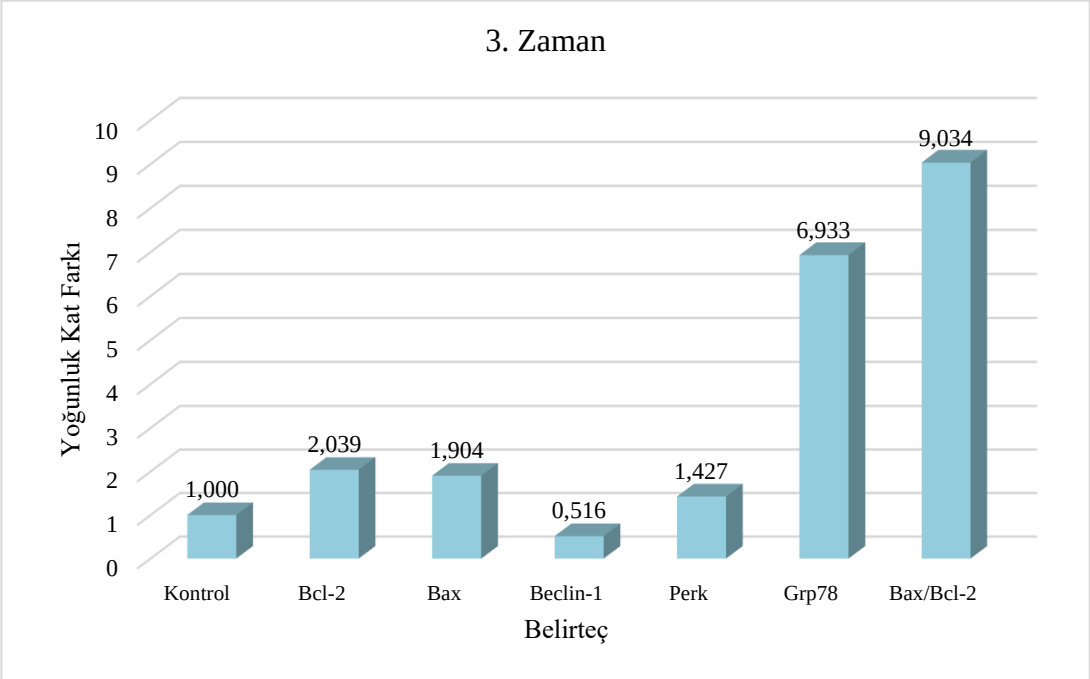
**Çizelge 3.15.** Ani Ölüm-1 Vakalarına Ait T-Testi Sonuçları

| Belirteç | | Test Değeri=1 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 2 Kuyruklu Anlamlılık | Ortalama Fark | 95%Güven Aralığı |
| BCL-2 | 12-18 Sa | **,013*** | 1,295 | ,407 _ 2,183 |
| | 18-27 Sa | ,530 | ,441 | -1,344 _ 2,226 |
| Bax | 12-18 Sa | **,023*** | -,518 | -,930 _ -,107 |
| | 18-27 Sa | ,543 | ,221 | -,705 _ 1,149 |
| Bax/Bcl-2 | 12-18 Sa | **,040*** | 6,828 | ,452 _ 13,203 |
| | 18-27 Sa | ,360 | 4,986 | -8,424 _ 18,396 |
| Beclin-1 | 12-18 Sa | ,968 | -,006 | -,382 _,369 |
| | 18-27 Sa | ,252 | -,330 | -1,016 _,355 |
| Perk | 12-18 Sa | ,412 | -,219 | -,849 _,410 |
| | 18-27 Sa | ,272 | -,222 | -,709 _,263 |
| Grp78 | 12-18 Sa | **,000*** | -,850 | -,937 _ -,763 |
| | 18-27 Sa | ,097 | -,357 | -,817 _,103 |

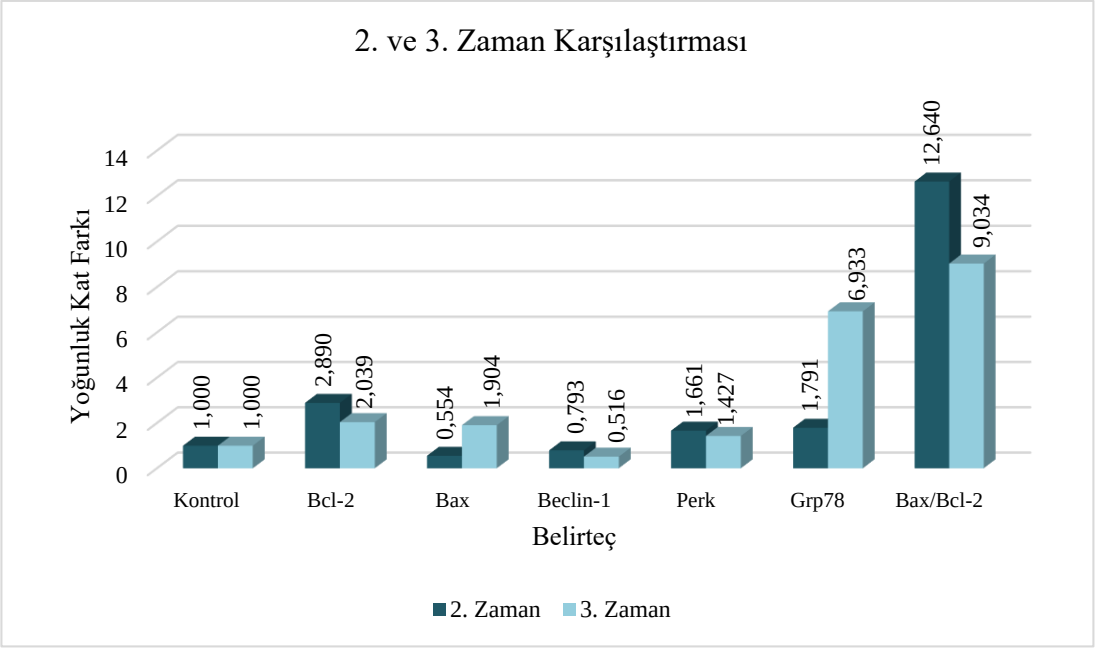
Ani ölüm-2 grubuna ait belirteçlerin western blot bantlarındaki protein yoğunluğunun kontrole ve zamana bağlı kat farkları tespit edilmiş, 2. zaman verileri şekil 3.15'de, 3. zaman verileri şekil 3.16'da, 2. ve 3. zaman karşılaştırması şekil 3.17'de verilmiştir.




**Şekil 3.15.** Ani Ölüm-2 Grubu Belirteç - 2. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi




**Şekil 3.16.** Ani Ölüm-2 Grubu Belirteç - 2. Zaman Yoğunluk Kat İlişkisi




**Şekil 3.17.** Ani Ölüm-2 Grubu Belirteç - Zaman Karşılaştırmalı Yoğunluk Kat İlişkisi

Ani ölüm-2 vakalarına ait T-Testi genel bilgileri çizelge 3.16'da verilmiştir.

