

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ
FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI

Danışman: Doç. Dr. Emel Hülya YÜKSELOĞLU

**ADLİ BİLİMLERDE YÜKSEK ISIYA MARUZ BIRAKILMIŞ İNSAN
KEMİKLERİNDE VE DİŞ ÖRNEKLERİNDE ORGANİK VE
İNORGANİK TEMELLİ DNA ÇEKİTLEME TEKNİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI VE DNA PROFİLLEMESİNDEKİ ÖNEMİ**

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

KADİR DAŞTAN

İSTANBUL
2017

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje Numarası: 48032

ÖNSÖZ

Tez çalışmamı gerçekleştirmeme olanak sunan İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü

öğretim üyesi ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız

Prof. Dr. Münevver AÇIKKOL'a,

doktora öğrenimim sırasında tezimin her aşamasını titizlikle takip edip bilgi ve birikimlerini

*her ihtiyaç duyduğumda benimle paylaşan değerli tez danışmanım **Doç.Dr.Emel Hülya***

YÜKSELOĞLU'na, , tezimin gerçekleşmesi sürecinde desteğini esirgemeyen ve tez jürimde

yer alan değerli hocalarım

Yrd. Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU, Yrd.Doç.Dr.Şule Beyhan ÖZDAŞ ve Yrd.Doç.Dr.Itir

ERKAN'a,

*tezimin laboratuvar aşamasında destek ve deneyimlerini esirgemeyen **Dr.Tuğba ÜNSAL,***

Gülten RAYİMOĞLU ve Ömer KARATAŞ'a

Ve tezimin farklı aşamalarında katkıları olan adlarını sayamadığım tüm sağlık personeli ve

hekim arkadaşlarıma

teşekkür ederim.

Kadir DAŞTAN

İçindekiler

TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	viii
1. ÖZETLER.....	8
1.1. Özet	
1.2. İngilizce Özet	
2. GİRİŞ VE AMAÇ.....	11
3. GENEL BİLGİLER.....	15
3.1. Adli Bilimlerde DNA Uygulamaları.....	15
3.1.1. Adli Bilimlerde Kimliklendirme ve Önemi.....	16
3.1.2. Kimliklendirme Dış Kalıntıların Önemi.....	17
3.2. İdentifikasyon Amaçlı DNA Analizleri.....	19
3.3. Dış ve Yapısal Özellikleri.....	21
3.3.1. İnsanda Dentisyon.....	25
3.3.2. Dış Tipleri.....	25
3.3.3. Kalıcı Dışlarda Pulpa ve Morfolojisi.....	26
3.4. Moleküler Analizler.....	26
3.4.1. DNA'nın Yapısı.....	27
3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	29
3.4.3. Degrade ve Antik Örneklerde DNA Analizi.....	30
3.4.5. Degrade DNA'da PCR Amplifikasyonu.....	32
3.4.6. Degrade Örneklerde miniSTR'lerin Kullanılması.....	34

3.5. PCR İnhibitörleri.....	37
3.6. Kemiğin Yapısı.....	38
3.7. Kemikten DNA Çekitleme Yöntemleri.....	43
3.8. Adli Olgularda Yanmış Kemikler ve Dişler.....	45
3.8.1. Yanmış Kemik ve Dişlerde Renk Değişimi.....	45
3.8.2. Yanmış Kemik ve Dişlerde Ağırlık Değişimi.....	47
3.8.3. Yanmış Kemik ve Dişlerde Büzüşme ve Deformasyon.....	48
3.8.4. Yanmış Kemik ve Dişlerde Fragmentasyon.....	50
3.8.5. Yanmış Kemik ve Dişlerde DNA Analizi.....	51
3.9. Adli genetik soruşturmalarda insan iskelet ve diş kalıntılarının tiplendirilmesi.....	53
3.9.1. Degrade Kemiklerde DNA Hasarı: DNA Degradasyon Süreci.....	56
3.10. Yangın Kavramı, Yangınların Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	60
3.10.1. Yangın Kavramı.....	60
3.10.2. Isı Transferi ve Türleri.....	63
3.10.2.1. Taşınım/Konveksiyon.....	63
3.10.2.2. İletim/Kondüksiyon.....	64
3.10.2.3. Işınım/Radyasyon.....	65
3.10.3. Yangın Yayılım Evreleri.....	66
3.10.3.1. Başlangıç Evresi.....	67
3.10.3.1.1. Hazırlık Evresi.....	67
3.10.3.1.2. Alev Evresi.....	68
3.10.3.1.3. Tam Yanma Evresi.....	68
3.10.3.1.4. Genel Kavuşma Evresi.....	68
3.10.3.1.5. Sürekli Yanma Evresi.....	68
3.10.3.1.6. Sönme Evresi.....	68

3.11. Yangın ve Malzeme İlişkisi.....	68
3.11.1. Yapı Malzemesi İç Yapısına Karşı Etkiler.....	68
3.11.2. Fiziksel Etkiler.....	69
3.11.3. Kimyasal Etkiler.....	69
3.12. Ev Tipi Yangınlar.....	77
3.13. Yangının Etkileri.....	77
3.13.1. Yangın ve Malzeme İlişkisinin Kişi Üzerindeki Etkileri.....	77
3.13.2. Alev ve Isının Etkileri.....	78
3.13.3. Gazların Etkileri.....	78
3.13.4. Dumanın Etkileri.....	78
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	86
4.1. Materyal.....	86
4.2. Kullanılan Kit ve Kimyasallar.....	91
4.3. Kit Uygulamaları.....	93
4.3.1. Örneklerden DNA Çekitleme.....	93
4.3.2. DNA Miktar Analizi.....	119
4.3.3. PCR Aşaması.....	120
4.3.4. Saflaştırma.....	121
4.3.5. ABI 3130 Genetik Analizör Cihazı İle DNA'ların Analizi.....	122
5. BULGULAR.....	123
5.1. Kemik, Diş ve Ağız İç Sürüntü Örneklerindeki DNA Miktarı Sonuçları.....	125
5.2. Kemik, Diş ve Ağız İç Sürüntü Örneklerinde STR Profillemeleri.....	126
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	140
7.KAYNAKLAR.....	161
8. EKLER.....	174

Tablolar Dizini

Tablo 1. Degrade DNA’da Farklı Hasar Tiplerine Genel Bakış.....	60
Tablo 2. Sıcaklık maruziyetlerine göre kemik ve dişlerde görünür renk değişiklikleri.....	71
Tablo 3. Farklı yakıtların yanma ısıları.....	74
Tablo 4. Ortam Havasında Ölçülen Maksimum Difüzyon Alev Isıları.....	75
Tablo 5. Tipik Isı Salım Hızları.....	75
Tablo 6. Kemik örneklerinin kül fırınında maruz bırakıldığı farklı sıcaklık dereceleri.....	89
Tablo 7. Diş örneklerinin kül fırınında maruz bırakıldığı farklı sıcaklık dereceleri.....	89
Tablo 8. Kemik Örneklerinden Qubit Fluorometre Sonuçlarına Göre Fenol-Kloroform ve QiaQuick Kiti Modifiye Yöntemi İle Elde Edilen DNA Miktarları.....	125
Tablo 9. Diş Örneklerinden Qubit Fluorometre Sonuçlarına Göre Fenol-Kloroform ve QiaQuick Kiti Modifiye Yöntemi İle Elde Edilen DNA Miktarları.....	126
Tablo 10. Ağız İçi Sürüntü Örneklerinden Qubit Fluorometre Sonuçlarına Göre Hybrigen Kiti Kullanılarak Elde Edilen DNA Miktarları.....	127

Şekiller Dizini

Şekil 1. Genel Diş Morfolojisi ve Çevreleyen Yapılar.....	24
Şekil 2. Diş Pulpa Boşluğu ve Kök Yapısı.....	24
Şekil 3. İnsanda kalıcı dişlerin dentisyonu.....	27
Şekil 4. PCR’da denatürasyon, primer bağlanması (annealing) ve Taq polimeraz ile uzama aşamaları.....	31
Şekil 5. MiniSTR primerleri.....	36
Şekil 6. Her bir çekitleme yönteminde izlenen genel aşamalar.....	38
Şekil 7. Kemiğin Genel Morfolojisi.....	40
Şekil 8. Yanmış olan insan iskeletinde renk değişiklikleri.....	47
Şekil 9. Yangın Üçgeni.....	63
Şekil 10. Taşınım ile Isı Transferi.....	64
Şekil 11. Tavan düzeyinde bulunan sıcak gaz tabakası.....	65
Şekil 12. Yapılar Arası Işınım Yoluyla Isı Transferi.....	67
Şekil 13. Yangın Yayılım Hızı.....	68
Şekil 14. Yangında İlerleme Süreci ve Yangın Dalgası.....	68
Şekil 15. Farklı Malzemelerin Ergime Sıcaklıkları.....	72
Şekil 16. Yüksek Sıcaklıklara Maruz Kalan Kemiklerde Renk Değişimi Aşamaları.....	85
Şekil 17. 100°C’de yakılmış kemik örneğinde Minifiler Kiti ile elde edilen elektroforegram ve lokusların görüntüsü.....	127
Şekil 18. 33 numaralı ağız içi sürüntü örneğinde Minifiler Kiti ile elde edilen elektroforegram ve tam profil lokus görüntüsü.....	128
Şekil 19. 400°C’de yakılmış diş örneğinde Minifiler Kiti ile elde edilen elektroforegram ve tam profil lokus görüntüsü.....	129

Şekil 20. 400°C’de yakılmış diş örneğinde Identifiler Kiti elektrogforegram görüntüsü ve elde edilen lokuslar.....	130
Şekil 21. 300°C’de yakılmış diş örneğinde Identifiler Kiti ile elde edilen elektroforegram ve tam profil lokus görüntüsü.....	131
Şekil 22. Ağız içi sürüntü örneğinde Identifiler Kiti ile elde edilen lokuslar.....	132
Şekil 23. 190°C’de yakılmış kemik örneğinde Globalfiler Kiti ile elde edilen elektroforegram görüntüsü.....	133
Şekil 24. 250°C’de yakılmış kemik örneğinde Globalfiler Kiti ile elde edilen elektroforegram görüntüsü.....	134
Şekil 25. 300°C’de yakılmış diş örneğinde Globalfiler Kiti ile elde edilen elektroforegram görüntüsü.....	135
Şekil 26. 450°C’de yakılmış diş örneğinde Globalfiler Kiti ile elde edilen elektroforegram görüntüsü.....	136
Şekil 27. 150°C’de yakılmış kemik örneğinde Globalfiler Kiti elektroforegram ve tam profil lokus görüntüsü.....	137
Şekil 28. 150°C’de yakılmış diş örneğinde Globalfiler Kiti ile elde edilen elektroforegram ve tam profil görüntüsü.....	138

Kısaltmalar

BBH: Binding Buffer (Bağlama Tamponu)

Bç: Baz çifti

BSP: Bone Sialoprotein (Kemik Sialoproteini)

Ca: Calcium (Kalsiyum)

CODIS: Combined DNA Index Systems (Birleşmiş DNA Veri Bankaları Sistemleri)

DNA: Deoxyribonucleic acid (Deoksiribo Nükleik Asit)

EDTA: Ethylenediaminetetra Acetic Acid (Ethilendiamintetra Asetik Asit)

ENFSI: European Network of Forensic Science Enstitutes (Avrupa Adli Bilimler Enstitüleri Örgütü)

ESSL: European Standard Set of Loci (Avrupa Standart Lokus Seti)

FBI: Federal Bureau of Investigation (Federal Araştırma Bürosu)

HRR: Heat Release Rate (Isı Salım Hızı)

HV: Hypervariable (Çok Değişken)

ISFG: International Society for Forensic Genetics (Uluslararası Adli Genetik Derneği)

LCN: Low Copy Number (Düşük Kopya Sayısı)

Mg: Magnesium (Magnezyum)

mtDNA: Mitochondrial DNA (Mitokondriyal DNA)

Na: Sodium (Sodyum)

NaOCl: Sodium Hypochlorite (Sodyum Hipoklorit)

NaCl: Sodium Chloride (Sodyum Klorür)

PCR: Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

qRT-PCR: Competetive/Quantitative Real-Time PCR (Kompetitif/Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

RT-PCR: Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotit Polimorfizmi)

STR: Short Tandem Repeats (Kısa Tekrar Dizinleri)

Tris-HCl: Tris (hydroxymethyl) Aminomethane Hydrochloride (Tris (hidroksimetil) Aminometan Hidroklorid)

TSE: Türk Standartları Enstitüsü

VNTR: Variable Number Tandem Repeat (Değişken Sayıda Ardışık Tekrar)

1. Özetler

1.1. Özet

Adli olguların aydınlatılmasında, yanmış olan kemik ve diş kalıntılarından mağdurun kimliğinin belirlenmesine yönelik bilgilerin elde edilmesi kritik önem taşır. Kemik ve dişlerin yandıklarında hem fiziksel hem de kimyasal özellikleri önemli ölçüde değişir ve bu durum, identifikasyon amaçlı antropolojik değerlendirmeler ve başarılı deoksiribonükleik asit (DNA) profillemelerine engel olur. Isı, maruz kalınan sıcaklık derecesine bağlı olarak, kemik ve dişlerin kullanıldığı kimliklendirme tekniklerinde zorluklara yol açar. Bu sebeple, yanma esnasında kemik ve dişlerde meydana gelen değişimler ile, gözlem ve analiz sonuçlarının doğru değerlendirmesi ve elde edilen bilgilerin belli bir sıra dahilinde kullanılması gerekir.

DNA'nın azalmış olan kalite ve kantitesi nedeniyle yanmış kemik ve dişlerden DNA çekitlenmesi adli bilimlerde daima zor bir süreç olmuştur ve günümüzde de bu zorluğunu hala sürdürmektedir. DNA'nın aşırı derecede degradasyonu ve PCR inhibitörlerinin varlığı, özellikle yanmış iskelet kalıntılarında DNA identifikasyonunu son derece komplike bir hale getirmektedir. Yangın, patlama, motorlu araç ve uçak kazaları ile diğer travmatik olaylarda elde edilen örneklerden geleneksel yöntemlerle DNA'nın tiplendirilmesi oldukça zordur.

Kitlesel ölüm olayları, savaşlar veya sosyo-politik olaylar gibi farklı durumlarda kayıp kişilerin ya da bilinmeyen kalıntıların tiplendirilmesi ve soybağının belirlenmesi için mevcut tek biyolojik materyal sıklıkla sadece diş ve kemik gibi insan kalıntıları olmaktadır. Kemikten çekitlenen DNA sıklıkla düşük kopya sayısı (LCN) halinde mevcut olup, kemiğin iç ve dış özelliklerinden kaynaklanan kimyasal ve fiziksel birtakım hasarlar nedeniyle farklı degradasyon aşamalarıyla karşılaşmaktadır. Etkili DNA çekitleme prosedürleri ve yanı sıra doğru DNA çoğaltma tekniği, iskelet kalıntılarının başarılı DNA analizindeki kritik aşamalardır. Kemik içindeki heterojeniteye bağlı DNA'daki varyasyonlar nedeniyle, literatürde yanmış kemik ve diş

gibi aşırı derecede degrade olmuş örneklerden DNA'nın elde edilebileceği tek, güvenilir bir yöntem maalesef hala mevcut değildir. Bu gerçek temel alınarak, bu tez çalışmasında, yaşları 18 ile 71 arasında değişen 22 kadın ve 28 erkekten alınmış 25 kemik ve 25 diş örneğinden oluşan toplam 50 örnek ile aynı kişilere ait 50 adet ağız içi sürüntü kontrol örnekleri kullanılarak, mevcut çekitleme yöntemleri karşılaştırılmış ve kemik ve diştan DNA'nın elde edilebildiği maksimum sıcaklık dereceleri belirlenmiştir. Sonuç olarak adli genetik kimliklendirmede, etkililik ve verimliliğin artırılması açısından, yeni geliştirilen modifiye bir prosedür ile çekitleme amacıyla fenol-kloroform ve Qiagen DNA Mini Kitinin rutinde birlikte kullanılabileceği önerilmiş, kemik örneklerinden maksimum 190°C, diş örneklerinden ise 400°C'ye kadar DNA çekitlemesi yapılarak başarılı profillemeler elde edilebilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adli Genetik, İdentifikasyon, DNA Çekitleme, Profillemeler, Yangın, Degrade Kemik ve Diş

1.2. İngilizce Özet (Abstract)

In the identification of forensic cases, it is critical to obtain information on the victim's identity from burnt bone and teeth remains. When bone and teeth are burned, both their physical and chemical properties change significantly, which prevents anthropological evaluations and successful DNA profiling. Heat causes difficulties in the identification techniques in which bones and teeth are used, depending on the degree of temperature exposure. Therefore, it is necessary to evaluate the results of observation and analysis, and the information obtained in a certain order, with the changes occurring in bone and teeth during burning period.

The identification of burnt or buried bones and teeth has always been a difficult process due to the diminished quality and quantity of DNA, and it is still a challenge. Excessive degradation of DNA and the presence of PCR inhibitors still result in a highly complicated DNA identification, especially from burnt skeletal remains. DNA profiling by conventional methods

from fire, explosion, motor vehicle and aircraft accident and other traumatic events is very difficult.

The only biological material available to identify the missing persons or unknown remains in different situations, such as mass death events, wars or socio-political events, is often human remains. DNA extracted from the bone is usually present in low copy number (LCN) and is subject to different degradation steps due to chemical and physical damage caused by internal and external properties of the bone. Effective DNA isolation as well as accurate DNA profiling are critical steps in successful DNA analysis of skeletal remains. Due to heterogeneity in DNA due to the heterogeneity within the bone, unfortunately, the only reliable method for obtaining DNA from highly degraded specimens such as burnt bones and teeth in the literature is still not available. Based on this fact, in this thesis study, 50 samples consisting of 25 bones and 25 teeth obtained from 22 females and 28 males aged between 18 and 71 were used and 50 samples of oral swabs belonging to the same persons were also used to compare current extraction methods and the maximum temperatures at which DNA from bone and teeth can be obtained were determined. As a result, a new modified extraction method is proposed for increasing the effectiveness and efficiency in routine forensic genetic identification processes and DNA extractions could be carried out in bone samples exposed to a maximum temperature of 190°C and teeth samples exposed to a maximum temperature of 400°C.

Key Words: Forensic Genetics, Identification, DNA Extraction, Profiling, Fire, Degraded Bone and Teeth

2. Giriş ve Amaç

Adli bilimler, farklı bilim dallarının multidisipliner bir yaklaşımla çözüm bekleyen adli sorunlara yanıt bulmak amacıyla birlikte çalıştığı uygulamaları kapsamaktadır. İlk zamanlardan beri adli vakaların aydınlatılmasında öncelikli olarak fiziksel delillerin incelenmesi ve bu delillerin yorumlanması yöntemi öncelikli olmuştur. Fiziksel delillerin bilimsel birtakım tekniklerle değerlendirilmesi ondokuzuncu yüzyılın sonları itibarıyla gündeme gelmiş, suç olgularının incelenip aydınlatılmasında farklı disiplinlere ait bilimsel veriler ve analiz yöntemleri kullanılıp adalete hizmet edilmeye başlanmıştır. Nihayetinde de biyoloji, toksikoloji, patoloji, antropoloji, diş hekimliği, mühendislik, fizik, jeoloji, matematik, psikoloji, psikiyatri gibi farklı disiplinleri kapsayan “adli bilimler” kavramı ortaya çıkmıştır (1,2).

Suçlu ve suç potansiyeli olan kişilerin her geçen gün kendilerini geliştirdikleri çağımızda, mevcut suçla mücadele yöntemleri yeniliklere açık olmalıdır. Bertillon tarafından geliştirilen antropometrik sistem ve sonrasındaki parmakizi uygulamaları ile devam eden süreç, günümüzde birçok alt disiplinin katılmasıyla yeni bir boyut kazanmış ve nihayetinde adli bilimler kavramı ortaya çıkmıştır (1-3).

Kemik ve diş dokularının yüksek ısı, nem ve mikroorganizma aktivasyonu gibi çevresel koşullara dayanıklılığı, ceset çürüme de uzun bir süre boyunca yapısal özelliklerini korumaları ve yanı sıra mağdura ait birtakım kişisel özellikleri ortaya koymaları nedeniyle bu dokular kimliklendirmede önemli bilgiler sağlamaktadır (6-8).

Özellikle diş dokusu etrafını çevreleyen epitel, bağ, kas ve kemik dokuları sayesinde, diş ortamın olumsuz etkilerine karşı oldukça korunmuştur ve başta pulpa olmak üzere sementum, dentin ve periodontol ligament, DNA analizi için STR olarak bilinen Kısa Ardışık Tekrarlar açısından oldukça zengin yapılar olarak karşımıza çıkmaktadır. Kemik ve diş, cesedin çürümesinin üzerinden uzun yıllar geçse bile, diğer dokulara göre DNA’nın en iyi korunduğu

dokulardır (9-11).

Genetik kimliklendirmede önemli bir delil olan kemik ve dişler farklı ortam koşullarına maruz kalabilmektedir. Yangın gibi ceset bütünlüğünün ileri derecede bozulduğu olaylarda, yanmış kemik ve diş kalıntılarından kimliklendirme amacıyla DNA'nın çekitlenerek bir profil elde edilmesi ile ilgili olarak literatürde çok sayıda çalışma mevcut olmasına rağmen, özellikle yüksek ve ekstrem derecede yüksek sıcaklıklara maruz kalmış diş ve kemik dokularında mevcut DNA çekitleme yöntemlerini karşılaştırarak uygulanabilirlik ve diğer faktörler açısından en uygun yöntemi belirlemeye çalışan kapsamlı bir araştırma mevcut değildir (12-18). Bu bilgiler temel alındığında, olay yerinde idantifikasyon amacıyla yalnızca yanmış ve aşırı derecede degrade olmuş kemik ve diş örneklerinin elde edilebileceği adli olgular söz konusu olabilmektedir.

Patlayıcı ile gerçekleştirilen kitlesel ölüm olayları, intihar girişimleri, araba ya da uçak ile gerçekleşen araç kazaları, ev tipi yangınlar veya bir suçu gizlemeye yönelik kasıtlı olarak gerçekleştirilen aşırı derecede ısının ortaya çıktığı yangın olaylarında, DNA analizi amacıyla olay yerinde sadece sert doku olarak bildiğimiz kemikler ve dişler kalmaktadır. Yanmış olan kemik parçalarından ve dişlerden çekitlenen DNA, genetik belirteçlerin amplifikasyonunu zorlaştıracak ve hatta imkansız hale getirecek şekilde aşırı derecede degrade olmuş olabilmektedir. Ayrıca, yanmış olan kemik ve dişler dış kaynaklı DNA kontaminasyonuna da oldukça açıktır.

Bir vücut yandığında, deri dokusu kısmen veya tamamen yanar ya da tamamen yok olur. Isı nedeniyle, maruz kalan kas dokusunda da sıklıkla rüptür ve bozunma görülür. Aynı şekilde yüzdeki yumuşak doku da yanar ve kafatası açığa çıkabilir. Bu nedenle kişi görsel olarak tanımlanamayabilir. Eller ve ayaklar da yandığı için parmak izi analizi de yapılamayabilir.

Antemortem diş kayıtları ve parmak izleri mevcut olmayabilir. Bu durumda kalıntıların identifikasyonu amacıyla sadece genetik analiz seçeneği kalmaktadır.

Çalışmamızda, farklı derecelerde ısılara maruz bırakılan iyi korunmuş, yarın yanmış, siyah renkte yanmış, mavi-gri renkte yanmış ve mavi-gri-beyaz renkte yanmış kemiklerde, farklı DNA çekitleme yöntemlerini karşılaştırıp, yeni modifiye bir çekitleme yöntemi geliştirmeyi ve özgün DNA profilleri elde edilip edilemeyeceğini belirlemeyi amaçladık.

Bu örneklerden DNA çekitlemesi ve başarılı PCR amplifikasyonunun halihazırda zorluğunu sürdürmesi, bazı yöntemlerin komplike ve zaman alıcı olması, henüz herhangi bir yöntemin rutinde kullanılacak bir kabul düzeyine ulaşmaması nedeniyle, bu çalışmada mevcut yöntemler arasında kullanıma en uygun olanı belirlemeyi ve çeşitli modifikasyonlarla daha iyi bir yöntem geliştirmeyi amaçladık. Yanmış diş ve kemik kalıntılarında DNA çekitlemesi ve başarılı PCR amplifikasyon, olayın aydınlatılması açısından hayati önem taşıyıp, mevcut yöntemlerin yeterli ve tatmin edici olmaması nedeniyle özellikle zordur. Yöntemlerin çoğu komplike ve zaman alıcıdır ve hiçbir yöntem rutinde kullanılabilecek düzeye ulaşmamıştır. Adli laboratuvarlarda gerçekleştirilen kemik çekitleme protokolleri, özellikle kemiklerin uzun bir süre boyunca çevresel koşullara maruz kaldığı olaylarda tekrarlanabilir ve çoğaltılabilir sonuçlar verememesi nedeniyle sınırlıdır (35,36).

Çalışmamızda femur, humerus, tibia, kosta gibi farklı kemikler ile büyük ve küçük azı dişleri, kesici dişler ve köpek dişleri gibi farklı diş örneklerini kullandık. Hangi tip kemiğin en iyi kalitede ve en fazla DNA'yı verdiğini doğrulamak amacıyla, maruz bırakıldıkları ısı derecelerini de değerlendirerek, kemiklerden DNA çekitlemesine yönelik yarı-standardize bir protokol oluşturduk. On farklı DNA çekitleme yöntemini değerlendirerek ve düşük miktarda kemik tozundan başlayarak (50-100 mg) insan iskelet kalıntıları ve dişlerinde elektroforetik ürünlerin kalite açısından bir karşılaştırmasını gerçekleştirdik. DNA çekitlemesi amacıyla

konvansiyonel fenol-kloroform organik yöntemine ek olarak, QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Almanya), DNA IQ™ System (Promega, Milan, İtalya) ve Genorise Bone DNA Extraction Kit (Genorise Scientific, PA, ABD), HiPurA™ Bone DNA Extraction Kit (HiMedia, India) ve Stratec Invisorb Spin Forensic Kit (Stratec Biomedical AG, Almanya) olmak üzere beş farklı ticari kitin etkinliğini ve verimliliğini değerlendirdik. Ayrıca, deneysel çalışmalarımızda, esas amacımız olan ve örnekleri daha iyi saflaştırmak amacıyla fenol-kloroformun kullanıldığı ve DNA'nın proteinler ve atık materyalden uzaklaştırıldığı yeni geliştirdiğimiz modifiye bir protokolü de gerçekleştirip diğer çekitleme yöntemleri ile karşılaştırdık. Modifiye protokolde yeni aşamayı, farklı kit solüsyonlarını lizis tamponu içinde inkübe ederek gerçekleştirdik. Fenol-kloroform aşaması, yakılan örneklerde atık materyalin kolonlar veya manyetik boncuklarla etkileşmesini önleyerek örneklerin temizlenmesini sağladı. Tüm örnekler, adli genetikte sıklıkla kullanılan AmpFISTR® Identifier™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD), AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) yanında Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, ABD), Stratec Invisorb Spin Forensic Kit (Stratec Biomedical AG, Almanya), GeneMATRIX Bone DNA Purification Kit (EURx Ltd., Polonya) ve HiPurA™ Bone DNA Purification Kit (HiMedia, Hindistan) ile çoğaltıldı.

Yeni DNA çekitleme yöntemlerinin geliştirilmesi ve mevcut ticari kitlelere ilaveten artan miniSTR sayısı, adli bilimlerde aşırı derecede degrade örnekler için etkili bir çözüm olabilir. Belirli süreler boyunca belirli sıcaklıklara maruz bırakılan düşük miktarlardaki taze kemik ve diş örnekleri için fenol-kloroform kullanımına dayanan DNA çekitleme protokolünün uygulanması, beklenen iyi sonuçları vermiştir.

Tüm bunlar doğrultusunda, bu çalışmadaki amaç, bir yangın simülasyon ortamı oluşturarak düşük, orta, yüksek, çok yüksek ve ekstrem derecede yüksek sıcaklıklara maruz

bırakılan kemik ve diş dokularında literatürdeki mevcut DNA çekitleme yöntemlerini karşılaştırıp, DNA elde edilmesi, çoğaltılması ve bu DNA’lardan STR profilleri çalışılması ile kişilerin kimliklendirme başarısının karşılaştırılması ve nihayetinde rutinde kullanılabilecek daha iyi bir yöntemi geliştirebilmek ve ayrıca DNA’nın elde edilebileceği maksimum sıcaklık derecelerini belirlemektir.

3. Genel Bilgiler

3.1. Adli Bilimlerde DNA Uygulamaları

Adli bilimler, çok farklı bilim dallarının multidisipliner bir yaklaşımla çözüm bekleyen adli sorunlara yanıt bulmak amacıyla birlikte çalıştığı uygulamaları kapsamaktadır. İlk zamanlardan beri adli vakaların aydınlatılmasında öncelikli olarak fiziksel delillerin incelenmesi ve bu delillerin yorumlanması yöntemi önde gelmiştir. Fiziksel delillerin bilimsel birtakım tekniklerle değerlendirilmesi ondokuzuncu yüzyılın sonları itibarıyla gündeme gelmiş, suç olgularının incelenip aydınlatılmasında farklı disiplinlere ait bilimsel veriler ve analiz yöntemleri kullanılıp adalete hizmet edilmeye başlanmıştır. Nihayetinde de biyoloji, toksikoloji, patoloji, antropoloji, diş hekimliği, mühendislik, fizik, jeoloji, matematik, meteoroloji, psikoloji, psikiyatri gibi farklı disiplinleri kapsayan “adli bilimler” kavramı ortaya çıkmıştır (1,4,5,79).

Bu antropometrik ölçüm çalışmaları devam ederken, Hindistan’da memur olarak görevli olan İngiliz kökenli William Herschel, resmi bir akım belgelerin üzerine kişilerin parmakizlerini alıp farkında olmaksızın, bugün DNA ile birlikte en önemli kimliklendirme aracı olan parmakizi yönteminin temellerini atmıştır. Aynı dönemlerde Henry Faulds isimli araştırmacı da parmakizinin bireye özgü olduğunu ve yaşlanma ile değişmediğini ortaya koymuştur. Daha sonra, Francis Galton mumyalarda yaptığı çalışmada daktiloskopi yani parmakizi biliminin kurucusu olmuş ve mumyalarda parmakizlerinin ölüm sonrası beş yıl boyunca değişmediğini kanıtlamıştır (4,5).

Suçlu ve suç potansiyeli olan kişilerin her geçen gün kendilerini geliştirdikleri çağımızda, mevcut suçla mücadele yöntemleri yeniliklere açık olmalıdır. Bertillon tarafından geliştirilen antropometrik sistem ve sonrasındaki parmakizi uygulamaları ile devam eden süreç, günümüzde birçok alt disiplinin katılmasıyla yeni bir boyut kazanmış ve nihayetinde adli bilimler kavramı ortaya çıkmıştır.

3.1.1. Adli Bilimlerde Kimliklendirme ve Önemi

Bir kişinin tanınması, tanımlanması ve diğer bireylerden ayırt edilmesinde faydalınılan özelliklerin tamamına “kimlik” adı verilir. Adli bilimlerin bir alt disiplini olan adli tıp ve hukuk uygulamalarında kimlik iki şekilde tanımlanır. İlki “adli kimlik” dediğimiz kişinin nüfus kayıtlarındaki, yaş, cinsiyet, anne ve baba adı, doğum yeri ve tarihi gibi bilgilerden oluşan kimliktir. İkincisi ise “tıbbi kimlik” olarak bilinen, kişinin vücut özelliklerinin hep birlikte değerlendirildiği kimliktir. Tıbbi kimlik altında yaş, fiziksel özellikler, cinsiyet, parmakizi, kemik ve diş yapısı gibi özellikler yer alır (86,87). Adli bilimlerde, gerçekleşen bir ölüm vakasının araştırılmasında atılan ilk adım cesedin kimliğinin tespit edilmesidir.

Olay yerindeki bir cesedin kimliklendirilmesi sürecinde, çevresel koşulların da göz önünde bulundurulduğu farklı teknikler kullanılmaktadır. Günümüzde en sık başvurulana ve kullanılan dört yöntem, ölen kişiyi tanıyan kişi ve/veya kişilerin mağduru doğrudan tanımlaması, vücut üzerindeki yara izi ve dövme gibi kişiye özgü birtakım işaretlerden yararlanılması, parmakizi alınıp karşılaştırılması ve DNA analizi şeklindedir (30,77).

Adli vakaların çoğunda kimliklendirme, mağduru tanıyanların görsel tanımlaması ile yapılır. Yangın, uçak ve motorlu taşıt kazaları, vahşi cinayetler gibi cesedin çürüdüğü ya da vücut bütünlüğünün ileri derecede bozulduğu vakalarda tanık veya tanıdık ifadelerini temel alan görsel kimliklendirme her zaman mümkün olmamaktadır (80). Bu gibi durumlarda, adli bilimlerin şemsiyesi altındaki farklı disiplinler devreye girmekte ve multidisipliner takım çalışması ile

kimliklendirme dediğimiz süreç başlamaktadır (78). Bu tür kimliklendirme çalışmaları kemik ve diş dahil insan kalıntılarından erişilebilecek bütün veriler kullanılarak gerçekleştirilir ve ölüm şekline ve belirlenen yaklaşık ölüm zamanına bağlı olarak farklı bir takım uygulamaları gerektirir.

İleri derecede çürümüş ya da yanma sonucu iskeletleşmiş, yani yapısal bütünlüğü son derece bozulmuş kalıntılarda kimliklendirme büyük ölçüde kemik ve diştten oluşan iskelet aracılığıyla yapılır. Örneğin Krogman tarafından ortaya konan antropolojik kimliklendirme sisteminden faydalanılarak, iskelet kalıntılarından büyük dörtlü olarak bilinen cinsiyet, yaş, kişinin ait olduğu topluma ait biyolojik ve fiziksel özellikler belirlenebilir.

İskelet kalıntıları içinde çevresel koşullara, zamana ve yanma gibi ekstrem koşullara en dayanıklı olan doku diş dokusudur. Bu bakımdan olay yerinde bulunan dişler kimliklendirme için büyük öneme sahiptir. Buna paralel olarak, adli bilimlerin bir alt disipini olarak adli odontoloji ortaya çıkmış, dişlerden faydalanılarak kişinin cinsiyeti (90), yaşı, ait olduğu popülasyonun ırk gibi biyolojik özellikleri (93), mevcut beslenme alışkanlıkları, eğitim seviyesi ve sosyal statüsü, herhangi bir dişine kanal tedavisi uygulanıp uygulanmadığını gösteren dental bilgileri ve anomalileri, kronik hastalıkları, dişleri ile ilgili kazanılmış olabilecek bir takım özellikler ve insan eli ile daha sonra oluşturulmuş değişiklikler, fonasyon, yaşam yeri ve de yaşadığı dönem belirlenebilmektedir. Bu şekilde antropologlar, adli diş hekimleri, adli biyologlar veya adli genetikçiler ölen kişinin bilgilerinden karşılaştırma yapılabilecek referans örnek sayısını azaltıp olayın aydınlatılmasına yönelik araştırmalarda bir yön belirlerler. Sayısı azaltılmış olan referans numuneler içinden, ölen kişinin birinci derece yakınlarından alınacak numunelerle gerçekleştirilecek DNA analizi kimliklendirmede kesin ve son aşamayı oluşturmaktadır (97).

3.1.2. Kimliklendirmede Diş Kalıntılarının Önemi

Kimliklendirmede ölmüş olan kişinin durumuna ve olayın gerçekleşme şekline göre

uygulanabilecek iki yöntem mevcuttur. İlk yöntem, ölen kişiye ait antemortem olarak bilinen ölüm öncesi kayıtların, cesedin incelenmesinin ve bir takım analizlerin gerçekleştirilmesinin ardından, elde edilen postmortem olarak bilinen ölüm sonrası kayıtlarla karşılaştırılması temeline dayanır. Bu yöntem özellikle felaket kurbanlarının kimliklendirilmesinde kullanılır ve belli bir hiyerarşiye dayanan işlemlerin dikkatli bir şekilde ve titizlikle takip edilmesi önemlidir. İkinci yöntemde ise antemortem kayıtların elde edilememesi sonucu ve ölenin kim olduğu ile ilgili herhangi bir ipucu olmaması durumu söz konusudur. Bu durumda adli diş hekimi, mağdurun dişlerinden elde edilebilecek bütün verileri toplayarak bu verilerin karşılaştırmasının yapılacağı referans numune aralığını mümkün olduğunca daraltmaya çalışır (80).

Yangınlar, uçak ve motorlu araç kazaları, kitlesel ölüm olaylarının gerçekleştiği felaketler ve cesetlere ulaşmanın zor olduğu ve zaman aldığı olaylar, cesedin parçalandığı ve ileri derecede bozulduğu cinayet vakalarında, bireyin yakınlarının ya da tanıdıklarının kişiyi kimliklendirmesi çoğu zaman olumsuz hale gelir veya psikolojik nedenlerden ötürü böyle bir kimliklendirmeye gidilmesi tercih edilmez. İşte bu gibi durumlarda dişlerin vücuttaki en dayanıklı doku olmasından dolayı, araştırmacılar özellikle dişleri kullanarak önemli veriler elde eder (80).

Dişlerden genellikle kişinin yaşını, cinsiyetini ve biyolojik bir takım farklılıklarını belirlemede yararlanılır. Yaş tayini esnasında özellikle iki önemli veri kullanılmaktadır. İlki dişlerin kalsifikasyonu iken, ikincisi dişlerin sürme zamanları şeklindedir. Kalsifikasyonun saptanabilmesi için mandibula ve maksilla kemiklerinden oluşan çenenin radyografileri çekilir. Sürme zamanının saptanabilmesi için ise mandibula ve maksillada bulunan mevcut tüm dişler dikkatlice incelenir ve diş sürme ile ilgili atlara göre değerlendirme yapılır. Dişlerde cinsiyetin belirlenmesi aşamasında kullanılabilecek farklılıklar ise oldukça değişkenlik göstermektedir. Literatüre göre kadın dişlerinin kısmen daha küçük olduğu ifade edilebilse de yalnızca dişlerin kullanılması ile cinsiyet saptanması riskli olduğundan tercih edilmemektedir.

Erişkin bir bireyin ağzında 32 adet diş bulunup her bir dişin 5 yüzeyi mevcuttur. Sonuç itibarıyla incelenebilecek 160 farklı yüzey bulunmaktadır ve tek yumurta ikizlerinde bile birbiri ile tamamen aynı olan diş dizisi bulmak olanaksızdır.

Özellikle geçtiğimiz son on yılda diş dokusu kullanılarak kimliklendirmede önemli aşamalar kaydedilmiştir. Cesedin üzerinde bulunabilecek ısırık izlerinin incelenmesinde daha önce kullanılan iki boyutlu çalışmaların yerini üç boyutlu dijital teknikler almıştır ve kimliklendirme amacıyla diş dokusundan DNA'nın elde edilmesi, kaydedilen bu ilerlemelere en iyi örneklerdir (75).

3.2. İdentifikasyon Amaçlı DNA Analizleri

Locart tarafından ortaya konan “Her temas bir iz bırakır” teorisine dayanılarak, olaya karışmış olan fail veya faillerin olay yerinde kendilerine ait DNA örneklerinin bulunduğu bir biyolojik delil bırakmaması imkansız görünmektedir. Eser miktardaki vücut sıvısı, yalnızca tek bir saç veya vücut kılı örneği ya da konvansiyonel parmakizi, olayla ilgisi olabilecek kişi veya kişilerin bağlantısını gösterebilecek DNA delili ortaya koymaya yetebilmektedir. DNA analizleri, yıllar önce gerçekleşmiş olan adli olaylardan elde edilmiş olan delilerin günümüzde de yeniden değerlendirilebilmesini sağlayabildiğinden retrospektif bir kısım değerli bilgileri de bize sunmaktadır (81).

Adli olguların aydınlatılmasında kullanılan DNA parmakizi veya DNA profillemeye çalışmalarının esasını yeryüzünde tek yumurta ikizleri hariç hiçbir bireyin DNA molekülünün tamamen aynı olamayacağı oluşturmaktadır. İnsanlarda DNA molekülü bireyler arasında büyük ölçüde birbirine benzerlik göstermektedir (97). DNA iplikçiklerinde yer alan genler belirli bir dizilimde ve sırada bulunmakta olup, organizma genomunda aynı zamanda polimorfizm olarak adlandırılan varyasyonel bölgeler mevcuttur. Yıllar süren çalışmaların neticesinde, genom üzerinde kimlik tespiti amacıyla kullanılabilecek polimorfik bölgeler saptanmıştır (28,31).

DNA parmakizi ve DNA profili kavramı, ilk kez 1985 yılında İngiliz genetik bilimci Sir Alec Jeffreys tarafından ortaya konmuştur. Bu araştırmacı DNA'nın belirli bölümlerinde birbirini tekrarlayan diziler olduğunu ve bu dizilerin tekrar sayılarının kişiler arasında farklılık gösterdiğini tespit etmiştir. DNA tekrar dizileri olarak bilinen, değişken sayıda ardışık tekrarların, yani VNTR'lerin (Variable Number Tandem Repeat), uzunluklarında kişisel varyasyonların saptanmasını sağlayan bir yöntem geliştiren Jeffreys, bu şekilde adli bilimlerde kimliklendirmeye yönelik çığır açan bir sürece öncülük etmiştir. Jeffreys'in VNTR'ler için kullandığı yöntem, restriksiyon endonükleaz enzimleri aracılığı ile özgün dizilerden DNA'nın belirli bölgelerinin kesilmesini sağlayan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi) tekniğidir. Bu yöntemin prensibi, genomda dağınık şekilde bulunan tekrar birimlerinin analiz edilmesine dayanır. Bu diziler, farklı kişilerin genomunda farklı tekrar sayılarında ve farklı yerlerde bulunur. DNA parmakizi oluşturabilmek için bireye ait DNA örneğinin belirli restriksiyon enzimleri ile kesilmesi gerekir. Daha önceki yıllarda ve günümüzde çoğu laboratuvarın uygulamayı bıraktığı yöntemde, elde edilen DNA parçaları agaroz jelde yürütülmekte, sonrasında Southern Blot tekniği ile görüntülenmekteydi. Böylece bir dizi DNA bandından oluşan, barkod görünümünde bir jel görüntüsü elde edilmekteydi. Farklılığın arandığı bireyde tekrar birimlerinin genomun farklı yerinde olması beklendiğinden, ikinci bireye ait DNA fragmentlerinin southern blot görüntüsü farklı şekilde elde edilerek yorumlamaya gidilmekte, elde edilen bantlar o kişilerin DNA parmakizi olarak adlandırılmaktaydı. Keşfedilmesiyle adli bilimlerde yeni bir devrimi başlatan bu teknik ilk kez bir cinayet vakasının çözülmesinde kullanılmış ve bu vakada elde edilen başarısının sonucunda kimliklendirmede artık vazgeçilmez bir yöntem olarak rutine geçmiştir. Belirtilen bu özelliklerine rağmen bu yöntemin nispeten kısıtlayıcı birtakım yönleri bulunmaktadır (28,31).

1. Mevcut yöntemlere göre bu yöntem, kısmen daha fazla DNA gerektirir. Bu yüzden özellikle

kan lekesi ve saç numunesi gibi eser miktarda DNA elde edilen biyolojik delillerde kullanılamaz.

2. Southern Blot tekniğinde bantlar arası yoğunluk farklı gözlenebileceği için değerlendirme sırasında problemle karşılaşılabilir.
3. Southern blot tekniğinde sağlık için riskli olabilecek radyoaktif işaretli problemler kullanılır.
4. Tamamlanması en az beş gün sürer.
5. Sonuçlar incelediğinde bir varyasyon içerip içermediği ve dışlama gücü tam olarak bilinmez.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun (PCR) 1994'teki keşfi ve sonrasında, bireyler arası varyasyonel bölgelerin STR analizyle saptanabileceğinin bulunması adli genetik kimliklendirme olgularında RFLP yönteminin dezavantajlarını ortadan kaldırmıştır. PCR için olay yerinden sadece bir hücrenin elde edilmesi yeterli olabilmektedir. Radyoaktif işaretli problemlerin kullanımı söz konusu olmadığı için, uygulamayı gerçekleştiren kişinin sağlığı açısından bir risk söz konusu değildir. PCR ile kısa bir süre içinde saf çoğaltılmış ürün elde edilebilirken, yeni geliştirilen insan hatasını en aza indiren otomatize multipleks STR sistemleri ile birkaç saatte ayırım gücü yüksek sonuçlar alınabilmektedir (81).

3.3. Diş ve Yapısal Özellikleri

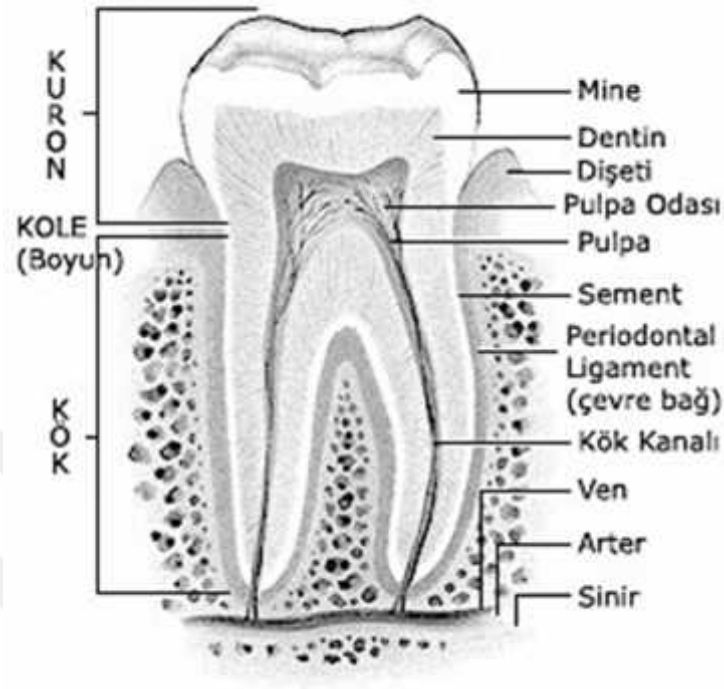
Dişler sindirim sisteminin başlangıcında yer alan, üst çene kemiği olan maksilla ve alt çene kemiği olan mandibulanın hareketleri ve çiğneme kaslarının yardımı ile ağız içinde alınan besinlerin parçalanmasını ve öğütülmesini sağlayan organlardır. Fonksiyonları arasında savunma, beslenme ve fonasyon yer almakta, ayrıca estetik açıdan önem taşımaktadırlar. Alveolus dentales adı verilen alt ve üst çene boşlukları içinde bulunup ve destek amaçlı paradontium ile çevrelenmişlerdir.