**Çizelge 3.16.** Ani Ölüm-2 Vakalarına Ait T-Testi Genel Bilgileri

| Belirteç | Zaman Aralığı | N | Ortalama |
|---|---|---|---|
| **BCL-2** | 12-18 Sa | 4 | 2,042±,907 |
| | 18-27 Sa | 5 | 1,441±1,437 |
| **Bax** | 12-18 Sa | 4 | ,355±,102 |
| | 18-27 Sa | 5 | 1,221±,746 |
| **Bax/Bcl-2** | 12-18 Sa | 4 | 8,375±7,143 |
| | 18-27 Sa | 5 | 5,986±10,800 |
| **Beclin-1** | 12-18 Sa | 4 | 1,028±,456 |
| | 18-27 Sa | 5 | ,669±,552 |
| **Perk** | 12-18 Sa | 4 | ,904±,722 |
| | 18-27 Sa | 5 | ,777±,391 |
| **Grp78** | 12-18 Sa | 4 | ,166±,100 |
| | 18-27 Sa | 5 | ,642±,370 |

Ani ölüm-2 vakalarına ait T-Testi sonuçlarına göre 2. zaman aralığında Bax (p=0,001) ve Grp78 (p=0) belirteçlerinde anlamlı fark bulunmuştur (Çizelge 3.17).

**Çizelge 3.17.** Ani Ölüm-2 Vakalarına Ait T-Testi Sonuçları

| Belirteç | | Test Değeri=1 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **2 Kuyruklu Anlamlılık** | **Ortalama Fark** | **95% Güven Aralığı** |
| **BCL-2** | **12-18 Sa** | ,105 | 1,042 | -,402 _ 2,487 |
| | **18-27 Sa** | ,530 | ,441 | -1,344 _ 2,226 |
| **Bax** | **12-18 Sa** | **,001*** | -,644 | -,808 _ -,481 |
| | **18-27 Sa** | ,543 | ,221 | -,705 _ 1,149 |
| **Bax/Bcl-2** | **12-18 Sa** | ,131 | 7,375 | -3,991 _ 18,743 |
| | **18-27 Sa** | ,360 | 4,986 | -8,424 _ 18,396 |
| **Beclin-1** | **12-18 Sa** | ,909 | ,028 | -,697 _,754 |
| | **18-27 Sa** | ,252 | -,3308 | -1,016 _,355 |
| **Perk** | **12-18 Sa** | ,809 | -,095 | -1,245 _1,054 |
| | **18-27 Sa** | ,272 | -,222 | -,709 _,263 |
| **Grp78** | **12-18 Sa** | **,000*** | -,833 | -,993 _-,674 |
| | **18-27 Sa** | ,097 | -,357 | -,817 _,103 |

# 4. TARTIŞMA

Ölüm zamanının tespiti adli bilimlerin en çetrefilli ve en çok araştırılan konuları arasında şüphesiz önemli bir yere sahiptir. Dünya genelinde yaygın olarak kullanılan sağlık bilimleri ile ilgili yayınların güncel olarak yer aldığı PubMed veri tabanında adli bilimler ve ölüm zamanı ile ilgili 2005-2016 yılları arasında yapılan yayın sayısının 4.12.2015 tarihli erişim sonuçları çizelge 4.1'de verilmiştir. 2016 yılı verileri yayın hakkı kazanmış çalışmalara aittir. Adli bilimler alanında yapılan yayınların 1/6'sı ölüm zamanı ile ilgili çalışmalardan oluşmaktadır. Ölüm zamanı konusu son 10 yılda stabil bir çalışma popülaritesi sahiptir. Bu popülarite tek başına konunun güncelliğinden ziyade ölüm zamanı tayini konusunda ki ihtiyaca dayanmaktadır.

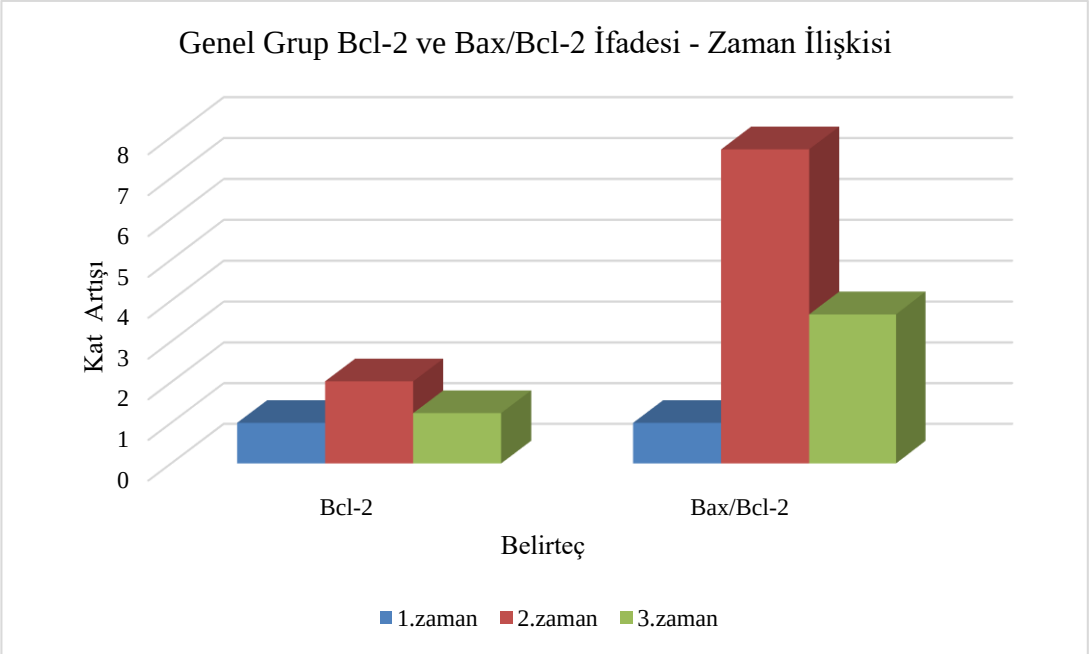
**Çizelge 4.1.** 2005-2016 Yılları Arasında Adli Bilimler ve Ölüm Zamanı Konularında Yapılan Yayın Sayısı

| | **Adli Bilimler** | **Ölüm Zamanı** |
|---|---|---|
| **2016** | 15 | 8 |
| **2015** | 2827 | 461 |
| **2014** | 3676 | 580 |
| **2013** | 3480 | 565 |
| **2012** | 3533 | 542 |
| **2011** | 3262 | 499 |
| **2010** | 3513 | 490 |
| **2009** | 3776 | 450 |
| **2008** | 3260 | 468 |
| **2007** | 2975 | 432 |
| **2006** | 2884 | 436 |
| **2005** | 2819 | 445 |

Bu çalışmada ölüm zamanı tayini için dış etkenlerden mümkün mertebe uzak ve ölüm sonrası çürüme hızının ortalama olarak kabul edildiği postmortem psoas kası tercih edilmiştir. Apoptoz, otofaji, ER stres belirteçlerinin ölüm zamanına bağlı olarak gösterdikleri ifade değişimi ve birbirileri ile olan pozitif - negatif ilişkiler araştırılmıştır.