Makroskopik olarak incelendiğinde dişin dişetinin dışında kalan ve mine ile örtülmüş kısmına kron, çene kemiği içinde gömülü kısmına kök, kronla kökün birleştiği yere ise boyun

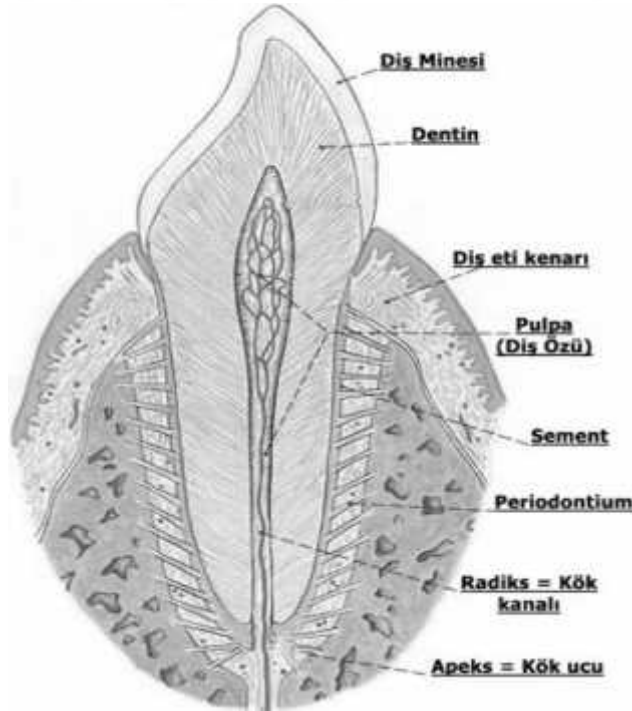
veya kole denir. Dişin büyük kısmı dentinden oluşmakta, dentini kron bölgesinde mine, kök kısmında ise sement denilen tabaka örtmektedir. Dentinin merkez bölgesinde ise dişin diğer kısımlarını foramen apikale aracılığıyla birbirine bağlayan pulpa bulunmaktadır (Şekil 1 ve 2) .

Canlı kalsifiye diş dokusunun %69 ila %99'luk kısmını, büyük bir bölümü apatit formunda olan kalsiyum fosfat minerali şeklindeki inorganik materyal meydana getirmektedir. Apatit, klor veya fosfor apatit şeklinde doğadaki kayalarda bulunur ve çift fosfatlı kalsiyum moleküllerine verilen isimdir. Kemik ve diş dokusundaki apatit moleküllerinin çoğu, karşılıklı yıldız kuyruğu şeklinde dizilim gösteren hidroksiapatit adı verilen farklı bir formda bulunmaktadır. Tek başına hidroksiapatit çok sert bir molekül değilken, minenin yapısında son derece kuvvetli bir yapının oluşumunu sağlar.

Mine, insan vücudunda bulunan en sert doku olup ektoderm kökenlidir ve kron bölgesindeki dentin tabakasını örtmektedir. Asit ortama dayanıksızdır ve diş çürüklerinin nedenidir. Kalınlığı diş boynuna gidildikçe azalır, kesici kenarlara doğru gidildikçe ise 2,5 mm kalınlıklara çıkar. Kişinin yaşlanması ile kalınlığı azalır. Vücuttaki en sert doku olsa da son derece kırılgan bir yapıya sahiptir ve altında yer alan dentin tabakası tarafından desteklenmeye gereksinim gösterir. Yapısında ameloblast hücrelerinin oluşturduğu prizma çubuklar yer alır.



Şekil 1. Genel Diş Morfolojisi ve Çevreleyen Yapılar



Şekil 2. Diş Pulpa Boşluğu ve Kök Yapısı

Dentin, dişlerin en büyük kısmını kaplayan bölümdür ve mineralize bağ dokusu yapısındadır. Geçmişte, sertliği, kimyasal ve biyolojik yapısının benzerliği nedeniyle kemik dokusunun yapısı ile aynı kabul edilmiştir. Ancak, daha sonraları kemik dokusu incelediğinde, metabolizmasının daha aktif ve kan damarları açısından daha zengin olduğu görülmüştür. Kemik dokusundaki öncü hücreler osteoblastlar iken, diş dokunun öncü hücreleri özellikle dentindeki dentinogenezden sorumlu odontoblastlardır. Dentin yapısında kollajen bulunduğu için, mineyle karşılaştırıldığında daha yumuşaktır ve çürümeye daha eğilimlidir. Aynı minede olduğu gibi yarı geçirgen özelliktedir ve içinde dentin kanalcıkları bulunmaktadır. Dolgu, kaplama gibi bir işlem için diş kesildiğinde bu kanalcıklar açığa çıkmış olur ve sıcak-soğuk, tatlı-tuzlu-ekşi gibi uyarılara karşı ağrı eşiği düşer. Yaşlandıkça bu kanalcıklar mineralize olup daralma gösterir ve bu yeni dentine sklerotik dentin adı verilir. Dentin yapımı hayat boyu süren bir olay olup, beslenmesini sağlayan doku pulpadır. Pulpanın ölmesi ya da bir işlem sonucu çıkarılması halinde dentin artık kırılgan duruma gelmiş olur.

Sement denilen kısım dişin kök kısmını kaplar ve kalsifiye olmuş bağ dokusu yapısındadır. Dentin gibi kimyasal yapı açısından kemiğe benzer. Büyük bir kısmı (%65) hidroksiapatitten oluşan inorganik materyalden, kalan kısmı (%20 ila %24) organik materyalden ve az bir kısmı da (%15) su moleküllerinden oluşur. Sementi sentezleyen ve onarımını sağlayan hücreler kökteki öncü sementoblastlardır. En kalın olduğu yer kök ucudur.

Pulpa, dişin merkezinde bulunan yumuşak bağ dokusu şeklindeki bir yapıdır (Şekil 2). Diş dokuları içinde kan dolaşımının olduğu tek yer burasıdır. Kan damarları ve sinirler açısından zengin olup, bu damar ve sinirler pulpa boşluğuna apikal foramen ile ulaşmaktadır. Başlıca görevi dentini oluşturmak olduğu için etrafı öncü odontoblast hücreleri tarafından çevrelenmiştir. Pulpanın ikinci görevi ise, besinler ve nem ile yapısını koruduğu organik materyal ile dişi beslemektir. Pulpa boşluğunda ayrıca immün sistem hücreleri yer alıp, bakteriyel enfeksiyonlara

karşı savunmayı sağlarlar. Pulpanın diğer görevleri ise duyuşal olarak, sıcaklık ve basınç değişikliklerini algılamak ve ikincil dentini yaparak koruyucu fonksiyon üstlenmektir.

3.3.1. İnsanda Dentisyon

Erişkin bir insanda üst maksiller ve alt mandibuler çenede dizilmiş olan 32 adet diş bulunmaktadır. Bu arklar normal koşullarda simetrik bir yapıya sahiptir. Her bir arkın eşit şekilde ortadan bölünen bir yarısına kuadran adı verilir. Her kuadranda 1 kanin, 2 kesici, 2 premolar ve de 3 molar olmak üzere toplam 8 adet diş bulunur (Şekil 3).

Klinik olarak incelendiğinde 3 tip dentisyon olduğu görölmektedir;

1. Primer/Geçici Dentisyon: Ağızda 20 adet diş mevcuttur. Bu dişler ayrıca bebek, süt ya da geçici dişler olarak da adlandırılmaktadır. Yenidoğanda ilk altı ay içinde oluşmaya başlarlar ve 12 yaş civarında yerlerini kalıcı dişler alır.
2. Karışık Dentisyon: Geçici ve kalıcı dişler bir aradadır. Altı yaş civarında ilk kalıcı dişler belirir ve 12 yaş civarında geçici tüm dişler dökölür.
3. Kalıcı dentisyon: Üst çenede 16 ve alt çenede 16 olmak üzere toplam 32 adet kalıcı diştten meydana gelir.

3.3.2. Diş Tipleri

A. Kesici Dişler: Üst çenede 4 ve alt çenede 4 olmak üzere toplam 8 adet kesici diş mevcuttur. Alınan besinlerin kesilmesini ve konuşma artikülasyonunu sağlarken, aynı zamanda ağızda estetik görünüşte ve dudakların desteklenmesinde önemlidirler.



Şekil 3. İnsanda kalıcı dişlerin dentisyonu

B. Kanin Dişleri: Alt çenede 2, üst çenede 2 adet bulunur. Bu dişlerde kesici dişler gibi dudakları desteklerler ve alınan besinlerin parçalanmasını sağlar.

C. Premolar Dişler: Alt çenede 4, üst çenede 4 adet bulunur. Besinlerin öğütülmesine yardımcı olurlar.

D. Molar: Alt çenede 6, üst çenede 6 adet bulunur. Besinlerin çiğnenmesi ve öğütülmesinde rol oynarlar.

3.3.3. Kalıcı Dişlerde Pulpa ve Pulpa Boşluğunun Morfolojik Yapısı

Kron ve kök dentini içerisinde yer alan boşluk pulpa boşluğu olarak adlandırılırken, bu boşluktaki mezenşimal kökenli bağ doku yapısı da pulpa dentis olarak adlandırılır.

Kron olarak adlandırılan bölgede şekillenen boşluğa pulpa odası, kök olarak adlandırılan bölgede şekillenen boşluğa ise pulpa kanalı adı denir. Pulpa boşluğu farklı nedenlere bağlı olarak küçülebilir ya da büyüyebilir ve farklı diş pulpa morfolojik açıdan farklılıklar gösterir.

3.4. Moleküler Analizler

İskelet ve diş kalıntılarında DNA analizi ile cinsiyetin belirlenmesinde en kolay yol, Y

kromozomuna özgü primerler kullanıp PCR ile DNA'nın çoğaltılmasıdır. X ve Y kromozomundaki ortak bir kısım diziler nedeniyle, bu aşamada titizlikle çalışılması önemlidir. Böylece Y kromozomuna işaret eden PCR bandı ya da kapiller elektroforez elektroforegram piki, ilgili DNA'nın bir erkeğe ait olduğunu gösterir. Herhangi bir bant görüntüsünün olmaması da örneğin dişi olduğunu gösterir. Kullanılan biyolojik örnek yeterli miktarda DNA içermiyorsa ya da elde edilen DNA aşırı derecede degrade ise ya da tüp içinde PCR aşamasını başarısız kılacak kontaminant faktörler bulunuyorsa, bu örnek bir erkek bireye ait olsa da bant veya pik elde edilemeyebilir. Bu durum özellikle antik örnekler için geçerlidir (28,31).

Bu dezavantajları bulundurmayan, cinsiyetin belirlenebileceği bir diğer yöntem, amelogenin denilen bölgenin PCR ile çoğaltılmasıdır. Amelogenin geni, dişin mine tabakasında yer alan bir proteini kodlayan gendir. Bu gen X ve Y kromozomunun ikisinde de yer almasına rağmen, X ve Y kromozomu üzerinde bulunan iki kopya birbirinden farklıdır ve boyutları aynı değildir. Mevcut primer setleri kullanıldığında X kromozomu üzerinde 106 bp'lik ve Y kromozomu üzerinde ise 112 bp'lik bir bölge çoğaltılabilmektedir. Amelogenin geni PCR ile analiz edildiğinde, kadınlardaki yalnızca X kromozomu bulunması nedeniyle tek bir bant ya da pik, erkeklerde ise X ve Y kromozomunun ikisi de bulunduğundan, iki bant ya da pik görüntüsü gözlenir. Elde edilen DNA yeterli kalite ve kantiteye sahip değilse ya da farklı bir nedenle amplifikasyon başarısız olduysa, kullanılan yöntemle göre farklılık göstermek üzere, herhangi bir bant ya da pik meydana gelmez. Bu şekilde kadın ve erkek ayırımında bir hata ile karşılaşılmaz (28,31).

3.4.1. DNA'nın Yapısı

DNA, canlı organizmalarda kalıtım materyali olup nükleotid olarak adlandırılan yapıtaşlarından meydana gelir. Nükleotidler beş karbonlu şeker olan deoksiriboz, bir azotlu baz ve bir de fosfat grubundan oluşur. DNA'nın yapısında dört farklı tipte nükleotid mevcuttur.

Nükleotidlerin farkını belirleyen deoksiribozun yapısındaki ilk karbona bağlanan dört farklı bazdır. Çift azot halkalı olan bazlar adenin ve guanin olup bunlara pürin adı verilir. Tek bir azot halkasına sahip bazlar timin ve sitozin bazları olup bunlar da pirimidin olarak adlandırılır (97).

DNA çekirdekte uzun kromozom adı verilen yapılar şeklinde organize olmuştur ve işlevsel DNA molekülü iki zincir halinde bulunur. DNA yapısı ilk kez 1953'te Watson ve Crick'in ortaya koyduğu bir modelle tanımlanmıştır. Karşılıklı DNA zincirlerinde pürin ve pirimidin bazları birbirini tamamlar ve DNA molekülü bu şekilde bir arada tutulur. Bu eşleşmede adenin bazı timin bazı ile iki hidrojen bağı yaparken, sitozin bazı guanin bazı ile üç hidrojen bağı yapıp bir araya gelmektedir. Buna paralel olarak, DNA'nın GC bazları yönünden zengin bölgeleri AT bazları yönünden zengin olan bölgeleriyle karşılaştırıldığında daha kuvvetli şekilde bir arada tutulmaktadır. Bu baz eşleşmeleri DNA molekülünün temelini oluşturur ve DNA profilellemesinde çeşitli manipülasyonlara olanak verir (81).

DNA'daki bilgi, dört nükleotidin doğrusal şekilde ardarda sıralanmasıyla meydana gelir. Gen, kalıtımın işlevsel ve fiziksel olan birimidir ve DNA'nın işlevsel bir proteine yönelik bilgi taşıyan kısmı olarak ifade edilir. İnsan genomunda tahminen 100.000 gen olduğu tahmin edilmektedir ve toplam baz çifti sayısı 3 milyardır. Gen denilen fonksiyonel birimler 46 kromozom üzerindeki lokus denen bölgelerde yer alır. Proteinleri kodlayan bölgelerin çoğunluğunda yalnızca tek bir gen formu mevcuttur. Bu şekilde çoğu gen, mutasyon toleransı göstermez. Bazı genlerde mutasyonların görülmesi daha olasıdır ve bu genler birden fazla formda bulunabilmektedir. Bu varyasyon genetik polimorfizm olarak adlandırılmaktadır. Her birey tek bir gen için sadece iki alel bulundurur. Buna karşın bir popülasyonda mevcut bir gen bölgesine yönelik çok sayıda alel mevcuttur ve adli olgularda DNA profillemesi bu gerçeği temel almaktadır. Örneğin, kan grupları, transplantasyon antijenleri ve serum proteinleri DNA düzeyinde genetik farklılıklar gösterir. Günümüzde DNA teknolojisi son derece gelişmiş olup,

belirli DNA dizilerindeki varyasyonların saptanmasını sağlayarak adli olaylarda DNA'nın başarıyla kullanılmasına olanak vermektedir.

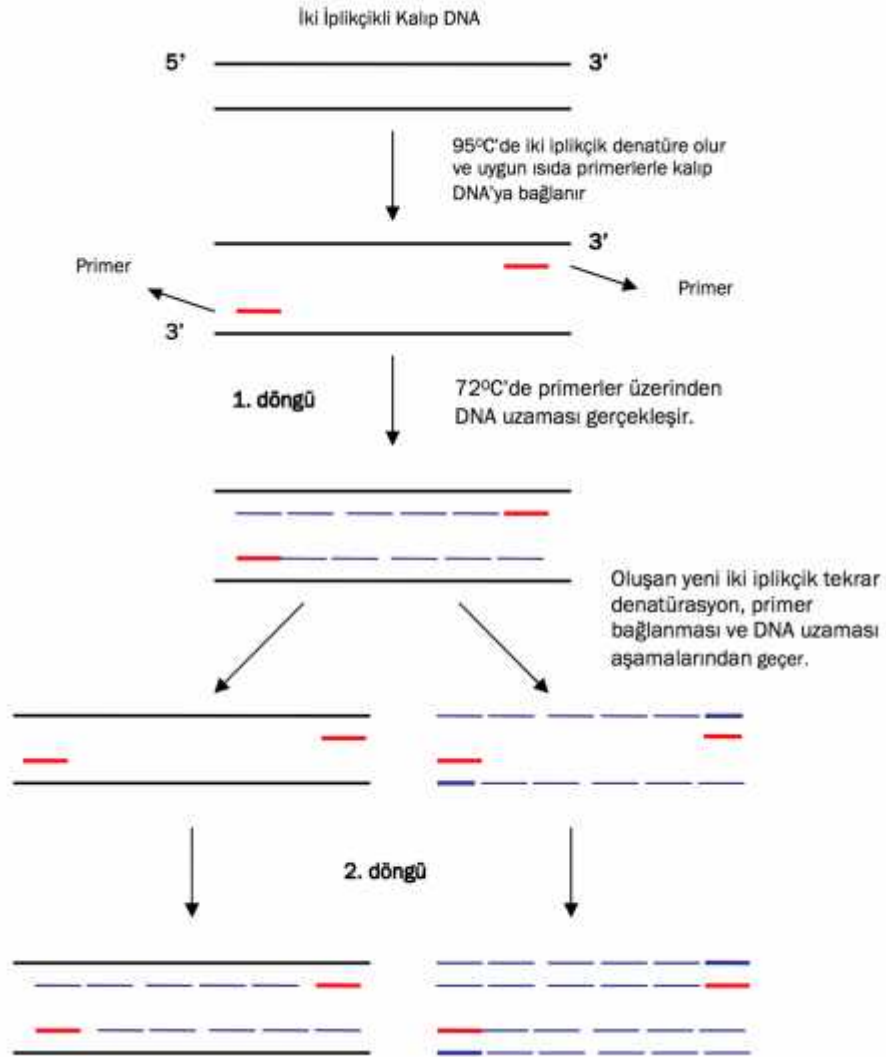
3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR tekniği ilk kez 1985'te Kary Mullis adlı araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Birkaç saat süren bir zaman diliminde DNA'nın belirli bir dizisinin milyonlarca kez kopyalanmasını sağlayan bu yöntem moleküler biyoloji çalışmalarında çığır açmış, adli bilimlerle de olayların aydınlatılmasında kullanımına yer verilerek Mullis'e 1993 yılında Nobel ödülünü kazandırmıştır (81).

PCR, sekansı bilinen bir DNA bölgesinin dizayn edilen primer kullanılarak in vitro ortamda çoğaltılmasına olanak verir. Bu yöntemde ısıya oldukça dayanıklı olan *Thermus Aquaticus* bakterisinden elde edilen Taq Polimeraz enzimi kullanılır. Bu enzimin moleküler ağırlığı 80.000 dalton olup, polimeraz etkinliğini 72°C'de gösterir. 94°C'de bekletildiğinde de işlevsel özelliğini kaybetmez. Polimerazlar aktivite göstermek için serbest magnezyum iyonlarına ihtiyaç gösterir. Başarılı DNA çoğaltma işlemi için uygun magnezyum miktarının bilinmesi gerekir. PCR tekniğinin temeli, amplifiye edilmek istenen dizinin iki ucuna özel ve buradaki baz dizilimine komplementer, 18–20 bç uzunluğa sahip bir çift primer kullanılıp bu bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesi şeklindedir.

Başlangıç DNA miktarı PCR döngü sayısının kaç olacağını belirler. Bu şekilde PCR'da döngü sayısı 20 ila 45 arasında değişir. PCR'ın temelinde birbirini izleyen üç aşama bulunur:

- 1) DNA'nın iki zincirinin, genellikle 95°C'nin kullanıldığı bir yüksek ısıda birbirinden ayrıldığı denatürasyon aşaması
- 2) Yine 37°C ile 72°C arasında değişen belirli bir ısıda primerlerin kalıp DNA'daki tamamlayıcı bölgelerle eşleştiği annealing (bağlanma) aşaması
- 3) Taq Polimeraz varlığında DNA'nın 72°C'de polimerize olduğu uzaman aşaması



Şekil 4. PCR’da denatürasyon, primer bağlanması (annealing) ve Taq polimeraz ile uzama aşamaları

Bu üç aşamanın gerçekleşmesi ile komplementer DNA zincirleri kendilerini kopyalar (Şekil 4). Birbirini izleyen bu reaksiyonlar sonucunda, istenen DNA bölgesinin çok sayıda kopyası elde edilmiş olur. Örneğin 25 döngüden sonra kopya sayısı 106’ya ulaşır.

3.4.3. Degradе ve Antik Örneklerde DNA Analizi

Özellikle antik DNA çalışmalarında DNA kaynağı olarak kemik ve diş dokuları

kullanılır. Bu tip çalışmalarda DNA'nın korunmuş olma derecesi, örneklerin bulunduğu çevresel koşullarla doğrudan ilişkilidir. Dişler vücutta bulunan en sert doku olup, olumsuz çevre koşullarına diğer biyolojik örneklerden daha dirençlidir ve avantajlıdır. Bu avantajı, etraflarını saran ve koruyucu bir tabaka oluşturan sert mine tabakası sağlamaktadır. Kemikler de dişler gibi çevresel koşullara oldukça dayanıklıdır ve hücre sayısı dişe göre çok daha fazladır. Bu nedenle dişlerle kıyaslandığında daha verimli DNA sonuçları elde edilmektedir (12).

İlk kez 1985 yılında Mısır mumyalarında gerçekleştirilen DNA analizleri evrim, genetik ve enfeksiyon hastalıkların ortaya konması, göç yollarının belirlenmesi gibi belirli antropolojik ve arkeolojik sorulara ışık tutmuştur. Ancak uygulamayla ilgili günümüzde de süren birtakım teknik güçlükler söz konusudur.

Degrade ve antik örneklerde özellikle kontaminasyon, DNA molekülünün aşırı derecede degradasyonu ve bir kısım PCR inhibitörlerinin varlığı gibi dezavantajlar söz konusudur (12).

Kontaminasyon esasen bütün DNA analizlerinde titizlik gösterilmesi gereken bir sorundur. Çağdaş örneklerde DNA miktarı yeterli miktarda olduğu için, olası eser miktardaki kontamine olmuş DNA baskılanır ve analiz sonuçlarını etkilemez. Ancak eski ve degrade örneklerde DNA genellikle eser miktardadır ve dış ortamdan kaynaklanan nükleik asitlerle PCR sırasında bir yarışma söz konusu olup, yarışı kazanan genellikle kontamine DNA örneği olmaktadır.

İnsan DNA'sının kullanıldığı analizlerde, bakteri gibi mikroorganizmalara ait DNA kirliliği kontaminasyon olarak kabul edilmez, çünkü insana özgü primerler kullanıldığı için diğer DNA'lar çoğalmayacaktır. Degrade örneklerde insan DNA'sı ile kontaminasyon önemli bir sorundur ve PCR'ın farklı aşamalarında meydana gelebilmektedir. Bu tip kontaminasyonların kaynağı genellikle analizin gerçekleştirildiği laboratuvardaki personeldir. Dikkat edilmesi gereken diğer önemli bir kontaminasyon riski ise önceki PCR örneklerinden kaynaklanan ve PCR sırasında meydana gelen kontaminasyondur.

Kemik dokusu gözenekli yapısı sebebiyle diş dokusuna kıyasla kontaminasyona daha açık bir dokudur. Diş dokusunda kemik dokusundaki Haversian gibi kanallar olmadığı için ve sert mine yapısı sayesinde kontaminantlar daha az etkilidir. Ancak diş dokusunda kök kısmı son derece geçirgen bir yapıya sahiptir. Genellikle pulpa dental tüpler aracılığıyla kök diş kısmı ile doğrudan bağlantılıdır. Bu nedenle çekilmiş bir diş ile çalışılırken minenin koruyuculuğunun önemi yoktur. Degrade diş ve kemiklerin kullanıldığı çalışmalarda karşılaşılan kontaminasyonların nedeni bu şekilde açıklanabilir.

Degrade örneklerde genellikle mitokondriyal DNA (mtDNA) dizinleme yöntemi kullanılmaktadır ve çekirdek DNA'sı ile gerçekleştirilen yöntemlere kıyasla kontaminasyon daha olasıdır. Bunun nedeni kontaminasyona neden olan hücrede sadece bir çekirdek DNA'sı varken, binlerce kopya mtDNA kopyasının olmasıdır.

3.4.5. Degrade DNA'da PCR amplifikasyonu

Kemik örnekleri, farklı nedenlere bağlı olarak yüksek derecede fragmente DNA molekülleri içerebilir. İnsan kalıntılarının modern adli amaçlı analizi, PCR ürünlerinin büyüklüğüne veya dizi analizine dayanır. Son derece etkili ve verimli olmasına rağmen PCR temelli protokollerde, kalıp DNA'nın düşük kopya sayıları ya da degradasyon süreçleri sırasında çeşitli modifikasyonlara maruz kalması nedeniyle birtakım komplikasyonlarla karşılaşılabilir. Tükürük veya kan gibi taze örneklerden modern DNA hazırlama teknikleri ile karşılaştırıldığında, eski ve yıpranmış kemik ve dişlerde DNA genellikle daha kısa uzunluktadır. PCR ile çoğaltılabilecek DNA dizilerinin uzunluğu, sadece iplik kırılmaları değil, aynı zamanda Taq polimeraz ile DNA ipliklerinin uzatılmasına yönelik engellerin varlığı nedeniyle sınırlıdır. Diploid bir insan hücresi yaklaşık olarak 6,6 pg genomik DNA içerir ve 100 pg genomik DNA'nın (nükleer DNA'nın yaklaşık 15-17 diploid kopyası) altındaki kalıp DNA konsantrasyonu Düşük Kopya Sayısı (Low Copy Number-LCN) olarak kabul edilir (26). PCR

sırasında düşük sayıda kalıp DNA ile çalışılıyorken, stokastik (rasgele) etkiler meydana gelebilir. Böyle bir durumda da, alelik dropout (alel düşmesi), alel dengesizliği, artmış stutter veya kalıp olmayan DNA'nın eklenmesi olayları ile karşılaşılabilir.

Heterozigot bireylerde, iki alelden birinin düzgün şekilde çoğaltılması başarısız olduğunda, terciqli amplifikasyon durumu meydana gelebilir. Bu etki alelik dropout olarak bilinir ve sonuç heterozigot bireyin homozigotmuş gibi genotiplendirilmesidir (23). Belirli bir heterozigot lokusta 2 alelin ekspresyon oranı 1:1 değilse, nihai etki alelik dengesizliktir.

Meydana gelen ve sık karşılaşılan diğer artefaktlar, DNA replikasyonu sırasında Taq polimerazdaki kaymalardan kaynaklanan stutter ürünlerdir. Bu nedenle, tetranükleotid tekrar üniteleri için, stutter ürünler esas alelden 4 baz çifti daha kısa veya daha uzundur ve ana pikin %10'undan azdır (27).

Kalıp olmayan DNA'nın eklenmesi sık karşılaşılan diğer bir artefakt tipidir ve PCR ürününün 3' ucuna fazladan bir nükleotidin eklenmesi şeklinde izlenir. Kalıp olmayan eklenme genellikle adenin (A) bazından kaynaklanır ve bu nedenle bu olay adenilasyon olarak adlandırılır. Bu modifikasyon primer spesifiktir ve hedef diziden bir baz çifti daha uzun bir ürünle sonuçlanır (28).

Optimum kalıp DNA miktarları iyi tanımlanmış olup genellikle 28-30 PCR çoğaltma döngüsünün olduğu 200 pg ila 2 ng başlangıç DNA miktarı aralığında değişim gösterir (çoğu ticari kitte optimum miktar 1 ng olarak kabul edilir) (29, 99-101). Bir nanogram DNA yaklaşık 660 kopya genomik DNA'ya eşittir ve başlangıç DNA miktarı 60 kopyadan az olduğunda, artmış sıklıkta PCR hataları gözlenir (30). DNA amplifikasyonu, adli amaçlı kullanılan lokuslar için 500 bp'den kısa bir uzunluk ve %45-56 oranında bir GC içeriği ile karakterize olan benzer bir etkinlik gösterir. Adli DNA tiplirmede kullanılan ticari multipleks kitler, 100-450 bp aralığında

uzunluğa sahip DNA fragmentlerini çoğaltır ve PCR reaksiyonunun multipleks hale getirilmesi, analiz için gereken örnek miktarını, çalışma süresini ve maliyetleri en aza indirir.

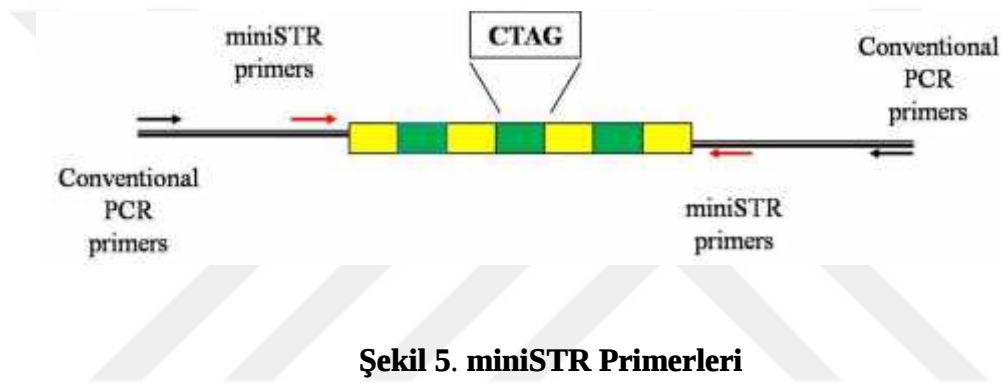
Düşük kopya sayısının olduğu örneklerde, sonuçların doğruluğunu ispatlamak için çekitleme ve çoğaltma işlemlerinin tekrarlanması ve ayrıca, PCR hacminin azaltılması, PCR döngü sayısının artırılması ve nested (iç içe) PCR gibi diğer analitik yaklaşımlar önerilir.

Düşük kopya sayısı ile tiplendirme kayıp kişiler ve insan kalıntılarının idantifikasyonu için uygunken, diğer uygulamalardaki sınırlamaların üstesinden gelinmesi gerekmektedir. PCR'ı başlatmak için kalıp DNA fragmentlerinin birkaç yüz baz çifti içerdiği gösterilirse, söz konusu artefaktların varlığı azaltılabilir. Kalıp moleküllerin miktar tayini Kompetitif PCR veya Kantitatif Real-Time PCR (qRT-PCR) kullanılarak yapılabilir (23).

3.4.6. Degrade Örneklerde miniSTR'lerin Kullanılması

Adli amaçlı DNA tiplendirmesinde kullanılan mevcut ticari multipleks STR kitleri, 100 ila 450 bp aralığında ampliconlar elde edilmesini sağlayabilmektedir. Günümüzde adli olgularda, çeşitli STR belirteç setleri ile Combined DNA Index System (CODIS) gibi büyük veritabanları kullanılmaktadır. STR analizinin mümkün olmadığı aşırı derecede degrade olmuş örneklerde, olayın aydınlatılması amacıyla genellikle mtDNA çok değişken (hypervariable) bölgelerine (HV-1 ve HV-2) yönelinmektedir (32,74). Ancak, mtDNA analizi zaman alıcı bir yöntemdir ve mtDNA'nın haploid, Mendel dışı kalıtımı nedeniyle, idantifikasyon amaçlarına yönelik veriler, CODIS'in 13 lokusluk tam STR eşleşmesi kadar güçlü değildir. Ayrıca, daha küçük bir hedef bölge gerektiği için, degrade DNA örneklerinden elde edilen bilgilerin teorik olarak tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ile elde edilmesi de mümkündür. SNP belirteçleri ile ilgili en önemli dezavantaj, STR belirteçleri ile karşılaştırıldıklarında ayırım güçlerinin düşük olmasıdır. Günümüzde eşdeğer ayırım gücü için yaklaşık 40-60 SNP önerilmekte veya 13-15 STR lokusunun rasgele eşleşme olasılığı kullanılmaktadır (31,32).

PCR hedef uzunluğunun azalması amplifikasyon etkinliğini ve verimini artırmasına rağmen, özellikle aşırı derecede degrade olmuş örnekler başta olmak üzere, kontamine DNA'nın çoğalma olasılığını da artırabilir. Degrade DNA örneklerinden bilgi elde etmeye çalışmaya yönelik diğer bir yaklaşım, primerleri STR tekrar bölgesine mümkün olduğu kadar yakın olacak şekilde taşıyarak PCR ürünlerinin boyutunu azaltmaktır (Şekil 5). Azalmış boyutta olan bu hedefler miniSTR'lar olarak adlandırılmaktadır (33).



Şekil 5. miniSTR Primerleri

miniSTR'ler, degrade DNA örneklerinden daha fazla bilgi elde edilmesini sağlayan küçük boyutta PCR ampikonları oluşturur ve geleneksel STR primerleri ile karşılaştırıldığında STR tekrar bölgesine daha yakındır.

DNA degradasyonu ile ilgili başlıca problemin kalıp DNA'nın fragmentasyonu olması nedeniyle, daha küçük PCR ürünleri oluşturan primerlerin daha kısa DNA fragmentlerinden bir profil elde edebilme olasılığı daha yüksektir. miniSTR'lerin avantajı, DNA fragmentlerindeki degradasyona rağmen, standart sayıda PCR döngüsü ile tam bir DNA profili elde edilmesini sağlamalarıdır. Geniş kullanım alanlarını nedeniyle, CODIS STR belirteçleri, daha küçük PCR ürünleri oluşturabilen yeni primerlerin tasarlanmasında ideal adaylardır. Yeni tasarlanan primerler, minipleks olarak adlandırılan genellikle her bir boya renginde tek bir lokusun olduğu çeşitli multipleks setlerle birleştirilmiştir. Bu miniSTR'ların majör bir avantajı, veritabanı uyumluluğunun, ticari STR multipleksler kullanılarak analiz edilen faile ait örneklerle

sürdürülebilmesidir. Ancak, bazı CODIS lokuslarının büyük alel aralıkları (örn. FGA) olması nedeniyle, CODIS lokuslarından birkaçı daha küçük ampliconlara küçültülememektedir (34).

Sonuç olarak, miniSTR analizleri, mevcut STR multipleks analizleri ile kısmi profillerin elde edildiği örneklerden yararlı bilgilerin elde edilmesi için potansiyel yeni bir araç ortaya koymaktadır.

Yanmış kemik ve dişlerde, ısıya bağlı büzüşme ve küçülme nedeniyle meydana gelen deformasyon ve fragmentasyon gibi fiziksel değişimler tür, cinsiyet, yaş ve kişinin boyunun antropometrik analizi için kritik olan morfolojik özellikleri değiştirir. Fiziksel değişimlere ilaveten, yanma sürecinde ortaya çıkan ısı, mevcut kimyasal maddelerin yanması, patlaması ve pirolizisi nedeniyle kemiklerde kimyasal değişim olaylarını da başlatır. Artan ısı ile birlikte bu değişimlerin derecesi artar ve DNA'nın degrade olmasına kadar ilerler. Bu nedenle, bu etkilerin ayrıntılarını iyi bilinmeli ve dokunun maruz kaldığı sıcaklık derecesini değerlendirebilmelidir. Böylece, adli bilimler uzmanları yanmış kemiklerden elde edilen bilgileri ve analiz sonuçlarını daha doğru yorumlayabileceklerdir.

Yanmış kemiklerin identifikasyonu ile ilgili literatürde birçok yayın bulunmaktadır. Bu yayınların bir kısmı bu tür kemiklerin laboratuvar analizi ile ilgili başlıklardan oluşurken, bir kısmı olay yerinden delillerin toplanması (13-16), kontamine ortamlardan bu kemiklerin toplanma stratejileri (16,17) ve yanı sıra yanma ve kremasyon olaylarının temelleri (17-19) gibi laboratuvar öncesi süreçlerle ilgili konuları ele almaktadır.

1980'li yılların başında DNA teknolojisi ile tanışılmasının ardından adli olguların aydınlatılmasında büyük yol katedilmiştir. DNA, vücuttaki tüm çekirdekli hücrelerde bulunmaktadır ve kan, tükürük, doku ve doku sıvıları, semen, saç, diş ve kemik olmak üzere farklı vücut bölgelerinden adli amaçlı olarak elde edilebilmektedir (16). Adli DNA analizinin temel uygulaması, DNA molekülü boyunca baz çifti dizilerindeki kalıtılmış genetik farklılıkların

incelenmesine dayanır (17). DNA analizi, daha az miktarda örnek başlangıç miktarı gerektirecek şekilde ayırım gücünü çok daha ileri bir boyuta taşımış ve süre veya çevresel koşullara bağlı olarak degrade olan örneklerin karakterizasyon ve idantifikasyonuna olanak vermiştir. DNA'nın büyük boyutu ve dizide yer alan olası farklı polimorfizmlere bağlı olarak, DNA analizi ile elde edilen popülasyon istatistikleri (4), olası katkı sağlayanları daha kesin bir şekilde belirlemeyi ve suçla ilişkisi olmayanları dışlamayı sağlamıştır.

PCR teknolojisinin ilerlemesi ile birlikte aşırı derecede degrade olmuş örneklerden elde edilen DNA çoğaltılabilmektedir. Kemik ve dişler, bozunmanın kolayca gerçekleşebildiği tipik bir çevresel ortamda bulunabilen ve adli açıdan önemi olan örneklerdir. DNA'nın insan kalıntılarından başarılı bir şekilde çekitlenip çoğaltılabildiği, Vietnam Savaşı ve Amerikan İç Savaşı askerlerine ait DNA örnekleri dahil olmak üzere, çok sayıda çalışma söz konusudur. Bu tip çalışmaların çoğunda analiz amacıyla mitokondriyal DNA (mtDNA) kullanılmıştır (32,74).

mtDNA'nın nükleer DNA'ya kıyasla hücrede çok daha fazla kopya halinde olması nedeniyle, mtDNA analizinin kemik örneklerinden DNA çekitlenmesine yönelik etkili bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır (32). Bilindiği üzere mtDNA sadece anne tarafından kalıtılmaktadır. Anne tarafından akraba olan herkes aynı mtDNA profiline sahip olduğu için, bireylerin idantifikasyonu açısından nükleer DNA'ya göre ayırım gücü daha düşüktür. mtDNA, karşılaştırma açısından anne tarafından akraba olan bireyler mevcut olduğunda idantifikasyon amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır, ancak yabancı DNA ile kontaminasyon riski daha yüksektir (74).

3.5. PCR İnhibitörleri

Eski ve degrade kemik veya diş örneklerinden nükleer DNA çekitlenmesi, diğer örneklerle çalışmaya göre daha zordur. DNA'nın degradasyonu, sıklıkla çoğaltılabilecek çok küçük fragmentlere neden olmaktadır. Birçok kez, DNA analizinin başarısı vücudun maruz kaldığı koşullara ve çevreye bağlı olmaktadır (18). Ayrıca, analiz sırasında gerçekleştirilen PCR

reaksiyonunu inhibe eden bir takım faktörler de söz konusudur (72,77,89). PCR inhibitörleri TaqDNA polimeraz olarak bildiğimiz enzimin etkinliğini bloke etmektedir. İnsan kalıntılarından DNA'nın çoğaltılmasını etkileyebilen olası bazı PCR inhibitörlerine örnek olarak toprak bileşenleri, hem molekülleri ve kollajen verilebilir. DNA'nın çoğaltılabilmesi için bu PCR inhibisyonu sorununun çözülmesi gerekmektedir (39,88).

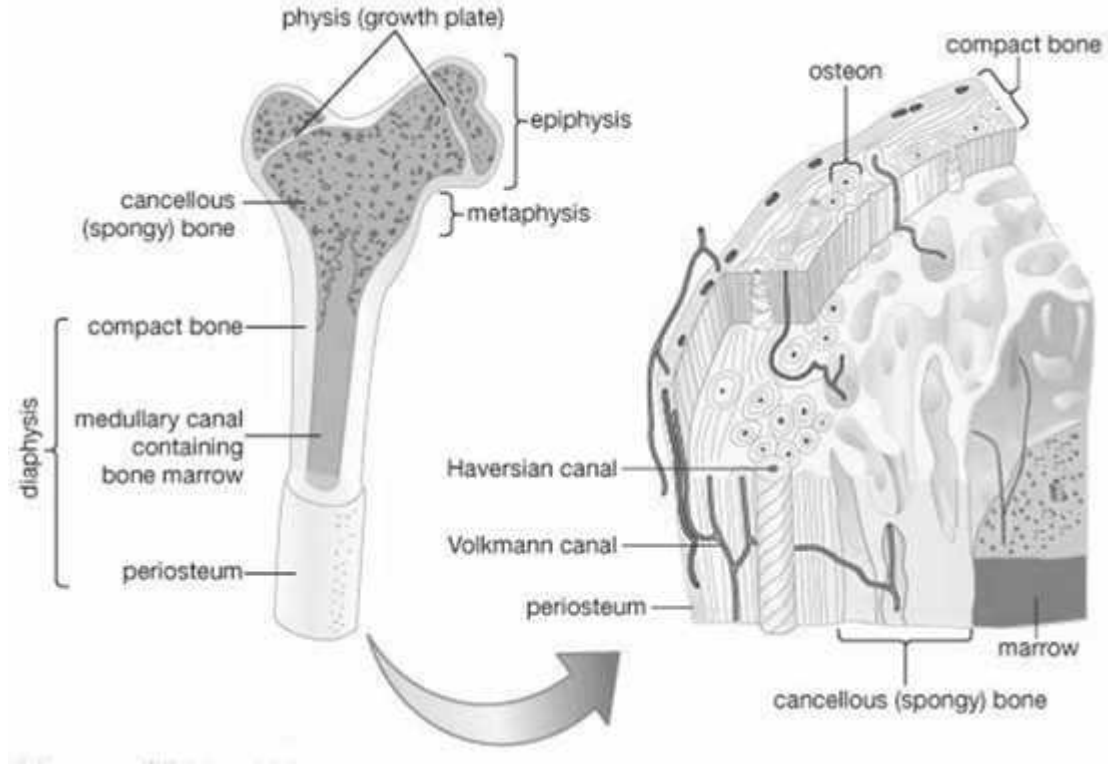
Çalışmamızda, olası bir PCR inhibitörünün olup olmadığını görmek açısından yetersiz çoğalmanın olduğu bazı örnekler, çoğalmanın yeterli olduğu bazı örneklerle bire bir oranında karıştırılmıştır. Örneğin 90°C ısıya maruz bırakılmış fenol-kloroform ile çekitlenen örnek, 180°C'de ısıya maruz bırakılmış sodyum asetat/izopropanol ile çekitlenen örneklerle karıştırılmıştır. Bu şekilde, fenol-kloroform içinde bir inhibitör mevcutsa, teorik olarak yeni karışımı da inhibe etmesi beklenmiştir, ancak tüm sterik koşullara uyulduğu için böyle bir durumla karşılaşılmamıştır.

3.6. Kemiğin Yapısı

Kemik dokusu kemik hücreleri, kollajen, kemik iliği ve bir inorganik kalsiyum matriksinden meydana gelmektedir (40-42). Osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler olmak üzere üç tip kemik hücresi bulunmaktadır. Bu hücre tiplerinin her biri, kemik dokusunun gelişiminde farklı görevlere sahiptir. Bu hücrelere ait nükleuslar içinde yer alan DNA, inorganik kalsiyum matriks içine sıkı bir şekilde hapsedilmiş gibidir. Optimum DNA elde edilmesi için bu hücrelerin etkin bir şekilde serbestleştirilmeye çalışılması karşılaşılan önemli bir güçlütür.

Kemik; kompleks, son derece organize ve özelleşmiş olan bir bağ dokusudur. Fiziksel olarak sert ve dayanıklı olup, mikroskopik olarak nispeten az sayıda hücre ile kollajen lifler ve destek maddelerinden oluşan, daha fazla miktardaki interselüler maddenin varlığı ile karakterizedir. Kemik doku başlıca proteinler ve mineraller ile kemiğe sertlik ve dayanıklılık

veren organik ve inorganik maddelerin bir araya geldiği kemik matriksinden oluşur. (43,45,46)
(Şekil 7).



Şekil 7. Kemiğin Genel Morfolojisi

Kemiklerin sınıflandırılması incelendiğinde, insan vücudunda uzun, kısa, yassı, düzensiz (irregüler) ve sesamoid olmak üzere beş tip kemik bulunmaktadır.

Uzun kemikler, kemiğin primer ossifikasyon merkezinin sonucu olarak uzun bir shafta (diafiz) sahiptir. Shaftın, yani gövdenin genişlemiş olan uçları metafiz olarak adlandırılırken, en uç kısımları sekonder ossifikasyon merkezinden gelişen epifiz olarak adlandırılmaktadır. Uzun kemiklerin dış kısmı, insan iskeletinin %80'ini oluşturan kompakt kemikten oluşmaktadır. Mikroskopik olarak kompakt kemik, sinirler, kan damarları ve lenfatik damarların geçtiği kanallar içerir. Kompakt kemiğin yapısal ünitesi, kemiğin uzun eksenini boyunca düzenlenmiş olan uzamış silindirik şeklindeki osteon ya da Haversian sistemi olarak adlandırılır. Osteonlar, birbirlerinin içine yerleşmiş, kemik matriks içeren boşluklu tüplerden oluşan (lamella) ince

ağırlık taşıyan yastıkçıklar şeklinde bir görüntüye sahiptir. Her bir osteonun içinde, kan damarları ve sinir liflerinin geçtiği bir kanal (merkez kanal ya da Haversian kanalı) bulunur. Uzun eksene dik açı ile uzanan kanallar, periostun vasküler ve sinir yapısını santral kanallara ve medüller kaviteye bağlar ve Volkmann kanalları olarak adlandırılır.