Somatik ölüm ile hücresel ölüm arasında gen ekspresyonunu duruncaya dek ürün oluşumu devam eder. Gen ekspresyonunun durması ile birlikte hücreler içinde bulundukları koşullara ve doku çeşidine bağlı olarak degrede olurlar. Gen ekspresyonunun ölümü takiben ne zaman durduğu ile ilgili bazı çalışmalar yürütülmekte hatta bu çalışmaların organ nakli yapılacak hastaların uyumluluğunun kontrol edilmesinde önemli bir parametre olabileceği düşünülmektedir. Dünya genelinde organ nakli için bekleyen hasta sayısı ve organ bağışı yapan kişi sayısı arasındaki fark dolayısıyla nakledilecek organın etkin değerlendirilmesi ve reddedilme ihtimalinin araştırılması içinde iyi bir parametre olabileceği düşünülmektedir (Guibert & ark, 2011).

Genel grupta Kruskal Wallis testi ile tespit ettiğimiz Bcl-2 (p=0,037) ve Bax/Bcl-2 (p=0,012) belirteçlerinin anlamlı ifade değişikliği moleküler düzeyde değerlendirdiğimizde doku bütünlüğünü korumak adına hücrenin apoptoza yönelmesi ile ilişkilidir. Bax/Bcl-2 oranı hücrede apoptoz varlığını tespit için önemli bir parametre olup genel grupta apoptoz varlığını göstermektedir. Bu grupta elde edilen bant hacminde Bcl-2/GAPDH yoğunluğu =0,106 iken (Bax/Bcl-2)/GAPDH yoğunluğu=3,722 olarak hesaplanmıştır. Bax/Bcl-2 ifadesinin Bcl-2 ifadesine göre 35 kat arttığı tespit edilmiştir. Genel grupta anlamlı ifade tespit ettiğimiz Bcl-2 ve Bax/Bcl-2 belirteçlerini zaman aralıkları bazında incelediğimizde 2. zamanda Bcl-2/GAPDH yoğunluğu=0,152 iken 3.zamanda Bcl-2/GAPDH yoğunluğu=0,093 olarak saptanmıştır. Özetle Bcl-2 ifadesi 2. zamandan 3.zamana 1,66 kat azalmaktadır. Kontrol grubunda (Bax/Bcl-2)/GAPDH yoğunluğu=0,903 iken 2. zamanda 7 kat artarak yoğunluk=6,955 olmuştur. 3. zamanda ise 2 kat azalarak yoğunluk=3,308 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



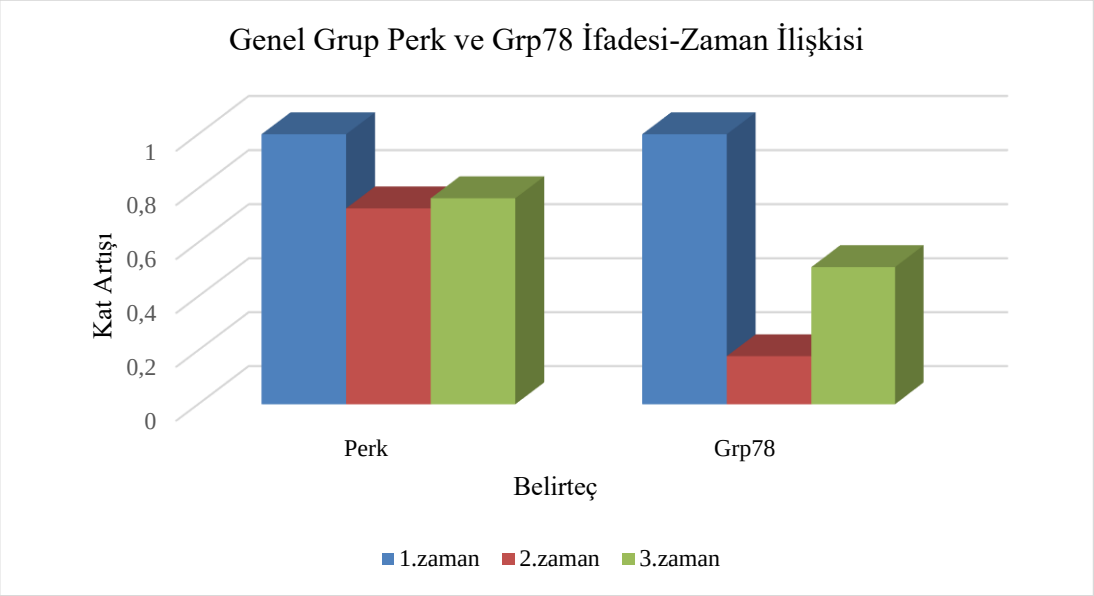

**Şekil 4.1.** Genel Grup Zamana Bağlı Bcl-2 ve Bax/Bcl-2 İfadesi Kat Artışı (Kruskal Wallis Testi)

Jarskog ve Gilmore çalışmalarında Bcl-2 ifadesinin insan frontal korteksinde ölümü takiben ilk 24 saatte anlamlı değişim göstermediğini tespit etmişlerdir (Jarskog & Gilmore, 2000). Aksine biz çalışmamızda Bcl-2 ifadesinin 12. saat öncesinde ve 18. saat sonrasında anlamlı derecede azaldığı tespit ettik. Jarskog ve ark. Bax/Bcl-2 oranını tespiti için yaptıkları çalışmada Şizofreni, Bipolar ve majör depresyon hastaları ile psikiyatrik hastalığı olmayan kişilerin (23-34 saat aralığında) temporal korteksinde Bax/Bcl-2 oranının Şizofreni hastalarında, bipolar ve majör depresyon hastaları ile normal kişilere göre %50 fazla olduğunu tespit etmişler ancak zamana göre değişime ilişkin bilgi vermemişler (Jarskog & ark, 2004). Biz de çalışma grubumuzda şizofreni tanısı bulunan 2 vakanın sonuçlarına detaylı olarak baktığımızda Jarskog ve ark.'nın çalışmaları ile uyumlu sonuçlar tespit ettik. Grubumuzda ki şizofreni hastalarına ait Bax/Bcl-2 oranı kontrole göre 1,9 kat artış göstermektedir ((Bax/Bcl-2)/GAPDH proteinin kontrol grubu yoğunluğu=0,903 şizofreni hastalarında ki protein yoğunluğu=1,744'dür).

Bu noktada genel grupta tespit ettiğimiz Bax/Bcl-2 ifadesinin 12. saatten itibaren takibindeki 6 saat içindeki artışı 12-18 saat zarfında da gen ekspresyonun

varlığı anlamı taşımaktadır. 18. saatten sonra Bax/Bcl-2 protein ifadesinin azalması gen ekspresyonunun azalması, durması, degredasyonun başlaması ya da diğer belirteçler tarafından baskılanması ile ilişkili olabilir.

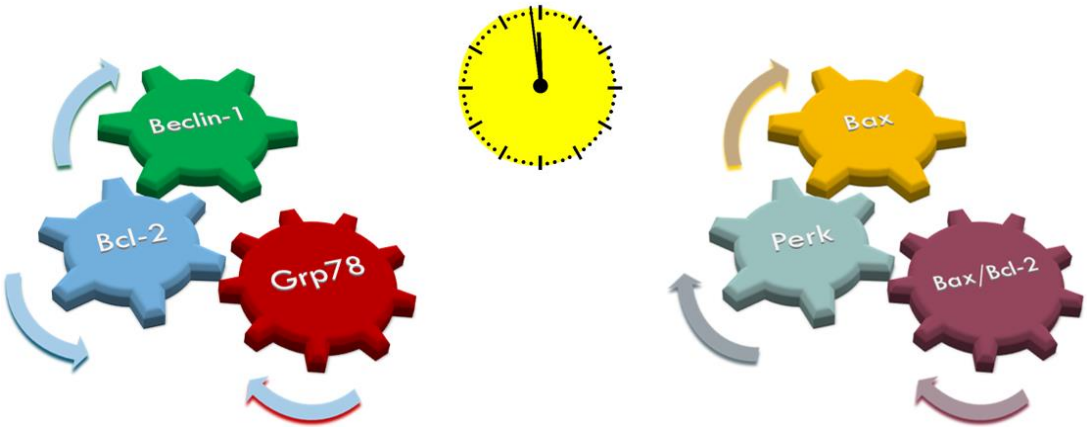
Genel grup T-Testi sonuçları da 2. zaman aralığında Kruskal –Wallis testi sonuçları ile örtüşmekte ve kontrole göre Bcl-2, Bax/Bcl-2 ifade değişimindeki anlamlılığı desteklemektedir. Ek olarak kontrol grubu Perk/GAPDH yoğunluğu=0,509 iken 1,37 kat azalarak 2. zamanda yoğunluğu=0,370'e 3. zamanda ise 1,30 kat azalarak yoğunluk=0,389'a tespit edilmiştir. Ayrıca kontrol grubu Grp78/GAPDH yoğunluğu=0,242'den 6 kat azalarak 2.zamanda yoğunluğu=0,043 olmuştur. 3. zamanda ise 2. zamana göre 2,8 artarak yoğunluğu=0,123 olarak saptanmıştır. GRP78 ifadesinin 3. zaman aralığındaki bu artış Perk proteinin yanı sıra bu çalışmada analiz etmediğimiz diğer UPR belirteçlerinden IRE-1 ve ATF6'nın aktivasyonu ile ilişkili olabilir (Şekil 4.2).




**Şekil 4.2.** Genel Grup Zamana Bağlı Perk ve Grp78 İfadesi Kat Artışı (T-Testi)

Korelasyon sonuçlarının hem bu çalışma hem de ileride yapılacak benzer çalışmalar için ehemmiyeti büyüktür. Çünkü belirteçler istatistiksel anlam aralığını yakalayamasa da diğer belirteçler ile aralarında var olan ilişkinin yönünü tespit etmek elde ettiğimiz verileri değerlendirmemize kolaylık sağlamaktadır. Tespit

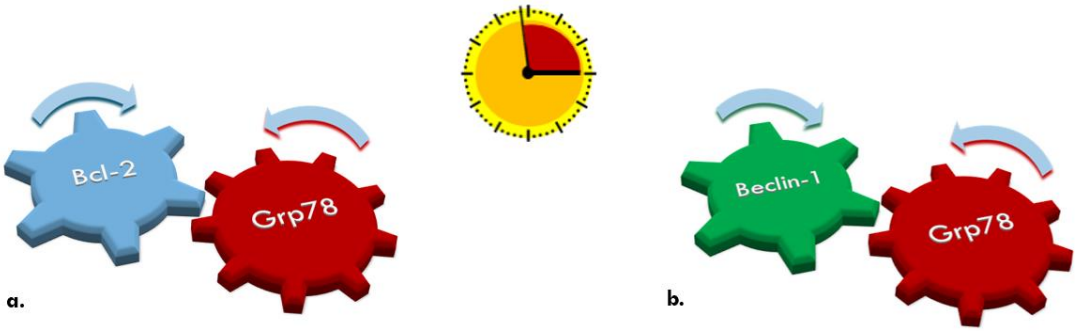
ettiğimiz belirteçler arası ilişki dişli çarklar arası ilişki gibidir (Şekil 4.3). Ölüm zamanı ilk 12 saat olan vakalarda Bcl-2 ve Grp78 artarken aralarındaki kuvvetli negatif ilişki dolayısıyla Beclin-1 azalmakta ve Beclin-1 artarken de Bcl-2 ile Grp78 ifadeleri azalmaktadır. Bu kuvvetli negatif ilişki Bcl-2'nin Beclin-1 ifadesini inhibe etmesi sonucu doğmaktadır. ER'da Grp78 aktivasyonu ile doğru orantıda Bax ifadesi de artar. Artan pro-apoptotik Bcl-2 üyelerinin ifadesi aynı şartlarda ki beclin-1 gibi otofaji belirteçlerinden daha fazla ifade olduğunda bu durum bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz Grp78 ile Beclin-1 arasındaki kuvvetli negatif ilişkiyi meydana getirir. ER stresi arttıkça katlanmamış protein cevabı yollarından Perk'in aktivasyonuda artar ve stres kontrol altına alınamayıp devam ettikçe Perk üzerinden apoptoz mekanizması duruma el koyar işte bu sebeple Perk'in artması Bax'ın artmasını tetikler ve aralarında ki kuvvetli pozitif ilişkiyi oluşturur.




**Şekil 4.3.** Kontrol Grubunda Belirteçler Arası Korelasyon İlişkisi

Ölüm zamanı 12-18 saat arasında olan vakaların korelasyon sonuçlarına göre ilk 12 saate kıyasla belirteçlerin ifadelerindeki değişim sonucu sadece Bcl-2 ve Grp78 arasında kuvvetli negatif ilişki saptanmıştır (Şekil 4.4). Dolayısıyla ölüm zamanı ilerledikçe ER stresinin artması ile Grp78 ifadesinin de arttığı ve Bcl-2'nin baskılanmaya devam ettiği düşünülebileceği gibi diğer UPR yolaklarının da aktivasyonu ile ifadesi fazla olan GRP78 degredasyon hızının Bcl-2'den daha yavaş olduğu düşünülebilir.

Ölüm zamanı 18-27 saat arasındaki vakalarda korelasyon sonuçlarına göre Grp78 ile Beclin-1 arasında kuvvetli olmasa da negatif bir ilişkinin varlığı (Şekil 4.4) azalan Bcl-2 ifadesinin Beclin-1'i inhibe etme kapasitesinde de azalmaya sebep olmasından kaynaklanabilir.