Uzun kemiğin iç bölümü, kırmızı kemik iliğini içeren küçük, irregüler kavitelere bitişik plakalar (trabeküller) ve çubuksu yapılar bulunduran süngerimsi yapıdan oluşur. Kanalcıklar, santral Haversian kanal yerine, kan akımını aldıkları bitişik kavitelere bağlanırlar. Trabekülaların görünümü gelişigüze, ancak bunlar bir binayı destekleyen kolon ve kirişlere benzer şekilde maksimum güç sağlamak üzere organize olmuşlardır. Süngerimsi kemiğin trabeküllerinde stres hatları bulunup stresin yönünün değişmesi halinde yeniden sıralanabilirler.

Kısa kemikler kabaca küp şeklindedirler ve süngerimsi iç kısmı çevreleyen ince bir kompakt kemik tabakasına sahiptirler. El ve ayak bileğinin kemikleri kısa kemikler olup sesamoid kemiklerdir.

Yassı kemikler, ince ve genellikle eğimli olup, bir süngerimsi kemik tabakasını çevreleyen sandviç şeklindeki iki paralel kompakt kemik tabakasından oluşurlar. Kafatasının çoğu kemiği ile sternum yassı kemiklerdir.

Düzensiz (İrregüler) kemikler, diğer kemiklerin özelliklerine uymazlar. Süngerimsi iç kısmı çevreleyen ince kompakt kemik tabakalarından oluşurlar. İsimlerinden anlaşılacağı üzere, şekilleri düzensiz ve komplikedir. Omurga ve kalça kemikleri düzensiz, irregüler, kemiklere örnektir.

Sesamoid kemikler, tendonlar içine gömülmüş olan kemiklerdir. Bu tendonlar, membran ve ligamentler şeklinde, yoğun fibröz doku bantları ile birleşen kemikler arasındaki sıkı, esnek olmayan fibröz eklemlerdir. Sesamoid kemiklere patella ve pisiform kemik örnek verilebilir.

Kemik matriksin organik yapısı incelendiğinde kollajen, kemik matriksin organik içeriğinin yaklaşık %90'ını oluşturduğu ve tip I kollajen liflerini meydana getirmek üzere, osteonektinin kollajen ve hidroksiapatit kristallerine bağlandığı proteoglikanlar ve glikoproteinlerden yapılmış olan amorf madde içinde yer almaktadır. Tip I kollajen, tropokollajen olarak sentezlenir ve ardından fibriller oluşturmak üzere dışarı verilir. Kollajen molekülleri, zincir başına yaklaşık 1000 aminoasitten oluşan üç polipeptid içerir. Bu aminoasitlerin büyük bir kısmı glisin ve hidroksiprolin şeklindedir. Zincirler hizalanıp sonrasında mineral kristaller şeklinde depolanan tabakalar şeklinde yeniden düzenlenen fibrillere bağlanır. Kollajen molekülleri, elastik fiberler oluşturarak kemiğe güç ve esneklik kazandırmak üzere birbirlerine sarılırlar. Tip I kollajene ek olarak kemiğin organik matriksi, organik matriksin yaklaşık %3'ünü oluşturan 32.000 Dalton moleküler ağırlığa sahip osteonektin, osteokalsin ve kemik sialoproteini (BSP) içerir.

Osteonektin kollajen, hidroksiapatit ve büyüme faktörlerini bağlar; hücre proliferasyonunu düzenler ve anjiyogenezi ve matriks metalloproteinazların üretimini uyartabilir.

Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenir ve mineralizasyon ve kalsiyum iyon homeostazisinde görevi olduğu, hidroksiapatit ile etkileştiği kalsiyum fosfat minerallerinin matürasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca osteokalsinin tam olarak görevi bilinmese de kemik formasyonunda negatif bir düzenleyici işlevi olabileceği kabul edilmektedir.

BSP, hem mineral hem de arjinin-glisin-aspartik (RGD) integrin bağlanma bölgeleri içermektedir. Mineralizasyondan önce, mineralizasyon sırasında ve mineralizasyondan sonra bu proteinin ortamda olduğu belirlenmiştir, dolayısıyla mineralizasyonun her aşamasında görevli olduğu varsayılmaktadır. Tip I kollajen ve hidroksiapatite afinitesine bağlı olarak, BSP'nin bir de novo nükleatör olduğuna inanılmaktadır. BSP'nin diğer olası işlevleri arasında hücre

tutunmasına aracılık etmesi yer almakta olup, kemikte tümör hücrelerinin metastazında rolü olduğu ileri sürülmektedir.

Kemik matriksin inorganik bileşimi değerlendirildiğinde, kemiğin mineral kısmının yaklaşık %70'inin kalsiyum fosfat, kalsiyum karbonat, kalsiyum fluorür, kalsiyum hidroksit ve sitrat içeren hidroksiapatitten oluştuğu görülür. Yeni kemiğin başlangıçtaki majör mineral içeriği, amorf formda bulunan kalsiyum fosfattır. Daha sonraki aşamada, matür kemikte, kollajen matriks içine gömülen hidroksiapatit kristalleri halinde organize olur. Kalsiyum karbonat, genellikle vertebrasız canlıların sert dokularında bulunan bir mineraldir. Kemiğin mineral matriks bileşimi, yaşla ve çeşitli diyetel faktörlere bağılı olarak değışim gösterir. Mineral kristalleri, kollajen fibriller boyunca partiküller halinde dağılım ortaya koyar ve fibrillerin kalınlaştıkları bölgelerde kimyasal olarak birbirleri ile birleşirler.

Kemik dokusunun yapısal düzenlenmesinde, mineral kısım protein kısma destek olarak, zararlı olabilecek eksojen/ekstraselüler ajanların/enzimlerin protein kısma fiziksel olarak geçişini engeller. DNA'nın hidroksiapatite karşı yüksek bir afinitesi söz konusudur ve degrade olması, bu hidroksiapatit kristal yapının bozulmasına ve ayrıca kollajen dokunun kaybına bağılıdır.

Kemiğin hücreel bileşimine bakıldığında, kemiği oluşturan farklı tipte hücreler söz konusu olup başlıca hücreler osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır.

Osteoblastlar, osteoprogenitör hücre soyundan gelir ve kemik materyalini sentezleyip depolar. Kollajenden zengin kalsifiye olmamış organik bir matriks olan ve osteoid olarak bilinen kemik materyalinin yapımından sorumludurlar. Kemiğin kalsifikasyonu, hidroksiapatit kristallerinin osteoid matriks içinde depolanması şeklinde gerçekleşir. Kemiksi matriks tarafından çevrelendiğinde, osteoblastlar lakünalar içinde yer alan osteositler olarak adlandırılır. Osteositler kemik dokunun devamlılığını sağlarlar. Osteoblastlar aynı zamanda kemiğin kendi üzerinde etkili olan prostaglandinler gibi hormonları üretirler. Kemik yüzeyini döşeyen hücreler

esas itibarıyla inaktif osteoblastlardır. Tüm kemik yüzeyini örterler ve belirli iyonlar için bir bariyer olarak işlev görürler.

Osteositler içeri doğru göç edip kendileri tarafından üretilen kemik matriksi tarafından çevrelenen osteoblastlardan köken alırlar. İçinde bulundukları boşluklara laküna adı verilir. Osteositlerin farklı görevleri olup, bunlar arasında kemik formasyonu, matriksin devamlılığı ve kalsiyum homeostazı yer alır. Ayrıca, kemiğin stres ve mekanik yüke karşı yanıtını düzenleyen mekano-sensöryel reseptörler olarak da görev gördükleri gösterilmiştir. Osteositler matür kemik hücreleridir.

Osteoklastlar, kemik yıkılımı olarak bilinen kemiğin hacminin azaltılarak remodelize edilmesinden sorumludurlar. Kemik yüzeyindeki Howship lakünleri veya rezorpsiyon çukurları içinde bulunan büyük, çok çekirdekli hücrelerdir. Bu lakünalar ya da rezorpsiyon çukurları kemik yüzeyinin yıkılmasından sonrada varlığını sürdürmektedir. Tüm iskelet elemanları organizmanın gelişmesi sırasında dramatik olarak değişim gösterir ve bu değişim çocukluk çağında da devam eder. Kemik formasyonu yaşam boyu devam eder. Kemiğin remodelizasyonu ise osteoklastlar kemik dokuyu uzaklaştırdıkça ve osteoblastlar yeni kemik doku ürettikçe hücresel seviyede gerçekleşmeyi sürdürür. Kemik oluşumu ve rezorpsiyonu, büyüme ve gelişme sırasında kemiklerin şekil ve boyutlarının sürdürülmesini veya değiştirilmesini sağlar.

3.7. Kemikten DNA Çekitleme Yöntemleri

Literatürde, insan kemik ve diş örneklerinden DNA'nın çekitlenmesine yönelik olarak kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur. Fenol-kloroform (21,26,48) yöntemi, moleküler biyoloji laboratuvarlarında ve ayrıca adli laboratuvarlarda uzun yıllardır kullanılan organik bir çekitleme prosedürüdür. Kan, tükürük ve semen dahil, farklı örneklerde DNA çekitlenmesinde oldukça başarılı bir yöntem olmasına rağmen, kemik örneklerindeki başarısı diğer örneklerde olduğu gibi

tutarlılık göstermemektedir. Bu yöntemle birlikte çekitlenen PCR inhibitörleri diğer bir sorunu teşkil etmektedir (31).

Literatürde bildirilen diğer DNA çekitleme yöntemleri, silika temelli yöntemler, sodyum asetat/izopropanol çekitleme yöntemi ve manyetik boncuk temelli yöntemlerdir. Silika temelli yöntemlerin temel prensibi, silika partiküllerinin yüksek DNA bağlama afinitesi ve birlikte saflaştırılan PCR inhibitörlerinin insidansının az olmasıdır. Manyetik boncuk temelli yöntem de benzer şekilde boncukların DNA moleküllerine afinitesinin artırılması mekanizmasına dayanır. Sodyum asetat/izopropanol çekitleme yöntemi, tuzla çökelme olarak bilinen salting-out tekniği ile nükleik asit dışındaki materyalin uzaklaştırılmasını temel alır.



Şekil 7. Her bir çekitleme yönteminde izlenen genel aşamalar

3.8. Adli Olgularda Yanmış Kemikler ve Dişler

Yanmış kemik ve dişlerin, analiz amacıyla adli birimlere ulaştırıldığı farklı tipte olaylar söz konusudur (12,16,30). Bu olaylar özellikle araç kazaları, kitlesel ölüm olayları ve ev tipi yangınlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tür kaza olayları yanında, bir cinayet olayını gizlemek amacıyla mağdurun yakıldığı olgularla da karşılaşılması mümkündür (29). Yanmış kemik ve dişlerdeki ısı ile indüklenen fragmentasyon ve parçalanma antropolojik incelemeleri oldukça zorlaştırmakta, bununla birlikte, ileri derecede yanmış kemik ve dişlerde DNA analizi de son derece güç hale gelmektedir.

3.8.1. Yanmış Kemik ve Dişlerde Renk Değişimi

Kemik ve dişlerin rengi, yanmaları ile birlikte önemli oranda değişir. Kemik ve diş yüzeyinin rengi ısıya maruziyetle birlikte değiştiği için, birçok araştırmacı analiz edilen kemik ve diş örneklerinin maruz kaldıkları ısıların hesaplanması ya da öngörülmesine yönelik bir indeks belirlemek amacıyla kemik ve diş rengi ile yanma sıcaklığı arasında bir ilişki kurmaya çalışmıştır (38,39). Bu renk değişimi aynı zamanda yanma süresi ile ilişkili olup, uzun bir süre boyunca yanma, beklenildiği üzere daha şiddetli renk değişimleri ile sonuçlanmaktadır (Şekil 8).

siyah, 500°C ve 600°C arasında kül benzeri bir renk ve 700°C'nin üzerinde tebeşir beyazına benzer bir renk şeklinde değerlendirilmektedir. Bu renk değişiklikleri farklı yayınlarda fotoğraflar ve renkli şemalarla daha öncesinde bildirilmiştir (64). Özellikle yanmış kemiklere ait renklerin, CIELAB (Comission Internationale de l'Eclairage, CIE, tarafından uyarlanan LAB temelli renk modeli) renk alanına dayanan bir kolorimetre yöntemi kullanılarak dijital olarak ölçülmesine yönelik çalışmalarda söz konusudur. Fredericks ve ark. yanmış kemiklerde renk değişimi ve DNA tiplendirme başarısı arasında ilişki kurulmasına dair bir çalışma yayınlamıştır (64,65). Kemik renginin tanımlanması için CIELAB kolorimetri ve konvansiyonel Munsell renk skorlama yöntemini kullanmışlar ve DNA analizi için rengin tanısal bir araç olabileceği sonucuna varmışlardır. Kolorimetri tekniği son derece objektif ve tekrarlanabilir bir analiz ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, gelecekte yanmış kemiklerin idantifikasyonunda bu tür bir uygulamanın gerçekleştirilebileceği umulmaktadır.

3.8.2. Yanmış Kemik ve Dişlerde Ağırlık Değişimi

Yanma sırasında, kemik ve diş ağırlığı suyun buharlaşması ve başlıca karbondioksit olmak üzere karbon salınımı şeklinde gözlenen organik materyallerin yanması nedeniyle azalmaktadır (13,70). İnsan vücudunun tam olarak kremasyona uğraması, kadınlarda yaklaşık 2000 gram, erkeklerde ise yaklaşık 3000 gram kadar kremate, yani yanmış kemiği geride bırakmaktadır. Yanmış kemiklerde ağırlık azalmasını deneysel olarak değerlendiren çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiş ve ısınma sonrası hemen bir ağırlık azalmasının olduğu gözlenmiştir. Bu azalma 400°C'ye kadar keskin ve etkili bir şekilde meydana gelmesine rağmen, yaklaşık 700°C civarında bir plato çizmekte ve orijinal ağırlığın yaklaşık %60'ı bir oranda sabitlenmektedir. Ortner ve Turner-Walker adlı araştırmacıların çalışmasına göre, kompakt kemik ağırlık olarak %14 su ve %24 organik matriksten oluşmakta ve kalan %62'lik kısmı yanma ile azalma göstermeyen kemiğe ait mineral kısım oluşturmaktadır (110). Bu nedenle,

400°C'ye kadar kemikte su ve önemli miktarda organik matriks kaybı olduğu ve yaklaşık 700°C'de organik matriksin tamamının yok olduğu söylenebilir. Fredericks ve ark., kemikte amid-fosfat oranını ölçerek kollajen miktarının azalmasını değerlendirmek üzere, yanmış kemik tozunda kızıl ötesi spektroskopi (FTIR) yöntemini gerçekleştirmiştir (65), kollajen miktarının 200°C ve 400°C arasındaki sıcaklıklarda önemli oranda azaldığını, 700°C'ye doğru ise kollajenin yıkılarak ortadan kalktığını tespit etmişlerdir. Bu bulgu, yanmış kemiklerde organik matriksin azalması ile ilgili önceki tanımlamaları desteklemektedir. DNA kemiğin organik bir bileşeni olduğu için, yanmış kemiklerde DNA analizi gerçekleştirirken organik matriksin bu erken azalması durumunu göz önünde bulundurmalıyız.

3.8.3. Yanmış Kemik ve Dişlerde Büzüşme ve Deformasyon

Kemik ve dişlerde yanma süreci boyunca hacimde bir azalma meydana gelir. Bu durum kemik ve dişlerde meydana gelen başlıca değişikliklerden biri olduğu için, çatlamış ve kırılmış formda kesin hacim ölçümünün zor olması nedeniyle, hacim azalması ile ilgili kantitatif bir analiz yöntemi ortaya konamamıştır. X-ışını bilgisayarlı tomografi (BT) teknolojisi kompleks şekillerin dijital hacim ölçümüne olanak tanımıştır ve yanmış kemik ve dişlerin hacim analizinde kullanılmıştır (28,46). Mikro-BT ile analiz kübik olarak kesilmiş, yanmış kompakt kemikte doğru hacim azalması ölçümleri sağlamıştır (67). Tanımlanan diğer ağırlık değişimlerinin aksine, hacim 600°C'ye kadar değişmemekte ancak bu sıcaklığın üzerinde ve kemik hacminin ikiye bölündüğü sıcaklık olan en az 1100°C'ye kadar olan sıcaklıklarda önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Bu büzüşme kollajenin ortadan kaybolması, hidroksiapatitin yeniden kristalizasyonu ve dolayısıyla kristalleşmenin artması, hidroksiapatitin kimyasal olarak beta-trikalsiyum fosfata değişmesi ve bu kristallerin füzyonu şeklinde bir takım olayların kombinasyonu şeklinde gerçekleşir.

Bu b z   me ve sonrasında meydana gelen önemli deformasyon antropometrik testlerde problemlere neden olmaktadır. Morfoloji  zerindeki etkisi çok büyük olabileceği gibi mikroskopik düzeyde de olabilmektedir. Goncalves, modern bir krematoryumda yakılmış olan 84 eri  kine ait femur, talus ve kalkaneusta antropometrik analizler ger ekle tirmi  tir (111). İstatistiksel olarak anlamlı olan bu sonuçlar, seksüel dimorfizmlerin, yani cinsiyetlere ait kemiklerdeki farklılıkların, ısı etkisi ile b z   m    olan kemiklerde korunduğunu g stermi  tir. Ancak, yanmamı   olan normal kemiklerde cinsiyet belirlenmesine yönelik bu antropometrik standartlar, erkek bireylerde b z   me olayı  l   mlerin azalmasına neden olduğu için etkili bir cinsiyet tespiti sağlamamı  tır. Ayrıca, yanmı   kemiklerde deneysel olarak histomorfolojik değişiklikler de  alı ılmı  tır (55). Hem Nelson hem de Bradtmiller ve Buikstra, yanmı   kompakt kemikte örneklerin histomorfolojik ya  tahminlerini yapabilmı  tır. Bu çalışmalarda mikroskop altında osteonlar ve Haversian kanalları incelenmi  tir. Yanmı   olan bu kemiklerde, 538 C ve 816 C arasında ve 600 C’de histolojik incelemeye dayanılarak ya  tahmininin yapılabilieceği belirtilmi  tir. Nelson tarafından yapılan önceki bir çalışma, yanma sonrası mikroyapısal elemanların önemli oranda b z  ld ğ n   ve k    ld ğ n   ortaya koyarken, sonraki çalışmalar b z  lmenin ya  tahmini üzerine önemli bir etkisinin olmadığını ortaya koymu  tur.

Ağırlık azalması bittikten sonra bile b z  lme ve k    lme olayı devam ettiği için, kompakt kemiğin yoğunluğu daha yüksek sıcaklıklarda (>500 C) artar ve bu durum kemiğin sertle mesine neden olur. Yanmı   kemiğin sertliği, Fredericks ve ark. tarafından Vickers sertlik ölçüme yöntemi kullanılarak  l   lm   tur (65). Elde ettikleri sonuçlar, 150 C’nin altında meydana gelen ilk hafif sertle menin ardından, kollajen yapısının zayıflamasına bağlı olarak kompakt kemiğin kolay kırılır hale geldiği ve 400 C’de sertle menin ba ladığını g stermi  tir. Sertleşme olayı, aynı zamanda meydana gelen artmı   kristalleşme ile birlikte, 700 C’nin üzerinde hızlanmı  tır. Yeniden kristalleşme sürecinde ise, taramalı elektron mikroskopunda, yüksek

büyütmede farklı boyut ve şekillerde kristaller gözlenmiştir. Kristal yapısında 600°C'nin üzerinde sferik, hegzagonal, yassı tanecikler ve rozetler gibi dramatik şekil değişiklikleri ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu benzersiz şekillerin oluşumu sadece ısıya maruziyetle ilişkili değil, aynı zamanda kişinin yaşı ile de ilişkilidir. Bu yeninden kristalleşme olayını kristal kimyası açısından değerlendiren çalışmalar ortaya konulmuştur (56,57).

Büzüşme mekanizması yanmış kemikte çatlaklar ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Işık mikroskobu altında incelendiğinde, 500°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda Haversian kanallarından kaynaklanma eğilimi gösteren çok küçük çatlaklar gözlenmekte ve daha yüksek sıcaklıklarda bu tür çatlakların sayısı ve boyutu artış göstermektedir. Literatürdeki diğer çalışmalarda, bu tür çatlakların daha düşük sıcaklıklarda (100°C-300°C) ve daha yüksek sıcaklıklarda da (>1000°C) gözlemlendiği belirtilmektedir. Sıcaklık 1150°C'ye yükseltildiğinde çatlaklar taramalı elektron mikroskobu altında multipl fissürler şeklinde izlenmektedir (42).

3.8.4. Yanmış Kemik ve Dişlerde Fragmentasyon

Sertleşmiş olan kemik ve dişte çatlakların oluşumu fragmentasyon denilen kırılma olayını tetiklemektedir. Yanmış kemik ve dişler farklı derecelerde fragmentasyonlar ortaya koymaktadır ve bu durum identifikasyonda zorluklara neden olmaktadır. İdentifikasyon sürecinde kemik fragmentlerine sıklıkla uygulanan tekniklerden biri rekonstrüksiyondur. Grevin ve ark. yanmış kemik parçalarından başarılı bir şekilde rekonstrükte edilen bir insan mandibulasının olduğu bir olay bildirmişlerdir (112). Waterhouse ise yanma sonrası fragmentasyonu incelediği bir çalışmada fragmentasyon oranının 24 saatlik bir süre sonunda arttığını belirlemiştir. Aynı araştırmacı, dondurucu soğuklar, artıp azalan sıcaklıklar veya yağmur gibi hava olaylarının yine kemik fragmentasyonunu artırdığını saptamıştır (113). Bu iki çalışmanın sonuçları, özellikle bizim konumuz olan DNA analizi açısından yanmış kemiklerin olay yerinden vakit kaybedilmeden toplanması gerektiğini vurgulamaktadır.

Cinayet vakalarında ayrıca yanmış kemik üzerinde olası bulunabilecek travma bulgularının da tespit edilmesi önemlidir. Pope ve Smith yakılmış cesetlerde kafa bölgesinde deneysel olarak oluşturulmuş balistik, künt ve kesici-delici alet yaralanmalarına ait travma izlerinin yanma olayı sonrasında bile tespit edilebildiğini belirlemiştir (114). Ayrıca, yanma olayı sırasında meydana gelen ısıya bağlı kırıkları incelemiş ve kenar keskinliği açısından önceden var olan travmatik kırıklardaki farklılıklara dikkat çekmişlerdir. Amadisi ve ark.'na ait bir çalışmada, ateşli silahla vurulan kosta kemikleri araştırmacılar tarafından deneysel olarak yakılmış ve 800°C'lik sıcaklıkta yakıldıktan sonra bile, renk olarak bir miktar daha sarımsı olmasına rağmen, isleklerinin hala tanımlanabilir olduğunu bildirilmiştir (115).

3.8.5. Yanmış Kemik ve Dişlerde DNA Analizi

DNA analiz tekniklerinde son yıllardaki gelişmeler, DNA'nın ayırım gücü ve hassasiyetini sürekli olarak daha ileri götürüp tür teknikler, iskelet ve diş kalıntılarının identifikasyonu için giderek rutin hale gelmeye başlamıştır (82-84). Morfolojik testler deformasyon ve fragmentasyon nedeniyle başarısız olduğunda, ileri derecede yanmış kemiklerin tanımlanmasında DNA profillemesi tek seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak, yanmış kemiklerle ilgili olaylar ve yayınlanan çalışmalar, bu uygulamanın esasen zor olduğunu ortaya koymaktadır. Daha önce bahsettiğimiz gibi, DNA da dahil olmak üzere organik matriks yanma sürecinin erken safhalarında kısmen ortadan kaybolmaktadır.

Yanmış kemiklerin araştırılmasına yönelik olarak, kimliklendirmede DNA tiplendirme yönteminin kullanılabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu alanda öncü çalışmalardan biri olan Cattaneo ve ark.'nın yaptığı bir araştırmada, deneysel olarak yakılmış insan kompakt kemiklerinde (20 dakika süreyle, 800°C-1200°C) ve ayrıca yanma sonucu kömürleşmiş olan ve gerçek adli olaylardan elde edilmiş kemiklerde, insan mitokondriyal DNA bölgesi V'in 120 bç uzunluğundaki ürünlerinin çoğaltılması değerlendirilmiştir (116). Bizim

çalışmamızın sonuçları bu çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir. Yakılmış ya da yanmış olan bu kemiklerin hiçbirinde çoğaltılabilir DNA elde edememişler ve yanarak kömür haline gelmiş kemiklerde DNA tiplendirmesinin başarılı olamayacağı sonucuna varmışlardır. Gerçek yangın olaylarında sıcaklık 800°C-1200°C arası bir sıcaklığa ulaştığı için, araştırmacılar bu sıcaklık aralığını seçmişlerdir. Bu nedenle, biz de çalışmamızda örnekleri bu aralıktaki sıcaklıklara da maruz bırakmayı dikkate aldık. Diğer çalışmalarda, yakılma sıcaklıkları ve süreleri değiştirilerek ve yanı sıra amplifikasyon ürünü uzunluğu değerlendirilerek daha ayrıntılı araştırmalar gerçekleştirilmiştir (18,38,39). Özellikle bu çalışmalarda bovin kompakt kemikleri kullanılıp, 10°C ila 50°C aralığında değişen sıcaklık artışları uygulanıp, kemikler maksimum 250°C bir sıcaklıkta yakılmıştır. Sonrasında, DNA çekitlenip, nükleer ya da mitokondriyal DNA'yı hedefleyen PCR aşaması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 2 saat süreyle 210°C'de ve 45 dakika süreyle 200°C'de yakılmış kemiklerde bile DNA'nın çoğaltılamadığını göstermiştir (18). Bunun nedeni yakılma sürelerinin uzun olmasına dayandırılabilir. Bu çalışmalarla, hedef uzunluğu ve PCR başarısı arasındaki ilişki de değerlendirilmiştir. Buna göre, PCR hedef uzunluğu ne kadar kısa olursa, yüksek yanma sıcaklıklarına o kadar dayanıklı olduğu sonucuna varılmıştır. Tsuchimochi ve ark. dişleri kullanarak benzer bir çalışma yapmıştır (70). Isıtılmış ve yakılmış dişlerde, dental pulpadan çekitlenen DNA Y-koromozomunu çoğaltmaya çalışmışlar, 2 dakika süreyle 400°C'de yakılmış dişlerde bile çoğaltma işleminin başarısız olduğunu ortaya koymuşlardır. Buna göre, dişlerde DNA'nın çoğaltılması başarısına yönelik eşik değer sıcaklığının, kemiklere göre daha yüksek olduğu söylenebilir. Çünkü dental pulpa, etrafını çeviren enamel ve dentin ile kısmen korunmaktadır. Ancak 2 dakika gibi kısa bir süre boyunca 400°C gibi ortalama bir sıcaklıkta bile DNA'nın aşırı degrade olup çoğaltılamaması, DNA'nın dişin bu kısmında bile ısıya karşı yeterince dirençli olmadığını göstermektedir.

Schwark ve ark.'nın çalışmasında ise, gerçek adli olaylara ait yanmış kemiklerden elde edilen DNA amplifikasyon sonuçlarının daha iyi olduğu gözlenmiştir (60). Yanma derecesini kemik rengine göre sınıflandırmışlar ve mavi-gri-beyaz olarak bilinen en ileri derece yanma derecelerinde DNA'yı başarılı bir şekilde çoğaltabilmişlerdir. Bu renk değişimi, yanma sıcaklığının 500°C ve üstünde olduğunu göstermektedir ve diğer çalışmaların sonuçları ile çelişmektedir. Ancak, bu çelişkinin olası mantıklı bir açıklaması mevcuttur. Schwark ve ark., PCR için hedef uzunluğu kısaltarak aşırı derecede degrade olmuş DNA'nın çoğaltılması için optimize edilmiş kendilerinin geliştirdiği multipleks bir PCR sistemi ve bunun yanında hassasiyeti artırmak amacıyla PCR döngü sayısının yüksek olduğu ticari bir nükleer DNA tiplendirme kitini kullanmışlardır (72). Buna göre, oldukça hassas olan bu tiplendirme sisteminin aşırı derecede degrade olmuş DNA'da iyi çalışması mümkün görünmektedir. Ancak, yangın olayında elde edilen bir kemik örneğinde farklı bölgeler, alevlerin farklı ve eşit olmayan dağılımı nedeniyle farklı sıcaklık derecelerine maruz kalmış olabilmektedir ve çekitleme için seçilen kemik bölgesinin, yanma renginin sınıflandırılması için kullanılan esas bölgeye göre daha düşük bir ısı ile karşılaşmış olması mümkündür. Dolayısıyla, bu konuya açıklık getirmek açısından daha sıkı sıcaklık kontrolleri altında yanmış olan kemik örneklerinde çalışılması gerekmektedir.

3.9. Adli genetik soruşturmalarda insan iskelet ve diş kalıntılarının tiplendirilmesi

İnsan kalıntılarının tiplendirilmesine yönelik yeni DNA analiz teknikleri adli soruşturmalarda yeni bir gelişmedir. Özel eşyaların veya diğer fiziksel özelliklerin incelenmesi ile kişinin tanımlanması mümkün olmadığında, DNA analizine dayanan bir idantifikasyon yönteminin gerçekleştirilmesi kaçınılmazdır. Kitlelölüm olayları, savaşlar, sosyo-politik olaylar gibi farklı durumlarda, bulunan insan kalıntılarını tanımlanmak, şiddet suçlarından sorumlu kişileri belirlemek ya da neseb tayini amacıyla, son yirmi yılda büyük çabalar ortaya konmuştur.

Adli olgularda DNA polimorfizminin kullanımı ilk kez 1985 yılında Jeffreys ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir ve bu ve benzeri polimorfizmler ilk kullanımlarından bu yana identifikasyon analizlerinde güçlü bir araç olmuşlardır. DNA polimorfizmlerinin belirlenmesi için yeni teknolojilerin geliştirilmesi ve bu yeni teknolojilerin validasyonu çok hızlı olmuştur. Geçtiğimiz yirmi yıl boyunca, adli amaçlı insan, hayvan ve bitki identifikasyonunda ve mikrosatellit bölgeleri olan kısa tekrar dizisi ya da kısa ardışık tekrar olarak adlandırılan STR lokuslarının kullanıma başlamasıyla, rutin soybağı tayini ve yanı sıra insan kimliklendirilmesinde DNA profillemesi başlıca yöntem olmuştur.

Genetik araştırmalar genellikle sırasıyla PCR tekniği ve DNA sekans sistemlerinin kullanıldığı enzimatik amplifikasyon ve STR bölgeleri ile gerçekleştirilir. Bilinen herhangi bir özelliği kodlamamaları nedeniyle, adli genetik uygulamalarda genellikle DNA intron bölgeleri kullanılır. Bir STR bölgesinin polimorfizmi, esas itibarıyla kişiler arasında STR bölgelerinin toplam uzunluğunda varyasyonlara neden olan tekrarlayan dizi sayısındaki farklılıklardan kaynaklanır. DNA tiplendirmesi ile elde edilen veriler son derece güvenilir ve adli olguları aydınlatmada güçlü bir araçtır. Spektral olarak çözünür olan floresan boyaların kullanıldığı ticari STR kitleri ile bu STR belirteçlerinin tümünün ya da bir kısmının multipleks PCR amplifikasyonu mümkündür. Ayrıca, ticari STR kitlerinin geliştirilmesi, STR'ların kullanımını büyük ölçüde kolaylaştırmış ve DNA popülasyon veritabanlarının geliştirilmesini sağlamıştır. STR belirteçlerinin DNA profillemesi amacıyla kullanımının, yüksek derecede polimorfik yapıları, genotipleme kolaylıkları ve degrade veya eser miktardaki DNA'dan sonuçların elde edilebilmesi gibi, daha önce kullanılan yöntemlere karşı bir takım avantajları mevcuttur. Farklı Avrupa ülkeleri arasında DNA profillerinin karşılaştırılması için, Avrupa Adli Bilimler Ağı (ENFSI-European Network Forensic Science International) tarafından Avrupa Standart Seti

(European Standard Set-ESS) ya da İnterpol Standart Lokus Setini içeren DNA kitlerinin kullanılması önerilmektedir.

DNA polimorfizminin belirlenmesi amacıyla örnek materyal olarak insan iskelet ve diş kalıntılarının kullanımı, adli amaçlı idantifikasyonda nispeten son ilerlemelerden biridir. Çevresel bozunma ve biyolojik saldırılara fiziksel ve kimyasal dayanıklılık gibi kemiğe ait intrinsek özellikler, yüz tanıma, daktiloskopi ya da dental kayıtlar gibi geleneksel yöntemlerle ortaya konamadığında, kişinin belirlenebilmesi için DNA analizini tek seçenek haline getirmektedir.

İnsan kalıntılarının adli amaçlı idantifikasyonu, genellikle farklı ortamlarda bulunan iskelet ve diş kalıntılarının idantifikasyonu ve feth-i kabir sonrası elde edilen örneklerin, kişilerin özellikle ebeveyn-çocuk ilişkisinin belirlenmesi amacını taşıyan neseb tayinine yönelik olarak gerçekleştirilir. Bu tür analizlerde sık karşılaşılan sorun DNA'nın korunmuş olup olmamasıdır. Kemikteki DNA'nın büyük kısmı osteositlerde yer almakta olup, Hochmeister ve ark., mikrogram ölçülerdeki DNA'nın bir gram DNA'dan çekitlenebileceğini belirtmişlerdir (117). Osteositler, çekitleme işlemi sırasında DNA'ya ulaşılması için bir bariyer olan kalsifiye matriks içine gömülmüşlerdir. Bu nedenle, elde edilmeye çalışılan DNA miktarını artırmak için bu matriksin uzaklaştırılması gerekmektedir. Ayrıca, kitlesel ölüm olaylarından elde edilen iskelet kalıntıları sıklıkla hem nükleer DNA'nın hem de mitokondriyal DNA'nın degrade olmasına neden olan bir takım dekompozisyon değişikliklerine uğramaktadır. Bu sebeple, degrade kemiklerdeki DNA kalitesi son derece değişkendir ve genellikle önemli ölçüde sınırlıdır. Bu tür örnekler elde edildiğinde, öncesinde sıcaklık, UV radyasyon, nem ve hayvan, böcek ve mikroorganizmalar gibi bir kısım farklı ekstrensek çevresel faktörlere maruz kaldıkları kolayca söylenebilir. Farklı degradasyon koşulları, farklı toprak tiplerine gömülme, kalıntıların su içine tam veya kısmen batması ya da ısıya maruziyet şeklinde olabilmektedir. Mikrobiyal

degradasyon, eski kemiklerde hem morfoloji ile hem de örnekler arasında değişkenlik gösteren mikrobiyal DNA miktarı ve DNA inhibitörlerinin birlikte çekitlenmesi şeklinde karşımıza çıkmaktadır (31). Farklı örneklerin DNA içeriğindeki kalitatif farklılıklar, stutter bantlar ya da alelik drop-out ya da drop-in gibi artefaktların olup olmaması gibi alel determinasyonlarının çoğaltılabilirlik derecesi ile belirlenebilmektedir. Kemik tozu ile çalışılırken havadan kaynaklanan kontaminasyon söz konusu olabileceğinden, bu tür örneklerin işlenmesi esnasında çok sıkı kontaminasyon kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir. Özellikle kitlesel ölüm olayları gibi farklı kemik örneklerinin aynı zamanda işlendiği kemik tozu örnekleri kullanılırken, laboratuvar kontaminasyonu olasılığı da göz önünde bulundurulmalıdır.

DNA'nın saflaştırılması için kullanılan ideal yöntem, DNA eldesini en yükseğe çıkarırken, PCR inhibitörlerinin ko-pürifikasyonunu en aza indirmelidir. Kantitatif karşılaştırmada düşük DNA eldeleri, düşük kalıp DNA miktarlarına veya yüksek inhibitör miktarlarına işaret edebilmektedir. Bakteri ve diğer mikroorganizmalarla dekompozisyona ilaveten, çevresel ajanlara eş zamanlı maruziyet, postmortem dokularda DNA degradasyonu ile sonuçlanır. DNA'nın korunma derecesi, cesedin çürümüş olup olmaması, kemiklerin az miktarda yumuşak doku içermesi ya da hiç yumuşak doku içermemesi arasında değişkenlik gösterir (12). Cesetlerde DNA erken postmortem dönemde bile çok hızlı degrade olmaktadır. Yumuşak dokuların degradasyonu özellikle yüksek ısılarla maruz kalanlar başta olmak üzere, dekompoze cesetlerde doğal olan hızlı bakteriyel çoğalmanın bir sonucu olarak ölümden kısa bir süre sonra belirgin hale gelmeye başlamaktadır.

Sonuç olarak, kemik ve dişlerin makroskobik ve mikroskobik seviyede morfolojik bozunmalara dayanıklı olmaları ve uzun süre bozunmadan kalmaları, DNA'nın da korunup bozunmadan kalmasını ve dolayısıyla idantifikasyon amacıyla çekitlenebilmesini sağlamaktadır.

3.9.1. Degrade Kemiklerde DNA Hasarı: DNA Degradasyon Süreci

Kemiğin majör bileşenleri proteinler ve kollajen lifler olup, bu bileşenler arasındaki ilişki kompleks bir takım özellikleri ve kimyasal bağları içerir. Kemik proteinlerindeki değişim, kemikteki postmortem değişikliklerden sorumlu olan yapısal ve kimyasal yıkım olaylarına neden olur. Enzimatik onarım süreci canlı organizmalarda ve organizma öldükten sonra DNA'nın bütünlüğünü korur. Postmortem dönemde, DNA fragmentasyon sürecini başlatan ilk ajanlar olan lizozomal nükleazlar ve endojen nükleazlar gibi enzimler tarafından DNA hızla degradasyona uğrar (72,97). Ayrıca, mikroorganizmalar, nem ve çeşitli organik bileşikler gibi eksojen ajanlar nedeniyle de DNA miktarı önemli miktarda azalır. Hidroliz ve oksidasyon ile spontan degradasyon da çok daha yavaş bir hızla DNA yapısını değişikliğe uğratar. Ölüm sonrası doku hızlı bir şekilde kuruması veya DNA'nın mineral bir matrikse emilmesi gibi nadir durumlarda, DNA enzimatik ve mikrobiyal degradasyondan uzaklaşmış olur. Bu gibi durumlarda, DNA'yı etkileyen kimyasal süreçler daha yavaş başlar ancak sürekliliğini korur. İn vitro koşullarda DNA degradasyon süreçlerinin çoğu, canlı hücrelerdekine benzerdir ya da aynı şekildedir, ancak postmortem dönemde bu süreçler hücresel onarım işlemleri ile dengelenememektedir. Hasarlar, DNA bütünlüğünü kaybedinceye kadar ilerleyen şekilde birikir ve nihayetinde nükleotid dizisi bilgileri geri dönüşümsüz olarak kaybedilmiş olur (Tablo 1). PCR gibi modern moleküler biyoloji teknikleri ile, henüz tam degrade olmuş olandan olmasa da DNA'dan kısmi veya tam bilgi elde etmek mümkündür.

Eski degrade iskelet kalıntılarında en sık rastlanan DNA hasarı genellikle uzunluğun 100 ila 200 bp arasına düştüğü degradasyonlardır. Uzunluktaki bu kısalmanın nedeni, ölümden kısa bir süre sonra meydana gelen enzimatik bir takım olaylar ile, fosfat-şeker omurgasında bulunan fosfodiester bağlarında tek iplikli çentiklerin oluştuğu enzimatik olmayan hidrolitik bölünmeler ve yarılmalardır. Azotlu bazlar ve şeker omurgası arasındaki glikozidik bağlar, apürinik ve

apirimidinik bölgelerin meydana geldiği depürinasyon ve depirimidinasyona neden olan hidrolitik bölünme ve yarılmaya en duyarlı bağlardır. Bir nükleotid serbest kaldığında, abazik bölge hemen tamir edilmemesi halinde iplikçik kesilmesine neden olabilen bir kimyasal yeniden düzenlenmeye gidebilir.

Bu modifikasyonlara ek olarak, DNA bazları aynı zamanda, DNA polimeraz tarafından yeni DNA iplikleri sentezlendiğinde, bazların yanlış insersiyonuna neden olduklarından (G yerine A ve T yerine C), DNA amplifikasyonu için özellikle önemli olan sitozin (urasil), 5-metil-sitozin (timin) ve adeninin (hipoksantin) hidrolitik deaminasyonuna da duyarlı hale gelirler. DNA'nın endojen hasarı, iyonize radyasyon ya da postmortem dokuda kolonize olan mikroorganizmaların aerobik metabolizması tarafından üretilen süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi oksidatif reaksiyonlarla da başlatılır. İyonize radyasyon, hücre içindeki su ile etkileşime girerek hücre ve dokularda hidroksil radikallarının ($\cdot OH$) oluşmasına da neden olabilir. Pirimidinler, özellikle de timin, pürinlere kıyasla oksidatif hasara daha duyarlıdır. Oksidatif hasar en çok şeker rezidülerinin modifikasyonu, sitozin ve timinin hidantoinlere dönüşmesi, bazların uzaklaştırılması ve çapraz bağlanmalar şeklinde olmaktadır. Farklı çevresel koşullardan gelen ve farklı yaşlarda olan iskelet kalıntılarının okside baz rezidüleri içerdikleri gösterilmiştir. Özellikle, Taq DNA polimerazı bloke edecek şekilde iki okside pirimidinin (5-hidroksi-5-metilhidantoin ve 5-hidroksihidantoin) yüksek oranda bulunduğu örneklerden PCR ile DNA dizilerinin çoğaltılması mümkün olamamaktadır.

Diğer bir hasar tipi, çeşitli eksojen veya endojen ajanlar DNA'da iki farklı pozisyonla etkileştiğinde meydana gelen çapraz bağlanmalardır. Bu bağlanmalar aynı iplikte (iplik içi çapraz bağlanma), DNA'nın karşı ipliğinde (iplikler arası çapraz bağlanma) ve de DNA ve protein arasında gerçekleşebilmektedir. İki DNA ipliği arasındaki çapraz bağlanma reaksiyonu ısıya duyarlıdır ve düşük sıcaklıklarda daha yavaştır. Ayrıca, DNA iplikleri, abazik bölgelerin

oluşmasından sonra, enzimatik olmayan bir glikozillenme reaksiyonunda bazıları aracılığıyla indirgen şekerlerle reaksiyona girerler. Çapraz bağlanmanın etkisi, antik fekal kalıntılar ya da fosilleşmiş dışkı olarak bilenen koprolitlerde, gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi ile tanımlanmış olan Maillard ürünleri ile gösterilmiştir. Maillard ürünleri, proteinler ve nükleik asitlerde, şekerler ve primer amino-grupları arasında kondensasyon reaksiyonları ile oluşur. Maillard ürünlerini yıkıma uğratan N-fenasiltiazolium bromid reaktifi ile muamele, çoğaltılmaya uygun olmayan bazı antik kalıntılardan DNA dizilerinin çoğaltulmasını sağlar.

Tüm DNA modifikasyonlarında, PCR sırasında bazların hatalı eşleşmesine ya da PCR amplifikasyonu esnasında elde edilmesi beklenen DNA fragmentinin tam kaybına neden olabildiği için bir takım sorunlarla karşılaşmaktadır.

Tablo 1- Degrade DNA’da Farklı Hasar Tiplerine Genel Bakış

HASAR TİPİ	NEDENLER	DNA ÜZERİNE ETKİLER	PCR ÜZERİNE ETKİLER	ÇÖZÜM
İplik Kırılmaları	Nükleaz aktivitesi	Tüm kalıp DNA kopya sayılarının kaybı;	PCR hatası;	Yeniden örnek toplama
İplik Kırılmaları	Mikroorganizmalarla degradasyon	DNA uzunluğunun azalması	Artmış stutter ve pikler	Birden çok PCR reaksiyonu
İplik Kırılmaları	Mikroorganizmalarla degradasyon	DNA uzunluğunun azalması	Tutarsız PCR sonuçları	Boyutun küçültülmesi
Oksidatif Hasarlar	Bakteriyel Metabolizma	Baz ve şeker fragmentasyonu	PCR hatası	Mini-STR
Oksidatif Hasarlar	Radyasyon	Nükleotid Modifikasyonu	PCR hatası	mtDNA
DNA çapraz bağlanmaları	Hidrolitik baz kaybı	DNA-DNA, DNA-Diğer Molekül Bağlanması	PCR hatası, Maillard ürünleri	SNP’ler
Hidrolitik Hasarlar	Amino grubunun hidrolitik kaybı	Kodlama potansiyelinin değişmesi	PCR yanlış kodlama hataları	PCR döngü sayısının 34’e çıkarılması, Ekstra Taq Polimeraz kullanılması, DNA Tamiri

3.10. Yangın Kavramı, Yangınların Özellikleri ve Sınıflandırmaları

3.10.1. Yangın Kavramı

Yangın kavramını tam olarak anlayabilmek için öncelikle ısı, sıcaklık ve yanma

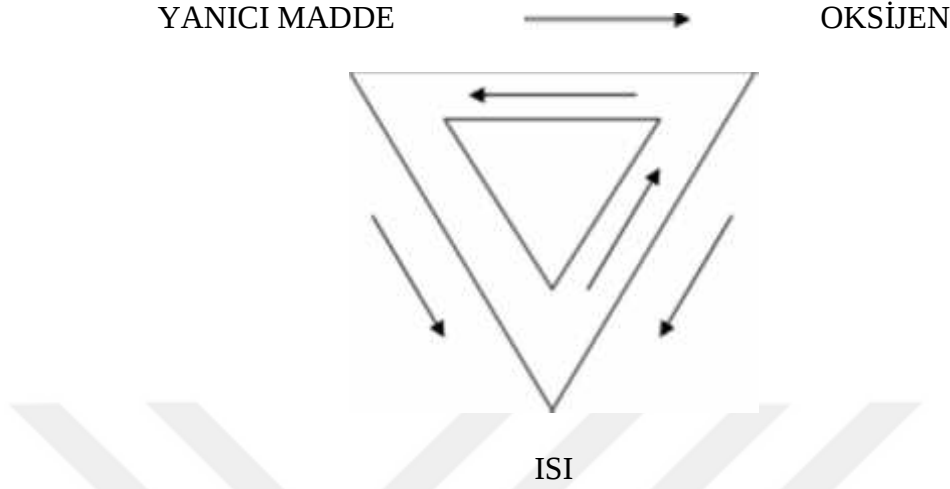
terimlerini bilmek gerekmektedir.

Isı, maddenin tüm moleküllerinin sahip olduğu hareket enerjileri toplamı olarak ifade edilmekte olup birimi kalorimetredir (cal). Isı ile birlikte madde içindeki moleküller titreşmeye başlar. Bu titreşim maddenin sıcak bölgelerinde hızlı iken soğuk bölgelerinde yavaştır. Bu şekilde meydana gelen hızlı titreşimler sayesinde enerji sıcaktan soğuğa doğru iletilmektedir.

Sıcaklık, maddenin ortalama hıza sahip bir molekülünün sahip olduğu hareket enerjisi olarak ifade edilir. Avrupa ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde kabul ettiğimiz değer Celsius (C) derecedir (40,45).

Yanma, yanabilme özelliği olan bir maddenin bir oksitleyici madde ile birlikte, genellikle dumanın yayıldığı, kızıl parıltıların ortaya çıktığı ve/veya alevlerin meydana geldiği ekzotermik bir reaksiyondur. Bu reaksiyon yavaş ya da hızlı olabilmektedir. Yanabilme özelliği olan maddeler katı, sıvı veya gaz halinde olabilir ve yanma olayında oksitleyici olarak hava en sık karşımıza çıkan ajandır. Hava ile temas eden yanabilme özelliğine sahip bir madde, genellikle ortam sıcaklığında herhangi bir tepki göstermemektedir. Yanma olayının başlayabilmesi için yanıcı madde ile birlikte genellikle hava olarak karşılaştığımız oksijenin ve tutuşmaya yetecek bir enerji kaynağının ortamda bulunması gerekmektedir. Bahsettiğimiz bu üç bileşen, yani yanıcı madde, oksijen ve ısı, yanma üçgeni olarak bilinmektedir (24,25) (Şekil 9). Yanma reaksiyonunun şiddeti, yayılan ısıya göre belirlenmektedir. Yanma olayının yayılma hızı saniyede 10 cm'yi geçerse bu yanma olayı artık patlama olayı olarak ifade edilir. Bulunulan ortamda sıcaklığın yükseldiği hissediliyor ancak ışık yayılımı olayı meydana gelmiyorsa bu durum, için için yanma şeklinde nitelendirilmektedir. Katı bir maddeden ışık yayılabilmesi için, ortalama sıcaklığın 500°C civarlarında olması gerekmektedir. 350°C ve 400°C arasındaki sıcaklıklarda yanmakta olan katı maddeler artık için için yanma evresine ulaşmış kabul edilmektedir. Sıcaklığın hissedilebilir derecelerde yükselmediği ve ilgili maddenin yavaş bir

şekilde, kısmi veya tam olarak tepkimeye girdiği durumlara ise oksitlenme adı verilmektedir.



Şekil 9. Yangın Üçgeni

Alev kavramı ise gaz durumunda meydana gelen bir oksitlenme reaksiyonudur. Bir kibrit veya mumun yanması sırasında gazlı alevin ısının bir kısmı katı maddeye aktarılmakta ve aktarılan bu ısı katı maddenin buharlaşmasına neden olmaktadır. Bu buharlaşma olayı sırasında maddenin yapısındaki moleküller kimyasal ayrışmaya uğrayabilmekte veya bu kimyasal ayrışma olayı meydana gelmemektedir. Dolayısıyla, yanma dediğimiz olay alev olmadan da gerçekleşebilmektedir.

Yanma ısı kavramına gelindiğinde, bu olay 1 kg yakıcı maddenin yanması ile ortaya çıkan kilokalori (kcal) cinsinden ısı miktarı olarak ifade edilmektedir ve birimi kcal/kg şeklindedir. Ateş kavramı ise yanma olayının görünür bir sonucu olarak nitelendirilmektedir. Belirli bir maddenin mevcut ısının o maddeyi kendi kendine tutuşturacak ve yakacak dereceye yükselmesi tutuşma olarak adlandırılmaktadır. Genellikle yangının ilk aşamalarındaki ısı, gaz ve buharın tutuşması için yeterli değildir. Yangın esnasında mevcut bir kıvılcım ya da yanmış bir parça, ısının iletilmesi olayı ile o maddenin ısını tutuşma derecesine ulaşıncaya kadar yükseltir ve ardından maddenin yüzeyinde bir ateş parlaması gerçekleşir. Yanmanın bir maddeden diğer

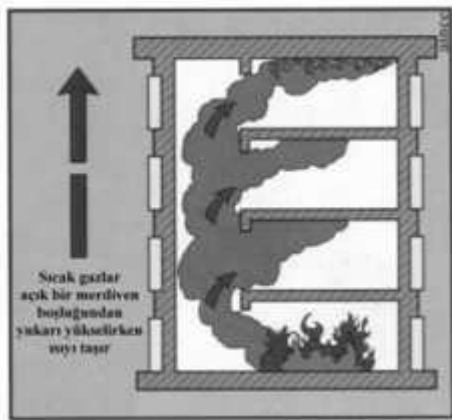
bir maddeye geçişi ısının iletkenlik olayı ile moleküller arasında iletilmesi, yüzeyde ortaya çıkan sıcak gaz akımı ile temas ve havada uçan ve yanmakta olan parçalar sayesinde meydana gelir. Yangın esnasında ortaya çıkan ısının, yanan malzemelerin ve yakıcı maddenin özelliklerine bağlı olarak 1200°C'ye kadar yükselebildiği belirlenmiştir (23,24).

3.10.2. Isı Transferi ve Türleri

Yanma olayı ekzotermik bir reaksiyon olup, yanma olayı sırasında sürekli olarak ısı üretilmesi söz konusudur. Belirli bir sürenin ardından, zincirleme reaksiyon şeklinde yanmakta olan maddenin bitişiindeki veya yakın çevresindeki maddeler tutuşma sıcaklığına erişir ve bu maddeler de yanmaya başlar. Bu olaylarda ısı üç değişik şekilde yayılmaktadır. Bu ısı yayılma şekilleri taşınım (konveksiyon), iletim ve ışıınım biçiminde gerçekleşmektedir.

3.10.2.1. Taşınım/Konveksiyon

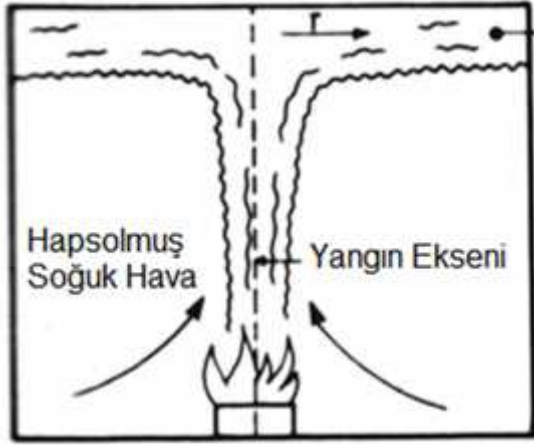
Maddenin yapısındaki moleküllerin akışkan hareketi ile enerji taşınımı olayıdır. Ortam sıvı ya da gaz ise, ısı enerjisi sıcaklık farkından dolayı akışkan hareket ile bir bölgeden diğer bölgeye aktarılmaktadır. Akışkanlar, katı yüzeylerle birbirlerinden ayrılmış oldukları için, konveksiyon olayı, bir madde yüzeyi ile akışkan arasında enerji taşınımı sırasındaki en önemli ısı transfer mekanizmasıdır.



Şekil 10. Taşınım ile Isı Transferi

Taşıyım olayı ile ısıнын iletimi bir yangının yayılmasındaki en önemli olaydır ve yangın sırasında yayılan enerjinin yaklaşık %80 kadarı bu süreç için harcanmaktadır. Basit bir ifadeyle, ısı kaynağı olan bir maddenin bir akışkana uygulanması halinde, sıcak olan yüzey bölgesine en yakın akışkan tabaka ısınmaktadır. Söz konusu akışkan tabaka bir miktar ısı enerjisini soğurmakta ve yerini daha soğuk ve daha yoğun olan diğer bir akışkan tabakaya bırakmaktadır. Bu olayda verimlilik, akışkan maddenin dinamik viskozitesi, sıcaklığı ve hareket hızı gibi faktörlere bağlıdır.

Yangın olayı esnasında, tutuşma sonucu ortaya çıkan sıcak gazlar, batma kuvvetleri nedeniyle hareket edip daha soğuk gazlarla yer değiştirmektedir. Sıcak gazlar genellikle çevrili olduğu yerin tavanına yakın konumlanmakta ve çevrelediği yüzeylerin radyan kaynakları gibi davranmaktadır (Şekil 11).



Şekil 11. Tavan düzeyinde bulunan sıcak gaz tabakası

3.10.2.2. İletim/Kondüksiyon

Isı iletimi, katı, sıvı ya da gaz bir ortamdaki mevcut bölgeler arasında veya doğrudan fiziksel temas halindeki farklı ortamlar arasında, atom ve/veya moleküllerin fark edilebilir düzeyde bir yer değişikliği olmaksızın doğrudan temasları sonucu ortaya çıkan ısı yayılımı olayıdır. Bir bölgede bulunan atom veya moleküllerin ortalama kinetik enerjisi, bitişik bir

bölgedeki atom veya moleküllerin ortalama kinetik enerjisinden daha fazlaysa, mevcut enerjilerini komşu olan atom ve moleküllere iletirler. Katı maddelerde enerji transferi, elektron yayılımına ek olarak o maddenin yapısını oluşturan kafes titreşimleri aracılığıyla da bitişik komşu bölgelere iletilir.

İletim yoluyla ısı transferi o maddenin mikroskobik yapısı ile doğrudan alakalıdır. Özellikle katı maddeler ile akışkanlarda iletim yoluyla ısı aktarımı olayı farklı şekillerde meydana gelebilmektedir. Örneğin elektrik iletkenliği çok iyi olan katı metallerin çok iyi birer ısı iletken olmalarının da nedeni budur. Hem elektrik iletimi hem de ısı iletimi olayında enerji taşıyıcıları mevcut serbest elektronlardır.

3.10.2.3. Işınım/Radyasyon

Yüksek katlı bina ve yapılarda genellikle giydirme cephe sistemleri kullanılmaktadır. Bu tür sistemlerde açıklıklar fazla olduğu için meydana gelen olası bir yangının yayılımında ışıınım ya da radyasyonun etkisi ön plandadır.

Bir maddeyi oluşturan atom ya da moleküllerin meydana getirdiği ısı hareket, elektromanyetik ışıma ve sonucunda enerji yayılımına neden olmaktadır. Sıcaklık arttıkça, atom ve moleküllerin hareketi ve ışıma şiddeti artmaktadır. Böylece ilgili maddenin artan sıcaklığı ile birlikte oluşan ısı ışıma, dalga boyları dışında, ışık, radyo dalgaları ve X ışınları ile aynı tipte olmaktadır. Maddelerin bir kısmı meydana gelen bu ışıma enerjisini soğururken, bir kısmı yansıtmakta, bir kısmı ise bu enerjinin iç yapılarından daha serbest geçişine olanak vermektedir (Şekil 10).

Yayılmakta olan bu ışıma enerjisi dalgaları soğurgan özellikte farklı bir ortamla karşılaştığında, mevcut enerjilerini yeni bulundukları ortama aktarır ve netice itibarıyla yeni ortamın ısı hareketi artar. Bu şekilde, oluşan ısı yayıldığı ortamdan ışımanın soğrulduğu yeni ortama transfer edilir. Ortamlardan birinin sıcaklığı düşerken yeni ortamın sıcaklığı yükselir.

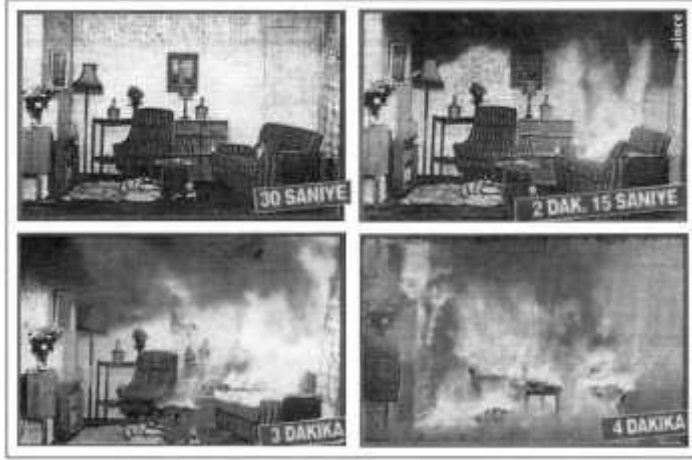
Tüm maddeler sürekli şekilde ısı ışıma yayarlar. Bu enerji yayılımı olayı, madde yüzeyinin sıcaklığına ve yüzeyinin özelliklerine göre değişkenlik gösterir. Yani özetle, birbirleri temas halinde olmayan sıcaklığı yüksek olan bir ortamdan düşük olan bir ortama doğru gerçekleşen ısı transferi olayına ışıma yoluyla ısı transferi denilmektedir.



Şekil 12. Yapılar Arası Işınım Yoluyla Isı Transferi

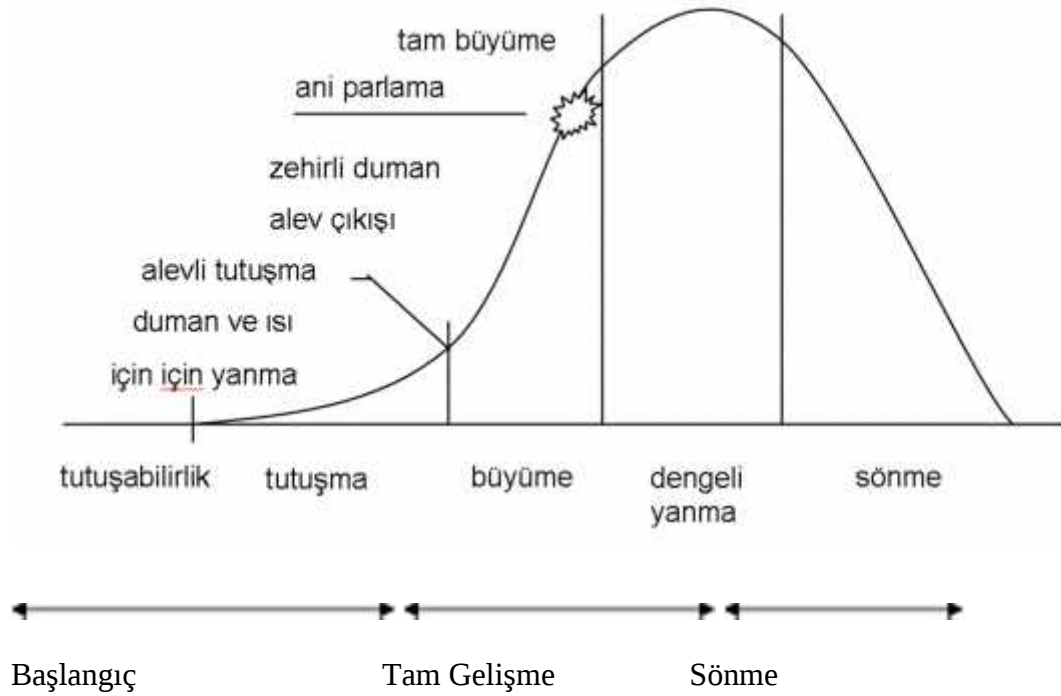
3.10.3. Yangın Yayılım Evreleri

Tüm tipteki yangınlarda çıkış noktası sınırları dardır ve küçük bir bölgedir. Yanma olayı esnasında açığa bir enerji çıkar ve açığa çıkan bu enerji ısıyı yükselterek yanma hızını artırır. Yanmakta olan bölgeden etrafa doğru dağılan ısı ve o bölgeden çıkıp etrafa yayılım gösteren sıcak bir takım gazlar, mevcut yanmakta olan hacimdeki hava ile bu hacmi çevrelemekte olan kolon, sütun, duvar, döşeme gibi bileşenlerin yüzeylerini ısıtır. Bu arada yanıcı maddeler ısı etkisi ile birlikte kimyasal olarak ayrışır ve ortama yanıcı gazlar çıkar (Şekil 14).



Şekil 13. Yangın Yayılım Hızı

Yangın büyüyerek ilerlemesi esas itibarıyla 3, genel olarak 5 evrede incelenmektedir (Şekil 14).



Şekil 14. Yangında İlerleme Süreci ve Yangın Dalgası

3.10.3.1. Başlangıç Evresi; Bu evre hazırlık evresi ve alev evresi olmak üzere iki evrede incelenir.

3.10.3.1.1. Hazırlık Evresi; Yanma olayının başlamasından önceki süredir. Bir kısım katı

maddelerin için için yanma olarak ifade edilen yanma şekli, hazırlık evresinde gerçekleşmektedir. Bu evrenin süresi yanıcı madde veya maddelerin özelliklerine ya da bulunulan ortamın özelliklerine göre değişkenlik gösterir (24-25).

3.10.3.1.2. Alev Evresi; Alevin ilk kez görülmesi ile başlayan evredir. Bilindiği üzere alev hava ile ne kadar temas ederse o kadar büyür. Yanmakta olan maddeden yayılan ısı, öncelikle iletim olayı ile ortamdaki diğer maddelere yayılır. Ardından yayılma olayı ışıınım ile devam eder. Bu evrede maddeler arasında bulunan mesafe fazlaysa ya da ortamdaki mevcut hava miktarı yetersizse ateş kendi kendine söner.

3.10.3.2. Tam Yanma Evresi

3.10.3.3. Genel Kavuşma Evresi; Bu evre ortamdaki bütün yanıcı cisimlerin yandığı, yangının tüm ortamı sardığı ve ısıнын hızlı bir şekilde yükseldiği evredir. Bu evreden önce ortamın farklı noktalarında önemli sıcaklık farklılıkları görülebilmektedir. Ancak ışıınım olayına bağlı olarak mevcut sıcaklık farkı giderek ortadan kalkmaktadır. Kapalı ortamda tavan kısmına doğru yükselen sıcak hava konveksiyon dediğimiz taşıma olayı ile odada dolaşır tüm yanıcı maddeleri tutuşma sıcaklıklarına yükselmekte ve tüm maddeler bir anda hep birlikte tutuşmaktadır. Bu evre aynı zamanda literatürde ani parlama olarak da ifade edilmektedir (24). Bu olay, tutuşma özelliği olan maddelerin bulunduğu bir yangının bütün yüzeye ani geçmesidir.

3.10.3.4. Sürekli Yanma Evresi; Bu evrede sıcaklık hızlı bir şekilde yükselir ve şiddetli bir şekilde yayılır. Aynı zamanda bu evrede yapı bileşenleri de zarar görmeye başlar. Sürecin ilerlemesi ile birlikte çatı ve zemin döşemeleri çöker. Camların kırıldığı pencerelerden dışarıya alevler yayılır (26).

3.10.3.5. Sönme Evresi; Bu evre, ortamdaki yanıcı maddelerin azalmasını ve sıcaklığın yavaş bir şekilde düşmeye başlamasını içerir. Alevler boyca kısalır ve azalarak kaybolur. Ancak, bu evrede sıcaklık düşüşü son derece yavaştır ve yapı bileşenlerinde meydana gelen zarar bu evrede

esnasında da sürmektedir.

3.11. Yangın ve Malzeme İlişkisi

Yangın ve malzeme ilişkisi ortamdaki yangın güvenliği açısından oldukça önemlidir. Ortamı meydana getiren malzemelerin yangın sırasındaki davranışları, özellikle yapı mimarı tarafından bilinmelidir.

3.11.1. Yapı Malzemesi İç Yapısına Karşı Etkiler

Yangın, yapı malzemelerinin iç yapılarını fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki şekilde etkiler.

3.11.2. Fiziksel Etkiler

Sıcaklığın artmasına bağlı olarak, yapı malzemesinin iç yapısında molekül bağları uzar, elastikiyet artar ve nihayetinde iç yapıda kristal sistem dağılır ve malzeme katı halde ise sıvı hale geçer (23,24).

Metal	232 ⁰ C - 1800 ⁰ C
Seramik	1000 ⁰ C - 1400 ⁰ C
Cam	700 ⁰ C - 800 ⁰ C
Termoplastik	90 ⁰ C - 327 ⁰ C

Şekil 14. Farklı Malzemelerin Ergime Sıcaklıkları

3.11.3. Kimyasal Etkiler

Yangında kimyasal etki, ilgili malzemede kimyasal ayrışmaya, gaz ve duman çıkışına neden olur. Kimyasal ayrışma, yangın sonucu malzemenin kimyasal yapısında değişiklikler meydana gelir ve molekül yapısı bozularak karbonlaşma olayı gerçekleşir. Yapıdaki inorganik

malzemelerden taş ve beton bünyesindeki CaSO , CaCO_3 , Ca(OH)_2 ve organik malzemelerden plastik ve ahşap bünyesindeki C , N_2 , H_2 ve S_2 yangın anında kimyasal bir değişime uğrar ve ilgili malzemenin molekül yapısında bozulma gerçekleşir. Bu esnada CO_2 , SO_2 , CO ve SO gibi bir kısım zararlı ve toksik gazlar da meydana gelir. Bu tür malzemelerin kimyasal yapısında gerçekleşen diğer bir olay ise karbonlaşma olayıdır. Bu olay daha çok organik malzemelerde gerçekleşmekte olup ortamdaki oksijen ilgili malzemede kimyasal yapıda bulunan karbon atomlarını yakmaktadır ve sonucunda bir yanma sıcaklığı oluşturmaktadır (24,25)

Bilindiği üzere azotlu bileşikler yüksek sıcaklığın olduğu ortamlarda karbon atomları ile birleşip asit siyanojen ve/veya asit siyanitrik oluşturmaktadır. Karbonla birleşen bu azotlu maddelerle özellikle yün, ipek ve deri gibi doğal maddelerin yanı sıra, poliamid, poliüretan ve poliakrilonitril gibi yanmış plastik malzemelerden çıkan dumanda karşılaşılır (26).

Duman kavramına gelindiğinde, dumanı bir yanma merkezinden açığa çıkan sıcak gaz ve buharın içindeki katı ve sıvı halde bulunan partiküllerin oluşturduğu bir bulut olarak tanımlayabiliriz. Yangın mevzuatı ve işçi sağlığı ile ilgili TSE yayınlarından TS 7486'da ise duman, yanma ve piroliz olayından dolayı meydana gelen katı ve/veya sıvı taneciklerin havadaki gözle görülebilir olan süspansiyonu şeklinde tarif edilmektedir.

Bir kısım maddeler alevsiz yanmalarına rağmen çok yoğun duman çıkarırken, diğer bir kısım madde ise dumanı sadece alevle birlikte yandıkları zaman çıkarmaktadır. Yine bir kısım malzeme ortamdaki kuvvetli hava akımı ya da havalandırmaya bağlı olarak fazla duman çıkarmaksızın alev alev yanmaktadır. Ancak, bu malzemeler oksijenin yetersiz olduğu bir ortamdayken havalandırmaya maruz kalırlarsa fazla miktarda duman çıkarırlar ve dumanın bol olduğu ve alevin olmadığı yavaş yanma dediğimiz bir olay gerçekleşir (26).

Yangın ve ölüm genellikle birbirine eşlik eden olaylardır. Yangın ölümün esas nedeni

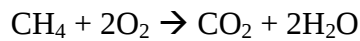
olabişeeği gibi, aynı zamanda bir cinayeti olayını örtbas etmek veya fiziksel delilleri yok etmek için kullanılan bir aracı da olabilir. Yangınlar aynı zamanda kaza sonucu ölümlerin başlıca nedenleri arasında da yer almaktadır. Ölümün nedeni ya da şekli ne olursa olsun, vücut çok çeşitli postmortem etkilere neden olacak şekilde yangına maruz kalabilir. Yangın, bir yakıt ve oksitleyici (sıklıkla ortamdaki oksijen) arasındaki ekzotermik bir oksidasyon reaksiyonu olup, kendi kendine devam etmeye yetecek kadar ısı üretir. Yangın uygun bir yakıt, oksijen, ısı ve reaksiyonun kendi kendine devam etmesini sağlayan bir kimyasal oksidasyon şeklinde dört temel bileşene sahiptir. Bu dört bileşen olmadan yangın gerçekleşemez. Yangın parlama-alevlenme ve için için yanma olmak üzere iki temel şekilde gerçekleşir. Alev, oksijen varlığında yanan gaz halindeki bir yakıtın görünür ürünüdür. Isı tarafından üretilen etkilerle görünür hale gelen bir gaz-gaz reaksiyonudur. Tersine için için yanma şeklindeki yangın olayı, katı bir yakıtın oksijenle doğrudan teması sonucu ortaya çıkmaktadır. Yakıtın yüzeyinde (ve örneğın kömür gibi gözenekli katı bir yakıtın matriksi içinde) meydana gelen bir katı-gaz reaksiyonudur. Bu reaksiyon hızlı bir şekilde devam ederse, yakıtın sıcaklığı 500°C'yi geçer ve yüzeydeki akkor çıplak gözle görülebilir. Görünür renk Tablo 2'de açıklandığı gibi yanan yüzeyin sıcaklığı ile ilgilidir.

Tablo 2. Sıcaklık maruziyetlerine göre kemik ve dişlerde görünür renk değışiklikleri

Renk	Yaklaşık Isı (°C)
Koyu Kırmızı (görünür ilk alev)	500-600
Mat Kırmızı	600-800
Parlak Vişne Kırmızısı	800-1000
Turuncu	1000-1200
Açık Sarı	1200-1400
Beyaz	1400-1600

Yanmakta olan sigara, renk değişimini açıklamak için iyi bir örnektir. Sigara içe çekilip solunursa, kül ışıklı odada bile sarı renkte bir korlaşma şeklinde görünür olan yüksek sıcaklığa ulaşır ve bunu sürdürür. Ardından sigara kül tablasına bırakıldığında, külün yüzey sıcaklığı neredeyse tam karanlıkta görülebilen kırmızı renkte korlaşmaya düşer. Normal oksijen seviyelerinde için için yanma denilen alevsiz duman çıkarma şeklindeki bir yangın olayında, hemen hemen tüm yakıtlar gözenekli olmalıdır ve yandıkça sert gözenekli kömürleşmeyi sürdürmelidir. Bu yakıtlar yandıkça termoplastikler erir, bu şekilde artık sert gözenekli kömürleşme oluşturmazlar ve yüzeyleri dışında veya başka bir alevden kaynaklanan çok yoğun radyant bir ısıya maruz kalmaları haricinde bu için için yanma olayı son bulur.

Alevli yangın yıkıcı ve tahrip edici yangın olayının en sık şekli olup, çok hızlı bir şekilde yayılır ve son derece yüksek ısıların salınmasına neden olur. Alev gaz formunda bir yakıt gerektirir. Bu yakıtlar gaz formundaki metan olabileceği gibi, pentan veya benzin gibi sıvı bir yakıtın buharları ya da katı bir yakıtın bozunması sonucu ortaya çıkan buharlar şeklinde olabilir. Yanıcı gaz en basit olaydır. Çünkü yakıt gaz halindedir ve ısı sadece bir moleküldeki atomların ayrılmasını tetikler (genellikle hidrojen ve karbon). Metan aşağıdaki gibi basit bir ayrışma reaksiyonuna uğruyor gibi görünse de, bu reaksiyonda yüzden fazla ara basamak söz konusudur.



Bazı dokuların kendi kendine tutuştuğu öztutuşma noktaları söz konusudur. Örneğin hayvanlardaki kuyruk yağının öztutuşma noktası yaklaşık 350°C'dir, ancak bu kuyruk yağının buharları örneğin ~250°C gibi çok daha düşük sıcaklıklarda tutuşabilmektedir. Benzin buharlarının parlama noktası -40°C iken, öztutuşma noktası 280-456°C'dir (40).

Sodyum ve potasyum gibi reaktif metal yakıtlar dışında, katı yakıtlar yanmak için buhar haline geçmek zorundadır. Bu buharlaşma olayı süblimleşme (örn., naftalin), erime ve evaporasyon

(örn., mum) ya da termal dekompozisyon (pirolizis) şeklinde olabilmektedir. Pirolizis, hemen hemen tüm katı yakıtlardan kaynaklanan yangınlarda gerekli olan temel aşamadır. Katı yakıta ait moleküller, oksijenle temaslarını sağlamak üzere yeterince küçük parçalara ayrılmalıdır. Yangında üretilen ısının bir kısmı bu pirolizis aşamasına tekrar uğrar. Çok fazla enerji gerekirse (örn., yangının üretebileceğinden daha fazla), bu durumda yangın kendi kendine söner.

Alevler laminar veya türbülans şeklinde olabilir. Örneğin mum alevi gibi küçük alevler, bir soğanın üst üste binen katmanları gibi laminardır. Laminar bir alevdeki bazı bölgeler çok yüksek sıcaklıklara ulaşabilir. Mum alevinde 1400°C ısıya ulaşabilen bir bölge söz konusuysen, asetilen kaynak torkundaki karışık bir alevde 3000°C 'den yüksek ısılara ulaşabilen bir bölge söz konusudur.

Bir alev büyüdüğü, laminar yapısı türbülans nedeniyle bozulur. Günlük yaşamımızda karşılaştığımız yangınların çoğu (ev ve bina yangınları, çöp yangınları ve kırsal alandaki söndürülmesi güç orman yangınları) türbülanslıdır. Bu tip yangınlardaki alevler aynı zamanda difüzyon alevleri şeklindedir. Burada sıvı veya katı yakıt yüzeyinden kaynaklanan buharlar, dış ortama doğru diffüze olur ve patlamak için uygun konsantrasyonlarda karışana kadar havadaki oksijenle karışırlar. Bu türbülans nedeniyle, herhangi bir noktada alevin sıcaklığını ölçmeye çalıştığımızda, sıcaklığın hızlı bir şekilde yükselip alçaldığını görürüz. Yapabileceğimiz en iyi şey ortalama alev sıcaklığını ölçmektir. Yakıtların yanma ısısı büyük ölçüde değişiklik gösterse de (Tablo 3), çoğu yakıt türbülanslı bir yangın şeklinde havada yanarken ortalama $800-1000^{\circ}\text{C}$ ısı üretir. Bunun en sık karşılaşılan istisnaları alev sıcaklıkları 1400°C 'ye ulaşabilen metanol, yine ölçülen alev sıcaklıkları yaklaşık 1400°C olabilen kömür ile stiren ve poliüretan gibi plastiklerdir. Benzin kaynaklı alevler, odun veya plastik gibi sıradan tutuşturuculardan kaynaklı alevlerden çok daha yüksek sıcaklıklara sahiptir. Bu nedenle, yüksek sıcaklığa bağlı etkilerin bu tür bir petrol ürününden kaynaklandığı düşünülebilir, ancak bu artık doğru değildir

(Tablo 3). Benzinle dolu yanan bir havuzdaki alevin sıcaklığı ile bir odun yığınının kaynaklanan alevin sıcaklığı benzerdir. Diğer istisnalar çok daha nadirdir; piroteknik karışımlar veya reaktif metaller (örn., magnezyum vb.) 3000°C ve üstü sıcaklıklara ulaşabilen alevlere neden olur. Oksijenden zengin atmosferlerdeki yangınlar da çok yüksek alev sıcaklıkları üretebilir.

Yangınlar ısı salım hızlarına (heat release rate (HRR), ısı çıkışı veya ısı gücü) göre değişiklik gösterir. Tüm boyut ve tipteki yangınlar, saniyede ölçülen kilojoule (kJ/s) veya kilowatt HRR değerlerine göre sınıflandırılır.

Tablo 3. Farklı yakıtların yanma ısıları

Odun veya Kağıt	16 kJ/g
Metanol	20 kJ/g
Poliüretan Köpük	24 kJ/g
PMMA (akrilik plastik)	25 kJ/g
Naylon	30 kJ/g
Hayvansal Kuyruk Yağı	32 kJ/g
Kömür	30-33 kJ/g
Polietilen/Polipropilen	44 kJ/g
Benzin	46 kJ/g

Tablo 4. Ortam Havaında Ölçülen Maksimum Difüzyon Alev Isıları

Odun	1027°C
Benzin	1026 °C
Metanol	1200 °C
Kerosen	990 °C
Hayvansal Kuyruk Yağı	800-900 °C
Kömür	1390 °C

Tablo 5. Tipik Isı Salım Hızları

Sigara Ateşi	5 W
Kibrit	50 W
Küçük Çöp Sepeti Alevi	50-150 kW
Küçük Döşemeli Sandalye	150-250 kW
Pamuklu Yatak Şiltesi	100-970 kW
Döşemeli Koltuk	350-750 kW
Sentetik Döşemeli Televizyon Koltuğu	500-1000 kW
Kanepe	1-3 MW
Beton Üzerindeki Benzin Birikintisi	0,9-1,0 MW

Bir alev veya yangının HRR'si bu ısı kaynağının temel özelliğidir. HRR bize alevin yüksekliği, içindeki odada sıcaklığın ne kadar hızlı yükseleceği, odanın ne kadar sürede dumanla dolacağı ve en önemlisi yangının yakınındaki veya temas halinde olduğu maddeleri nasıl etkileyeceği hakkında fikir verir.

Isı kondüksiyon, konveksiyon ve radyasyon (veya bunların bir kombinasyonu) olmak

üzere üç şekilde aktarılır. Çöp sepeti içindeki bir yangın gibi küçük bir yangında ısıнын çoğu konveksiyon yolu ile (hareketli sıcak gazlar) aktarılır ve sadece alevlere çok yakın olan yüzeyler alevlerden kaynaklanan radyant ısıdan etkilenir. Yangın ne kadar büyükse, HRR o kadar yüksektir ve radyant ısı yakınındaki yüzeylerde o kadar etkilidir. Alevlerle doğrudan temas halinde olan nesneler hem radyant hem de konvektif süreçlerle ısınır ve sıcaklıkları hızla yükselir (21-23).

Isı bir nesneye aktarıldığında, bu nesnenin sıcaklığı, ilk olarak ısınan yüzeyde ve ardından ısının kondüksiyon ile penetre olmasıyla daha iç kısımlarda yükselme gösterir. Isının yoğunluğu, birim alan başına yüzeye çarpan ısı oranı ile ölçülür ve kJ/s/m^2 ya da kW/m^2 olarak ifade edilir. Süre ile çarpılan oran, nesneye ne kadar ısının aktarıldığının bir ölçüsüdür. Nesnenin kütlesini, ısı kapasitesini ve kondüktif, konvektif veya radyatif süreçlerle nesneden kaybedilen ısı oranını kontrol eden yalıtım faktörlerini biliyorsak, nesnenin denge sıcaklığını hesaplayabiliriz. Bu durumda, yangına maruziyetten sonra gördüğümüz fiziksel ve kimyasal etkiler, ısı aktarımı (ısı akışı), süre ve nesneye ait fiziksel parametrelerin bir sonucudur. Örneğin bir kamp ateşine 4 m uzaklığa bir ahşap çubuk koyarsak, üzerine düşen radyant ısı bu çubuğun ısınıp ölçülebilir bir dereceye yükseltmeyecektir, çünkü bu ahşap çubuk üzerine ısı eklendikçe bu ısıyı çevresine yayıp hızlı bir şekilde kaybedecektir. Çubuğu aynı ateşe 2 m mesafeyle yaklaştırdığımızda, herhangi bir değişiklik görmeyiz, ancak çubuğun aleve dönük olan kenarına dokunduğumuzda (ya da sıcaklığını ölçtüğümüzde), ısınmış olduğunu görürüz. Çubuğu bu kez 1 m mesafeye getirdiğimizde, yüzeyi ısınır ve üzerinde esasen uzaklaştırılan su olan beyaz bir dumanın yükseldiğini görebiliriz. Çubuğu 0,5 m uzaklığa yerleştirdiğimizde yüzey sıcaklığı artık ahşabın pirolizisine, buharların salınmasına ve kömürleşmeye yetecek kadar yüksek olduğu için hafifçe yanma veya alazlanma görürüz. Çubuk 0,25 m’de iken, kömürleşme görürüz ve oluşan buharlar tutuşabilir. Çubuğu alevle yakın temasa maruz bıraktığımızda, konektif ısı aktarımı önem kazanır

ve ısınan yüzey tutuşur. Çubuğu doğrudan alevlerin arasına koyduğumuzda ise, saniyeler içinde sırasıyla hafifçe yandığını, kömürleştiğini ve tutuştuğunu görürüz.

Odun veya plastik gibi katı yakıtların yüzey sıcaklığı yaklaşık 350-400°C'dir (24). Bu sıcaklık, yukarı kısımdaki alevlerden kaynaklanan radyant ısınma ile elde edilir ve yüzeydeki alevsiz dumanlara bağlı içten yanma radyatif ve konektif kayıplar ve uçucu pirolizis ürünlerinin buharlaşmasına karşı dengelenir.

3.12. Ev Tipi Yangınlar

Adli önem taşıyan yangınların çoğu ev tipi yangınlardır. Yangının başlangıç noktasından hareketli gazla yükselerek tavanda birikir ve yukarıdan aşağıya doğru odayı doldurur. Bu duman tabakası elbette pencere ve kapılardan veya havalandırmalardan sızabilir. Yangın ne kadar büyükse, yani HRR değeri ne kadar yüksekse, duman tabakası o kadar hızlı oluşup odayı doldurur ve sıcaklığı o kadar hızlı yükselir. Yangın ilerlerken, odadaki etkilerin çoğu yukarı kısımlarda ve yangının başlangıç noktasında gerçekleşir. Yangının büyüklüğü yakıt kaynağının yapısına veya havalandırmaların boyutuna bağlıdır. Tüm kapı ve pencerelerin tamamen kapalı olduğu bir odada yangın çok sınırlıdır. Tek bir açık kapı, yangını yaklaşık 3 MW artıracak kadar oksijenin içeri girmesine neden olabilir ve böylece yangın tüm odaya yayılabilir. Normal boyuttaki bir odada (tavan yüksekliği 2,4 m), ortalama tavan katma sıcaklığı yaklaşık 600°C'ye yükselir, radyant ısı akışı (yoğunluk) 20 kW/m²'ye ulaşır ve bu şekilde tüm mobilyalar, duvar kaplamaları ve döşemeler tutuşur. Ani alevlenme sonrası, zeminden tavana doğru 800-1000°C'lik bir ısı oluşur ve ısı akışları 150 kW/m²'ye ulaşabilir. Bu durum yoğun türbülans ile içeri giren hava ve sıcak yanıcı gazların karışması sonrası gerçekleşir.

3.13. Yangının Etkileri

3.13.1. Yangın ve Malzeme İlişkisinin Kişi Üzerindeki Etkileri

Yangın sırasında, olay yerinde canlı organizmaları etkileyebilecek farklı tipte zararlı

atıklar ortama yayılır. Bu atıkların canlıların üzerindeki etkileri alev ve ısı, duman ve gaz olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

3.13.2. Alev ve Isının Etkileri

Alev canlılar üzerinde, doğrudan etki ve ısınım ile etki olmak üzere iki şekilde etkilidir. Hem alevin doğrudan etkisi hem de ısınım yoluyla etkisi canlılarda farklı derecelerde yanıklara ve nihayetinde ölüme neden olabilmektedir. Aynı zamanda yüksek derecelere ulaşan ısı canlı organizmaların su kaybetmesine ve bunun sonucunda tükenmişlik, bilinç kaybı ve nefes alıp vermede güçlük ile ileri derece yanıklara yol açabilmektedir.

3.13.3. Gazların Etkileri

Yangın sırasında olayın gerçekleştiği ortama, canlı organizmaları çeşitli derecelerde etkileyen farklı gazlar yayılır. Azot ya da klor içeren maddelerin yanmaları halinde olay yerine, ölümcül etkili asit siyanidrik ve asit klorhidrik toksik gazları salınır. Aynı zamanda, yangın sırasında ortama santral sinir sisteminde suprese edici etkileri olan aseton, asetilen veya etil alkol gibi maddeler ile toksik toluen, benzen, kurşun, civa, arsenik, karbondisülfid ve metil alkol gibi boğucu ve zehirleyici maddeler de yayılır.

3.13.4. Dumanın Etkileri

Yangın sırasında ortamı kaplayan duman, içerideki kişilerin dışarı çıkış yolunu bulmalarına engel olabilmektedir. Dumanın en önemli özelliği boğucu olup nefes alıp vermeyi engellemesi ve ayrıca kişinin görmesini engelleyerek paniğe yol açmasıdır. Sonuç itibarıyla, yangını söndürmeyi amaçlayan itfaiyecilerin yangına müdahale etmelerini ve mağdurları bulup dışarı çıkarmalarını önlemektedir.

Yangının yumuşak doku veya kemik gibi bir materyal üzerindeki etkisini değerlendirirken, sadece sıcaklık değil, aynı zamanda ısınan bölgenin etrafındaki atmosfer (esasen ısınan yüzeyle temas halinde olan atmosfer) ve temas süresi de önem taşımaktadır. Mum

ve t p gaz alevi gibi laminar bir alev bir yüzeye doğrultulursa, ısınan gazların etkisi yanma ürünlerini ortamd n uzaklaştırır ve atmosferdeki oksijenin ısınan yüzeye ulaşmasını engeller. Ardından, ısınan yüzeydeki kimyasal reaksiyonlar oksijen olmadan gerçekleşir. Türbülanslı alevlerin olduğu bir yangında ise, yanan bir ahşap çubuğun üzerine üflendiğinde, hava akımı oksijeni sıcak yüzeyde tutarak pirolizis ürünlerinin yerini değiştirir ve ısınan oksijen içeriği, katı yakıtın yüzey sıcaklığında ani bir artışa neden olur. Bu durumda, alevin körüklenmesi sonucu parlak bir akkor görülür. Tipik türbülanslı bir yangında, yanmakta olan yakıtın yüzey sıcaklığı artıp azalır ve ortamdaki atmosfer zaman zaman redüksiyona ve zaman zaman ise oksidasyona neden olur.

Yangın maruziyeti ile ilgili değişkenler şu şekilde özetlenebilir:

1. Yangının büyüklüğü (ısı salım hızı)
 - a. Tek bir maddenin yanması
 - b. Birden fazla maddenin yanması
 - c. Tüm odanın yanması (ani alevlenme-kuru kıvılcım)
 - d. Uzun süreli, ani alevlenme sonrası yanma
2. Vücudun yangına maruz kalması
 - a. Yangın boyunca alev almayan-tutuşmayan zeminde
 - b. Yanan maddelerin üzerinde
 - c. Yangın esnasında  ken ve tutuşma özelliği olan zeminde
 - d. Metal iskelet üzerinde kalma ( rn., araç koltuğu)
 - e. Her taraftan ve yönden yangına maruz kalma (ticari kremasyon)
3. Maruziyet süresi
 - a. Antemortem
 - b. Postmortem

4. Kemiğin veya dişin durumu

a. Taze/Yeni

b. Kurumuş

Canlı bir kemik komplike bir matriks içinde su, kan, yağ ve diğer dokuları içerir. Kemiğin ısınması ile birlikte, bu bileşenlerin her biri, buharlaşarak veya pirolizis ile kömürleşerek, büzüşerek, sıvılaşarak ya da genişleyerek, yanmaya karşı yüzeydeki bir sıvı yakıt ya da gözenekli sert bir fitildeki yakıt gibi yanıt verirler. Yağ vücuttaki en iyi yakıttır ancak yalnızca hava ile temas halinde olan uygun bir absorban madde uygulanması halinde yanacaktır. Kemiğin kendisinin dehidrate olma, kalsinasyona uğrama, küçülme ve büzülme, delamine olma ve kırılma özelliği vardır. Organik içeriğin kömürleşmesinden sonra ilk olarak dehidrasyon gerçekleşir. Alevlerin temas ısısına (550°C veya üstü) sürekli maruziyet ile kömür okside olup uzaklaştırılır. Kemik, tıpkı aşırı ısınması durumunda düşen beton gibi iç kısmındaki nemin buhara dönüşmesi ile parçalanabilir. Osteoporozu olan mağdurlara ait kemiklerin osteoporozu olmayanlara kıyasla çok daha hızlı degrade olduğu ve çok daha yaygın şekilde yandığı gösterilmiştir (20). Ev veya araç yangınları sürekli olabileceği gibi, ani ısınma ve soğumanın olduğu kısa ve aralıklı sürelerde de olabilir. Oksidatif ya da redüktif etkiler ortaya çıkabilir. Yangının neden olduğu hasarın yorumlanması sırasında bu değişkenler göz önünde bulundurulmalıdır. Yumuşak doku üzerindeki etkiler, yüzeye uygulanan ısının yoğunluk ve süresine ve de maruz kalan dokunun kalınlık ve termal özelliklerine bağlı olarak değişir. Epidermis çok kısa süreli yangınlarda bile (ani parlama şeklindeki yangınlar) dermis dokusundan kolayca ayrılabilir. Alttaki deri tabakalarının kalınlığı, termal iletkenliği ve ısıl eylemsizlik özelliği ısının penetrasyonunu yavaşlatır.