**Şekil 4.4.** Zaman Aralıklarına Göre Belirteçler Arası Korelasyon İlişkisi

a. 12-18 saat, b. 18-27 saat

Vakaları kategorilere ayırmakta amacımız sahip oldukları ortak özelliklerin bizim çalışmamızda etkin rolü olup olmadığını belirlemektir.

Hastane yatış öyküsü bulunan vakalarımızın hastanede yatarak tedavi olmalarını gerektiren sebepler homojen olmayıp geneli büyük travma kaynaklıdır. Hastane koşullarında hastaya uygulanan tedavi ve ilaçların araştırdığımız parametrelere etkisi olabilir ve hatta bu etki hastadan hastaya farklılıklar gösterebilir. Ancak bizim bu noktada esas araştırmak istediğimiz kişinin ölüm ile noktalanan süreç öncesi sürekli olarak yatmasının belirteçlerde değişime neden olup olmadığını analiz etmektir. Öte yandan sürekli kontrol altında bulunan hastaların ölüm zamanı tespiti malpraktis gibi istisnai durumlar haricinde sorun teşkil etmez. Hunter ve ark. ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada 7 gün boyunca hindlimb kaslarının hareket ettirilmemesine bağlı olarak iskelet kasına özgül kalsekuestrin (kalsiyum bağlayan protein) ifadesinde artış tespit etmişler ancak Grp78 ifadesinde anlamlı değişim saptayamamışlardır (Hunter & ark, 2001). Öte yandan Jian ve ark. yaptıkları çalışmada hemorajik travma hastalarında ER stresinin arttığını Grp78 ve Perk ifadesinde ki anlamlı artış ile saptamışlardır (Jian & ark, 2008). Biz çalışmamızda

hastane yatış öyküsü bulunan vakaların T-Testi sonuçlarında Grp78 ifadesinde kontrole göre 2. zaman aralığında 1,59 kat azalma, 3. zaman aralığında 1,13 kat ifade artışı tespit edilmiştir. Zamana bağlı Grp78 ifadesinde gördüğümüz bu dalgalanmanın sebebi 10 gün ve üzerinde yatarak tedavi gören vakaların ölüm zamanının 3.zaman aralığına dâhil olması olabilir (Grp78/GAPDH yoğunlukları; kontrol=0,075, 1. zaman=0,047, 2. zaman=0,082).

Ani ölüm-1 grubuna kalp-damar hastalık tanısı bulunan vakaları dâhil ettik çünkü kalp-damar hastalıklarında hastalığın seviyesine bağlı olarak apoptoz belirteçlerinde ifade farklılığı bilinmektedir. Hayakawa ve ark, damar sertliği olan hastalarda yaptıkları çalışma ile Bax ve Bax/Bcl-2 oranında anlamlı artış tespit etmişler (Hayakawa & ark, 1999). Biz de ani ölüm-1 grubunda kontrole kıyasla 2. zaman aralığında Bax/Bcl-2 oranı 12 kat artış tespit ettik ((Bax/Bcl-2)/GAPDH yoğunlukları; kontrol=0,567, 2. zaman=7,072). Ancak damar sertliği olan vakaların dışarıda tutulduğu ani ölüm-2 grubunda Bax/Bcl-2 ifadesinde ani ölüm-1 grubuna göre anlamlı değişim tespit edemedik.

Ani ölüm-2 grubunda kontrole oranla 2. zaman aralığında Bax ifadesinin 1,8 kat azaldığını (Bax/GAPDH yoğunlukları; kontrol=0,083, 2.zaman=0,046) Grp78 ifadesinin ise 1,79 kat arttığını tespit ettik (Grp78/GAPDH yoğunlukları; kontrol=0,022, 2. zaman=0,040).

Damar sertliğinin organ/dokuda yetersiz beslenmeye sebebiyet vermesi hasebiyle damar sertliği seviyesine bağlı olarak kişilerde ER stres damar sertliği olmayan kişilerden fazla görülmektedir (Groenendyk & ark, 2010). Çalışmamızda, ani ölüm-1 grubunda damar sertliği ile ilişki ER stres belirteçlerinden Grp78 ifadesinin 9 kat azaldığını tespit ettik ancak bu sonuçta ifadesi 12 kat artan Bax/Bcl-2 oranının rolü olabilir. Bu durum damar sertliği seviyesini bilmediğimiz vakaların hastalığın ilk evresinde olmalarına bağlı olarak hastalığın henüz kalıcı ER stresi geliştirmediği şeklinde yorumlanabilir.

# 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak bugün uygulamada ölüm zamanı tespiti için kullanılan makroskopik değerlendirme yöntemlerinin sağladığı bilgilerin detaylandırılması ve moleküler seviyede kanıta dayalı olabilmesi hem tıbben hem de hukuken mühimdir.

Bu tez çalışmasında ölüm zamanı tespiti için hücre ölüm çeşitlerinden apoptoz ve otofaji ile hücre ölümünde ve pek çok hastalıkta tetikleyici rol alan endoplazmik retikulum stres belirteçlerini farklı ölüm zamanlarındaki postmortem dokularda çalıştık ve western blot tekniği ile seçtiğimiz protein belirteçlerin ifade düzeylerini tespit ettik.

Genel grupta Bcl-2 ve Bax/Bcl-2'de tespit ettiğimiz anlamlı ifade değişimi ölüm sebebi heterojen olan bu grup için çok önemlidir çünkü bu noktada elde ettiğimiz sonuçlar ölüm sebebinden bağımsız olarak tüm vakalar için geçerlilik arz etmekte olup teorik olarak genel bilgiler kısmında belirttiğimiz anti-apoptotik ve pro-apoptotik belirteçlerin birbirilerine zıt ifade seviyelerini teyit etmektedir.

Beclin-1 belirteci genel kısmında belirttiğimiz ve hem bulgular hem de tartışma bölümlerinde tespit ettiğimiz sonuçlar çerçevesinde anti-apoptotik Bcl-2 belirteci tarafından baskılanmakta ve baskı seviyesi azaldığında ifadesindeki değişim ile kendini göstermektedir.

Çalışmamızda incelediğimiz ER stres belirteçlerinden Grp78 ifadesindeki anlamlı değişim tüm kategorilerde mevcuttur. Analiz ettiğimiz diğer ER stres belirteci Perk 3.zamanda genel grupta gösterdiği ifade değişimi ile ER stresin postmortem süreçte kritik rol oynadığını göstermektedir.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda zaman aralıklarına göre hangi grupta hangi belirtecin ölüm zamanı tayininde kullanılabileceği çizelge 5.1'de verilmiştir.