Yangının söndürülmeye başlaması ile, yanan kemikler etkilenmeye başlar ve gözlenen tüm hasarın ısı ya da alevlere bağlı olmadığı söylenebilir. Hortumla ani soğutma işlemi, sıcak

olan kemiklerin kırılmasına ya da parçalanmasına neden olabilir. Bu durum, özellikle kemikler delaminasyon veya kalsinasyon aşamasındayken gerçekleşir. Doğrudan hortumdaki su akışına bağlı olarak mekanik hasar, molozların düşmesi veya yangın sonrası taşıma ve onarım ya da kurtarma operasyonlarına bağlı olarak da meydana gelebilir.

Yangının insan kalıntılarına verdiği hasarı değerlendirirken, kalıntılar ve yangın arasındaki ilişki kritiktir. Yangın boyunca fiziksel ve termal ilişkiler ve koşullar sabit değildir. Hiçbir yangın birbiri ile aynı değildir. Sıcaklıklar aşırı değişkenlik gösterebilir, ısı akışları sıklıkla ve hızlıca değişir ve ventilasyon koşulları da sürekli ve bazen dramatik olarak değişir. Kemik ve diş değişkenlik gösteren kompleks kompozit maddelerdir. Yangın olay yeri ve kalıntılarının yangın öncesi ve sonrası dikkatli bir şekilde kayıt altına alınması çok önemlidir. Mümkünse, kalıntılar ilk olarak bulundukları olay yerinde incelenip değerlendirilmelidir. Bazı yanlış kanılardan ve fazla basitleştirme olaylarından kaçınılması önem taşımaktadır.

Yangın, biyolojik ve içeriksel rekonstrüksiyonlar için hayati önemi olan değerli kanıtlara zarar verebilen, bunları değiştirebilen veya ortadan kaldıracı bir güçtür. Çeşitli araştırmalar, vücudun konumu ve kremasyon sırasında dekompozisyon aşaması, yangının nasıl ve ne boyutta kemiğe zarar verdiği ve de kemik termal olarak değiştikten sonra perimortem ve antemortem travmanın yangından veya kremasyondan sonra biyolojik parametrelerin elde edilemeyeceğinin belirlenmesi üzerine odaklanmıştır.

Kalıntıların değişmesine neden olan yıkıcı güçler aynı zamanda araştırmacıların ölümcül yangın olaylarını daha doğru ve daha kapsamlı değerlendirmelerini de sağlayabilmektedir. Bu artefaktların doğru yorumlanması, yanmış kemiklerle ilgili olarak adli genetik ve antropolojik araştırmalarda araştırmacılar için yeni bir itici güç olarak ortaya çıkmaktadır. Adli genetik ve adli antropolojik literatür incelendiğinde, yanmış insan kemik ve diş kalıntılarına yönelik analizlerin sıklıkla zaman alıcı ve tutarsız olduğu da görülmektedir.

Olay yerinde bulunan yanmış iskelet kalıntıları ve dişler için temel hedef, mağdurun kimliğini ve suç faaliyet ile ilgili potansiyel kanıtları tespit etmek amacıyla, termal etkileşimler sonucu değişmiş olan kemiklerin ve dişlerin toplanması, korunması ve yorumlanmasına yönelik yöntemleri belirleyip geliştirmek ve nihayetinde ölümün nedenini ve şeklini ortaya çıkarmaktır. Delillerin etkin bir şekilde toplanıp korunması, bu tür yanmış örneklerle ilgili çalışmaların başarısının temelini oluşturmaktadır (45,51). Bunun yanında, birçok araştırmacının bu tip yangın olayları ile ilgili çalışmalarda sadece sıcaklığı göz önünde bulundurduğu, atmosfer ve süre gibi diğer değişkenleri dikkate almadığı görülmektedir (21). Bunun nedeni, kemiklere ulaşmaya yetecek kadar tüm vücut dokularının yangında yıkıma uğramasına bağlı olarak vücut pozisyonunun, vücudun yüz üstü veya yüzü koyun olup olmamasının ya da maruziyet süresinin artık önem taşımamasıdır. Yangın esnasında gerçek zamanlı dinamik parametreler dikkate alındığında, vücuttaki yanık paternlerini sınıflamak üzere üç tanısıl prosesin kullanılması mümkündür. Bu parametreler;

- 1) Vücut pozisyonu ve kemiğin üzerini örten koruyucu dokular
- 2) Termal olarak değişim gösteren kemikteki renk değişikliği
- 3) Yanmış kemikteki kırık biyomekaniği

Bu üç dinamik değerlendirildiğinde, termal yıkımın normal bir yanma paternine ya da şüpheli anormal bir yanma paternine uyup uymadığı söylenebilmektedir (24). Bu tür olguların değerlendirilmesinde sıcaklık ve ısıya maruz kalınan süre yanında, yanma şekli, kemiğin maruz kaldığı maksimum sıcaklık, iskelet kalıntıları ve dişlerin kuru, taze olup olmaması veya yumuşak doku içerip içermemesi, renk değişiklikleri, kırık bulunup bulunmaması ve kırık varsa kırık paternleri de önem taşımaktadır. Bu tür araştırmalar ilerledikçe, termal etkileşimler sonrası kemik yapısındaki değişimler gibi kantitatif değerlendirmeler de göz önünde bulundurulmaya başlanmıştır.

Yanmış insan kalıntılarında başarılı DNA'nın elde edilmesi ile ilgili olarak literatürde çeşitli yayınlar mevcuttur. 1991 yılında Sajantila ve ark. (15,27) ekstrem derecede yanmış olan 10 yangın kurbanına ait iskelet kalıntılarında başarılı DNA tiplemesi yaptıklarını bildirmişlerdir. Brown ve ark. (31) erken Bronz Çağı'na ait krematasyonla yakılmış insan kemiğinden DNA'yı elde edebilmişlerdir.

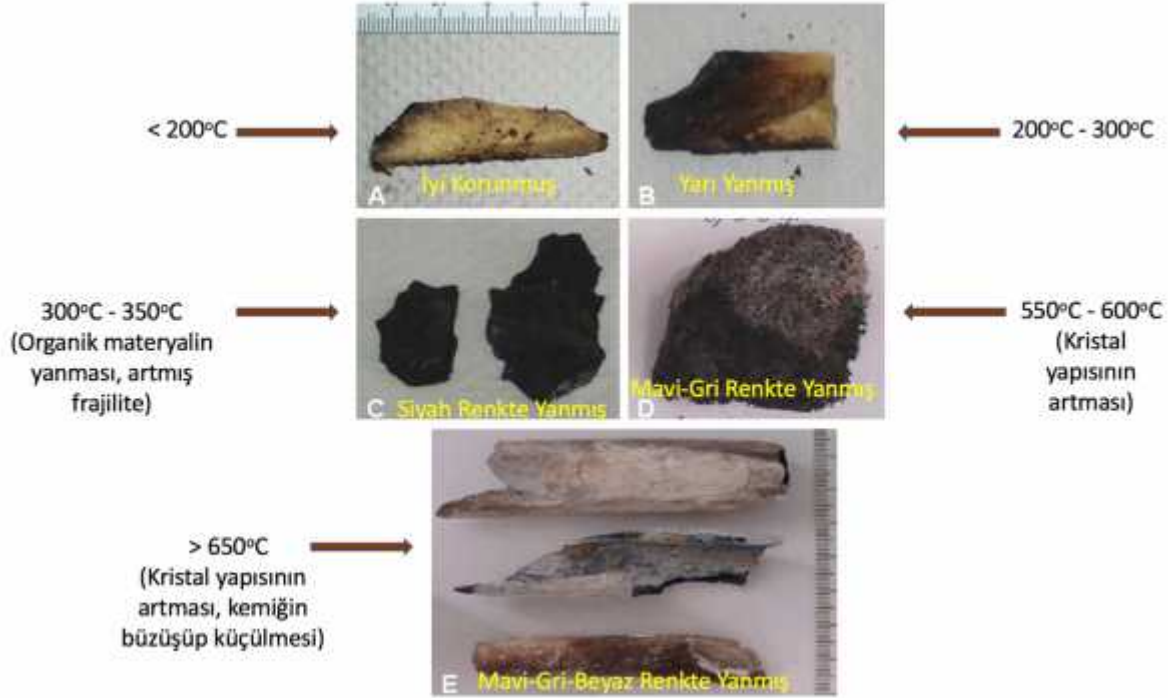
Tsuchimochi ve ark. 2002 yılında (29,70) dişlerin 300°C'ye kadar sıcaklıklara maruz bırakıldıktan sonra dental pulpadan DNA çoğaltılabileceğini ve başarılı olarak tiplendirilebileceğini, 300°C'nin üzerinde sıcaklıklara maruz bırakılan dişlerde ise DNA tiplendirmesinin başarılı olmadığını belirtmişlerdir.

Yangına bağlı ölüm terimi, yaşamsal bulgulardan bağımsız olarak ısı etkisi ile doku hasarının ortaya çıktığı insan cesetleri için kullanılır. Adli rutin analiz bazı durumlarda olay yerinde sadece kemik ve kemik parçalarının kaldığı yanmış cesetlerin idantifikasyonunu gerektirir. Bu durum özellikle yüksek ısıların üretildiği kitlesel ölüm olayları, intiharlar, araba kazaları veya ev yangınlarında geçerlidir. Bazı olgularda ise, yangın bir suçu gizlemeye yönelik olarak da çıkarılmış olabilmektedir (40).

Ciddi şekilde yanmış kemikler dokunulduklarında parçalara ayrılır, dağılıp ufalanır. Kortikal yüzeyde ince yüzeysel kırık ağları gözlenir (42). Isının artması ile birlikte, kemikte bir renk spektrumu ile karşılaşılır. Bu renk spektrumu bej renkten başlayarak, koyu kahverengi siyah renge ilerler, ardından mavi-yeşil renge dönüşür ve nihayetinde de beyaz renk ile son bulur. Bu farklı renkler, kemiğin maruz kaldığı yaklaşık sıcaklığı tahmin etmekte kullanılır. Buna göre, sarımsı veya kahverengimsi renk değişikliği 200-300°C, siyah renk değişikliği 300-350°C, gri renk değişikliği 550-600°C ve beyaz renk değişikliği 650°C'nin üzerindeki sıcaklıklarla ilişkilendirilir (Şekil 16). Organik maddelerin tutuşması ve ilerleyici şekilde yanıp kül olması siyah bir renk değişimine ve kemiğin kırılabilirliğinde bir artışa neden olur. Yüksek sıcaklıklara

uzun bir süre boyunca maruziyet kemiğin kristal yapısını bozar ve kemikte gri-beyaz bir renk değişikliği ve büzölmeye neden olur.

İç organların korunduğu yangın kurbanlarının genetik idantifikasyonu genellikle sorunsuz olarak yapılabilmektedir. Ancak, ekstrem sıcaklıklarda yanmış olan cesetlerde sıklıkla DNA elde edilememekte ya da elde edilse bile aşırı derecede degrade olduğu için STR tiplemesine engel olmaktadır. Son yıllarda, aşırı derecede degrade olmuş DNA'ya yönelik olarak, söz konusu miniSTR'ler (81,82), SNP analizi veya mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) çok kısa fragmentlerinin dizilenmesi (74) ile ilgili çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır.



Şekil 16. Yüksek Sıcaklıklara Maruz Kalan Kemiklerde Renk Değişimi Aşamaları

Yanmış kemiklerin DNA analizinde karşılaşılan diğer sorunlar arasında, DNA çekitlenmesi sırasında, kemik içine infiltre olmuş olan benzin vb. yakıtlar, erimiş plastik veya tekstil ürünü ve yanı sıra mikroorganizmalar gibi yabancı DNA ile kontaminasyon gibi PCR inhibitörlerinin birlikte çekitlenmesi gelmektedir. Özellikle kemik veya dış yüzeyi poröz ve fragil

olduğunda, ilgili kemik veya dişin temizlenmesi mümkün olamamaktadır ve polis, paramedikler veya itfaiye memurları gibi üçüncü şahıslar tarafından kontaminasyon göz önünde bulundurulmalıdır.

Yangın vakalarında kemikler incelenirken, DNA miktarı ve kalitesi açısından spongiyöz yani süngerimsi kemik yerine kompakt kemik tercih edilmelidir (12). Bizim çalışmamızda da belirtilen tüm uygulama koşulları dikkate alınmıştır.



4. Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda, yaşları 18 ile 71 arasında değişen 22 kadın ve 28 erkekten alınmış 25 kemik ve 25 diş örneğinden oluşan toplam 50 örnek ile aynı kişilere ait 50 adet ağız içi sürüntü kontrol örneklerini kullandık. Deneklere ait Aydınlatılmış Onam Formu Ek 2’de ve Etik Kurulu onayı üst yazıları Ek 3’te verilmiştir. Bilindiği üzere, özellikle patlayıcı ile gerçekleşen kitlesel ölüm olayları, intihar girişimleri, araç kazaları, ev yangınları veya bir suçu gizlemeye yönelik bilinçli gerçekleştirilen aşırı derecede ısıнын üretilebildiği yangın olaylarında DNA analizi amacıyla sadece sert doku olarak bildiğimiz kemikler ve dişler kalmaktadır. Yanmış olan kemik parçalarından ve dişlerden çekitlenen DNA, genetik belirteçlerin amplifikasyonunu zorlaştıracak ve hatta imkansız hale getirecek şekilde yüksek oranda degrade olmuş olabilmektedir. Ayrıca, yanmış olan kemik ve dişler dış kaynaklı DNA kontaminasyonuna da oldukça açıktır.

Çalışmamızda, farklı derecelerde ısılara maruz bırakılan iyi korunmuş, yarı yanmış, siyah renkte yanmış, mavi-gri renkte yanmış ve mavi-gri-beyaz renkte yanmış kemiklerde, farklı DNA çekitleme yöntemlerini karşılaştırıp, yeni modifiye bir çekitleme yöntemi geliştirmeyi ve özgün DNA profilleri elde edilip edilemeyeceğini belirlemeyi amaçladık.

Bu örneklerden DNA çekitlemesi ve başarılı PCR amplifikasyonunun halihazırda zorluğunu sürdürmesi, bazı yöntemlerin komplike ve zaman alıcı olması, henüz herhangi bir yöntemin rutinde kullanılacak bir kabul düzeyine ulaşmaması nedeniyle, bu çalışmada mevcut yöntemler arasında kullanıma en uygun olanı belirlemeyi ve çeşitli modifikasyonlarla daha iyi bir yöntem geliştirmeyi ve ayrıca kemik ve diş örneklerinden DNA’nın elde edilebildiği maksimum sıcaklık derecelerini belirlemeyi amaçladık.

4.1. Materyal

Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, İstanbul Eğitim ve Araştırma hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği ile Beyin ve Sinir

Cerrahisi Kliniği'nden ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği ile Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği'nden topladığımız 25 kemik örneği; femur başı, femur diafiz parçaları, tibia medial ve lateral kondil parçaları ile diafiz parçaları, ulna shaftı parçaları, laminektomi ve herni ameliyatlarında eksize edilen vertebra parçaları ile kemik tümörü ameliyatlarında eksize edilen vertebra gövdeleri ve kosta kemiklerinden oluşurken, 25 diş örneği ise Okmeydanı Ağız ve Diş Sağlığı Hastanesi'nden toplanmış olan süt dişleri, kesici dişler, küçük azı ve büyük azı diş örneklerinden oluşmuştur.

Örneklerin toplanması aşamasından ardından, çekitleme aşamasına geçmeden önce her bir kemik ve diş örneğinde öncelikle %10'luk çamaşır suyu ile steril hale getirilmiş fırça, cerrahi makas, skalpel ve bisturi ile mekanik temizleme işlemi gerçekleştirilerek, sert doku üzerinde bulunabilecek görünür tüm yumuşak doku uzaklaştırıldı ve tüm örnekler zımparalamaya tabi tutularak 5 gün boyunca çeker ocakta kurumaya bırakıldı. 25 kemik örneği Planmed Kemik Kırıcı ve Dremel Multipro cihazı ile küçük parçalara ayrıldı. Diş örneklerinin halihazırda küçük olması ve doğal sert yapısı nedeniyle parçalama işlemine tabi tutulmalarına gerek duyulmadı.

Ardından, tüm örnekler %0,5'lik sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulup, distile su ile 5'er dakika yıkandı. Daha sonra örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı ve 1 saat süreyle UV-C ışımaya tabi tutuldu. Kontaminasyonu önlemek için International Society for Forensic Genetics (ISFG-Uluslararası Adli Genetik Derneği) DNA Komisyonu'nun kalite standartları ve önerileri dikkate alındı.

Bu aşamanın ardından kemik ve diş örnekleri 50°C'den başlanarak önce 10°C'lik artışlarla ardından 50°C bir artış ve en son 100°C'lik artışlarla kül fırınında aşağıdaki şekilde 50°C-1000°C arası yüksek, çok yüksek, ultra yüksek ve ekstrem derecede yüksek ısılara maruz bırakıldı. Isı aralığı seçilirken özellikle ev veya arabada gerçekleşen yangın olaylarında sıcaklığın 800-1000°C'ye kadar yükselmesi dikkate alındı.

Kemik ve diş örnekleri, kül fırınında 7 farklı sürede (10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 dakika) 25 farklı ısı derecesine (50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000°C) tabi tutulup bir yangın olay yeri simülasyonu gerçekleştirildi (Tablo 6 ve 7).



Tablo 6. Kemik örneklerinin kül fırınında maruz bırakıldığı farklı sıcaklık dereceleri

1) 50°C.....60 dakika	14) 180°C....30 dakika
2) 60°C.....50 dakika	15) 190°C....30 dakika
3) 70°C.....40 dakika	16) 200°C.....20 dakika
4) 80°C.....30 dakika	17) 250 °C....20 dakika
5) 90°C.....30 dakika	18) 300 °C....15 dakika
6) 100°C....30 dakika	19) 400 °C....15 dakika
7) 110°C....30 dakika	20) 500 °C....10 dakika
8) 120°C....30 dakika	21) 600 °C....10 dakika
9) 130°C....30 dakika	22) 700 °C....10 dakika
10) 140°C....30 dakika	23) 800 °C....10 dakika
11) 150°C....30 dakika	24) 900 °C....10 dakika
12) 160°C....30 dakika	25) 1000 °C..10 dakika
13) 170°C....30 dakika	

Tablo 7. Diş örneklerinin kül fırınında maruz bırakıldığı farklı sıcaklık dereceleri

1) 50°C.....60 dakika	14) 180°C....30 dakika
2) 60°C.....50 dakika	15) 190°C....30 dakika
3) 70°C.....40 dakika	16) 200°C.....20 dakika
4) 80°C.....30 dakika	17) 250 °C....20 dakika
5) 90°C.....30 dakika	18) 300 °C....15 dakika
6) 100°C....30 dakika	19) 400 °C....15 dakika
7) 110°C....30 dakika	20) 500 °C....10 dakika
8) 120°C....30 dakika	21) 600 °C....10 dakika
9) 130°C....30 dakika	22) 700 °C....10 dakika
10) 140°C....30 dakika	23) 800 °C....10 dakika
11) 150°C....30 dakika	24) 900 °C....10 dakika
12) 160°C....30 dakika	25) 1000 °C..10 dakika
13) 170°C....30 dakika	

Kemik tozu elde etme aşaması için yapılan ön çalışmalar sırasında, elde edilen küçültülmüş kemik örnekleri ile sağlam diş örneklerinden, mevcut öğütücüler kullanılmadan önce el matkabı ile düşük hızda 1 ila 3 gr kemik ve diş tozu elde edilebildiği görüldü. Yukarıda belirtilen kül fırınında uygulanmış olan sıcaklık ve süreler hem sağlam kemik ve diş örneklerine hem de öğütülmüş kemik ve diş örneklerine uygulandı. Çalışmamızda her ne kadar kit protokollerinde belirtilen miktarlar uygulansa da, 3 gr örnek kullanımı ile daha yoğun ve kullanılabilir DNA elde edildiği tespit edildi. Bu nedenle tüm çekitleme reaksiyonları için 3 gr kemik ve diş tozu örneği standart olarak kabul edilip kullanıldı.

Öğütme işlemi için sonrasında Dentreal Kemik Öğütücü “Bone Mill” ve Retsch “Cryomill” Ultra Santrifüj Kemik Öğütücü ile örnekler toz haline getirildi. Bilindiği üzere, kemiğin %70’ini oluşturan inorganik bölüm kalsiyum hidroksiapatit kristallerini içermektedir. Temel rolü kemik mineralizasyonuna katılmak olan Ca^{+2} iyonları kemik dokusu içerisinde geniş mineralizasyon alanlarını oluşturur. Ekstraksiyon ayraçlarına karşı fiziksel bariyer durumundaki bu bölgeler DNA içeren hücrelere ulaşmayı zorlaştırır. DNA’ya en verimli şekilde ulaşabilmek için Ca^{+2} iyonlarının materyalden uzaklaştırılması gerekmektedir. Kemik ve diş gibi yapısal olarak sert olan DNA kaynakları için günümüz ekstraksiyon protokollerinin çoğu da toz haline getirilmiş materyalin yüksek hacimdeki etilen diamin tetra-asetik asit (EDTA) içeren ekstraksiyon tamponunda inkübasyonunu ve ardından süpernatantın toplanması esasını temel alır. Literatürdeki birçok yayında, yanmış kemik örneklerine yönelik DNA çekitleme yöntemleri arasında farklılıklar mevcuttur. Yayınların çoğu, toz haline getirilmiş kemiğin bir lizis tamponu içinde inkübasyonu ve ardından süpernatantın atılıp kalan materyalin çalışılması gerektiğini savunurken, bazı yayınlar ise kemik tozunun tam olarak fiziksel çözünmesini ve tüm DNA’nın elde edilebilmesini sağlayacak olan tam demineralizasyon işleminin yapılması gerektiğini savunmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda, ısıya tabi tutulan pulverize örneklerin her biri 1,5 mL

0,5 M EDTA içinde dekalsifikasyon için 56°C'lik su banyosu içinde bir gece boyunca inkübasyona tabi tutuldu. Bu işlem, solüsyonun değiştirilmesi ile iki gece boyunca daha tekrarlandı. Ardından örnekler santrifüj edilip üstte kalan süpernatant atıldı ve geriye kalan dekalsifiye pelette çekitleme yöntemlerinin uygulanmasına geçildi.

Kemik ve diş örneklerini çekitleme amacıyla aşağıdaki 10 farklı prosedür kullanıldı:

- 1) Fenol-Kloroform Organik Çekitleme Yöntemi
- 2) CTAB + İzomil Alkol- Kloroform Organik Çekitleme Yöntemi
- 3) Sodyum Asetat Çekitleme Yöntemi
- 4) Silika Çekitleme Yöntemi
- 5) Chelex® 100 İnorganik Çekitleme Yöntemi
- 6) QIAamp® DNA Mini Kit İnorganik Silika Temelli Çekitleme Yöntemi
- 7) QIAamp® DNA Mini kit + Fenol-Kloroform Modifiye Bileşik Yöntem
- 8) Qiaquick Temelli İnorganik DNA Çekitleme Yöntemi (Bosna Yöntemi)
- 9) Invisorb Spin Forensic Kit İnorganik Temelli Çekitleme Yöntemi
- 10) DNA IQ System İnorganik Temelli Çekitleme Yöntemi

Her çekitleme prosedüründen sonra elde edilen DNA miktarları Qubit Fluorometre ile belirlendi. Buna göre, en iyi sonuçların 7. prosedür olan QIAamp® DNA Mini kit + Fenol-Kloroform Modifiye Yöntemi ile elde edildiği görüldü. Elde edilen DNA konsantrasyonları Tablo 9 ve Tablo 10'da gösterilmiştir.

Çalışmamızda hem silika hem de manyetik boncuk temelli yöntemler, lizis tampon inkübasyonu ve fenol-kloroform-izoamil alkol ile pürifikasyon işlemi sırasında modifiye edildi.

4.2. Kullanılan Kit ve Kimyasallar

A. Çekitlemede Kullanılan Kitler:

- 1) Genorise Bone DNA Extraction Kit

- 2) HiPurA™ Bone DNA Extraction Kit
- 3) Qiagen QIAamp® DNA Mini Kit
- 4) Invisorb Spin Forensic Kit
- 5) Hibrigen Blood Genomic DNA Isolation Kit

B. Çekitlemede Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler:

- 1) Fenol-Kloroform
- 2) CTAB + İzamil Alkol- Kloroform
- 3) Sodyum Asetat
- 4) Silika
- 5) Qiaquick Kolonları

C. DNA Miktar Ölçümünde Kullanılan Kitler:

Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Invitrogen, USA)

D. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması Amacıyla Kullanılan Kit ve Kimyasallar:

- 1) NaOH
- 2) EMD miliAmicon Ultra-4 santrifüj filtreleri
- 3) Qiagen Qiaquick PCR Purification Kit
- 4) Sefadex G50
- 5) Stratec Invisorb Spin Forensic Kit
- 6) GeneMATRIX Bone DNA Purification Kit
- 7) HiPurA™ Bone DNA Purification Kit

E. PCR Amplifikasyonunda Kullanılan Kitler

- 1) AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit
- 2) AmpFISTR® Identifiler PCR Amplification Kit
- 3) GlobalFiler™ PCR Amplification Kit

F. Elektroforezde Kullanılan Kimyasallar:

Hi-Di™ Formamide (Thermo Fisher, Applied Biosystems)

GeneScan™-500 LIZ™ Size Standard (Thermo Fisher, Applied Biosystems)

G. PCR ve Elektroforez İşleminde Kullanılan Cihazlar

Fluorometre Cihazı-Quibit® (Life Technologies, Invitrogen™)

Isı Döngü Cihazı (PCR)-GeneAmp® 9700 (Thermo Fisher, Applied Biosystems)

Mikrosantrifüj-ALC Multispeed-PK121

Vortex-Harmony Mixer Uzusio- VTX- 3000L

Genetik Analizator-ABI 3130 (Thermo Fisher, Applied Biosystems)

4.3. Kit Uygulamaları

4.3.1. Örneklerden DNA Çekileme

I) Genorise Kemik DNA Çekileme Kit Protokolü

Bu kit, 20 mg kemikten genomik ve mtDNA'yı çekilebilmektedir ve DNA kantite ve kalitesini artırmaktadır.

Kit içinde tedarik edilen malzemeler:

120 ml 5 x Lizis Çözeltisi

220 ml Protein Presipitasyon Çözeltisi

220 ml DNA Hidrasyon Çözeltisi

1.5 ml 10 x DNA Örnek Yükleme Tamponu

Gerekli Olan Ancak Kitle Birlikte Tedarik Edilmeyen Malzemeler:

Proteinaz K (öncesinde 20 mg/ml olarak hazırlanıp -20°C'de saklanmıştır)

İzopropanol (2-propanol)/Etanol

Hücre Lizisi

- 1) 1,7 mL'lik mikrotüp içindeki 20 mg toz kemik üzerine 0,4 mL DNA su çözeltisi ve 0,1 mL 5 x Lizis Çözeltisi eklendi. 20 saniye boyunca vortekslendi ve 3 µL Proteinaz K çözeltisi (20 mg (mL) eklendi, 20 saniye süreyle vortekslendi.
- 2) Hücre lizatı tamamen şeffaf oluncaya kadar 55°C'de gece boyunca inkübe edildi.

Protein Çöktürme

1. Örnekler 1 dakika süreyle buz üzerine konulup oda sıcaklığına getirildi.
2. Lizata 0,2 mL Protein Presipitasyon Çözeltisi eklendi.
3. Örnekler 20 saniye süreyle vortekslendi ve 5 dakika boyunca bir buz banyosu içine yerleştirildi.
4. 5 dakika boyunca 15.000 g hızda santrifüjlendi.

DNA Çöktürme

1. DNA'yı içeren süpernatant yeni bir 1,7 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2. 5 dakika boyunca 15.000 g hızda santrifüjlendi.
3. Süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı; herhangi bir pellet görünmeyene kadar 1 ve 2. adımlar tekrarlandı.
4. DNA'yı içeren süpernatant %100 izopropanol (2-propanol) içeren yeni bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
5. Örnekler 50 kere hafifçe ters düz edilerek karıştırıldı ve 10 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. 5 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüjlendi.
7. Süpernatant döküldü ve tüp içeriği şeffaf bir absorban kağıt üzerine süzüldü. 1 mL %70'lik etanol eklendi ve DNA pelletini yıkamak için tüp birkaç kez ters düz edildi.

8. 5 dakika süreyle 13.000 rpm’de santrifüjlendi, DNA pelletini bozmadan etanol dikkatlice döküldü.
9. Tüp şeffaf absorban bir kağıt üzerine ters çevrilip süzüldü, kalan sıvı bir pipet ile tamamen uzaklaştırıldı ve 5 dakika süreyle oda ısısında kurumaya bırakıldı.

DNA Hidrasyonu

1. 50 µL DNA Sulandırma (Hidrasyon) Çözeltisi eklendi.
2. DNA bir pipet ile 5 dakika boyunca resüspanse edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübasyon ile DNA rehidrate edildi.
3. Kullanmadan önce kısa bir süre vorteksleme yapıldı ve -20°C’de saklandı.

II) HiPurA™ Kemikten DNA Çekileme Kiti

Prosedür:

1. Saklama koşulu oda sıcaklığı olan kit içindeki reaktifler, öncelikle presipitasyon açısından gözden geçirilip iyice karıştırıldı. Çökelti bulunan reaktifler, çökelti çözünene kadar su banyosunda ısıtılıp kullanılmadan önce oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.
2. 22 mL olan yıkama solüsyonuna %96’lık etanolden 22 mL karıştırılıp sulandırıldı.
3. Prosedür sırasında kullanılacak steril tüpler ve pipet uçları hazırlandı.
4. Kit içinde tedarik edilip 2-8°C’de parafilmle sıkı bir şekilde kapatılıp saklanan Glass Powder Suspension (GPS) kullanılmadan önce iyice karıştırıldı.
5. Birinci gün kemiğin dekalsifikasyon işlemi ile başlandı. Protokol öncesi kemik ve dişlerde mekanik temizliği kolaylaştırmak için örnekler bir gece boyunca 95°C’lik su banyosunda bekletildi. Bu aşama ile örneklerin yumuşak doku ve diğer kalıntılardan temizlenmesi kolaylaştı.

6. Örnekler çalışılmadan önce bir bölümü ısıya maruz bırakılmadan önce bir bölümü ise ısıya maruz bırakıldıktan sonra öğütücü cihazlar kullanılarak toz haline getirildi.
7. Örneklerden 500 mg tartılarak steril 15 mL'lik bir polipropilen tüpe aktarıldı.
8. Bu örneklerin üzerine dekalsifikasyon amacıyla 10 mL Bone Extraction Buffer (Kemik Ekstraksiyon Tamponu) eklendi.
9. Örnekler parafilmle kapatıldı ve bir gece boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bir tüp çevirici rotatorda çevrildi.
10. İkinci gün kemikten DNA çekitleme aşamasına geçildi. Elde edilen DNA miktarını artırmak için, 56°C'de 3 saat daha inkübasyon gerçekleştirildi.
11. Örnekler 5000 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant 20 mL Binding Buffer (BBH-Bağlanma Tamponu) içeren 50 mL'lik bir polipropilen tüpe aktarıldı.
12. Tüpe 100 µL GPS eklendi ve lizatin pH'ı 4.0'a ayarlandı.
13. GPS, içindeki dibe çökmüş olabilecek partiküllerin karışması için pipetlenmeden önce vortekslendi.
14. Tüpler parafilmle kapatılıp, karanlıkta ve oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edildi.
15. Örnekler 5000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.
16. Silika pelet üzerine BBH eklendi ve aşağı yukarı pipetlenerek süspansiyon sağlandı. Tampon ve silikadan oluşan süspansiyon çözelti 2 mL'lik bir toplama tüpüne aktarıldı.
17. Örnekler 13.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant tamamen atıldı.
18. Elüsyon tamponu içindeki çok yüksek olup elüsyon sırasında DNA'nın silikadan ayrılmasını engelleyeceği için BBH'ın tam olarak uzaklaştırılmasına dikkat edildi.
19. Silika pelete seyreltilmiş Yıkama Çözeltisinden 1 mL eklendi ve aşağı yukarı pipetlenerek süspansiyon sağlandı.

20. Örnekler 13.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant tamamen atıldı.
21. 1 mL daha Yıkama Çözeltisi eklendi ve 13.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi.
Süpernatant tamamen atıldı.
22. Silika pelet oda sıcaklığında 15 dakika süreyle kurutuldu.
23. Kurumuş olan silika pelet üzerine 100 µL Elüsyon Buffer eklendi ve aşağı yukarı pipetlenerek süspansiyon sağlandı.
24. Örnekler 10 dakika süreyle oda sıcaklığında ara sıra ters düz edilerek inkübe edildi.
25. Ardından 13.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
26. DNA’yı içeren süpernatant yeni steril bir tüpe aktarıldı.

III) Invisorb Spin Forensic Kit

Kit İçeriği (50 Test)

Bone Lysis Enhancer 50 mL	Lysis Buffer M 3 x 2 mL	Carrier RNA 1,2 mL
RNase Free Water 2 mL	Binding Buffer B6	4 mL (final volume 15 ml)
Proteinase K (550 µL)	Wash Buffer I	30 mL (final volume 60 mL)
Wash Buffer II	18 mL (final volume 60 mL)	Elution Buffer 15 mL
RTA Spin Filter Set 50	RTA Receiver Tubes 50	1,5 ml Receiver Tubes 50

Hazırlık Aşaması:

- 1) Binding Buffer B6’ya 11 mL %99,7’lik izopropanol eklendi.
- 2) 1 dakika boyunca ters düz edilerek karıştırıldı.
- 3) Proteinaz K’ya 550 µL ddH₂O eklenip tamamen çözünene kadar iyice karıştırıldı.
- 4) Carrier RNA’ya 1,2 mL RNase Free Water (RNaz İçermeyen Su) eklendi ve tamamen çözünene kadar iyice karıştırıldı.

- 5) Wash Buffer I'e 30 mL %96'lık etanol eklendi.
- 6) Wash Buffer II'ye 42 mL %96'lık etanol eklenip iyice karıştırıldı ve şişenin kapağı her zaman sıkıca kapalı tutuldu.

Örnek Lizisi Aşaması:

- 1) Kemik ve diş örnekleri için örnek lizisi aşamasında toz haline getirilmiş her bir örnekten 250 mg alınıp steril bir tüp içine aktarıldı ve 1 mL Bone Lysis Enhancer ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpün dip kısmında toplanan her bir örnekten 300 µL süpernatant alınıp yeni bir Receiver (Alıcı) Tüp içine aktarıldı. Normal protokolda alınması gereken süpernatant 100 µL olarak belirtilmiş olmasına rağmen, bizim örneklerimiz degrade ve aşırı derecede degrade olduğu için ve elde edilmesi beklenen DNA miktarı az olduğundan 300 µL süpernatant kullanılması tercih edildi. Bu durumda Lysis Buffer M, Proteinaz K ve Binding Buffer B6'dan 1:1 oranında kullanılmasına dikkat edildi. Ayrıca RTA Spin filtre iki kez yüklendi. Kemik ve diş çekitine 100 µl Lysis Buffer M, 20 µl Carrier RNA ve 10 µl Proteinaz K eklendi. Örnekler rotasyonlu bir çalkalayıcı kullanılarak 56°C'de gece boyunca inkübe edildi.
- 2) Örnekler 1,5 mL'lik reaksiyon tüplerine aktarıldı.
- 3) 100 µL Lysis Buffer M, 100 µL ddH₂O, 20 µL Carrier RNA ve 10 µL Proteinaz K eklendi.
- 4) 10 saniye süreyle vortekslendi.
- 5) Döner çalkalayıcıda 56°C'de 30 dakika süreyle inkübe edildi.
- 6) 200 µL Binding Buffer B6 eklendi.
- 7) İki kez yukarı aşağı pipetlenerek karıştırıldı.
- 8) Elde edilen lizat RTA Spin Filtre membranı üzerine aktarıldı.
- 9) 11.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüjlendi.

- 10) 300 µL Wash Buffer I eklendi.
- 11) 11.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi.
- 12) RTA Spin Filtre yeni bir RTA Receiver (Alıcı) Tüp içine yerleştirildi.
- 13) 600 µL Wash Buffer II eklendi.
- 14) 11.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi ve filtrat atıldı.
- 15) RTA Spin Filtre tekrar RTA Receiver (Alıcı) Tüp içine yerleştirildi.
- 16) Maksimum hızda 4 dakika boyunca santrifüjlendi.
- 17) RTA Spin Filtre 1,5 mL’lik RTA Receiver (Alıcı) Tüp içine yerleştirildi.
- 18) Önceden 56°C’de ısıtılmış 30 - 200 µL Elution Buffer eklendi.
- 19) Oda sıcaklığında 1 dakika süreyle inkübe edildi.
- 20) 11.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi ve RTA Spin Filtre atıldı.

Ayrıca, Invisorb Spin Forensic Kit protokolü modifiye edilerek, DNA konsantrasyonunu artırmak için hücre lizisi gece boyunca gerçekleştirilip, elüsyon hacmi 50 mL’ye düşürülmüştür.

IV) Kemik Örneklerinden Qiaquick Temelli DNA Çekilmesi – Bosna Yöntemi

1. Toz haldeki kemik, diş numuneleri üzerine (500 mg) 8 mL 1M EDTA çözeltisi ve 100 ml Proteinaz-K eklenip vortekslendi.
2. 56 °C’de hibridizasyon fırınında 1 gece süreyle inkübe edildi.
3. Daha iyi verim alındığı için normal protokolde 20 dakika olan santrifüj süresi 10 dakikaya çıkarılıp 4000 rpm hızda santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
4. Santrifüjden alınan örnek barkod etiketli veya üzerine örneğin DNA numarası yazılı Amicon filtreye aktarıldı.
5. 10 dakika 2500 rpm hızda santrifüj edildi ve filtrelerde 300 µL – 450 µL arasında sıvı kalmasına dikkat edildi.
6. Sıvının istenilen miktarı filtreden geçmemiş ise santrifüj basamağı tekrar edildi.

7. Filtrede kalan 150 μ L – 250 μ L arasında sıvı barkod etiketli veya üzerine DNA numaraları yazılmış 2 mL'lik tüplere 200 μ L'lik pipet kullanarak transfer edildi.
8. 200 μ L'den az kalmış örnekler distile su ile 200 μ L'ye tamamlandı.
9. Üzerlerine 1000 μ L PBI Buffer eklendi. 5-10 saniye vortekslenerek PBI Buffer ve DNA'nın karışması sağlandı.
10. Her bir 2 ml tüpten 600 μ l PBI Buffer-DNA karışımı Qiaquick kolona aktarılır. 1 dakika 13000rpm'de santrifüj edilir. Atık tüpüne geçen sıvı boşaltılır. Bu basamak 2 ml tüp içindeki örnek bitinceye kadar bir kere daha tekrarlanır.
11. Qiaquick kolonlara 500 μ l PE Buffer eklenir. 1 dakika 13000rpm'de santrifüj edilir. Atık tüpüne geçen sıvı boşaltılır. Bu basamak bir kere daha tekrarlanır.
12. Atık tüpüne geçen sıvı boşaltılır, kolonlar boş şekilde 3 dakika 13000rpm'de santrifüj edilir.
13. Spor üzerine temiz atık tüpleri dizilir. Santrifüjden alınan Qiaquick kolonlar bu tüplere yerleştirilir.
14. 50 μ l EB Buffer doğrudan Qiaquick kolonunun ortasına gelecek şekilde her bir kolona eklenir, 1 dakika süreyle bekletilir. 1 dakika 13000rpm'de santrifüj edilir.
15. Süzülen materyal barkod etiketli veya üzerinde DNA numarası yazılı olan temiz tüpe aktarılır ve +4 C'de saklanır.

Bu kit prosedürü fenol-kloroform-izoamilalkol çekitleme yöntemi ile birleştirilerek modifiye bir yöntem geliştirildi. Lizis tamponu içinde inkübasyon işleminin ardından, herbir örneğe eşit hacimde fenol-kloroform-izoamilalkol eklendi. Örnekler vortekslenmiş, ardından nükleik asitleri içeren üstteki aköz fazı ve alttaki fenol kloroform içinde çözünmüş proteinleri ve lipidleri içeren açık pembe fazı ayırmak için 3 dakika süreyle 14.000 rpm'de santrifüjlendi. Bu aşama, kemik ve diş örneklerinin tabi tutulduğu ısı derecesi arttıkça iki veya üç kez tekrarlandı. Aköz faz daha sonra yeni bir tüpe aktarıldı ve aynı hacimde fenol-kloroform-izoamilalkol eklendi. Üç dakika

boyunca 14.000 rpm’de santrifüj işleminin ardından aköz faz başka bir tüpe aktarıldı ve 500 µL, %96’lık etanol eklenerek 20 saniye süreyle vortekslendi. Örnekler ardından kit protokolüne göre yeni bir tüpe aktarıldı.

V) Sodyum Sitrat Sodyum Klorür yöntemi

1. 2 gr örnek tartılarak 2 mL eperdorf tüpe koyuldu. Örneğin üzerine 750 µL 1XSSC eklendi ve 1 dakika vortekslendi. Örnek 56°C’de 45 dakika inkübe edildi.
2. Süpernatant döküldü ve örneğe tekrar 1XSSC eklendi, vortekslendi ve inkübe edildi. Temiz bir faz elde edilene kadar bu işlem tekrar edildi.
3. Örnekler 14000 rpm de 8 dakika santrifüjlendi. Supernatant kısmı döküldü. Tüpün dibinde küçük bir pellet kaldı.
4. Pellete, solüsyonun inaktivasyonu ve örneklerden proteinlerin uzaklaştırılması için 0.2 M sodyum asetat (pH =5.2), %10 SDS, Proteinaz-K (2U/µl; 40 mg/mL) eklendi.
5. Karışım 56°C’de 2 saat veya tüm gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örneğin toplam hacmine (400-450 µL), 120µl Fenol:kloroform:izoamil-alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnek 14000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi.
6. Üst faz dikkatlice başka bir tüpe aktarıldı ve 1000 µL %95’lik soğutulmuş etanol eklendi. Karışım 10 dakika karıştırıldı ve 14000 rpm hızda 10 dakika santrifüjlendi.
7. Pellete 500µl %70 etanol çözeltisi eklendi ve 14000 rpm de 5 dakika santrifüjlendi.
8. Kurumuş pellete 120 µLTE buffer (pH 8.0) eklendi.
9. 56°C’de 30 dakika inkübe edildi. Örnekler kısa süreli kullanım için +4°C’de, uzun süreli kullanım için -20°C’ de saklandı.

VI) %0.9 Sodyum Klorür-Sodyum Asetat Yöntemi

1. Örnekler 2 mililitrelik eperdorf tüpe kondu. Örneğin üzerine %0.9Sodyum klorür çözeltisi eklendi ve vortekslendi. Supernatantın karışması için örnekler 60°C’de 2 saat inkübe edildi.

2. İnkübasyon süresi boyunca örnekler 2-3 defa karıştırıldı.
3. Örnekler 14000 rpm'de 4 dakika santrifüjlendi. Üst fazlar atıldı. Pellet üzerine 1ml %70'lik etanol eklendi, vortekslendi. 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
4. Üst faz atıldı ve birkaç dakika tüplerin kapakları açık olarak bekletildi. Tüplere 120 µL AE tamponu eklendi.
5. İnkübasyon yapıldı ve örnekler kısa süreli kullanım için +4 °C'de, uzun süreli kullanım için -20°C' de saklandı.
6. Bu işlemde bazı modifikasyonlar da yapıldı. 3. aşamadan sonra örneğe Proteinaz K, 0,6 M Sodyum asetat ve %20'lik SDS çözeltileri eklendi. Bir gece inkübasyonda bırakıldı. Normal işleme bu aşamadan sonra devam edildi.

VII) Chelex Yöntemi

1. 3 gr kemik ve diş örneği ependorf tüpe alındı ve 1 mL steril distile su eklendi. 45 dakika oda ısısında inkübe edildi.
2. Örnekler 5 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
3. Tekrar 1 ml distile su eklendi ve 5 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
4. Supernatan kısmı dikkatlice döküldü. Tüpün dibinde küçük bir pellet kaldı.
5. Pellete 100 µL distile su eklendi ve 1 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Son hacmi 300 µL olacak şekilde %5 Chelex 100 çözeltisi eklendi. Bir saat 56°C'de inkübe edildi.
7. İnkübasyondan sonra 5-10 saniye yüksek hızda vortekslendi. 8 dakika 100°C'de kaynatıldı.
8. Örnekler 3 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi.
9. Daha sonra örnekler +4 °C'de saklandı.