**Çizelge 5.1.** Ölüm Zamanı Tayininde Kullanılabilecek Belirteçler

| Zaman | Kategori | Belirteç | Anlamlılık |
|---|---|---|---|
| **12 - 18 sa** | Genel Grup | Bcl-2 | p=0,005 |
| | | Bax / Bcl-2 | p=0,019 |
| **18 - 27 sa** | | Perk | p=0,055 |
| | | Grp78 | p=0,002 |
| **12 - 18 sa** | Hastanede Yatanlar | Grp78 | p=0,05 |
| **18 - 27 sa** | | Grp78 | p=0,07 |
| **12 - 18 sa** | Ani Ölüm-1 | Bcl-2 | p=0,013 |
| | | Bax | p=0,033 |
| | | Bax / Bcl-2 | p=0,040 |
| | | Grp78 | p=0 |
| **12 - 18 sa** | Ani Ölüm-2 | Bax | p=0,001 |
| | | Grp78 | p=0 |

Çalışmamızın benzerine yaptığımız literatür taramalarında ulaşamadık. Bu açıdan belirtmek isteriz ki çalışmamız bu alanda oluşturulabilecek bir veri tabanı için öncül ve kıymetli sonuçlar sağlamaktadır.

Bireysel tıbbın, pek çok hastalık mekanizmasının keşfinde ve tedavi yollarının geliştirilmesinde sahip olduğu önem Dünya'da kabul görmüş bir gerçektir. Tıp Dünyasında kabul gören bu önemli konu hiç şüphesiz adli bilimler için de büyük önem arz etmektedir. Genetik yapının oluşturduğu kişisel farklılıkların ölüm zamanı tayininde araştırdığımız parametrelere negatif/pozitif etkilerinin olabileceği göz ardı edilmemeli ve apoptoz, otofaji, ER stres ile sebep - sonuç ilişkisi tespit edilmiş (Varma & Sen, 2015; Pickford & ark, 2008; Fonseca & ark, 2011 ve Sano & Reed, 2013) hastalık tanısı bulunan kişiler ayrıca değerlendirilmelidir. Böylece farklı etkenlerin varlığı ve etki seviyesi bu konudaki araştırmaların artması ile belirlenebilir.

Çalışmamızın istatistiksel değerlendirmesinde hem zaman aralıkları hem de ölüm kategorileri bazında anlamlı sonuç elde edemediğimiz belirteçlerin daha büyük bir çalışma grubunda ve ölüm sebebi homojen *in vivo* grupta yapılmasının anlamlı sonuçlar sağlayacağı kanaatindeyiz.

Çalışmanın hem ölüm zamanı hem de vaka sayısı bakımından daha geniş çalışma grubu ile farklı dokularda da yapılmasını öneriyoruz. Otofajide incelediğimiz Beclin-1'e ek olarak ATG proteinlerinin, ER stres'te Grp78 ifadesine ait anlamlı sonuçların desteklenmesi için IRE-1 ve ATF6 proteinlerinin incelenmesinin kıymetli bilgiler sağlayacağını düşünmekteyiz. Ayrıca Zapico ve ark. tarafından ratlar da yapılan bir ölüm zamanı çalışmasında apoptoz dahil pek çok biyolojik olayda rol alan tümör baskılayıcı PTEN geni ve apoptozun dışsal yolağında rol alan FasL seviyeleri incelenmiş olup PTEN ve FasL seviyelerinin ölümü takiben 2-6 sa arasında arttığı 8. saatte azaldığı tespit edilmiş. (Zapico & ark, 2014) Bu sonuç özellikle erken ölüm zamanına dahil vakaların inceleneceği bir çalışmada diğer belirteçler ile birlikte çalışılmasının önemini göstermektedir. Apoptoz da lizozomal enzimlerden Katepsin D ve B'nin de çalışılmasını ve çalışmanın farklı dokularda da yapılmasını öneriyoruz. Belirteçlerin zaman ile ifade değişimlerinde elde ettiğimiz sonuçlar ışığında önerdiğimiz ek parametreler kullanılarak geliştirilmesinin ölüm zamanı tespitine ışık tutacak sonuçlar sağlayacağına inanıyoruz.

# ÖZET


**Ölüm Zamanı Tayininde Yeni Biyolojik Belirteçlerin Rolü**

Beklenmeyen ölüm olaylarında kişinin ölüm nedeni kadar ölüm zamanının tespiti de önemlidir. Ölüm zamanının tayininde tek başına kullanılabilecek tek bir yöntem henüz bulunmamaktadır. Bugünün bilinen ve kullanılan adli ve moleküler biyoloji metotları net ölüm saati belirlemekten ziyade muhtemel ölüm zaman aralığı ile ilgili bilgi sağlamaktadır. Adli vakalarda ölüm zamanının tayin edilmesi olay mekanizmasının çözümlenmesinde son derece önemlidir.

Bu tez çalışmasının amacı zamana bağlı apoptoz, otofaji ve ER stres belirteçlerinin ifade değişimini western blot tekniği ile tespit etmektir. 21 postmortem psoas kası üç zaman aralığında (1. 0-12 sa, 2. 12-18 sa, 3. 18-27 sa) ve dört kategoride incelenmiştir; genel grup, hastanede yatanlar, ani ölüm-1 ve ani ölüm-2. İstatistiksel olarak genel grupta Bcl-2 ve Bax/Bcl-2 (2. zaman aralığında), Perk ve Grp78 (3. zaman aralığında); hastanede yatanlar grubunda Grp78 (2. ve 3. zaman aralıklarında); ani ölüm-1 grubunda Bcl-2, Bax, Bax/Bcl-2, Grp78 ve ani ölüm-2 grubu Bax ve Grp78 (2. zaman aralığında) ifadelerinde anlamlı sonuçlar tespit ettik ($p < 0,05$).



**Anahtar Kelimeler:** postmortem zaman aralığı, ölüm zamanı, apoptoz, otofaji, ER stres

# SUMMARY


**Role of New Biological Markers for Determination of Postmortem Interval**

It is important to determine time and cause of death in case of a sudden death. There is no single method that can be use in the determination of time of death. Known forensic and molecular biology methods provide information about probable postmortem time interval rather than time of death. In criminal cases, the determination of the time of death has great significance in resolution of case mechanisms.

The aim of this thesis study is to determine time-dependent expressional changes of apoptosis, autophagy and ER stress markers by western blot technique. 21 postmortem psoas muscles were analyzed in three time intervals (1. 0-12 h, 2. 12-18 h, 3. 18-27 h) and four categories; general group, in-patient group, sudden death-1 and sudden death-2. In the general group, expressions of Bcl-2 & Bax/Bcl-2 ($2^{th}$ time interval) and Perk & Grp78 ($3^{rd}$ time interval); in-patient group Grp78 ($2^{th}$ and $3^{rd}$ time intervals); sudden death group-1, Bcl-2, Bax, Bax/Bcl-2 and Grp78 ($2^{th}$ time interval); sudden death group-2; Bax and Grp78 ($2^{th}$ time interval) were statistically significant ($p < 0,05$).



**Keywords:** post mortem interval, time of death, apoptosis, autophagy, ER stress

# KAYNAKÇA


1. Mitochondria, Apoptosis and Oxidative Stress. Erişim Adresi: [https://www.premedhq.com/mitochondria-apoptosis-and-oxidative-stress]. Erişim Tarihi:30/08/2015.