VIII) DNA IQ™ System Purification Method

- 1) 1,5 mL'lik bir test tüpüne DNA çözeltisi ve kit içerisindeki lizis tamponundan eşit hacimlerde eklenip iyice karıştırıldı.
- 2) Ardından örnek üzerine 7 µL resüspanse edilmiş rezin eklenip 3 saniye süreyle vortekslendi ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığından inkübe edildi.
- 3) İnkübasyondan sonra, örnek 2 saniye boyunca yeniden vortekslendi ve hemen manyetik stand üzerine alındı.
- 4) Rezin üzerindeki çözelti rezini bozmadan atıldı.
- 5) Rezin 100 µL lizis tamponu ile yıkandı ve 2 saniye vortekslenip tüp tekrar manyetik stand üzerine yerleştirildi.
- 6) Rezin üzerindeki çözelti rezini bozmadan atılıp aynı yıkama prosedürü toplamda üç yıkama şeklinde tekrarlandı.
- 7) Son yıkama işleminin ardından, tüp kapağı açık bir şekilde manyetik stand üzerinde ortam havasında 5 dakika boyunca kurumaya bırakıldı.
- 8) Daha sonra 20–40 µL deiyonize su eklenip tüpün kapağı kapatıldı.
- 9) Karışım 2 saniye vortekslendi ve 5 dakika boyunca 65°C'deki su banyosunda ısıtıldı.
- 10) Tüpler su banyosundan çıkarıldıktan sonra 2 saniye vortekslendi ve manyetik stand üzerine yerleştirildi.
- 11) Elde edilen DNA'nın da içinde yer aldığı sıvı faz -20°C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

Genetik Analiz Amacıyla Kemik Ve Diş Örneklerinden DNA Saflaştırma Protokolleri

(1) Kemik Ve Diş Örneklerinin Hazırlanması

A. Malzemeler

1. Kemik ve diş numunesi (kompakt kemik ve kanal tedavisi görmemiş dişler)
2. Eldiven, koruyucu gözlük & laboratuvar önlüğü
3. %10'luk çamaşır suyu (v/v)

4. kağıt havlu
5. Dremel kemik öğütücü & bıçakları
6. Kilitli örnek toplama poşetleri
7. Asetat kalemi

B. Prosedür

1. Örnek hazırlama aşamasının genetik analiz yapılacak alandan farklı olmasına dikkat edildi.
2. Öncesinde çeker ocağa konulan tüm malzemeler çeker ocaktan kaldırıldı.
3. Çeker ocak %10'luk çamaşır suyu ile yıkandı.
4. Eldiven ve koruyucu gözlük takıldı.
5. Çalışılacak olan kemik ve diş örneği alındı.
6. Öncesinde mekanik olarak temizlenmiş ve zımparalanmış olan kemik ve diş örneklerinin dış yüzeyi %10'luk çamaşır suyu ile nemlendirilmiş kağıt havlularla yüzey dekontaminasyonu işlemine tabi tutuldu.
7. Aynı şekilde %10'luk çamaşır suyu ile Dremel öğütücü ve bıçakları temizlendi.
8. Dremel cihazı ile 2,5 cm x 1,25 cm ölçüsünde küçük bir parça kesildi. Her örnek için bıçakların değiştirilmesine dikkat edildi.
9. Kesilen parça steril kilitli bir poşete alındı ve poşetin üzeri etiketlendi.

(2) Kemik Ve Diş Örneklerinin Çekitleme İçin Hazırlanması

A. Malzemeler

- Steril kilitli poşet içinde saklanan kemik ve diş örnekleri
- Steril bisturi bıçakları
- Steril petri kutuları (her numune için 2 adet)

- 2 steril plastik poşet
- Kağıt havlu
- Çekiç
- Kemik öğütücü cihaz
- 15 mL konik santrifüj tüpü (ağırlığı önceden ölçüldü)
- Aplikatör ve pamuklu çubuk (steril, ayrı ayrı paketlenmiş)
- DNA içermeyen dekontaminasyon çözeltisi
- Terazî
- Sıvî azot
- Maşa
- Stratofor bardaklar
- Steril forseps

B. Prosedür

1. Kemik ve diş örneklerinin daha önce PCR ürünleri ile çalışılma yapılmayan bir alanda işlenmesine özen gösterildi.
2. Steril eldiven takılarak örnekler steril poşetlerinden çıkarıldı ve petri kutularına yerleştirildi.
3. Yeni steril bir bisturi bıçağı açıldı.
4. Her örneğin dış yüzeyi, 0,5 ila 2 mm dış kortikal yüzey uzaklaştırılınca kadar dikkatlice tekrar tıraşlandı. Tıraşlanan kısımların petri kutularına dökülmesine dikkat edildi.
5. Kemik ve diş fragmentleri daha derin temizlenmek üzere ikinci bir petri kutusuna aktarıldı. İlk petri kutusu atıldı.
6. Sıvî azot kullanma aşamasına geçildi.

7. Laboratuvar tezgahı üzerine sıvı azot dökülmesini engellemek için stratofor buz kabı içine stratofor bir bardak yerleştirildi.
8. Küçük sıvı azot tankı Dewar içindeki sıvı azot stratofor bardağa 2/3'ü dolana kadar boşaltıldı. Buharlaşmayı önlemek için yavaşça dökülmesine özen gösterildi.
9. Steril forseps kullanılarak kemik örneği hemen bu bardak içine daldırıldı. Kabarcıklanma ya da köpüklenme son bulana kadar 5 ila 10 dakika boyunca donması sağlandı. Donmuş olan kemik ve diş örneği steril kilitli plastik poşet içine konuldu. Bu poşette yine steril ve kilitli ikinci bir poşet içine yerleştirildi. Ardından poşetler birkaç kat kağıt havlu ile sarıldı.
10. Bu kemik ve diş parçaları bir çekiçe özenli bir şekilde ezilerek küçültüldü.
11. Bu örnek parçaları ardından steril öğütücüye aktarılarak ince kum taneleri halinde toz haline getirildi.
12. Toz haline gelmiş olan örneklerin her biri, steril pamuklu çubuk veya bir aplikatörlerle ağırlığı bilinen 15 mL'lik steril konik santrifüj tüpüne alındı.
13. Tüpün kapağı kapatıldı ve ağırlığı tekrar ölçülüp içine konan örnek ağırlığı belirlenip not edildi.
14. Öğütücü cihaz DNA içermeyen dekontaminasyon çözeltisi ile silindi ve oda ısısında kurumaya bırakıldı.

(3) Kemik Ve Diş Örneklerinin Dekalsifikasyonu

Bu işlemin gerekli olup olmadığı hala tartışmalıdır. Bazıları dekalsifikasyon sırasında DNA'nın kaybedildiği ve/veya daha da degrade olduğunu belirtmekte ve bu aşamanın gerçekleştirilmemesi gerektiğini savunmaktadır. Bazıları ise, DNA kaybını kabul etmekte ancak dekalsifikasyon işlemi yapıldığında DNA çoğaltılması sırasında nadir alellerin çoğaltılmasında

daha başarılı olduğunu ileri sürmektedir. Biz çalışmamızda hem dekalsifiye edilmiş hem de dekalsifiye edilmemiş örnekleri kullanarak bu iki durumun geçerliliğini değerlendirdik. Buna göre dekalsifikasyon yapılmamış örneklerimizde başarılı bir alel çoğaltma işlemi gözlemlemedik ve dekalsifikasyon aşamasının gerekli olduğu kanaatine vardık. Çalışmamız sırasında steriliteden emin olmak için şu adımlara dikkat ettik:

1. Tüp açıkken örneği tuttuğumuz sırada eldiven giydik ve eldivenlerimizi olası DNA kontaminasyonunu önlemek için sık sık değiştirdik.
2. Pipetleri laboratuvar tezgahlarına ve diğer steril olmayan yüzeylere temas ettirmemeye özen gösterdik.
3. Pipetlere eldivensiz kullanmadık.
4. Reaktiflerin aerosol kontaminasyonunu en aza indirmek için stok çözeltilerini kullandıktan sonra hemen kapaklarını kapattık.
5. Kontamine olduğunu düşündüğümüz çözeltileri attık.

A. Malzemeler

1. Kemik ve diş tozu (0,4 ila 2 g)
2. 0.5 M EDTA, pH 8.0
3. 10 mL'lik pipet uçları & pipetörler
4. Çalkalayıcı (shaker/rocker) platform
5. Transfer pipetleri
6. Atık kabı
7. Soğutmalı santrifüj
8. Doymuş amonyum okzalat çözeltisi

B. Prosedür

1. Her 3 gram kemik ve diş örneği için 5 mL 0,5 M EDTA eklendi.

2. Tüpün kapağı kapatıldı ve orta hıza ayarlanmış bir çalkalayıcı üzerine yerleştirildi.
3. Gece boyunca bu şekilde inkübasyon işlemine bırakıldı.
4. Ardından, 5 dakika boyunca 1500 rpm’de santrifüjlendi.
5. Steril bir transfer pipeti kullanılarak süpernatant dikkatlice uzaklaştırılıp atıldı.
6. Üzerine yeninden 5 mL 0,5 M EDTA eklendi.
7. 2-6 arası adımlar tekrarlandı.
8. 0,5 M EDTA ile üçüncü inkübasyonun ardından süpernatant alınıp steril bir tüp içine konuldu.
9. Süpernatant üzerine birkaç damla doymuş amonyum okzalat çözeltisi eklendi. Çok bulanık olması halinde (kalsiyum okzalat çözünmeyen bir bileşiktir), EDTA aşaması tekrar edildi. Şeffaf veya hafif bulanık ise EDTA uzaklaştırma ve deproteinasyon aşamasına geçildi.

(4) EDTA’nın Uzaklaştırılması

A. Malzemeler

1. EDTA’lı süpernatantın uzaklaştırıldığı dekalsifiye kemik ve diş tozu
2. DNA içermeyen dH₂O
3. Vorteks
4. Santrifüj
5. Transfer pipetleri
6. Atık kabı

B. Prosedür

1. Dekalsifiye kemik ve diş tozu örnekleri üzerine 5 ml dH₂O eklendi.
2. Bu karışım kısa bir süre vortekslendi.
3. 5 dakika boyunca 1500 rpm hızda santrifüjlendi.
4. Süpernatant atıldı.

(5) Deproteinasyon

A. Malzemeler

1. Proteinaz K, 10 mg/ml (taze hazırlandı & alikuotlara bölündü)
2. Hücre lizis tamponu (CBL) (10 mM Tris, pH 8.5, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, %0,1 Sodyum Sarkozin)
3. İçinde plastik tüp sporu olan 55⁰ C'lik su banyosu
4. 1 mL ve 5 mL'lik pipetler ve pipetörler

Birçok protokolde Proteinaz K çözeltisinin önceden hazırlanıp soğutucuda saklanması ve gerektiğinde çıkarılıp kullanılması gerektiği belirtilirken, biz gereksinim duyduğumuz zaman Proteinaz K stok çözeltilerimizi hazırladık ve hazırladıktan sonra 3 gün içinde kullanmaya özen gösterdik.

B. Prosedür

1. 5 mL CBL'yi dekalsifiye kemik tozu üzerine ekledik.*
2. 50 µL, 10 mg/mL Proteinaz K ekledik.*
3. En az 2 saat boyunca inkübe etmek üzere plastik bir tüp sporunu 55⁰ C'deki su banyosuna yerleştirdik.
4. Hala çözünmemiş olan materyal varsa, ilave 50 µL, 10 mg/mL proteinaz K ekledik.
5. 2 saat daha inkübasyon işlemi gerçekleştirdik.
6. Materyalin çoğu çözünmüşse, aşağıdaki organik çekitleme aşamasına geçtik. Değilse, Proteinaz K adımını bir kez daha gerçekleştirdik.
7. Proteinaz K işleminin ardından materyal hala tamamen çözünmemişse, artık çözünmeyeceğini kabul ederek organik çekitleme aşaması ile devam ettik.

*Alternatif Prosedür: Her 2 gramlık kemik ve diş tozu için, 5 mL CBL ve 0,5 mg Proteinaz K (PK) ekledik. PK'yı çözüldürdük, ardından aşağıdaki tabloyu dikkate alarak her 2 gram örnek için 5 mL ekledik.

Kemik/Diş Örneği (gram)	CBL (mL)	PK (mL)
1	2,5	0,25
2	5	0,5
3	7,5	0,75
4	10	1
5	12,5	1,25
8	20	2
10	25	2,5
12	30	3
15	37,5	3,75
20	50	5
30	75	7,5

(6) Organik Çekitleme

A. Malzemeler

1. Su ile doyrulmuş fenol (normalde asidik olan fenole 1/100 hacminde 1 M Tris, pH 8.0 eklendi).
2. Kloroform:İzoamil Alkol (Cl),), 24:1 (24 ml CHCl₃ + 1 ml IAA)

3. Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol (25:24:1) (PCI) (25 mL su ile doyrulmuş fenol, 25 mL Cl)
4. Tert-Bütanol
5. Sterile 15 mL'lik tüpler (her örnek için 3 adet)
6. Çalkalayıcı platform
7. Cam pipetler (plastik pipetler kloroform içeren çözeltilerde çözüldüğü için kullanılmadı)
8. Pipet pompası
9. Atık kutusu

B. Prosedür

Tüm adımlar organik çözücülerle çalışıldığı için çeker ocakta ve her seferinde eldiven değiştirilerek gerçekleştirildi.

1. Bir cam pipet kullanılarak, deproteinize kemik ve diş örneklerine 5 mL PCI eklendi.
2. Örnekler uygun bir tüp içerisine konulup tüplerin kapakları kapatıldı ve örnekler 5 dakika boyunca sallandı.
3. Ardından 5 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüjlendi.
4. Santrifüj işleminin ardından üstte DNA'yı içeren aköz ve altta PCI, lipidler ve peptidleri içeren organik faz olmak üzere iki faz elde edildi.
5. Süpernatant, yani DNA'yı içeren üst faz, steril 15 mL'lik bir tüpe alınarak saklandı.
6. Alttaki faz (organik faz, PCI) atık kutusuna atıldı.
7. DNA'ya 5 mL CI (kloroform:IAA) eklendi.
8. 5 dakika boyunca 5000 rpm hızda santrifüjlendi.
9. Süpernatant (üst faz) steril 15 mL'lik bir tüpe alındı.
10. Alttaki faz (organik faz, PCI) atık kutusuna atıldı.
11. Bir plastik tüp kullanılarak örneklerle 5 mL butanol eklendi.

12. Tüpün kapağı kapatıldı, 5 dakika süreyle sallandı ve 5 dakika boyunca 5000 rpm hızda santrifüjlendi.
13. Bu aşamada üst fazda yer alan butanol değil, alttaki tabaka steril 15 mL'lik bir tüpe aktarıldı.
14. Nihayetinde DNA'nın tuzsuzlaştırma (fazla tuzun, çözücülerin uzaklaştırılması ve DNA'nın 10 mM TE ve 1 mM EDTA'ya eşitlenmesi) aşamasına geçildi.

(7) Organik Olarak Çekitlenen DNA'da Tuz Giderme Aşaması

Bu aşamada DNA içeren çözelti çok küçük boncuklardan oluşan bir kolonda geçirilir. Bu boncuklar özel porlara sahip olup, sadece 50.000 FW'den küçük moleküller ve iyonlar bu porlara girerek burada kalmaktadır. Buna göre, 50 kbp'den küçük olan DNA ve diğer küçük moleküller (kloroform, fenol, EDTA) ve iyonlar (Ca^{+2} ve Na^{+1}) bu boncuklar içinde tutulmaktadır. Kolon, TE tampon içinde pH 8 ila 9'a (10 mM Tris ve 1 mM EDTA) dengelenir ve bu şekilde prosedür tamamlandığında DNA TE içinde çözünmüş olur.

A. Materyaller

1. 3 veya 5 mL'lik enjektör
2. Steril pamuk ve steril forseps (her ikisi de otoklavlanmış)
3. 15 mL'lik tüp
4. Parafilm
5. TE Tampon (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) içinde dengelenmiş Sefadeks G50
6. 1 mL'lik pipet
7. Organik olarak çekitlenmiş DNA örnekleri
8. Transfer pipeti ve pipet pompası
9. Santrifüj cihazı

B. Prosedür

1. Eldiven giyildikten sonra, enjektör paketi açılarak piston ve kapak kısmı çıkarılıp atıldı.
2. Enjektör gövdesi içine 1 mL'lik bir pipet kullanılarak küçük bir parça pamuk yerleştirildi.
3. İçinde pamuk olan enjektör 15 mL'lik bir tüp içine yerleştirildi ve dikey olarak bir tüp sporuna konuldu.
4. Sefadeks boncukları hızlı bir şekilde döndürüldü ve boncuk hacmi enjektörün üst kısmına gelene kadar enjektöre döküldü.
5. Parafilm ile kapatıldı.
6. Fazla TE tamponu uzaklaştırmak için tüp ve enjektör 1500 rpm hızda 1 dakika süreyle santrifüj edildi.
7. Tüpün kapağı açılarak enjektör çıkarıldı ve TE tüpten uzaklaştırıldı.
8. Enjektör 15 mL'lik tüpe yeniden yerleştirildi.
9. Kolona damla damla DNA örneği eklendi.
10. Parafilmle kapatıldı.
11. 3 dakika süreyle 1500 rpm hızda santrifüjlendi.
12. Enjektör çıkarılıp atıldı. Bu şekilde tüp içinde DNA kalmış oldu.
13. DNA'yı konsantre etmek için mikrokonsantrasyon aşamasına geçildi.

(8) Mikrokonsantrasyon

A. Materyaller

1. Tuzsuzlaştırma işleminden geçmiş DNA
2. Amicon Ultra Santrifüj Filtresi (Merck Millipore)

Amicon filtresinden 10.000 MW'den büyük moleküller ile DNA > 100 bç veya GC > 80 bç olan DNA'lar filtre içinde kalmaktadır. Daha küçük olan moleküller ve iyonlar ise filtreden geçerek atılmaktadır. Amaç, DNA'yı 50-100 µL'ye kadar konsantre etmektir.

B. Prosedür

1. Örnek Amicon Ultra Santrifüj Filtresi içine aktarıldı.
2. Üreticinin belirttiği 5000 ila 8000 rpm arası uygun hızda 20 dakika boyunca santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
3. Tüpün alt kısmında toplanmış olan hacim (çoğunlukla TE ve çok küçük degrade DNA) ile üst kısımdan eksilen hacim kontrol edildi (DNA). Bu şekilde, her dakikda ne kadar hacim azalması olduğu belirlendi.
3. Her 20 dakika için azalmış olan hacim oranından gereken santrifüj süresi hesaplandı. Örneğin her 20 dakikada 1 mL azalma oluyor ve üst kısımdan ilave bir 2 mL uzaklaştırmak durumunda kaldığımızda ekstra 40 dakika daha santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
4. Bu adımlara göre hacimler tekrar kontrol edilerek gerekiyorsa tekrar santrifüj yapıldı.
5. Üretici protokolüne göre toplam prosedür süresi 3 saatti. Bu süreye göre tüm 3 saat boyunca tek bir santrifüj işlemine tabi tutulabilirdi. Ancak, üst faz tamamen kuruyabilir ve DNA filtreden ayrılamayabilirdi.
6. Hacim 50-100 µL arasında olduğunda, üst kısımdaki DNA dikkatlice alınıp 0,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpü içine aktarıldı.
7. DNA alınmadan önceki tüp ağırlığı ile alındıktan sonraki tüp ağırlığı ölçülerek DNA miktarı belirlendi.

8. Qubit ile DNA miktarı belirlendi.
9. Tüp etiketlenerek ve soğutucuya yerleştirildi.

Genematrix Bone DNA Purification Kit Protokolü:

Genematrix nükleik asitleri seçici olarak kompozit silika yapılara bağlayan yeni nesil bir DNA ve RNA bağlama membranıdır. Matriks spin formatında kullanıma hazır bir kit şeklindedir. Genematrix Bone DNA Purification Kit, insan kemik ve diş örneklerinden hızlı DNA (genomik, mitokondriyal) saflaştırılmasına olanak veren bir kittir. Saflaştırılan DNA proteinler, lipidler, boyalar, deterjanlar, organik enzimatik reaksiyon inhibitörleri, tamponlar, tuzlar, iki değerlikli katyonlar ve diğer inhibitörlerden arındırılmış olur. Kit içindeki Proteinaz K kollajen ve diğer proteinlerin sindirilmesini sağlar. Optimize edilmiş tamponlar ve etanol, santrifüj sırasında DNA'nın bağlanması için seçici ortama katkıda bulunurken, kontaminantlar spin kolondaki Genematrix reçine membranının içinden geçer. Reçinede kalan eser miktardaki kontaminantlar ise iki ayrı yıkama aşaması ile uzaklaştırılır. Sonuç itibarıyla da düşük tuz tamponu içinde yüksek kaliteli DNA elde edilmiş olur.

Protokol

1. Spin kolon içine 40 µL aktivasyon Buffer N eklenip lizat spin kolona aktarılan kadar oda sıcaklığında bekletildi.
2. Kemik ve diş örneklerinin yüzeyinin kir ve kalıntı içermemesine dikkat edildi.
3. Önceden elde edilmiş olan kemik tozundan 0,4 gram alınarak kit içinde tedarik edilen 2 mL'lik vida kapaklı tüplere konuldu.
4. Bu tüpe 800 µL Lyse BN tamponu eklendi ve örnek süspansiyon haline getirildi.
5. 40 µL Proteinaz K eklendi ve tüp vorteksenerek içerik karıştırıldı.
6. Çalkalayıcı üzerinde bir gece boyunca 56°C'de inkübasyona bırakıldı.
7. 800 µL Sol BN tamponu eklendi ve tüp vorteksenerek içerik karıştırıldı.
8. 10 dakika boyunca 56°C'de inkübe edildi.

9. Lizat bir mikrosantrifüjde 14.000 rpm hızda 3 dakika boyunca santrifüjlendi.
10. 1200 µL süpernatant yeni bir 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
11. 600 µL %96'lık etanol eklendi ve tüp vorteksenerek içerik karıştırıldı.
12. Tüp kapağındaki olası damlaların giderilmesi için kısa bir süre santrifüjlendi.
13. Bir toplama tüpü içine yerleştirilen spin kolona 600 µL lizat aktarıldı.
14. 12.000 rpm hızda 30 saniye süreyle santrifüj edildi.
15. Spin kolon çıkarıldı, içerik döküldü ve spin kolon toplama tüpü içine tekrar yerleştirildi.
16. 14-16. Aşamalar tekrar edildi.
17. Kalan süpernatant toplama tüpüne yerleştirilen spin kolona aktarıldı. Reçine içinde kalan lizatın süzülmesini sağlamak için 12.000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi.
18. Spin kolon çıkarıldı, içerik döküldü ve spin kolon toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
19. Spin kolona 500 µL Wash BNX1 tamponu eklenip 12.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi.
20. Spin kolon çıkarıldı, içerik döküldü ve spin kolon toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
21. Spin kolona 500 µL Wash BNX2 tamponu eklenip 12.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüjlendi.
22. Spin kolon yeni bir toplama tüpü (1,5-2 mL) içine yerleştirildi ve bağlanmış olan DNA'yı ayırmak için önceden 70°C'ye ısıtılmış 30-100 µL Elüsyon tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) eklendi.
23. Spin kolon ve toplama tüpü birlikte oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi.
24. Spin kolon 12.000 rpm'de 30 saniye boyunca santrifüjlendi.
25. Spin kolon atıldı ve toplama tüpünün kapağı kapatıldı. Ve nihayetinde DNA elde edilmiş oldu ve daha sonra analiz edilmek üzere -20°C'de saklandı.

GlobalFiler™ PCR Amplication Kit Protokolü

Applied Biosystems™ GlobalFiler™ PCR Amplication Kit, insan genomik DNA'sının çoğaltılmasına yönelik 6 boyalı bir STR multipleks analiz kitidir. Kitin çoğalttığı lokuslar; 21 otozomal STR lokusu (D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338), 1 Y-STR (DYS391), Y kromozomu üzerindeki 1 insersiyon/delesyon polimorfik belirteci (Y indel) ve Amelogenin (cinsiyet belirleyici lokus) şeklindedir. GlobalFiler™ kit, 13 orijinal CODIS lokusunu, genişletilmiş European Standard Set of Loci (ESSL-Avrupa Standart Lokus Seti) ve son derece ayırt edici olan SE33 lokusu ile bir araya getirmektedir. Kit, mevcut kitler arasında 24 lokusun bir arada olduğu en yüksek ayırım gücüne sahip insan idantifikasyon kitidir. Tamamı 220 bp'nin altında olan 10 mini-STR lokusunun konsantrasyonu, aşırı derecede degrade örneklerde maksimum performans sağlamaktadır. Bir enzimi içeren optimize edilmiş tampon formülasyonu çoğaltma işleminin yaklaşık 80 dakika içinde tamamlanmasını sağlamaktadır. GlobalFiler™ kit içindeki geliştirilmiş amplifikasyon primerleri yorumlamayı kolaylaştıran net elektroforetik arka planlar ortaya koymaktadır.

Kit, 29 döngü için 1,0 ng DNA (15 µL başlangıç hacmi) ve düşük konsantrasyondaki örneklerde hassasiyetin artırılması amacıyla 30 döngü için 500 pg DNA (15 µL başlangıç hacmi) ile valide edilmiştir. GlobalFiler™ kit primerleri, NGM SElect™ ve Identifiler™ Plus kitlerindeki primerlere benzer şekilde aynı sentez ve saflaştırma iyileştirme teknikleri kullanılarak üretilmiştir. Bu iyileştirmeler analiz sinyal-gürültü oranını artırır ve sonuçların yorumlanmasını kolaylaştırır. Kite kullanılan primerler; vWA, D16S539, AMEL, D2S441, D22S1045, D8S1179, DYS39, Y İndel, TPOX ile 8 yeni D3S1358, vWA, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D5S818 ve SE33 şeklindeki lokuslara özgü olarak tasarlanmıştır.

Gerekli Olan Standartlar ve Kontroller

GlobalFiler™ kit, PCR ile çoğaltma, PCR ürününün uzunluğunu ayarlama ve genotipleme işlemi için gereken standart paneli; çoğaltma aşamasının etkinliğini değerlendirmeye yönelik pozitif kontrol olan DNA Control 007, bir iç uzunluk belirleme standardı olan GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0 ve kit ile çoğaltılan alellerin doğru şekilde karakterizasyonu için geliştirilmiş GlobalFiler™ Alelic Ladder şeklindedir.

Protokol:

DNA'nın Çekitlenmesi



DNA Miktar Tayini



PCR Aşaması



Elektroforez Aşaması



Örneklerin Elektroforez İçin Hazırlanması (3130 Serisi Cihaz İçin)



Verilerin Analizi (GeneMapper™ ID-X Yazılımı)

1. DNA miktar tayini ile protokole başlandıktan sonra, optimum sonuçlar elde edebilmek için örneklerin hazırlanması amacıyla low-TE tamponu hazırlandı. Tamponu hazırlamak için 10 mL, 1M Tris-HCl pH 8.0, 0,2 mL 0,5 M EDTA PH 8.0 ve 990 mL distile su steril bir balon joje içinde karıştırıldı.
2. Ardından alikuotlara ayrılıp çözelti otoklavlandı.
3. Bu alikuotlar oda sıcaklığında saklandı.
4. Kit kullanılmaya başlanmadan önce Master Mix ve Primer Seti çözüldü. Kullanılmayan primer seti, çoğaltılan DNA, alelik ladder ve size standard ışığa duyarlı olduğu için alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu.
5. Master Mix ve Primer Seti 3 saniye süreyle vortekslendi. Tüp veya şişeler açılmadan önce,

- kapaklardaki olası damlacıklar tüpleri kısa bir süre santrifüjlenmesiyle ve laboratuvar tezgahı üzerinde şişelere hafifçe vurularak giderildi.
6. Uygun boyuttaki renksiz polipropilen tüpe 7,5 µL Master Mix ve 2,5 µL Primer Set konuldu.
 7. Reaksiyon karışımı 3 saniye vortekslendi ve ardından kısa bir süre santrifüjlendi.
 8. Her bir MicroAmpTM Optik 96-Kuyucuklu Reaksiyon Plağına 10 µL reaksiyon karışımı alındı.
 9. Örnek başlangıç miktarı en az 1.0 ng olduğundan 29 PCR döngüsü için, 15 µL başlangıç hacmi elde etmek üzere low-TE buffer ile dilüsyon yapıldı.
 10. Örnekler aşağıdaki tabloda olduğu gibi hazırlandı and uygun tüpe aktarıldı. (Nihai reaksiyon hacmi 25 µL).
 11. MicroAmpTM Optik 96-Kuyucuklu Reaksiyon Plağı, MicroAmpTM Optik Adheziv Film ile kapatıldı.
 12. Plak, santrifüjle 3000 rpm’de 20 saniye boyunca santrifüjlendi.
 13. Aşağıdaki koşullara göre örneklerin çoğaltılması aşamasına geçildi.
 14. MicroAmpTM Optik Adheziv Film ile kapatılan MicroAmpTM Optical 96-Kuyucuklu Reaksiyon Plağın üzerine buharlaşmayı önlemek için MicroAmpTM Optik Film Kompresyon Pedi yerleştirildi.
 15. Plak ısı döngüleyici cihaza yüklendi, ısınan kapak kapatıldı, ardından çalışma başlatıldı.
 16. Çalışma tamamlandığında çoğaltılmış olan ışıktan korunacak şekilde kapatılarak DNA - 20°C’de saklandı.
 17. Örnekler kapiller elektroforez cihazında genotiplenmek üzere derin dondurucudan çıkarıldı.
 18. Örnekler kapiller elektroforez aşaması için hazırlandı. Bu amaçla uygun boyuttaki polipropilen tüpe aşağıda belirtilen hacimlerde gereken bileşenler aktarıldı.

19. Tüp vortekslenip, ardından kısa bir süre santrifüjlendi.
20. Her MicroAmp Optik 96-Kuyucuklu Reaksiyon Plağına 10 µL formamid/size standard karışımı ve 1 µL PCR ürünü eklendi.
21. Kör kuyucuklar için 10 µL Hi-Di Formamid eklendi.
22. Reaksiyon plağı, her kuyucuk içeriğinin iyice karıştığından ve tüpün en alt kısmında toplandığından emin olmak için kısa bir süre santrifüjlendi.
23. Reaksiyon plağı ısı döngü cihazında 95°C’de 3 dakika boyunca ısıtıldı.
24. Plak ardından hemen 3 dakika süreyle buz üzerine yerleştirildi.
25. Örnek tepsisi otomatik örnekleme bölmesi (autosampler) üzerine yerleştirilip elektroforez çalışması başlatıldı.
26. Elektroforez aşamasının tamamlanmasından sonra, otomatik genotipleme programı olan GeneMapper ID-X Yazılımı v1.4 ile verilerin analiz edilmesi aşamasına geçildi.

QIAquick® PCR Purification Kit

- 1) Kullanılmadan önce PE Tampona %96’lık etanol eklendi.
- 2) Tüm santrifüj aşamaları oda sıcaklığında 13.000 rpm’de standart bir santrifüjde gerçekleştirildi.
- 3) PB Tampona 1:250 oranında pH indikatör I eklendi. Sarı renk oluştuğunda pH’ın ≤7.5 olarak kabul edildi.
- 4) PB Tamponu ile PCR reaktifi 5:1 oranında karıştırıldı. Elde edilen renk turuncu ya da mor ise, 10 µl 3 M sodyum asetat, pH 5.0 eklenip karıştırıldı ve rengin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- 5) 2 mL’lik toplama tüpü içine bir QIAquick kolonu yerleştirildi.
- 6) DNA’nın bağlanması için, QIAquick kolonu 60 sn santrifüjlendi.
- 7) Süpernatant atıldı ve QIAquick kolonu aynı tüp içine yerleştirildi.

- 8) Yıkama işlemi için, QIAquick kolona 0,75 mL PE Tamponu eklenip 60 sn santrifüj edildi.
- 9) Süpernatant atıldı ve QIAquick kolonu aynı tüp içine yerleştirildi.
- 10) Kalan yıkama tamponunu uzaklaştırmak için QIAquick kolonu kit içinde verilen 2 mL'lik toplam tüpü içinde 1 dakika süreyle santrifüjlendi.
- 11) Her bir QIAquick kolonunu 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpü içine yerleştirildi.
- 12) DNA elüsyonu için, QIAquick membranının orta kısmına EB Tamponundan (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) 50 µL eklendi ve kolon 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Daha fazla DNA konsantrasyonu elde etmek için, QIAquick membranının orta kısmına 30 µL elüsyon tamponu eklendi ve kolon 1 dakika bekletilip santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
- 13) Elde edilen DNA çalışılmak üzere buzdolabında saklandı.

Ağız içi Sürüntü (Swab) Örneklerinden DNA Çekitleme:

Hastalardan alınan ağız içi sürüntü örneklerinden işlem yapılınca kadar +4°C'de saklanmıştır.

Ağız içi sürüntü örneklerinden DNA çekitleme amacıyla Hibrigen Blood Genomic DNA Extraction Kit kullanılmıştır.

Hibrigen Blood Genomic Extraction Kit ile Ağız içi Sürüntü (Swab)

Örneklerinden DNA İzolasyon Prosedürü:

1. Ağız içi sürüntü örnekleri sapından kesilerek 1,5µL'lik tüpe konuldu.
2. Tüplere 800 µL RS ilave edilerek vortex yapıldı.
3. 5000 rpm hızda 3 dakika santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı.
4. 200 µL DS eklenerek tekrar vortex yapıldı.
5. Tüm örneklerle 20 µL proteinase K ve 220 µL MS ilave edilerek vortexlendi. 10 dak. 65C° de inkübasyona bırakıldı.
6. 220 µL etanol ilave edildi.

7. Tüplerin içerisindeki ağız içi sürüntü örnekleri başları dikkatlice çıkarılarak, karışım tüplerden kolona aktarıldı..
8. Kolona aktarılan karışım 1dak 12.000 rpm hızda santrifüj yapıldı. Alt taraftaki çözelti atıldı.
9. Yeni tüpe takılan kolona 500 µL wash PS ilave edildi. 1 dakikak 12.000 rpm de santrifüj edildi ve alt tarafa geçen çözelti uzaklaştırıldı.
10. Toplama tüpü tekrar değiştirilerek 500 µL wash PE ilave edildi. 1 dak. 12.000 rpm hızda santrifüj edildi.
11. 12.000 rpm hızda 3 dakika boş santrifüj yapıldı.
12. Son olarak filtre kolon steril 1,5 mL’lik yeni mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 30-100 µL elüsyon tamponu ilave edildi.

4.3.2. DNA Miktar Analizi

Örneklerin DNA miktarları The Quant-IT dsDNA HS Assay Kit kullanılarak fluorometrik yöntemle belirlendi. İşlem basamakları aşağıda belirtildiği gibidir.

The Quant-IT dsDNA HS Assay Kit ile DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

1. Ölçülecek örnek sayısı ve cihazın kalibrasyonu için gerekli 2 adet standart ile birlikte toplam sayı belirlenerek, 0,5 ml’lik steril tüpler hazırlandı.
2. Miktar tayin kitinin içeriğinde bulunan Quat-IT dsDNA HS reaktifi ölçümü yapılacak her örnek için 200:1 oranında “Quant-IT working” çözeltisi ile seyreltildi. Tüplere bu çözeltiden 200 µl’lik karışımlar hazırlandı.
3. Hazırlanan bu karışımdan standartların ölçüleceği tüplere 190 µl, örneklerin ölçüleceği tüplere ise 199 µl konuldu.
4. İki standarttan da 10 µl alınarak 190 µl’ lik karışım içeren tüplere eklendi.
5. 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. 12.000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon atıldı. Tüpteki izolat +4 C° de saklanmak

üzere buzdolabına kaldırıldı.

7. İncelenecek örneklere ait özütlerden de 1 µL alınarak, 199 µL'lik karışım içeren tüplere eklendi.

8. Elde edilen karışımlar kısa süre vortexlenerek, 5 dakika oda ısısında bekletildi.

9. Öncelikli olarak standartların Quibit fluorometre cihazında DNA konsantrasyonları belirlenerek aletin kalibrasyonu sağlandı.

10. Kalibre edilen Quibit fluorometer cihazında sırasıyla örnekler ölçülerek miktarları not edildi.

4.3.3. PCR Aşaması

AmpFISTR- Identifiler PCR Amplification Kit ile PCR Amplifikasyonu

Çalışmamızda PCR için AmpFISTR- Identifiler PCR Amplification Kit kullanılmıştır.

Her bir örnek için:

5,25 µL Tampon

2,25 µL Primer

0,25 µL Taq gold

5µL örnek DNA'sı

Toplamda 12,25 µL'lik karışım hazırlanarak örnekler GeneAmp® 9700 (Thermo Fisher, Applied Biosystems) PCR Cihazı'na yerleştirildi.

Kullanılan PCR Programı:

95 C° de	11 dakika	
94 C ° de	1 dakika	} 28 ve 32 Siklus
59 C° de	1 dakika	
72 C° de	1 dakika	
60 C° de	60 dakika	
4 C°de	∞	

Elde edilen PCR ürünleri kapiller elektroforez cihazı kullanılarak tiplendirildi.

AmpFISTR- Minifiler PCR Amplification Kit ile PCR Amplifikasyonu

Çalışmamızda PCR için AmpFISTR- Minifiler PCR Amplification Kit kullanılmıştır.

Her bir örnek için:

5,25 µL Tampon

2,25 µL Primer

0,25 µL Taq gold

5µL örnek DNA'sı

Toplamda 12,25 µL'lik karışım hazırlanarak örnekler GeneAmp® 9700 (Thermo Fisher, Applied Biosystems) PCR Cihazı'na yerleştirildi.

Kullanılan PCR Programı:

95 C° de	11 dakika	
94 C ° de	1 dakika	} 28 ve 32 Siklus
59 C° de	1 dakika	
72 C° de	1 dakika	
60 C° de	60 dakika	
4 C°de	∞	

Elde edilen PCR ürünleri kapiller elektroforez cihazı kullanılarak tiplendirildi.

4.3.4. Saflaştırma Aşaması

Amicon Ultra -4 Santrifüj Filtre İle PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Çalışmamızda PCR ürünlerini saflaştırmak amacıyla Amicon Ultra-4 Santrifüj Filtre Cihazı kullanılmıştır. İşlem basamakları aşağıda belirtildiği şekildedir.

1. Her bir örnekten 4mL alınarak Amicon Ultra filtre cihazı içine konuldu.
2. Filtre 4000 rpm hızda 10-40 dakika arası santrifüj edildi.
3. Filtrenin altında kalan solüsyon bir pipet yardımıyla çekip alındı. Başka bir santrifüj tüpüne

aktarıldı.

4.3.5. ABI 3130 Genetik Analizör Cihazı İle DNA'ların Analizi

Örnek Hazırlanması

ABI 3130 Genetik Analizör cihazında analiz edilecek her bir örnek için aşağıdaki gibi karışım hazırlandı:

- 1.** 12,5 µl Hi-Di™ formamide (Thermo Fisher, Applied Biosystems)
- 2.** 0,5 µl GenScan™ 500 LIZ™ Size Standard (Thermo Fisher, Applied Biosystems)
- 3.** 1 µl PCR ürünü

Örneklerin Elektroforezi

Analiz için hazırlanan karışım, 5 dakika 95 C° de denatüre edildi, hemen ardından 3 dakika buzda bekletildi. Yukarıda hazırlanan PCR ürün karışımı ABI PRISM 3130 cihazına yerleştirildi. Örnekler, 36 cm kapilerle, POP-4 polimeri kullanılarak, enjeksiyon süresi 5 saniye, yürütme süresi 24 dakika olacak şekilde 60°C de 15000 V'de DS-33 Matrix standardı ve GS POP-4 (1ml) – C βFiltresi seçilerek yürütüldü.

Örneklerin Analizi

Örneklerin elektroforezi sonrası elektroferogram görüntüleri elde edilerek, kemik ve diş örnekleri hangi sıcaklık derecesine kadar profillemeye yapılabildiği yorumlandı.

5. Bulgular

Bu araştırmada dūřuk, orta, yūksek, ultra yūksek ve ekstrem sıcaklık derecelerinde yanmaya maruz bırakılan, kemik ve diř örneklerinden DNA çekitlemesi ve profillemesi yapılarak, mevcut çekitleme yöntemleri karşılaştırılmış ve yanmış dokulardan elde edilen çekirdek DNA'sının genetik kimliklendirmede ne kadar etkili ve başarılı olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, kemik ve diř örneklerinin alındığı aynı kişilerden kontrol amaçlı ağız içi sürüntü örnekleri de alınıp DNA çekitlemesi yapılmış ve elde edilen iki profil arasında karşılaştırma yapılmıştır.

Çalışmamızda femur, humerus, tibia, kosta gibi farklı kemikler ile büyük ve küçük azı dişleri, kesici dişler ve köpek dişleri gibi farklı diş örneklerini kullandık. Hangi tip kemiğin en iyi kalitede ve en fazla DNA'yı verdiğini doğrulamak amacıyla, maruz bırakıldıkları ısı derecelerini de değerlendirerek, kemiklerden DNA çekitlemesine yönelik yarı-standardize bir protokol oluşturduk. On farklı DNA çekitleme yöntemini değerlendirerek ve düşük miktarda kemik tozundan başlayarak (50-100 mg) insan iskelet kalıntıları ve dişlerinde elektroforetik ürünlerin kalite açısından bir karşılaştırmasını gerçekleştirdik. DNA çekitlemesi amacıyla konvansiyonel fenol-kloroform organik yöntemine ek olarak, QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Almanya), DNA IQ™ System (Promega, Milan, İtalya) ve Genorise Bone DNA Extraction Kit (Genorise Scientific, PA, ABD), HiPurA™ Bone DNA Extraction Kit (HiMedia, India) ve Stratec Invisorb Spin Forensic Kit (Stratec Biomedical AG, Almanya) olmak üzere beş farklı ticari kitin etkinliğini ve verimliliğini değerlendirdik. Ayrıca, deneysel çalışmalarımızda, esas amacımız olan ve örnekleri daha iyi saflaştırmak amacıyla fenol-kloroformun kullanıldığı ve DNA'nın proteinler ve atık materyalden uzaklaştırıldığı yeni geliştirdiğimiz modifiye bir protokolü de gerçekleştirip diğer çekitleme yöntemleri ile karşılaştırdık. Modifiye protokolde yeni aşamayı, farklı kit solüsyonlarını lizis tamponu içinde inkübe ederek gerçekleştirdik. Fenol-kloroform aşaması, yakılan örneklerde atık materyalin

kolonlar veya manyetik boncuklarla etkileşmesini önleyerek örneklerin temizlenmesini sağladı. Tüm örnekler, adli genetikte sıklıkla kullanılan AmpFlSTR® Identifier™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD), AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, ABD), Stratec Invisorb Spin Forensic Kit (STRATEC Biomedical AG, Almanya), GeneMATRIX Bone DNA Purification Kit (EURx Ltd., Polonya) ve HiPurA™ Bone DNA Purification Kit (HiMedia, Hindistan) çoğaltıldı.

Yeni DNA çekitleme yöntemlerinin geliştirilmesi ve mevcut ticari kitlere ilaveten artan miniSTR sayısı, adli bilimlerde aşırı derecede degrade örnekler için etkili bir çözüm olabilir. Belirli süreler boyunca belirli sıcaklıklara maruz bırakılan düşük miktarlardaki taze kemik ve diş örnekleri için fenol-kloroform kullanımına dayanan DNA çekitleme protokolünün uygulanması beklenen iyi sonuçları vermiştir.

Bu bölümde araştırma sonucunda elde edilen bulgular özetlenmekte, bu bulgular yorumlanmakta ve sonuçlar sıralanarak bunlara dayalı bazı önerilere ortaya konmaktadır.

Tablo 8. Kemik Örneklerinden Qubit Fluorometre Sonuçlarına Göre Fenol-Kloroform + QIAQuick Kiti Modifiye Yöntemi İle Elde Edilen DNA Miktarları

A) Kemik Örneklerinden Elde Edilen DNA Miktarları:	13) 170°C....30 dakika....4,13 ng/µL
1) 50°C.....60 dakika....11,68 ng/µL	14) 180°C....30 dakika....3,32 ng/µL
2) 60°C.....50 dakika....13,48 ng/µL	15) 190°C....30 dakika....1,17 ng/µL
3) 70°C.....40 dakika....12,30 ng/µL	16) 200°C.....20 dakika....0,29 ng/µL
4) 80°C.....30 dakika....12,32 ng/µL	17) 250 °C....20 dakika....0,21 ng/µL
5) 90°C.....30 dakika....10,79 ng/µL	18) 300 °C....15 dakika....0,21 ng/µL
6) 100°C.....30 dakika....9,99 ng/µL	19) 400 °C....15 dakika....0,082 ng/µL
7) 110°C.....30 dakika....9,72 ng/µL	20) 500 °C....10 dakika....0,041 ng/µL
8) 120°C.....30 dakika....7,56 ng/µL	21) 600 °C....10 dakika....0 ng/µL
9) 130°C.....30 dakika....7,27 ng/µL	22) 700 °C....10 dakika....0 ng/µL
10) 140°C.....30 dakika....6,15 ng/µL	23) 800 °C....10 dakika....0 ng/µL
11) 150°C....30 dakika....6,01 ng/µL	24) 900 °C....10 dakika....0 ng/µL
12) 160°C....30 dakika....5,70 ng/µL	25) 1000 °C..10 dakika....0 ng/µL

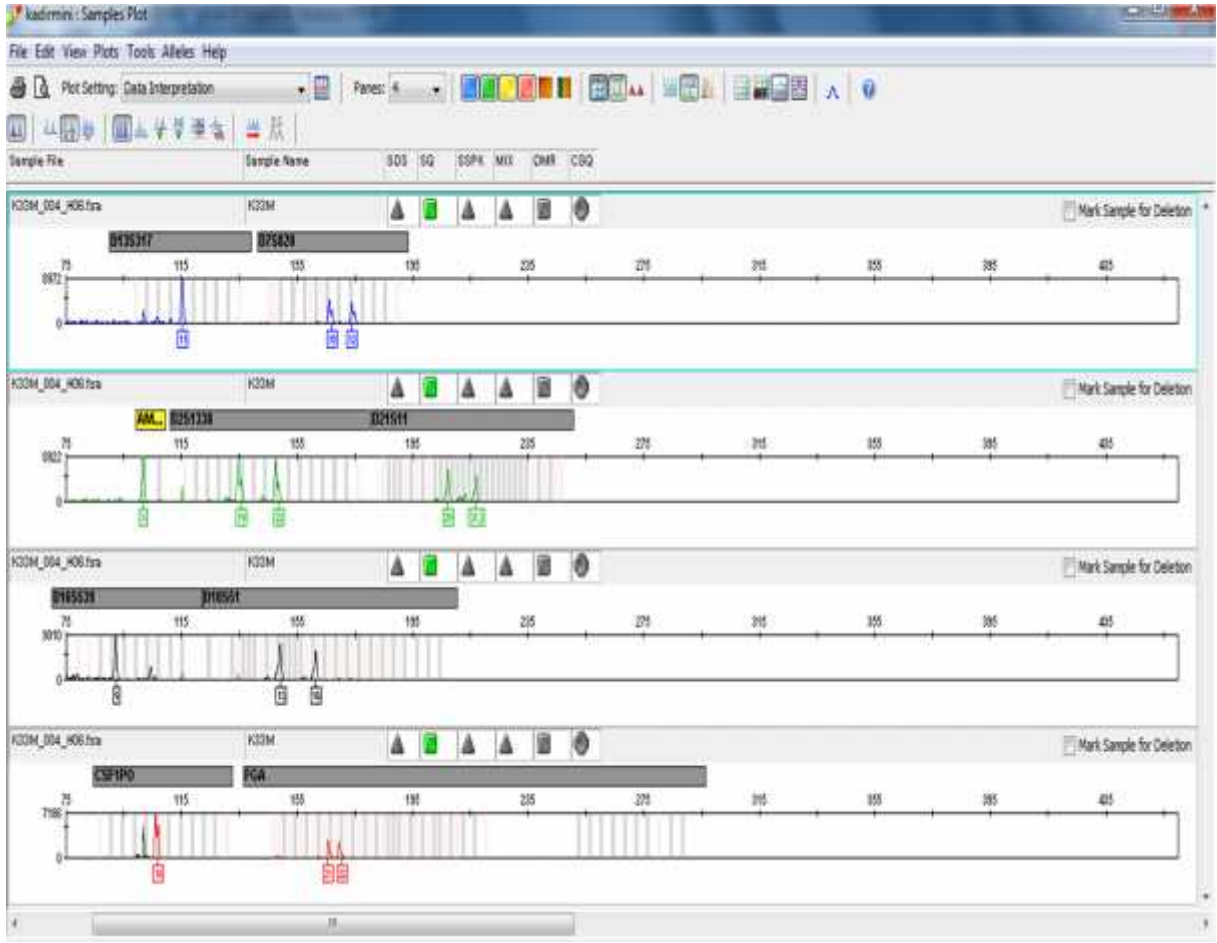
Tablo 9. Diş Örneklerinden Qubit Fluorometre Sonuçlarına Göre Fenol-Kloroform + QIAQuick Kiti Modifiye Yöntemi İle Elde Edilen DNA Miktarları

B) Diş Örneklerinden Elde Edilen DNA Miktarları:	13) 170°C....30 dakika....0,90 ng/µL
1) 50°C.....60 dakika....5,67 ng/µL	14) 180°C....30 dakika....0,72 ng/µL
2) 60°C.....50 dakika....2,95 ng/µL	15) 190°C....30 dakika....0,68 ng/µL
3) 70°C.....40 dakika....2,71 ng/µL	16) 200°C.....20 dakika....0,53 ng/µL
4) 80°C.....30 dakika....2,55 ng/µL	17) 250 °C....20 dakika....0,31 ng/µL
5) 90°C.....30 dakika....1,65 ng/µL	18) 300 °C....15 dakika....0,29 ng/µL
6) 100°C....30 dakika....1,47 ng/µL	19) 400 °C....15 dakika....0,11 ng/µL
7) 110°C....30 dakika....1,42 ng/µL	20) 500 °C....10 dakika....0,02 ng/µL
8) 120°C....30 dakika....1,29 ng/µL	21) 600 °C....10 dakika....0 ng/µL
9) 130°C....30 dakika....1,09 ng/µL	22) 700 °C....10 dakika....0 ng/µL
10) 140°C....30 dakika....1,05 ng/µL	23) 800 °C....10 dakika....0 ng/µL
11) 150°C....30 dakika....1,02 ng/µL	24) 900 °C....10 dakika....0 ng/µL
12) 160°C....30 dakika....1,011 ng/µL	25) 1000 °C..10 dakika....0 ng/µL

Tablo 10. Ağız İçi Sürüntü Örneklerinden Qubit Fluorometre Sonuçlarına Göre Hybrigen Kiti Kullanılarak Elde Edilen DNA Miktarları

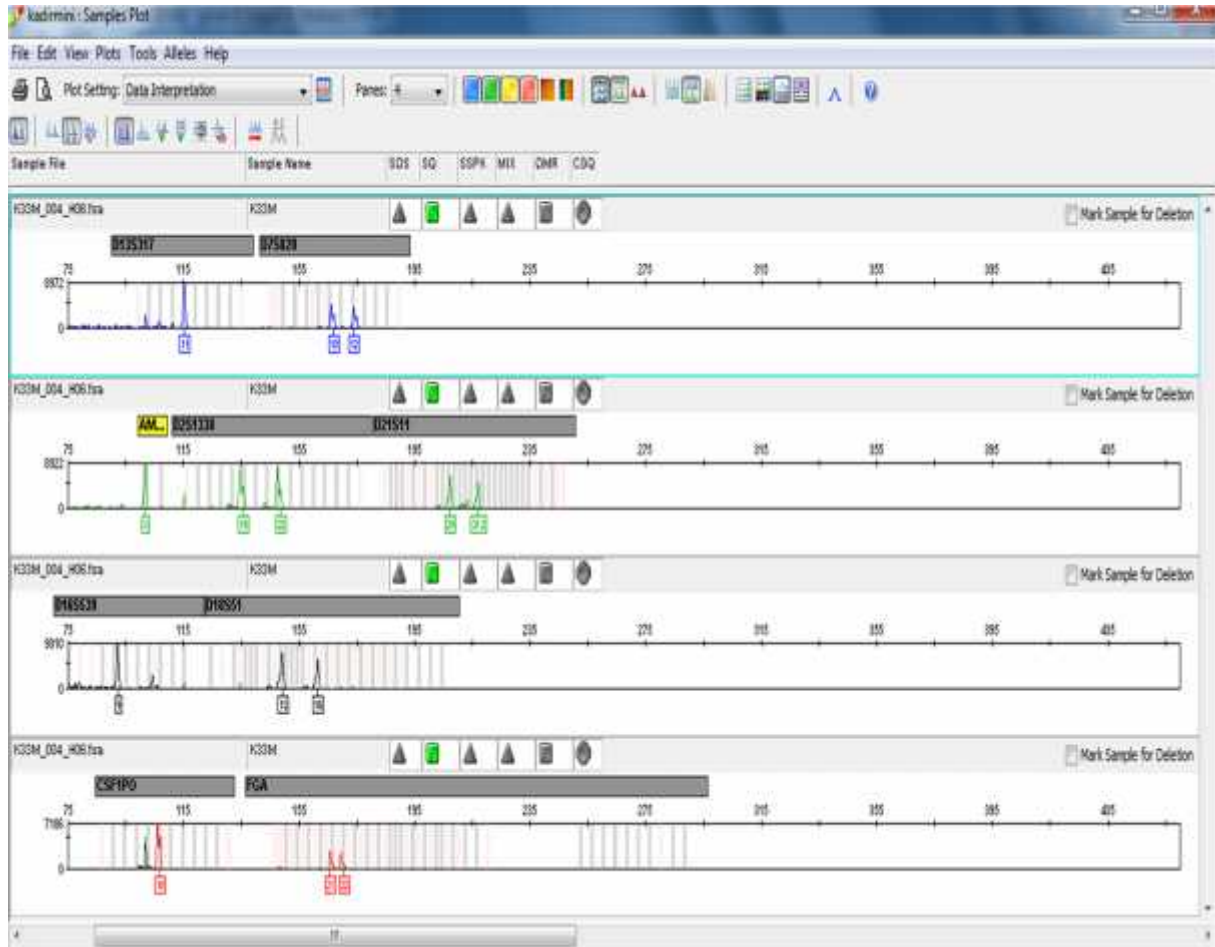
1) 62,80 ng/μL	14) 66,90 ng/μL	27) 21,00 ng/μL	40) 85,10 ng/μL
2) 65,23 ng/μL	15) 63,20 ng/μL	28) 48,02 ng/μL	41) 75,60 ng/μL
3) 67,81 ng/μL	16) 56,90 ng/μL	29) 70,63 ng/μL	42) 75,70 ng/μL
4) 76,90 ng/μL	17) 41,40 ng/μL	30) 18,30 ng/μL	43) 71,63 ng/μL
5) 66,80 ng/μL	18) 62,90 ng/μL	31) 70,60 ng/μL	44) 58,30 ng/μL
6) 90,52 ng/μL	19) 63,90 ng/μL	32) 77,00 ng/μL	45) 60,60 ng/μL
7) 52,40 ng/μL	20) 36,90 ng/μL	33) 71,60 ng/μL	46) 73,24 ng/μL
8) 46,20 ng/μL	21) 21,25 ng/μL	34) 70,80 ng/μL	47) 71,90 ng/μL
9) 57,40 ng/μL	22) 68,10 ng/μL	35) 62,61 ng/μL	48) 50,80 ng/μL
10) 67,70 ng/μL	23) 42,70 ng/μL	36) 55,34 ng/μL	49) 60,61 ng/μL
11) 42,20 ng/μL	24) 53,34 ng/μL	37) 61,11 ng/μL	50) 35,44 ng/μL
12) 67,30 ng/μL	25) 68,20 ng/μL	38) 85,30 ng/μL	
13) 32,30 ng/μL	26) 45,30 ng/μL	39) 84,30 ng/μL	

5.2. Kemik, Diş ve Ağız İçi Sürüntü Örneklerinde STR Profillemeleri



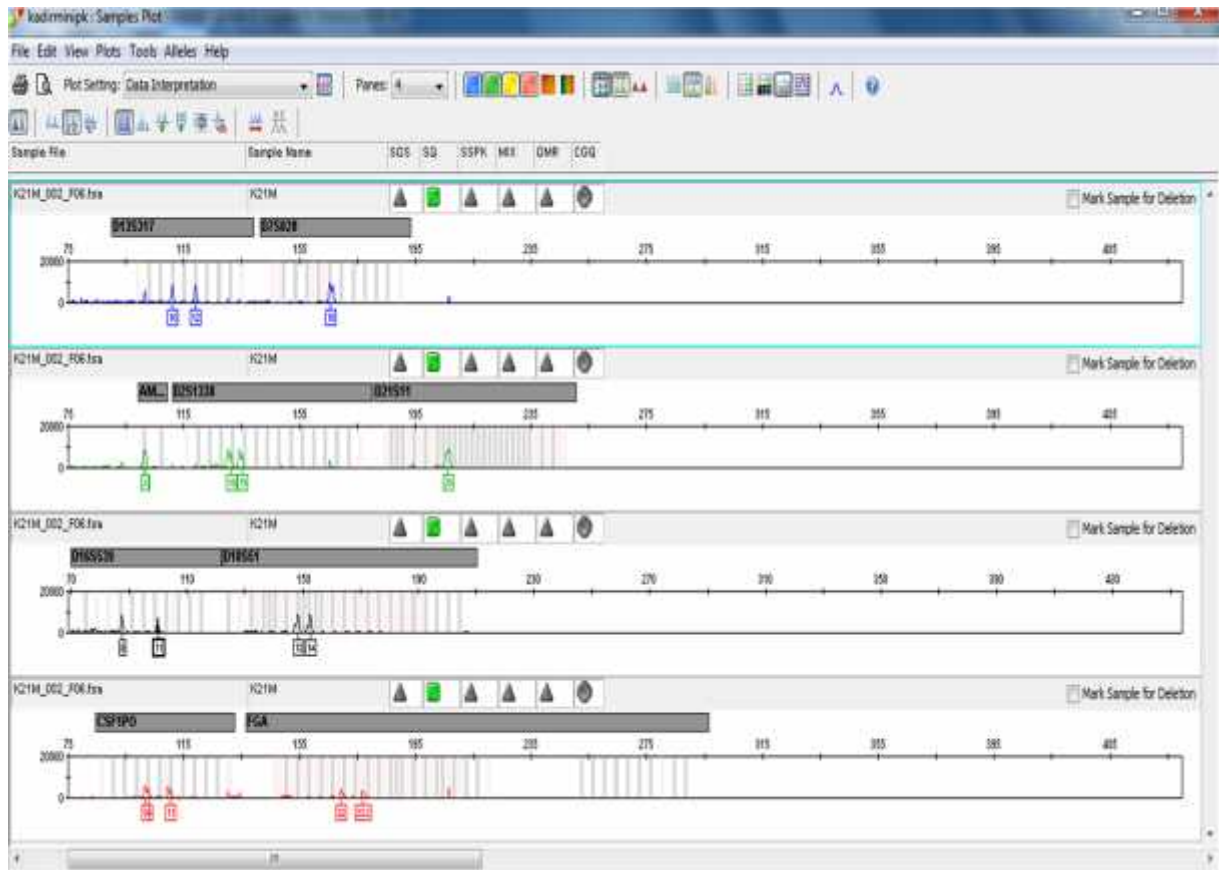
Sample Name	Marker	Allele 1	Allele 2	Height 1	Height 2
K33M	D13S317	11		8972	
K33M	D7S820	10	12	2735	4175
K33M	AMEL	X		8922	
K33M	D2S1338	19	22	4509	3889
K33M	D21S11	29	31.2	6379	5383
K33M	D16S539	9		9010	
K33M	D18S51	13	16	7259	5792
K33M	CSF1PO	10		5255	
K33M	FGA	21	22	2862	737

Şekil 17. 100°C’de yakılmış kemik örneğinde Minifiler Kiti ile elde edilen elektroforegram ve lokusların görüntüsü



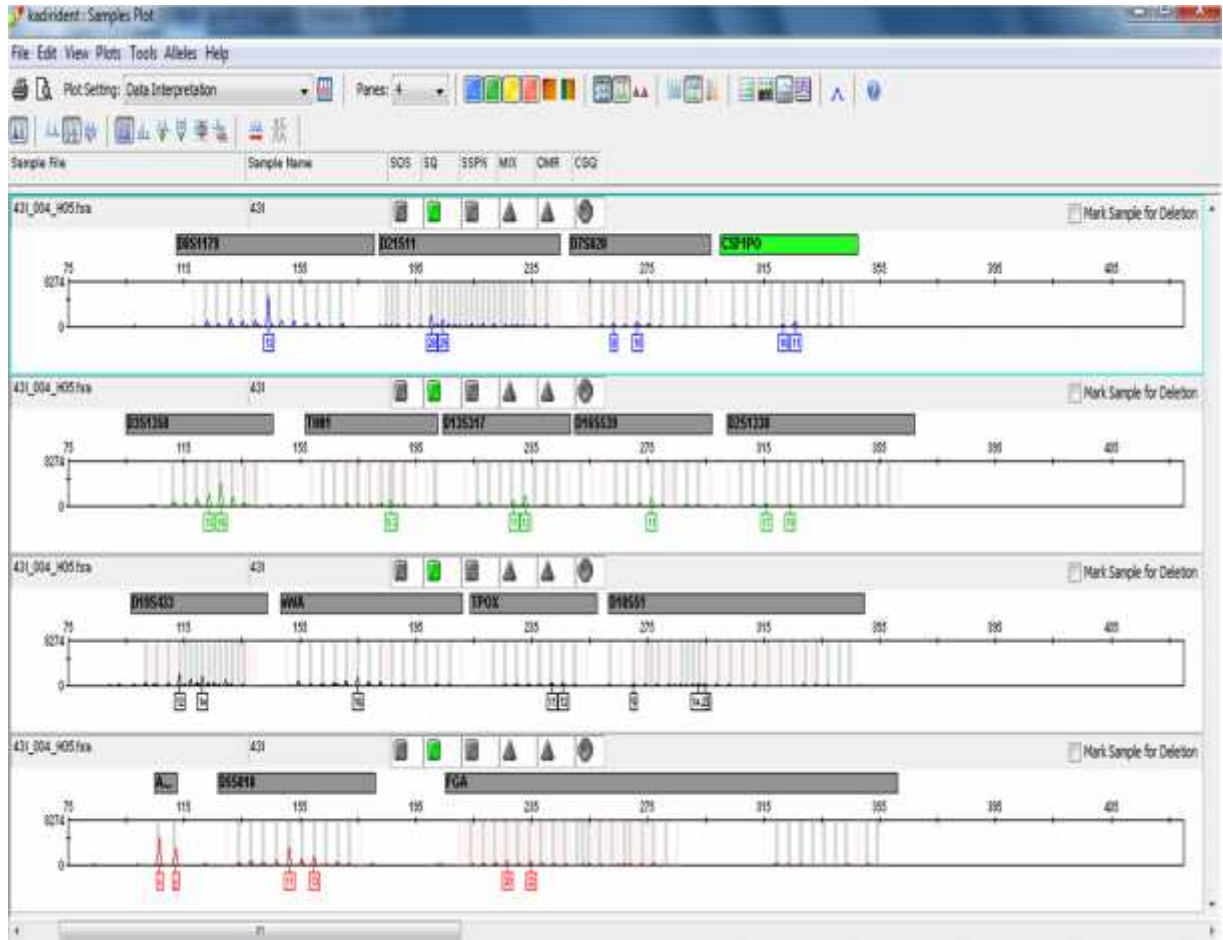
Sample Name	Marker	Allele 1	Allele 2	Height 1	Height 2
K33M	D13S317	11		8972	
K33M	D7S820	10	12	2735	4175
K33M	AMEL	X		8922	
K33M	D2S1338	19	22	4509	3889
K33M	D21S11	29	31.2	6379	5383
K33M	D16S539	9		9010	
K33M	D18S51	13	16	7259	5792
K33M	CSF1PO	10		5255	
K33M	FGA	21	22	2862	737

Şekil 18. 33 numaralı ağız içi sürüntü örneğinde Minifiler Kiti ile elde edilen elektroforegram ve tam profil lokus görüntüsü



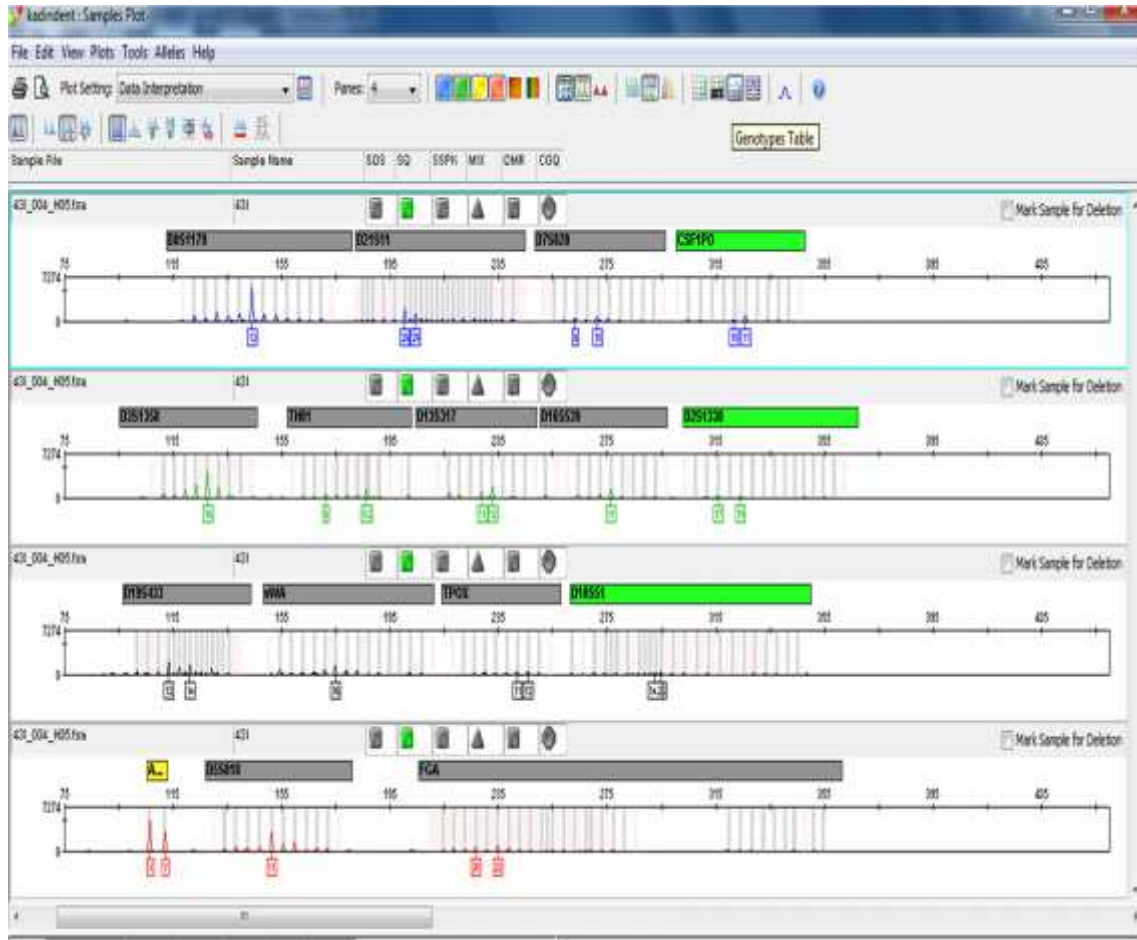
Sample Name	Marker	Allele 1	Allele 2	Height 1	Height 2
K21M	D13S317	10	12	8268	8350
K21M	D7S820	10		8935	
K21M	AMEL	X	x	8356	8399
K21M	D2S1338	18	19	6962	6347
K21M	D21S11	29		8640	
K21M	D16S539	8	11	8364	7038
K21M	D18S51	13	14	8658	8874
K21M	CSF1PO	9	9	5772	4310
K21M	FGA	22	23.2	4112	3534

Şekil 19. 400°C’de yakılmış diş örneğinde Minifiler Kiti ile elde edilen elektroforegram ve tam profil lokus görüntüsü



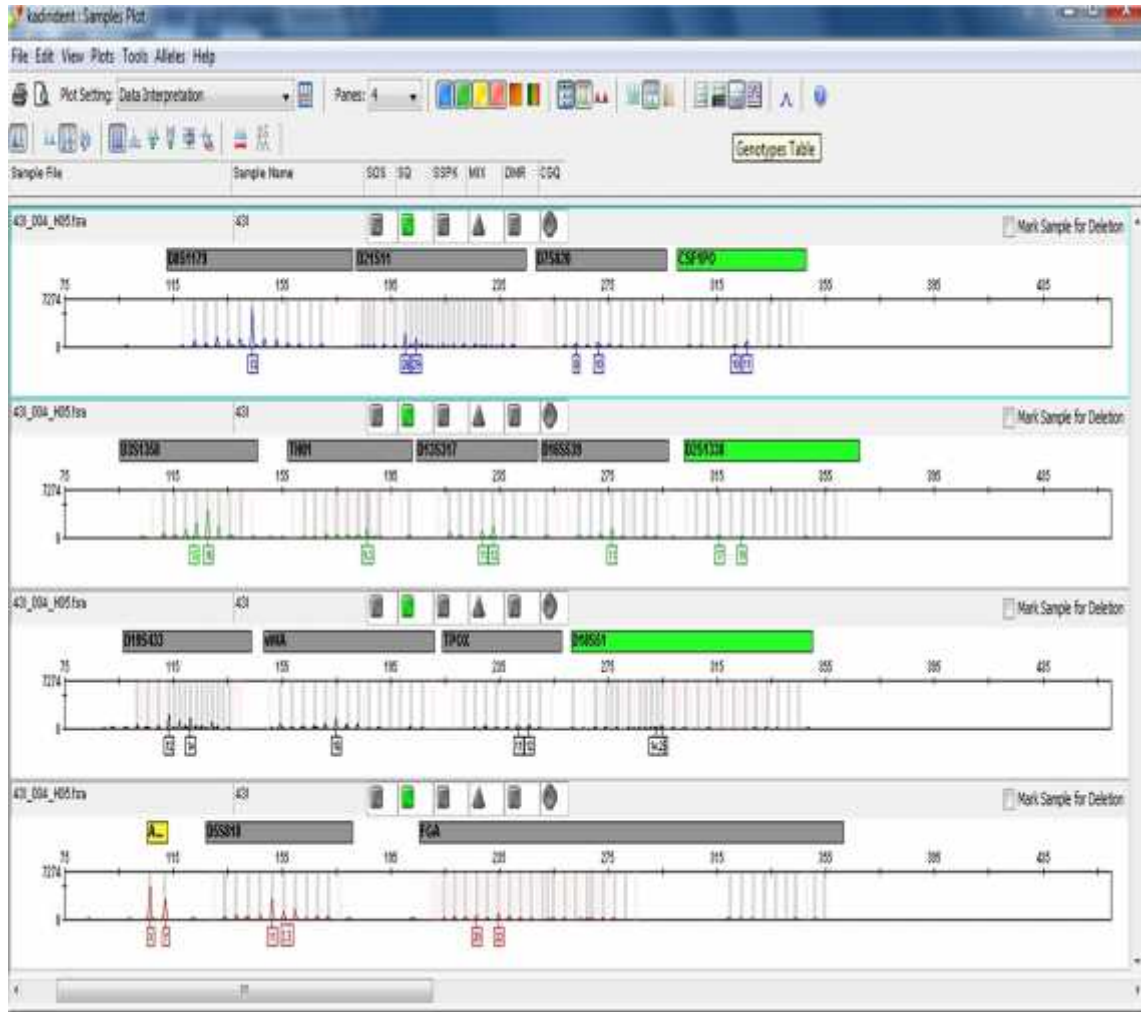
Sample Name	Marker	Allele 1	Allele 2	Height 1	Height 2
431	D8S1179	13		5797	
431	D21S11	28	29	2121	1178
431	D7S820	8	10	524	761
431	CSF1PO	10	11	279	852
431	D3S1358	15	16	2060	4274
431	TH01	9.3		1128	
431	D13S317	11	12	931	1905
431	D16S539	11		1493	
431	D2S1338	17	19	345	267
431	D19S433	12	14	2061	1697
431	vWA	16		1573	
431	TPOX	11	12	359	388
431	D18S51	9	14.2	225	272
431	AMEL	x	y	5156	3047
431	D5S818	11	13	3221	1520

Şekil 20. 400°C’de yakılmış diş örneğinde Identifiler Kiti elektrogforegram görüntüsü ve elde edilen lokuslar



Sample Name	Marker	Allele 1	Allele 2	Height 1	Height 2
43I	D8S1179	13		5797	
43I	D21S11	28	29	2121	1178
43I	D7S820	8	10	524	761
43I	CSF1PO	10	11	279	852
43I	D3S1358	16		4274	
43I	TH01	6	9.3	552	1128
43I	D13S317	11	12	931	1905
43I	D16S539	11		1493	
43I	D2S1338	17	19	345	267
43I	D19S433	12	14	2061	1697
43I	vWA	16		1573	
43I	TPOX	11	12	359	388
43I	D18S51	14.2	15	272	333
43I	AMEL	X	Y	5156	3047
43I	DSS818	11		3221	

Şekil 21. 300°C’de yakılmış diş örneğinde Identifiler Kiti ile elde edilen elektroforegram ve tam profil lokus görüntüsü



Sample Name	Marker	Allele 1	Allele 2	Height 1	Height 2
43I	D8S1179	13		5797	
43I	D21S11	28	29	2121	1178
43I	D7S820	8	10	524	761
43I	CSF1PO	10	11	279	852
43I	D3S1358	16		4274	
43I	TH01	6	9.3	552	1128
43I	D13S317	11	12	931	1905
43I	D16S539	11		1493	
43I	D2S1338	17	19	345	267
43I	D19S433	12	14	2061	1697
43I	vWA	16		1573	
43I	TPOX	11	12	359	388
43I	D18S51	14.2	15	272	333
43I	AMEL	X	Y	5156	3047
43I	D5S818	11		3221	

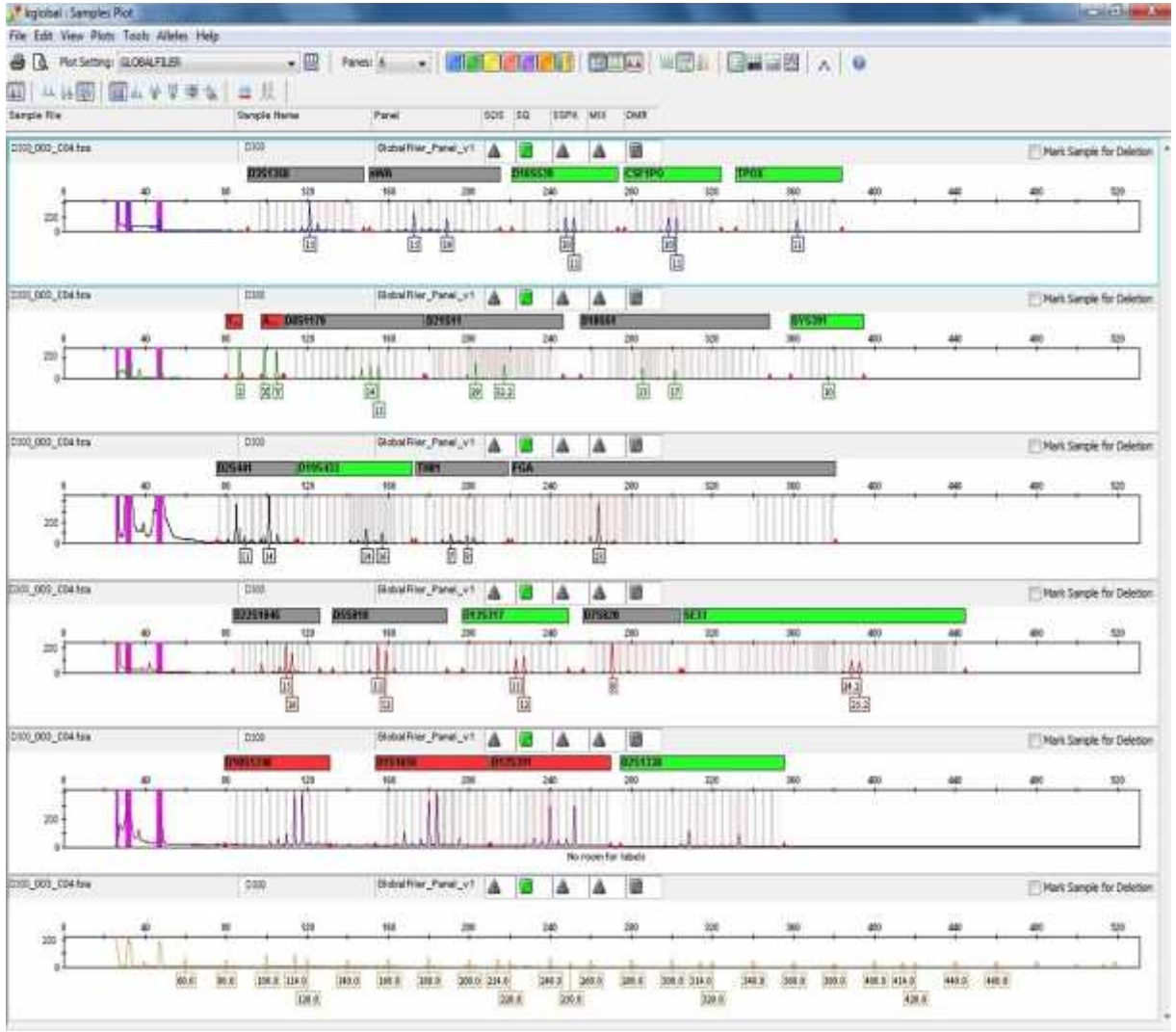
Şekil 22. Ağız içi sürüntü örneğinde Identifiler Kiti ile elde edilen lokuslar



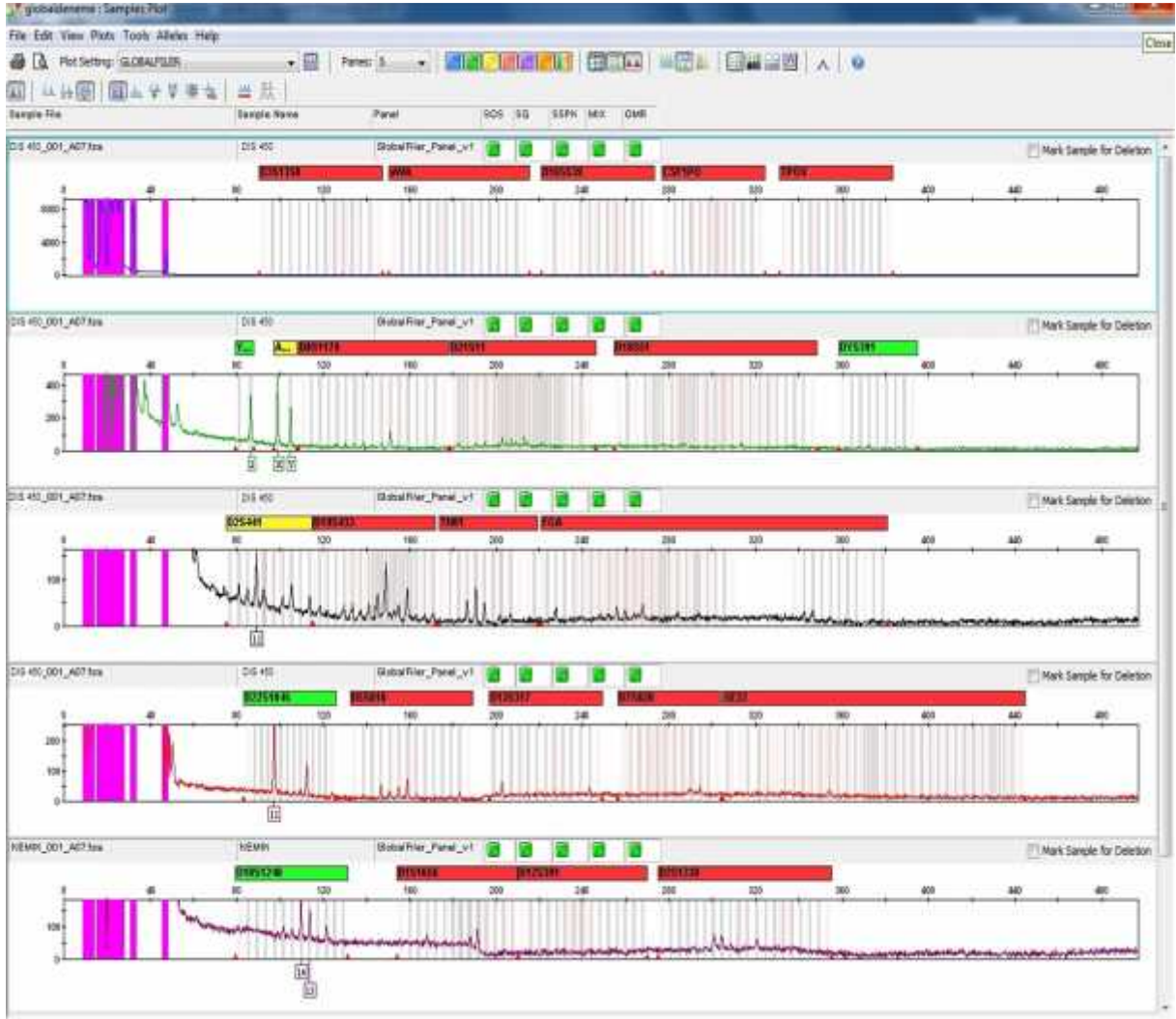
Şekil 23. 190°C’de yakılmış kemik örneğinde Globalfiler Kiti ile elde edilen elektroforegram görüntüsü



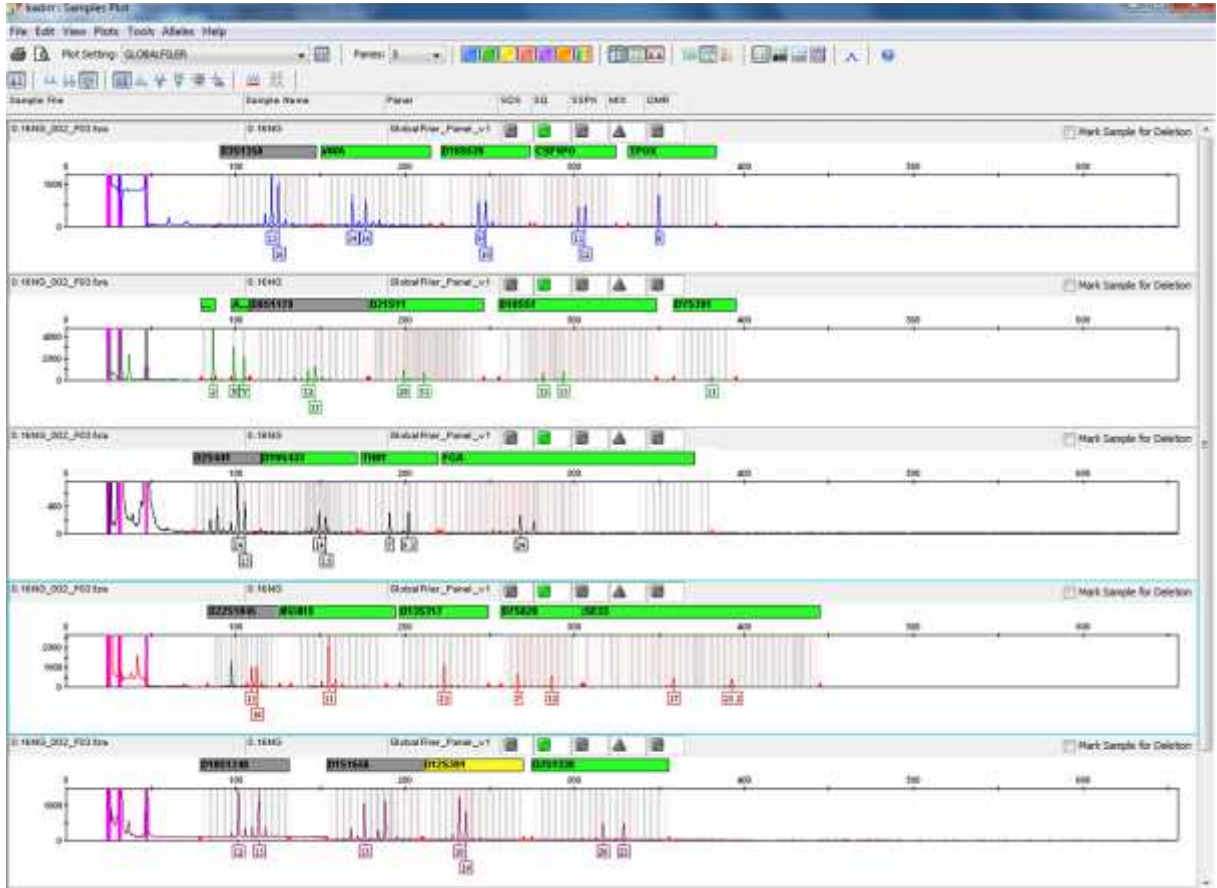
Şekil 24. 250°C’de yakılmış kemik örneğinde Globalfiler Kiti ile elde edilen elektroforegram görüntüsü



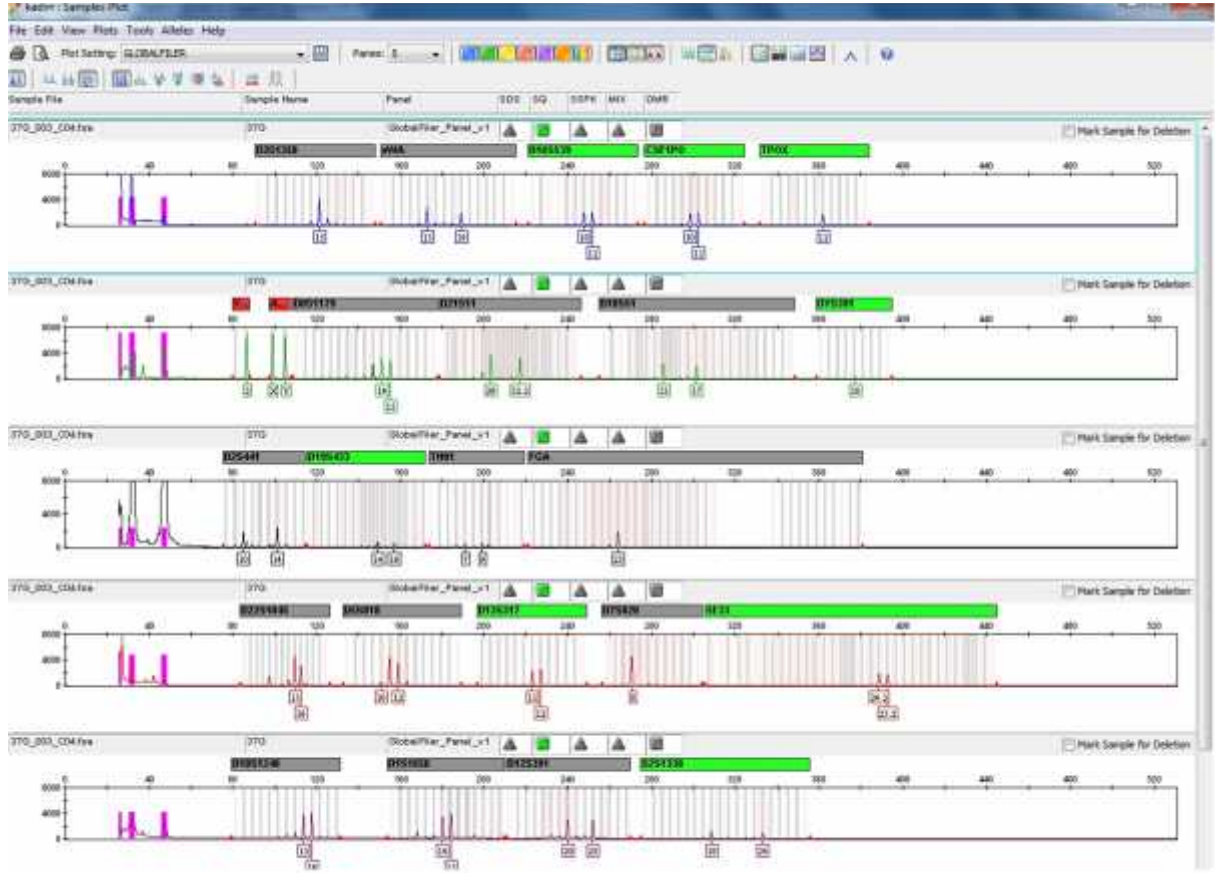
Şekil 25. 300°C’de yakılmış diş örneğinde Globalfiler Kiti ile elde edilen elektroforegram görüntüsü



Şekil 26. 450°C’de yakılmış diş örneğinde Globalfiler Kiti ile elde edilen elektroforegram görüntüsü



Şekil 27. 150°C’de yakılmış kemik örneğinde Globalfiler Kiti elektroforegram ve tam profil lokus görüntüsü



Şekil 28. 150°C’de yakılmış diş örneğinde Globalfiler Kiti ile elde edilen elektroforegram ve tam profil görüntüsü

6. Tartışma

Kemik ve diş gibi olay yerinde elde edilen insan kalıntılarında kimliklendirmede ilk aşama cinsiyetin ve yaştan saptanmasıdır. Adli bilimlerde kimliklendirme amacıyla vücudun en dayanıklı dokusu olduğu için önemli bir yeri olan dişlerden morfolojik yöntemler kullanılarak yaş ve cinsiyet ile ilgili ipuçları elde edilebildiği bilinmektedir. Mevcut morfolojik yöntemlerin kimliklendirmede yetersiz kaldığı durumlarda ise, yine sert diş ve kemik dokusu içerisinde korunmuş olarak bulunan DNA materyali adli olguların aydınlatılmasında önemli bir yönlendirici olmaktadır (75,80).

Adli olaylarda, özellikle ileri derecede hasar görmüş, vücut bütünlüğü bozulmuş ve yanmış, görsel kimliklendirmenin mümkün olmadığı cesetlerde kemik ve dişler yapılarının sağladığı avantajlar nedeniyle kimliklendirmeye yönelik en önemli materyallerdir (80). Dişlerden cinsiyetin belirlenmesi için kullanılan tekniklerden birisi iskelet kalıntıları üzerindeki metrik çalışmalardır. Dişler üzerinde yapılan odontometrik çalışmalar ise osteometrik çalışmalar kadar yaygın değildir (90). Ayrıca, dişlerle ilgili olarak odontometrik analizlerin populasyon düzeyinde gerçekleştirildiği ve populasyonlar arasındaki farklılıkların ortaya konduğu kapsamlı çalışmalar mevcut değildir. Bu nedenle, bu tip örneklerde DNA analiz tekniklerinin uygulanması cinsiyetin kesin olarak belirlenmesi açısından da son derece önem taşımaktadır. Bunun yanında, özellikle adli diş hekimleri olmak üzere, DNA analizleri ile cinsiyetin saptanmasının her zaman tercih edilmemesi gerektiğini savunan araştırmacılar da mevcuttur. Bunu, DNA analizlerinin önemli bir maddi harcama, ekipman, konusunda özel olarak uzmanlaşmış bir ekip ve laboratuvar koşulları gerektirmesine bağlamaktadırlar. Bu açıdan sadece hassas bir kumpas ve diş boyutlarını belirleyebilen bir diş hekiminin varlığında gerçekleştirilebilecek odontometrik analizlerin DNA analiz yöntemlerine alternatif olabileceğini savunanların olduğunu da belirtmek gerekmektedir. Bir başka ifadeyle, dişlerden cinsiyetin belirlenmesi ile ilgili önemli tartışmalar mevcuttur. Dişler, diğer iskelet

dokularından farklı olarak oluştuktan sonra büyüme ve gelişmeye bağlı olarak yeniden şekillenmemektedirler ancak zaman geçtikçe aşınmaya bağlı olarak boyutlarında bir miktar azalma meydana gelmektedir. Bu nedenle, cinsiyet tespitinde kullanılan diğer iskelet kalıntılarının aksine, ilgili birey cinsel olgunluğa erişmeden önce ve eriştikten sonra farklı özellikler ortaya koymazlar. Buna bağlı olarak, özellikle cinsel olgunluğa henüz erişmemiş ve iskeletinde cinsiyete bağlı önemli değişimler ortaya çıkmamış bir bireyin kimliklendirilmesi ve cinsiyetinin belirlenmesi aşamasında dişlerin önemli olduğu, maliyetli ve zahmetli DNA analiz yöntemlerine gerek kalmadan basit odontometrik ölçümler ve morfolojik değerlendirmelerle dişlerden cinsiyet tespiti yapılabileceği belirtilmektedir. Ancak, odontometrik verilerin cinsiyeti ortaya koyacak kadar ayırt edici olmadığı olgularda, cinsiyetin belirlenmesi amacıyla kullanılması gereken yöntem DNA analizleridir. Çağdaş örneklerin değerlendirdiği adli olgularda, örnek ileri derecede zarar görmüş bir kişiye ait olduğunda bile, dişin koruyucu doğal yapısı DNA'nın zarar görmesini önlediğinden cinsiyet tayini için sorun teşkil etmemektedir. Ancak antik veya ileri derecede degrade örneklerle yapılan çalışmalarda amelogenin bölgesinin amplifikasyonu açısından çağdaş örneklerde elde edilen başarı yüzdesinin elde edilmesi son derece zordur. Bu tip örneklerin içerisinde barındırdığı DNA'yı ne kadar koruyabildiği, örneğin ne kadar eski olduğuna ve içinde bulunduğu çevresel koşullara bağlıdır. Araştırmalar kemik ve diş örneklerindeki bozulma derecesinin çeşitli etkenlere bağlı olduğunu göstermektedir. Bu bozulmanın zaman ve çevresel etkenlere bağlı olduğu ve her etkenin etkisinin farklı boyutlarda olabileceği belirtilmektedir (77,83,89). Aynı olay yerindeki örnekler içerisinde bile korunma açısından önemli farklılıklar olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (83).