2. DAVIDSON COLLEGE BIOLOGY DEPARTMENT (2000). Perforin. Erişim Adresi: [http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/students/spring2000/woodall/perforin.html]. Erişim Tarihi: 06/09/2015.

3. GOSWAMI A, SEN P, JANA K, RAHA S (2014). Involvement of Caspases in the Pathophysiology of Neurodegeneration and Stroke. *ROLE OF PROTEASES in CELLULAR DYSFUNCTION.* DHALLA NS, CHAKRABORTI S. 1st Ed. p.: 47-67.

4. ADAMS JM, CORY S (2001). Life or death decions by the Bcl-2 family. *Trends. Biochem Sci.* **26**:61-66.

5. ANDERSON JJB, GARNER SC (1996). CALCIUM AND PHOSPHORUS IN HEALTH AND DISEASE. p.:45-62.

6. Avery OT, MACLEOD CM, MCCARTY M (1944). Studies on the chemical nature of the substance ınducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction ısolated from pneumococcus type ıı ı. *Journal of Experimental Medicine*. **79**: 137–158.

7. CHEN Y, BRANDIZZI F (2013). IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends in Cell Biology,* **23**:547-553.

8. CHOI JH, KIM SY,KIM SK, KEMP MG, SANCAR A (2015). An integrated approach for analysis of the dna damage response in mammalian cells nucleotide excision repair,dna damage checkpoint,and apoptosis. *The Journal Of Biological Chemistry*, **290:** 28812-28821.

9. COTTER TG (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer,* **9**: 501-507.

10. COX WA (2009). Early postmortem changes and time of death. Erişim Adresi: [https://forensicmd.files.wordpress.com/2009/12/early-postmortem-changes1.pdf] Erişim Tarihi:4/5/2015

11. CUERVO AM, WONG E (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research*, **24**: 92-104.

12. EL-HAROUNY AM, EL-DAKROORY SA, ATTALLA SM, HASAN NA, EL-NABİ SEH (2009). The relationship between postmortem interval and DNA degradation in different tissues of drowned rats. *Mansoura J. Forensic Med. Clin. Toxicol.* **16:** 45-61.

13. ERKOL Z (1994). Ölüm zamanı tayini. *Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **5:**112-122.

14. FENG Y, HE D, YAO Z, KLIONSKY DJ (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* **24**: 24-41.

15. FESTJENS N, VANDEN BERGHE T, VANDENABEELE P (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta*. **1757:** 1371–1387.

16. Fonseca SG, GROMADA J, URANO F (2011). Endoplasmic reticulum stress and pancreatic B-cell death. *Trends in Endocrinol Metab.* **22:** 266-274.

17. GOLSTEIN P, KROEMER G (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* **32:** 37-43.

18. GROENENDYK J, SRENIVASAIAH PK, KIM DH, AGELLON LB, MICHALAK M (2010). Biology of Endoplasmic Reticulum Stress in the Heart. *Circ Res*. **107:** 1185-97.

19. GUIBERT EE, PETRENKO A, BALABAN CL, SOMOV AY, RODRIGUEZ JV, FULLER BJ (2011). Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. **38:** 125–142.

20. HANCI H. (2002). ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER. s.: 9-22

21. HAYAKAWA Y, TEKEMURA G, MISAO J, KANOH M, OHNO M, OHASHI H, TAKATSU H, ITO H, FUKUDA K, FUJIWARA T, MINATOGUCHI S, FUJIWARA H (1999). Apoptosis and Overexpression of Bax Protein and bax mRNA in Smooth Muscle Cells Within Intimal Hyperplasia of Human Radial Arteries: analysis with arteriovenous fistulas used for hemodialysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19:** 2066-2077.

22. HITOMI J, CHRISTOFFERSON DE, NG A, YAO J, DEGTEREV A, XAVIER RJ, YUAN J (2008). Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. **135:** 1311-23.

23. HUNTER RB, MITCHEN FELTON H, ESSIG DA, KANDARIAN SC (2001). Expression of endoplasmic reticulum stress proteins during skeletal muscle disuse atrophy. *Am J Physiology Cell Physiol.* **281:** C1285-C1290.

24. JARSKOG FL, SELINGER ES, LIEBERMAN JA, GILMORE JH (2004). Apoptotic Proteins in the Temporal Cortex in Schizophrenia: High Bax/Bcl-2 Ratio Without Caspase-3 Activation. *Am J Psychiatry*, **161:** 109-115.

25. JARSKOG FL, GILMORE JH (2000). Developmental expression of Bcl-2 protein in human cortex. *Developmental Brain Research.* **119:** 225-230.

26. JIAN B, HSIEH CH, CHEN J, CHOUDHRY M, BLAND K, CHAUDRY I, RAJU R (2008). Activation of endoplasmic reticulum stress response following trauma-hemorrhage. *Biochim Biophys Acta.* **1782:** 621-626.

27. JOHNSON L, FERRIS J (2002). Analysis of postmortem DNA degradation by single-cell gel electrophoresis. *Forensic Science International*, **126:** 43-47.

28. KADOWAKI H, NISHITOH H (2013). Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes(Basel)*. **4:** 306-333.

29. KALIN S (2014). Postmortem İnterval Tayininde Adli Entomolojinin Yeri ve Önemi. Bitirme Tezi. s.: 69-71

30. KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26:** 239-257.

31. KOÇ S, CAN M (2011). BİRİNCİ BASAMAKTA ADLİ TIP. 2.Baskı. İstanbul Tabip Odası. s.: 19-25

32. KRAFT C, PETER M, HOFMANN K (2010). Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol.* **129:** 836-41.

33. KROEMER G, GALLUZI L, VANDENABEELE P, ABRAMS J, ALNEMRI ES, BAEHRECKE EH, BLAGOSKLONNY MV, EL-DEIRY WS, GOLSTEIN P, GREEN DR, HENGARTNER M, KNIGHT RA, KUMAR S, LIPTON SA, MALORNI W, NUNEZ G, PETER ME, TSCHOPP J, YUAN J, PIACENTINI M, ZHIVOTOVSKY B, MELINO G; NOMENCLATURE COMMITTEE ON CELL DEATH 2009 (2009). Classification of Cell Death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. **16:** 3–11.

34. LAMB CA, YOSHIMORI T, TOOZE SA (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **14:** 759-774

35. LEVINE B, SINHA S. KROEMER G (2008). Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, **4:** 600-606.

36. LI WW, LI J, BAO JK (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*. **69:** 1125-1136.

37. MATTSON MP, CHAN SL (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biology*. **5:** 1041 - 1043.

38. MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO AM, KLIONSKY DJ (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature,* **451:** 1069-1075.

39. MULLA A. (2005). *Role of vitreous humor biochemistry in forensic pathology.* Thesis. p.: 1-12

40. NI M, LEE AS (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *Cellular Stress*, **581:** 3641–3651.

41. NORMAN JM, COHEN GM, BAMPTON ET (2010). The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases. *Autophagy.* **6:** 1042-1056.

42. ÖZTÜREL A (1979). ADLİ TIP. s,: 1-4

43. PARK SW, ÖZCAN U (2013). Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Semin Immunopathol,* **35:** 351-373.

44. PICKFORD F, MASLIAH E, BRITSCHGI M, LUCIN K, NARASIMHAN K, JAEGER PA, SMALL S, SPENCER B, ROCKENSTEIN E, LEVİNE B, CORAY TW (2008). The autophagy-related protein beclin-1 shows reduced expression in early alzheimer disease and regulates amyloid b accumulation in mice. *The Journal of Clinical Investigation,* **118:** 2190-2199.

45. AHI RS, GARG V (2011). Role of vitreous potassium level ın estimating postmortem ınterval and the factors affecting ıt. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **5:** 13-15.

46. BALI R, CHANDRA A, VERMA R (2013). Apoptosis in normal oral tissues and odontogenesis. European Journal of General Dentistry, **2:** 195-198.

47. SANO R, REED JC (2013). ER stress- induced cell death mechanisms. *Biochimica and Biophysica Acta,* **1833:** 3460-3470.

48. SU HC, LENARDO MJ (2008). Genetic Defects of Apoptosis and Primary Immunodeficiency. *Immunol Allergy Clin North Am*. **28:** 329-51.

49. TAHA TA, MULLEN TD, OBEID LM (2006). A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta*, **1758:** 2027-2036.

50. TATLICI G (2003). Ölüm Zamanı Tayininde Postmortem DNA Degredasyonu: Flow Sitometrik Analizin Önemi. Tez. s.:1-5.

51. VARMA D, SEN D (2015). Role of the unfolded protein response in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Acta Neurobiol.* **75:** 1-26.

52. VITALE A, PEGORARO F (2015). Role of granzymes and granulysin. [www.flipper.diff.org: http://flipper.diff.org/app/items/info/6535]. Erişim Tarihi: 06/09/2015.

53. WOODCOCK J (2006). Sphingosine and Ceramide Signalling in Apoptosis. *IUBMB Life*. **58:** 462 – 466.

54. YOUSEFI S, PEROZZO R, SCHMID I, ZIEMIECKI A, SCHAFFNER T, SCAPOZZA L, BRUNNER T, SIMON HU (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Bio*. **8:** 1124-11232.

55. ZAPICO SC, MENENDEZ ST, NUNEZ P (2014). Cell death proteins as markers of early postmortem interval. *Cell. Mol. Life Sci.* **71:** 2957-62.

# EKLER

**EK-1. ETİK KURUL ONAYI**

**TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**
**KLİNİK ARAŞTIRMALARI**
**ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ**

**SAYI** : 99950669/215 30/06/2014
**KONU** : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı

**SAYIN YRD.DOÇ.DR. DİLARA AKÇORA YILDIZ**

Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 27 Haziran 2014 tarih ve 39 sayılı toplantısında sunulan **"Post Mortem Ölüm Zamanın İskelet Kasında Belirlenmesinde Yeni Moleküler Biyolojik Belirteçlerin Araştırılması; ADAMTS,ER Stres, Apoptotik, Otofajik, ECM."** başlıklı araştırma projesi öneriniz incelenmiş, adli tıp kurumundan izin alındıktan sonra etik ve bilimsel ilkelere uygun olduğuna oybirliğiyle karar verilmiştir.

Prof.Dr. Osman ÖZCAN
Başkan

Prof. Dr. Şenol DANE

Prof. Dr. N.Cenap DENER

Prof. Dr. Ali AKÇAY

Doç. Dr. Bülent BOZKURT
Başkan Yardımcısı

Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ

Doç. Dr. Murat ULAŞ

Doç. Dr. Özlem EVLİYAOĞLU

Doç. Dr. Bünyamin MUSLU

Doç. Dr. Ayşe Esra YILMAZ

Doç. Dr. Nurhayat BAYAZIT

Yrd. Doç. Dr. Mehmet KAYA

Farm. Dr. Ayşe GÜREL
Raportör

Yrd.Doç.Dr.Mehmet NAMUSLU

Avukat Meltem BAĞCI

Yasin GÜRSOY

**EK-2. BİLİMSEL ÇALIŞMA İZNİ**

**T. C.**
**ADALET BAKANLIĞI**
**Adli Tıp Kurumu Başkanlığı**

Sayı : 21589509/ 596 09/09/2014
Konu: Bilimsel Çalışma

**Sayın, Prof. Dr. Aslıhan AVCI**

"Ölüm Zamanı Tayininde ADAM-TS'in Rolü ve Yeni Moleküler Biyolojik Belirteçlerin Belirlenmesi" isimli çalışma öneriniz, 09/09/2014 tarihli Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu toplantısında görüşülmüş ve kabul edilmiştir.

Bilginize rica ederim.

**Doç. Dr. Yalçın BÜYÜK**
**Başkan**

Adli Tıp Kurumu, Telefon: (0 212) 454 15 00 Faks:(0 212 ) 454 15 82
Çobançeşme Mah. Kımız Sok. Bahçelievler/İST. Elektronik Ağ: www.atk.gov.tr

# ÖZGEÇMİŞ

## I. Bireysel Bilgiler


| | |
|---|---|
| Adı | : Emine Firdevs |
| Soyadı | : YILDIRIM |
| Doğum Yeri ve Tarihi | : Altındağ – 04.01.1989 |
| Uyruğu | : Türkiye Cumhuriyeti |
| Medeni Durumu | : Bekâr |
| İletişim Adresi ve Telefonu | : Ahi Mesut Mah. 1890. sok. Yeşil Elvan Sitesi 8-4B No:19 Etimesgut/ANKARA +90 506 698 69 39 |


## II. Eğitim

2007-2011 Lisans: International University of Sarajevo Faculty of Engineering and Natural Sciences, Biological Sciences and Bioengineering- Saraybosna / BOSNA HERSEK

2003-2007 Lise: Yabancı Dil Ağırlıklı Ankara Ömer Seyfettin Lisesi, Ankara

Yabancı Dil: İngilizce (İleri düzeyde)

## III. Diğer Bilgiler

**Aldığı Kurslar**

4-30 Temmuz 2010

Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yaz Okulu

23-28 Eylül 2014

Sertifikalı Adli Diş Hekimliği Kursu

14-16, 21-23 Kasım 2014

Sertifikalı Adli Antropoloji Kursu

**Organizasyonuna Katkıda Bulunduğu Bilimsel Toplantılar**

12-14 Ağustos 2014

Kosova Türkiye Adli Bilimler Günleri / Prizren- KOSOVA

20-21 Eylül 2014

2. Ulusal Felaket Kurbanlarının Kimliklendirilmesi (F2K) Kongresi

23-25 Ekim 2014

XI. Uluslararası Anadolu Adli Bilimler Kongresi/Bayburt

27-28 Kasım 2014

1. Uluslararası Adli Biyoloji ve Genetik Kongresi

23-15 Nisan 2015

2. Ulusal Sağlık Hukuku Kongresi/ Gaziantep