Diş örnekleri ile diğer iskelet kalıntılarının DNA molekülünü koruyucu özellikleri açısından kıyaslandıkları birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu, dişlerin koruyuculuk açısından diğer tüm dokulardan daha avantajlı olduklarını söylemektedir (12,80).

Bizim çalışmamız da bu çalışmalarla paralel sonuçlar ortaya koymuştur. Her ne kadar dişler vücudun en sert ve dayanıklı dokusu olsa da kök kısımları oldukça geçirgendir. Çoğunlukla pulpa boşluğu birçok dentin kanalı aracılığı ile kökün dışı ile direkt bağlantılı durumdadır. Bu yüzden çene dışındaki izole bir diş örneği ile çalışılırken minenin ne kadar koruyucu olduğunun pek önemi kalmamakta, özellikle kontaminasyonun meydana gelmeyeceği koşulların oluşturulması ön plana çıkmaktadır. Antik ve degrade diş örneği çalışmalarında karşılaşılan kontaminasyonların sebebi budur.

Yaşın ilerlemesiyle birlikte dişlerde pulpa boşluğunun daraldığı dikkati çekmektedir. İleri derecede degradasyonun söz konusu olduğu örneklerde de pulpa boşluğunun daraldığı ve zaman zaman yeterli miktarda pulpanın elde edilemediği görülmektedir. Degrade ya da antik örneklerde, kazıma aşamasında yeterli pulpa elde edilemediği düşünülen örnekler içinde DNA analizlerine pozitif sonuç verenler vardır. Burada, kullanılan PCR yönteminde 1 - 2,5 ng DNA'nın varlığı yeterli görülmektedir. Çalışmalarda, DNA miktar tayini sonuçları ile nanodrop cihazının sonuçları karşılaştırıldığında pozitif amplifikasyon sonuçlarının yüksek DNA konsantrasyonu ile ilgili olmadığı, miktardan çok kalitenin sorun olduğu varsayılmaktadır.

Diş örneklerinden DNA analizi gerçekleştirilirken farklı teknikler için farklı diş dokularından faydalanılması söz konusudur. Özellikle degrade ve antik örneklerden DNA için doku elde edilmesi gerektiğinde, sıvı nitrojen içinde bekletilen diş örnekleri ufalanarak toz haline getirilmektedir. Bu şekilde hem dentin dokusu hem de pulpa dokusunun içinde yer aldığı bir örnek elde edilebilmektedir. Bu sistemde, araştırmacılar arasındaki çalışma sırası doğal olarak öncelikle morfolojik ve metrik analizler olmalı, bu çalışmaların ardından DNA analizleri gerçekleştirilmelidir. Bu tip çalışmalar, antik ve ileri derecede degrade diş örneklerinin geri dönüşümsüz olarak yok edilmesine sebep olabilmektedir. Bu aşamada Cobb adlı araştırmacı geleneksel ufalama yöntemlerinin yerine, ters kök kanal sisteminin

kullanılması gerektiğini önermektedir (118). Bu sistemde dental kalıntılarda yıkım meydana gelmemekte ve kolayca DNA elde edilebilmektedir. Ters kök kanal sisteminde degrade ve antik dişlerin bir ön temizlik aşamasından geçirilmesinden sonra uygun büyüklükteki kanal aletleri ile apekten diş içine giriş yapılmaktadır. Bu işlemde mümkün olan en ince kanal aleti ile başlanmakta olup gittikçe artan kalınlıktaki kanal aletleri ile kanala giriş yeri genişletilmektedir. Genişletilen kanal giriş yeri sayesinde, kanal eğeleri yardımıyla doku örnekleri kazınıp steril tüplere aktarılabilmektedir. Bu yöntem ile yeterli amplifikasyon ürünü elde edilmektedir. Ayrıca bu teknikte, örneğin kanal içinden kazınarak alınması nedeniyle ufalama yöntemiyle karşılaştırıldığında kontaminasyon açısından daha avantajlı bir sistemle çalışıldığı da belirtilmektedir. Bu sayede, morfolojik çalışmalar yapan antropolog ya da arkeologlar ile moleküler çalışmalar yapan araştırmacılar multidisipliner olarak uyumlu şekilde çalışabilmektedir.

Bu sonuçlara göre, miktar olarak 1ng'dan daha yüksek konsantrasyonlarda DNA elde edilmesi halinde, amplifikasyondan pozitif sonuç alınması mümkün olabilmektedir. Ancak Nanodrop cihazındaki kalite göstergesi olan 230 ve 280 nm'lerdeki spektrofotometrik absorbanların, amplifikasyon sonuçlarını önemli bir oranda etkilemediği saptanmıştır. Düşük DNA konsantrasyonu ve protein kontaminasyonlarının olduğu durumlarda pozitif sonuç veren STR analizlerini en çok etkileyen faktörlerden birisinin DNA degradasyonu olduğu belirtilmektedir. Ancak, DNA'daki bu degradasyon spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmemektedir.

Eser miktarda DNA molekülünün elde edildiği degrade DNA çalışmalarında kullanılan PCR tekniği ön plana çıkmakta, bu teknik daha da büyük bir önem kazanmaktadır. Az miktarda DNA molekülü ile yapılan çalışmalarda PCR tekniğinin hassasiyetinin artırılmasına yönelik olarak, PCR döngü sayısının artırılabilceği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda kit protokollerinde belirtilen standart PCR döngülerine rağmen, prosedürler

modifiye edilerek döngü sayıları artırılmıştır. Ancak döngü sayısının arttırılmasının, kontaminasyon ve alel düşmesi olasılığını arttırdığı da göz önünde bulundurulmuştur. Çalışmamızda, kullandığımız yüksek sıcaklıklara maruz bırakılarak yakılmış örneklerde, kalite olarak düşük ve az miktardaki DNA amplifikasyonlarında bu gerçek göz önüne alınarak, hem üretici firmaların önerdiği ideal PCR şartları kullanılmış hem de bu PCR şartları modifiye edilerek döngü sayısı değiştirilmiş ve amplifikasyon başarısının arttığı gözlemlenmiştir. Özellikle Identifiler ve Minifiler kitleri içerisinde bulunan Amplitaq Gold DNA polimeraz enzimi 95°C’de belli bir süre bekletildikten sonra aktif hale geçebilmektedir (99-101). Bu da amplifikasyon koşulları tam olarak kurulmadan işleme başlanmasının ve spesifik olmayan bantların oluşmasının önüne geçmektedir.

Zorlu çevre şartlarına maruz kalan DNA örnekleri küçük fragmentlere ayrılmaktadır. Bu parçalanmada başlıca su ve nükleazların varlığının sorumlu olduğu bilinmektedir. Geçmişte kullanılan RFLP teknikleri çok miktarda parçalanmamış DNA örneği gerektirdiği için, bu şekilde degrade olup parçalara ayrılan örneklerden çoğu vakada sonuç elde edilememiştir. Ancak günümüzde kullanılan PCR tekniklerinde, herhangi bir biyolojik örnekten elde edilen DNA’nın içerisindeki parçalanmamış yapısını koruyan tek bir DNA molekülü bile kalıp görevini üstlenebilmektedir. Günümüzde adli olgularda kullanılan STR tekniklerinde çok küçük DNA parçaları kullanabilmektedir. Gerçekleştirilen çalışmalarda gen bölgesinin boyutu büyüdükçe, o bölgeden sonuç alma olasılığının da o kadar azaldığı ortaya konmuştur. Özellikle eser miktarda DNA içeren degrade örneklerle yapılan çalışmalarda, analiz edilen STR bölgesi ne kadar büyükse alel düşmesi olasılığının o kadar yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmalara göre, ileri derecede fragmente bir DNA örneği üzerinde gerçekleştirilen STR analiz sistemlerinde D18S51 ve FGA bölgelerinde diğer bölgelere göre daha fazla alel düşmesi olasılığı olduğu saptanmıştır. Bu açıdan 106-112 bp’lık iki alele sahip amelogenin bölgesinin, mevcut sistemlerde kullanılan diğer tüm STR bölgelerine kıyasla daha

başarılı amplifikasyon ortaya koyduğu gözlenmektedir. Bizim çalışmamızda benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Örneğin, Neolitik Bronz Çağı'na ait antik örneklerde gerçekleştirilen bir DNA analizi çalışmasında, amelogenin bölgesinin pozitif sonuç verme yüzdesinin %90'larda olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ilgili kişiye ait farklı kemik ve diş örneklerinde yapılan amelogenin amplifikasyon çalışmaları sonuçlarında birebir uyum olduğu saptanmıştır. Bu şekilde şüphe götürmeyen kesin bir cinsiyet tayini yapılabilmektedir. Bu çalışmada, X bandına yönelik alel düşmesinin önemli olmadığı belirtilmiştir. Ancak bilindiği üzere, Y bandının düşmesi yanlış bir takım yorumlamalara sebebiyet verebilmektedir. Ekstrem çevre koşullarına maruz bırakılan diş örnekleri ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada, çok bölgeli prob analizlerine uygun olmayan DNA örneklerinin tamamından olumlu cinsiyet sonuçları elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda yüksek derecede sıcaklıklara maruz bırakılan kemik ve diş örneklerinde amelogenin lokusunun profillemesi ile bireylerin cinsiyetleri tespit edilebilmiştir.

Eski ve uzun süre olumsuz çevre koşullarına maruz kalmış örneklerde DNA analizlerinin başarısı, DNA molekülünün ne derece degrade olduğuna, kontaminasyon olup olmadığına ve PCR inhibitörlerinin varlığına bağlıdır. Adli olaylarda, DNA analizi amacıyla ileri derecede degrade örneklerle çalışılırken diş örneklerinin tercih edilmesi kaçınılmazdır. Diş, DNA'nın bulunduğu pulpayı çevresel bozulma etkilerinden koruyan, doğal mineralize sert dokularla kaplıdır. Ortamda PCR inhibitörleri bulunsa da diş örnekleri daha olumlu sonuçlar vermektedir (12).

PCR tekniği, düşük miktarda DNA örnekleri ile çalışmaya uygun hassas bir sistem olup, genellikle bu hassasiyet sistemin dışarıdan kolayca kontamine olma olasılığını ortaya çıkarmaktadır. Olası bu kontaminasyon riskini engellemek için, olay yerinden örnek elde edilirlen olay yeri örnek toplama prosedürlerine dikkat edilmesi yanında, örneklerin çalışılacağı laboratuvar şartlarında kontaminasyon açısından titizlikle düzenlenmesi önem taşımaktadır.

Bahsedildiği gibi, kemik ve diş dokuları dışarıdan gelebilecek olası kontaminantlara karşı diğer dokulara göre nispeten daha korunaklı bir bölge ortaya koymaktadır. Morfolojik yapıları gereği kemik ve dişlerin üzerinde kontaminantların uzaklaştırılması da daha kolaydır.

Çalışmamızda tüm laboratuvar aşamalarında, standartlar dikkate alınarak kontaminasyonu önlemeye yönelik gerekli önlemler alınmıştır. Ayrıca, kemik örneklerinin ameliyathane ortamlarından ve diş örneklerinin kliniklerden toplanma aşamalarında da olası kontaminantlar elimine edilmeye çalışılmıştır. Laboratuvar aşamasına geçildiğinde üzerinde önemle durulan nokta, örneklerin DNA çekitleme aşamasına alınmadan önce olası dış kontaminantlardan mümkün olduğunca temizlenmesi olmuştur. Temizlik aşamasında sodyum hipoklorit (NaOCl) kullanımının bazı dezavantajları olabileceğini söyleyen çalışmalar olsa da çoğu çalışmada NaOCl kullanılması nedeniyle, bizim çalışmamızda da örneklere yapılan ön işlem sırasında NaOCl kullanılmıştır. Örnekler, Ricaut'ın 2005 yılına ait bir çalışmasında önerdiği şekilde UV ışık altında 1 saat süreyle tutulmuştur (119).

Degrade DNA analizleri ile ilgili çalışmalarda kontaminasyon varlığını kontrol etmek için, bireye ait farklı örneklerden birden fazla DNA çekitlemesi yapılması önerilmektedir. Bizim çalışmamızda kontrol amaçlı her olguya ait ağız sürüntüsü örnekleri kullanılmıştır. Degrade DNA analizlerinde hedef DNA bölgesinin farklı derecelerde bozunmaya uğrayıp fragmente olması, eser miktarlarda bulunması ve bu tip analizlerin yüksek kontaminasyon riski taşıması nedeniyle çalışmanın güvenilirliğinin anlaşılması son derece güçtür. Özellikle 200 bç'den daha uzun olan bölgelerin çoğalması, degrade DNA'nın başka bir DNA ile kontamine olmuş olabileceğini gösterebilmektedir. mtDNA sekans analizi gerçekleştirilen bir çalışmada da antik diş örneklerinden 200 bç'den daha uzun olan bir bölgenin sekans analizinden sonuç almanın güç olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda tüm örneklerde özellikle amelogenin ve D8S1179 lokus bölgesinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Amelogenin lokusunun bir aleli 106 bç iken, diğeri 112 bç uzunluğundadır. D8S1179 gen

lokusunun farklı alelleri de 123 ve 153 bp uzunlukları arasında değişen PCR ürünleri elde edilmesini sağlamaktadır. Her iki durumda da elde edilen ürünler 200 bp uzunluğu geçmemekte ve bu da modern DNA ile kontaminasyon riski ihtimalini elimine etmektedir.

Kontaminasyona yönelik stratejiler dikkatli bir şekilde gerçekleştirildiğinde, kemik ve diş örneği ile ilgili çalışmalarda dış DNA kontaminasyonu riski, diğer örneklerle göre daha rahat önlenelirdir. Laboratuvar öncesi olası kontaminantlardan arındırma aşamalarının dikkatli bir şekilde uygulanması ve sonrasında laboratuvarda aşamasında da kontaminasyona yönelik gerekli önlemlerin alınması analizleri büyük ölçüde güvence altına almaktadır. Degrade DNA örneklerinden bahsederken en önemli kontaminasyon riski, daha önce analiz edilmiş DNA'nın ya da analizi yapan kişiye veya diğer laboratuvar çalışanlarına ait PCR ürünleri ile meydana gelen kontaminasyondur. Bu tip PCR ürünleri ile kontaminasyonlar laboratuvar içerisinde alınacak önlemlerle ortadan kaldırılabilmektedir. Kontaminasyon analizi ile ilgili bir çalışmalarda, kontaminasyonun basit dikkatsizliklerle ortaya çıkan bir durum olmaktan ziyade, belirgin önemli hatalar sonucu meydana geldiği ortaya konmaktadır. Bu çalışmalarda, DNA örnekleri ve PCR ürünlerinin tüpleri dondurucuda açık olarak bekletilmiş, buna rağmen örnekler arasında bir kontaminasyonun meydana gelmediği gösterilmiştir. Degrade biyolojik örnekler ve antik örneklerle yapılan çalışmalarda örnekler içerisindeki DNA miktarı o kadar düşüktür ki kendi içlerinde birbirlerini kontamine etme olasılıkları son derece düşüktür. Bu tür örneklerle gerçekleştirilen DNA çalışmalarında önemli problemler olarak sıralanan kontaminasyon, PCR inhibitörleri ve DNA degradasyonu arasında, önlem alınamayan ve engellenemeyen en büyük problem esasen DNA degradasyonu olarak görülmektedir. Kontaminasyon DNA analiz laboratuvarlarında her zaman önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır, ancak sistematik bir takım önlemlerle bu sorunu büyük ölçüde ortadan kaldırmak mümkündür. Bu önlemler arasında en önemlileri şu şekildedir; Laboratuvarda çalışan personel, kendi biyolojik örnekleri ile delil niteliğindeki materyalleri

kontamine etmemek için koruyucu tek kullanımlık kıyafet, maske, boneler ve eldiven kullanmalıdır.

DNA'nın çoğaltılmasından önceki işlemler ile çoğaltma sonrası işlemler birbirinden ayrılmalı, gerçekleştirildikleri bölgeler fiziki olarak birbirinden ayrılmalıdır.

PCR'dan önce ve PCR'dan sonraki işlemlerde kullanılan laboratuvar ekipmanları farklı olmalıdır.

Tüm reaksiyonlar sterilize edilebilir olan laminar hava akımına sahip bir kabin içerisinde gerçekleştirilmelidir.

Sıvı transferi nedeniyle meydana gelebilecek kontaminasyonu engellemek için steril filtrelili pipet uçları kullanılmalıdır.

Analizlerin gerçekleştirildiği alanlar her analizen sonra UV ışığı ve %10'luk hipoklorit çözeltisi kullanılarak sterilizes edilmelidir.

Amplifikasyon aşamasında negatif kontrol örnekler de çalışılmalıdır. Bizim çalışmamızda da negatif ve pozitif kontrol örnekleri kullanılmıştır.

Laboratuvarda çalışanlarının DNA profili çıkartılmalı ve analiz edilen örneklerde bu kişiler tarafından gerçekleştirilmiş herhangi bir kontaminasyon olmadığı kontrol edilmelidir. Çalışmamızda tüm bu koşullar yerine getirilmiştir.

İkinci önemli sorun olan PCR inhibitörlerinin varlığı da etkin bir çekitleme ve saflaştırma yöntemi ile ortadan kaldırılabilir. Yakın geçmişe ait çalışmalarda, degrade DNA örneklerinin çeşitli endonükleazlarla onarıldıktan sonra analizlenmesi gerektiği önerilmektedir. Literatürde bu tür çalışmaların sayısının artırılması ve özgün PCR ürünü elde edilmesi açısından değerlendirilmesi, şüphesiz DNA degradasyonu sorunu açısından olumlu bir ilerleme sağlayacaktır.

Günümüz teknolojisinde bir damla tükürük, kan, sperm veya herhangi bir biyolojik sıvı veya doku örneği ya da tek bir saç teli kullanılarak adli olayla ilgisi olan bir kişi için

genetik kimliklendirme yapılabilmektedir.

Adli bir olgu ile ilgili olarak olay yerinde bulunan herhangi bir insan kalıntısı için kimliklendirme yapılması, mağdurun yakınları arasında mirasın paylaşılması ya da sigorta şirketlerinden tazminat alınması gibi durumlar açısından son derece önemlidir. Savaş ve terör gibi patlama olaylarının yaşanabildiği vakalar ile araç ve uçak gibi motorlu taşıt kazaları durumlarında olaya dahil olan kişi veya kişilere ait kalıntılar genellikle parçalanmış ve birbirilerine karışmış olarak bulunmaktadır. Bu yüzden, geleneksel yöntemler olarak bildiğimiz parmak izi karşılaştırması, kişinin üzerinde bulunan dövme veya doğal izlerin yakınlarınca sorgulanması ya da antemortem ve/veya postmortem diş kayıtlarının değerlendirilmesi çoğu zaman kimlik tespiti amacıyla kullanılamamaktadır. Sonuç itibarıyla, kimlik tespiti amacıyla DNA analiz yöntemlerini kullanacak adli genetik uzmanlarına başvurulmaktadır. Dişler, iki çene kemiği, dil ve yapılarındaki mine sayesinde, bu tür kasıtlı veya kazaen gerçekleşen olaylarda son derece değerli bir DNA kaynağı olarak kabul görmektedir. Diş dokusu yapısında bulunan mine, diş insan vücudundaki en sert doku haline getirmekte ve son derece olumsuz çevre koşullarında bile dişlerin korunmuş ve eksiksiz bulunmasını, nem, yüksek ısı, bakteri ve mantar üremesi gibi durumlarda DNA'nın bozunmasına karşı doku direnci sağlamaktadır.

Bu çalışmada, yaşları 18 ve 71 arasında değişen ve aydınlatılmış onamları alınan, 28 erkek ve 22 kadın olmak üzere 50 kişiden toplamda 100 kemik, diş ve ağız içi sürüntü örneği toplandı. Toplanmış olan tüm örneklerden İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü Öğrenci Laboratuvarı ve Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda DNA çekitlemesi ve profillemeye yapıldı. Adli olgularda delil niteliğindeki örneklerden DNA çekitleme, örneklerin çevresel koşullara bağlı olarak bozulması, örnek türlerinin çeşitliliği, kontaminasyona neden olan PCR inhibitörlerinin varlığı veya kısıtlı miktardaki başlangıç materyali gibi sebeplerden ötürü zorlu bir süreçtir.

Çalışmamızda kullanmış olduğumuz ticari DNA çekitleme kitlerinin her biri, örneklerden DNA eldesi sırasında iyi sonuçlar vermiş, DNA'nın kolay ve hızlı elde edilmesini sağlamıştır. Bu çekitleme yöntemleri arasında verimlilik açısından en uygun olanının belirlenmesi bu çalışmanın temelini oluşturmuştur. Chelex çekitleme yöntemi diş ve kemik örneklerinin yapısı sert olsa da fenol kloroform izoamil alkol yöntemi ise uzun sürmesi, kontaminasyon riski, kanserojen olması ve analizi gerçekleştirenlerin sağlığı açısından riskli olmasına rağmen diğer yöntemlerle karşılaştırma yapılabilmesi açısından gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen çekitleme çalışmaları sonucunda kemik ve diş örnekleri ile ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen DNA miktarlar tablolar halinde verilmiştir. Elde edilen verilere göre diş örneklerinde en düşük düşük 0,02 ng/μL, en yüksek 5,67 ng/μL olarak bulunmuştur. Kemik örneklerinde elde edilen DNA miktarları ise sırasıyla en düşük 0,041 ng/μL ve en yüksek 13,48 ng/μL'dir. Kontrol amaçlı kullanılan ağız içi sürüntü örneklerinde ise en yüksek 90,52 ng/μL en düşük ise 21,00 ng/μL DNA elde edilebilmiştir. Pötsch ve ark. tarafından 1992 yılından gerçekleştirilen bir çalışmada, uzun süre oda sıcaklığında bekletilen diş örneklerinden elde edilen toplam DNA miktarlarının 6 μg/mL ile 50 μg/mL arasında olduğu belirtilmiştir (120).

Diş ve kemik gibi insan kalıntılarından kişinin genetik olarak kimliklendirilmesini sınırlandıran yangın ve yüksek sıcaklıklara maruz kalma gibi baş dış kaynaklı bir takım çevresel faktörler söz konusudur. İleri derecede yanmış ve yumuşak dokunun elde edilemediği insan kalıntılarından genetik parmakizi ile kimliklendirme rutin adli kimliklendirmede son derece önem taşımaktadır. Sıcaklığın ekstrem derecelere ulaştığı yangın vakalarında DNA analizi amacıyla sadece sert dokular olarak bildiğimiz kemik ve dişler kalmaktadır. Özellikle diş kimyasal ve fiziksel yapısı nedeniyle daha dayanıklı bir doku olup, sayı itibarı ile fazla olması sayesinde de genetik materyalin korunduğu ve adli olgularda önemli bir delil niteliğindedir.

Tablo 9 ve 10, 50°C ile 1000°C arası sıcaklıklara maruz bırakılan kemik ve diş örneklerine ait elde edilen DNA miktarlarını göstermektedir. Analiz sonuçlarına göre DNA miktarları 0,02 ila 5,65 ng/μL arasında değişmiştir. Toplam 25 yanmış diş örneğinin 6 tanesinde (%24) elde edilen DNA ölçüm miktarı sonucunun 0,05 ng/mL'nin altında olduğu belirlenmiştir. Silva ve ark.'nın 2012 yılında yaptıkları çalışmada elde edilen sonuçlar da çalışmamızdaki sonuçlara benzerlik göstermiştir (121). Bu araştırmacılar, DNA çekitleme ve analiz prosedürlerinin standardizasyonuna katkı sağlamak üzere, yanmış bir insan simülasyonu oluşturmak amacıyla diş örneklerini yüksek ısılara maruz bırakmış ve elde ettikleri DNA örneklerini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, örneklerin doğrudan 600, 800 ve 1000°C gibi yüksek sıcaklıklara maruz bırakılması başarılı DNA amplifikasyonu ortaya koymamış, elde edilen DNA konsantrasyonu sonraki analiz için uygun olsa da, bu yüksek sıcaklıklara maruz bırakılan diş örneklerinden PCR ürünü elde etmeleri mümkün olmamıştır.

Yapılan başka bir çalışmada, diş örneklerini 60 dakika boyunca 200, 400, 500 ve 600°C gibi sıcaklıklara maruz bırakarak üç farklı çekitleme yöntemini karşılaştırmıştır. Kullandığı örneklerden 200°C ve 400°C sıcaklığa maruz bıraktıklarının yarısında genomik DNA çekitlemede başarılı olurken, daha yüksek sıcaklıklarda yalnızca gerçekleştirdiği yöntemlerden birinde mtDNA çekitlemesinde başarı elde edebilmiştir (120).

DNA miktarlarının belirtildiği tablo incelendiğinde özellikle 0,5 ng/mL ve altındaki DNA miktarlarının, yüksek sıcaklıklara bağlı aşırı derecede degrade olmuş örnekler ve/veya her ne kadar diş örnekleri toplanırken kanal tedavisi görmemiş olmalarına dikkat edilse de, çürük ve amalgam dolgulu olabilecekleri öngörülmüştür.

Aynı kişide genellikle sağlıklı ve bütünlüğü bozulmamış, çürüklü ve endodontik kök dolgulu olmak üzere farklı kalitelerde dişler mevcut olabilmektedir. Endodontik dolgu işleminde, çekirdek DNA'sının esas kaynağı olan pulpa dokusu ve dentinin iç tabakaları çıkarılıp yerine

evre dokular ile uyumlu termoplastik endodontik dolgu maddesi konulmaktadır. Bu şekilde, kötü evre koşullarına karşı dentinal tübüller içinde yer alan odontoblast hücrelerinin devamlılığı sağlanmaktadır. Corte-Real ve ark.'nın 2006 yılında endodontik di örneklerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, endodontik tedavi görmüş di örneklerinde de STR profilleri elde edilebileceği gösterilmiştir (122). Sonuç olarak dişler adli kimliklendirme olaylarında son derece önemli örneklerdir.

Çalışmamızda kullandığımız kemik ve diş rnekleri, DNA ekitlemeleri yapıldıktan sonra AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit, AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit ve GlobalFiler™ PCR Amplification Kit kullanılarak sırasıyla 8, 16 ve 24 STR lokusu PCR ile çoğaltılmıştır (99-101). rneklerimizin tümü aşır derecede degrade örneklerden oluştuğu için, muhtemel PCR inhibitörleri ve yabancı DNA olasılıklarına karşı saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla EMD miliAmicon Ultra-4 santrifüj filtreleri ve farklı ticari kitler kullanılmıştır. Kemik ve diş örnekleri gibi zorlu, ve evre koşullarına bağlı olarak degradasyonu uğrayan örneklerde, DNA analizi aşamasında amplifikasyon sonuçlarının optimize edilmesi ve olası inhibitör aktivitelerinin azaltılması gerekmekte, bu yüzden ek saflaştırma işlemi uygulanmaktadır. Özellikle dişler çok sert ve mine tabakası ile korunmuş olsa da inhibitörlere karşı geçilemez değildir ve pulpadaki DNA'nın ileri derecede degradasyonu inhibisyona neden olabilmektedir.

PCR saflaştırma aşamasından sonra, elde edilen PCR rnleri ABI 3130 Kapiler Elektroforez cihazında yürütülmüş, elektroforegramaki pikler analiz edilmiş ve ortaya çıkan STR profilleri Bulgular bölümünde şekiller halinde gösterilmiştir. Bu şekillerde ortaya konan STR profilleri ile olgulardan kontrol amaçlı toplanan ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen profillerle karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda yakılmış diş örneklerinden elde edilen profilere bakıldığında, Identifiler kiti ile yakılmış olan toplam 25 örnekten 19 tanesinde 16 STR lokusuna ait tam

profil, 1 tanesinde tam olmayan profil gözlenmiş ve 5 tanesinde hiçbir sonuç alınamamıştır. Minifiler kiti ile yakılmış olan toplam 25 örnekten 19 tanesinde 8 STR lokusuna ait tam profil, 1 tanesinde tam olmayan profil gözlenmiş ve 5 tanesinde hiçbir sonuç alınamamıştır. Globalfiler kiti ile ise yakılmış olan toplam 10 örnek çalışılmış ve 4 örnekte 24 STR lokusuna ait tam profil, 1 tanesinde tam olmayan profil gözlenmiş ve 5 tanesinde hiçbir sonuç alınamamıştır.

Çalışmamızdaki yakılmış kemik örneklerinden elde edilen profillere bakıldığında, Identifiler kiti ile yakılmış olan 25 örnekten 15 tanesinde 16 STR lokusuna ait tam profil, 5 tanesinde tam olmayan profil gözlenmiş ve 5 tanesinde hiçbir sonuç alınamamıştır. Minifiler kiti ile yakılmış olan toplam 25 örnekten 15 tanesinde 8 STR lokusuna ait tam profil, 5 tanesinde tam olmayan profil gözlenmiş ve 5 tanesinde hiçbir sonuç alınamamıştır. Globalfiler kiti ile ise yakılmış olan toplam 10 örnek çalışılmış ve 4 örnekte 24 STR lokusuna ait tam profil, 1 tanesinde tam olmayan profil gözlenmiş ve 5 tanesinde hiçbir sonuç alınamamıştır.

Çalışmamızla paralel sonuçlar ortaya koyan Corte-Real ve ark.'nın yaptığı çalışmada, yakma dahil farklı çevresel koşullara maruz bırakılan toplam 30 diş örneğinde, ekstrem derecelerde sıcaklıklara maruz bırakılan örneklerde STR profillerine ulaşılamamış ve sonuç itibarıyla mtDNA ile çalışmanın çekirdek DNA'sı ile çalışmaya göre daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

Gleisner ve ark.'nın 2004 yılına ait mtDNA ile yaptıkları bir çalışmada, dentin tozu örnekleri kullanılmasına imkan veren yöntem ile mtDNA dizileri elde edilebilmesi diş tipi, kullanılan dentin toz miktarı, dişlerin tedavi görüp görmediği, kalıntıların bulunduğu ortam koşulları gibi birçok değişken faktör açısından değerlendirildiğinde, ilk sonuçlar, mtDNA dizilerinin kimliklendirilmede kullanılabilmesi için, diş örneklerinin bozulmamış durumda olmak zorunda olmadığını ortaya koymuştur (123).

Literatürdeki birçok çalışmada, DNA profili elde edilebilmesi için sadece DNA miktarının değil, aynı zamanda DNA'nın saflığı ve kalitesinin de önemli olduğu vurgulanmıştır. Olay yerinde cesede ait diş ve kemik kalıntıları, bol miktarda kaliteli DNA sağlamakta, bu tip örnekler DNA analizinde büyük avantaj sağlamaktadır. Özellikle diş, diğer vücut kısımları ile karşılaştırıldığında mükemmel kalitede bir DNA kaynağıdır ve tüm adli olgularda kullanılabilir.

Tilatta ve ark. yaptıkları bir çalışmada, diş örneklerini ezerek toz haline getirmiş, bu diş örneklerinin dış yüzeylerini delip endodontik giriş tekniği ile pulpalarını çıkartmış ve elde ettikleri DNA miktarını ve profillerini karşılaştırmışlardır (124). Toz haline getirdikleri bu diş örneklerinde 32 örnekten 3'ünde tam profil (%9) elde etmiş, 24 örnekte ise (%75) hiç profil elde edememişlerdir. Endodontik olarak delinerek pulpaları çıkarılan diş serisinde ise 32 örnekten 24'ünde tam profil elde ederek %75 başarı sağlanmıştır.

Alakoç ve ark.'da yaptıkları çalışmada, "orthrograte entrance" yöntemini kullanarak 72 antik örnekten 58 tanesinde yani %80,1 oranında çekirdek DNA'sı amplifikasyon ürünleri elde etmişlerdir (125). Bu araştırmacılar kullandıkları yöntem ile antik diş örneklerinin morfolojik yapılarına zarar vermemişlerdir. Bu iki çalışmaya göre, diş örneklerinden DNA çekitleme aşamasında, diş örneklerinin maruz kaldığı çevresel koşullar ile dişe uygulanan tekniğin de çok önemli olduğu ortaya konmuştur.

Bahsedilen bu çalışmalara ilaveten, literatürdeki diğer çalışmalar (Pinchi ve ark. 2011) değerlendirildiğinde, çekitleme işlemi öncesi, örneklerin toz haline getirilmesi için uygulanan yöntemin çalışmanın başarı oranını etkilediği öngörülmektedir (126). Ancak çalışmamızda mevcut cihaz ve aletlerin yetersizliği nedeniyle, endodontik delme tekniği uygulanamamıştır.

Çalışmamızda kontrol amaçlı olarak kullandığımız ağız içi sürüntü örneklerinde eksik veya hiç çıkmayan STR profilleri ile karşılaşılmamıştır. Bu durumun, toplanan ağız içi sürüntü örneklerinin çekitleme aşamasına kadar gereken koşullarda saklanmasına ve

çekitleme aşaması sonrası elde edilen DNA izolatlarının da yine uygun koşullarda saklanmış olmasına bağlı olduğu görülmüştür.

Ayrıca tercih edilen kemik örneklerinin özellikle kompakt kemikler olması ve diş örneklerinin endodontik dolgulu ve/veya çürüklü olmamaları, toplanmaları sırasında kontaminasyonun minimuma indirilmesi ve bu örneklerden DNA çekitlenmesi için en uygun yöntemin seçilmesi gibi koşulların çalışmanın başarı oranı üzerinde etkili olduğu varsayılmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda, literatürdeki yayınlara paralel olarak, adli bilimlerde belirli ısı derecelerine kadar yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmış kemik ve diş örneklerinin uygun saklama koşullarına dikkat edilmesi halinde kimliklendirme amaçlı kullanılmasının mümkün olduğu görülmüştür.

Suçlu ve suç potansiyeli olan kişilerin her geçen gün kendilerini geliştirdikleri çağımızda, mevcut suçla mücadele yöntemler yeniliklere açık olmalıdır. Bertillon tarafından geliştirilen antropometrik sistem ve sonrasındaki parmakizi uygulamaları ile devam eden süreç, günümüzde birçok alt disiplinin katılmasıyla yeni bir boyut kazanmış ve nihayetinde adli bilimler kavramı ortaya çıkmıştır (2).

Kemik ve diş dokularının yüksek ısı, nem ve mikroorganizma aktivasyonu gibi çevresel koşullara dayanıklılığı, ceset çürümede uzun bir süre boyunca yapısal özelliklerini korumaları ve yanı sıra mağdura ait birtakım kişisel özellikleri ortaya koymaları nedeniyle bu dokular kimliklendirmede önemli bilgiler sağlamaktadır (6,7,8).

Özellikle diş dokusu etrafını çevreleyen epitel, bağ, kas ve kemik dokuları sayesinde dış ortamın olumsuz etkilerine karşı oldukça korunmuştur ve başta pulpa olmak üzere sementum, dentin ve periodontol ligament, DNA analizi için STR olarak bilinen Kısa Ardışık Tekrarlar açısından oldukça zengin yapılar olarak karşımıza çıkmaktadır. Kemik ve diş, cesedin çürümesinin üzerinden uzun yıllar geçse bile, diğer dokulara göre DNA'nın en iyi korunduğu

dokulardır (9- 11).

Genetik kimliklendirmede önemli bir delil olan kemik ve dişler farklı ortam koşullarına maruz kalabilmektedir. Yangın gibi ceset bütünlüğünün ileri derecede bozulduğu olaylarda, yanmış kemik ve diş kalıntılarından kimliklendirme amacıyla DNA'nın çekitlenerek bir profil elde edilmesi ile ilgili olarak literatürde çok sayıda çalışma mevcut olmasına rağmen, özellikle yüksek ve ekstrem derecede ısılara maruz kalmış diş ve kemik dokularında mevcut DNA çekitleme yöntemlerini karşılaştırarak uygulanabilirlik ve diğer faktörler açısından en uygun yöntemi belirlemeye çalışan kapsamlı bir araştırma mevcut değildir (11-16). Bu bilgiler temel alındığında, olay yerinde idantifikasyon amacıyla yalnızca yanmış ve aşırı derecede degrade olmuş kemik ve diş örneklerinin elde edilebileceği adli olgular söz konusu olabilmektedir.

Patlayıcı ile gerçekleştirilen kitlesel ölüm olayları, intihar girişimleri, araba ya da uçak ile gerçekleşen araç kazaları, ev tipi yangınlar veya bir suçu gizlemeye yönelik kasıtlı olarak gerçekleştirilen aşırı derecede ısının ortaya çıktığı yangın olaylarında, DNA analizi amacıyla olay yerinde sadece sert doku olarak bildiğimiz kemikler ve dişler kalmaktadır. Yanmış olan kemik parçalarından ve dişlerden çekitlenen DNA, genetik belirteçlerin amplifikasyonunu zorlaştıracak ve hatta imkansız hale getirecek şekilde aşırı derecede degrade olmuş olabilmektedir. Ayrıca, yanmış olan kemik ve dişler dış kaynaklı DNA kontaminasyonuna da oldukça açıktır.

Bir vücut yandığında, deri dokusu kısmen veya tamamen yanar ya da tamamen yok olur. Isı nedeniyle maruz kalan kas dokusunda da sıklıkla rüptür ve bozunma görülür. Aynı şekilde yüzdeki yumuşak doku da yanar ve kafatası açığa çıkabilir. Bu nedenle kişi görsel olarak tanımlanamayabilir. Eller ve ayaklar da yandığı için parmak izi analizi de yapılamayabilir. Antemortem diş kayıtları ve parmak izleri mevcut olmayabilir. Bu durumda kalıntıların idantifikasyonu amacıyla sadece genetik analiz seçeneği kalmaktadır.

Çalışmamızda, farklı derecelerde ısılara maruz bırakılan iyi korunmuş, yarın yanmış, siyah renkte yanmış, mavi-gri renkte yanmış ve mavi-gri-beyaz renkte yanmış kemiklerde, farklı DNA çekitleme yöntemlerini karşılaştırıp, yeni modifiye bir çekitleme yöntemi geliştirmeyi ve özgün DNA profilleri elde edilip edilemeyeceğini belirlemeyi amaçladık.

Bu örneklerden DNA çekitlemesi ve başarılı PCR amplifikasyonunun halihazırda zorluğunu sürdürmesi, bazı yöntemlerin komplike ve zaman alıcı olması, henüz herhangi bir yöntemin rutinde kullanılacak bir kabul düzeyine ulaşmaması nedeniyle, bu çalışmada mevcut yöntemler arasında kullanıma en uygun olanı belirlemeyi ve çeşitli modifikasyonlarla daha iyi bir yöntem geliştirmeyi amaçladık. Yanmış diş ve kemik kalıntılarında DNA çekitlemesi ve başarılı PCR amplifikasyon olayın aydınlatılması açısından hayati önem taşıyıp, mevcut yöntemlerin yeterli ve tatmin edici olmaması nedeniyle özellikle zordur. Yöntemlerin çoğu komplike ve zaman alıcıdır ve hiçbir yöntem rutinde kullanılabilecek düzeye ulaşmamıştır. Adli laboratuvarlarda gerçekleştirilen kemik çekitleme protokolleri, özellikle kemiklerin uzun bir süre boyunca çevresel koşullara maruz kaldığı olaylarda tekrarlanabilir ve çoğaltılabilir sonuçlar verememesi nedeniyle sınırlıdır (35).

Çalışmamızda femur, humerus, tibia, kosta gibi farklı kemikler ile büyük ve küçük azı dişleri, kesici dişler ve köpek dişleri gibi farklı diş örnekleri kullanılmıştır. Hangi tip kemiğin en iyi kalitede ve en fazla DNA'yı verdiğini doğrulamak amacıyla, maruz bırakıldıkları ısı derecelerini de değerlendirerek, kemiklerden DNA çekitlemesine yönelik yarı-standardize bir protokol oluşturduk. On farklı DNA çekitleme yöntemini değerlendirerek ve düşük miktarda kemik tozundan başlayarak (50-100 mg) insan iskelet kalıntıları ve dişlerinde elektroforetik ürünlerin kalite açısından bir karşılaştırmasını gerçekleştirdik. DNA çekitlemesi amacıyla konvansiyonel fenol-kloroform organik yöntemine ek olarak, QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Almanya), DNA IQ™ System (Promega, Milan, İtalya) ve Genorise Bone DNA Extraction Kit (Genorise Scientific, PA, ABD), HiPurA™ Bone DNA Extraction Kit

(HiMedia, India) ve Stratec Invisorb Spin Forensic Kit (Stratec Biomedical AG, Almanya) olmak üzere beş farklı ticari kitin etkinliğini ve verimliliğini değerlendirdik. Ayrıca, deneysel çalışmalarımızda, esas amacımız olan ve örnekleri daha iyi saflaştırmak amacıyla fenol-kloroformun kullanıldığı ve DNA'nın proteinler ve atık materyalden uzaklaştırıldığı yeni geliştirdiğimiz modifiye bir protokolü de gerçekleştirip diğer çekitleme yöntemleri ile karşılaştırdık. Modifiye protokolde yeni aşamayı, farklı kit solüsyonlarını lizis tamponu içinde inkübe ederek gerçekleştirdik. Fenol-kloroform aşaması, yakılan örneklerde atık materyalin kolonlar veya manyetik boncuklarla etkileşmesini önleyerek örneklerin temizlenmesini sağladı. Tüm örnekler, adli genetikte sıklıkla kullanılan AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD), AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, ABD), Stratec Invisorb Spin Forensic Kit (STRATEC Biomedical AG, Almanya), GeneMATRIX Bone DNA Purification Kit (EURx Ltd., Polonya) ve HiPurA™ Bone DNA Purification Kit (HiMedia, Hindistan) çoğaltıldı.

Yeni DNA çekitleme yöntemlerinin geliştirilmesi ve mevcut ticari kitlere ilaveten artan miniSTR sayısı, adli bilimlerde aşırı derecede degrade örnekler için etkili bir çözüm olabilir. Belirli süreler boyunca belirli sıcaklıklara maruz bırakılan düşük miktarlardaki taze kemik ve diş örnekleri için fenol-kloroform kullanımına dayanan DNA çekitleme protokolünün uygulanması beklenen iyi sonuçları vermiştir.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmadaki amaç, bir yangın simülasyon ortamı oluşturarak düşük, orta, yüksek, çok yüksek ve ekstrem derecede ısılara maruz bırakılan kemik ve diş dokularında literatürdeki mevcut DNA çekitleme yöntemlerini karşılaştırıp, DNA elde edilmesi, çoğaltılması ve bu DNA'lardan STR profilleri çalışılması ile kişilerin kimliklendirme başarısının karşılaştırılması ve nihayetinde rutinde kullanılabilecek daha iyi

bir yöntem geliştirebilmektir.

Adli olguların aydınlatılmasında, yanmış olan kemik ve diş kalıntılarında mağdurun kimliğinin belirlenmesi için değerli bilgilerin elde edilmesi kritik önem taşımaktadır. Kemik ve dişler yandıklarında hem fiziksel hem de kimyasal özellikleri önemli değişiklikler göstermektedir. Bu durum sonuç itibarıyla, başarılı antropojik değerlendirmeleri ve DNA profillemelerini büyük ölçüde engellemektedir. Isı, maruz kalınan sıcaklık derecesine bağlı olarak, kemik ve dişlerin idantifikasyonunda zorluklara neden olur. Bu nedenle, yanma esnasında kemik ve dişlerde meydana gelen değişimler ile, gözlem ve test sonuçlarının doğru değerlendirme üzerine olan etkileri ile ilgili ayrıntılı bilgilerin bilinmesi ve bu bilgilerin belli bir sıra dahilinde kullanılması gerekmektedir.

DNA'nın azalmış olan kalite ve kantitesi nedeniyle yanmış kemiklerden DNA çekitlenmesi adli bilimlerde daima zorlu bir süreç olmuştur ve bu zorluğunu hala sürdürmektedir. DNA'nın aşırı derecede degradasyonu ve PCR inhibitörlerinin varlığı, özellikle yanmış kemiklerden DNA idantifikasyonunu son derece komplike hale getirmektedir. Yangın, patlama, araba ve uçak kazaları ve diğer travmatik olaylarda elde edilen örneklerden geleneksel yöntemlerle DNA'nın tiplendirilmesi oldukça zordur.

Kitlesel ölüm olayları, savaşlar veya sosyo-politik olaylar gibi farklı durumlarda kayıp kişilerin ya da bilinmeyen kalıntıların tiplendirilmesi ve soybağının belirlenmesi için mevcut tek biyolojik materyal sıklıkla sadece insan kalıntıları olmaktadır. Kemikten çekitlenen DNA sıklıkla düşük kopya sayısı (Low Copy Number-LCN) halinde mevcut olup, kemiğin iç ve dış özelliklerinden kaynaklanan kimyasal ve fiziksel bir takım hasarlar nedeniyle farklı degradasyon aşamalarında bulunmaktadır. Etkili DNA çekitleme prosedürleri ve yanı sıra doğru DNA amplifikasyonu, iskelet kalıntılarının başarılı DNA analizinde kritik aşamalardır. Kemik içindeki heterojeniteye bağlı DNA'daki varyasyonlar nedeniyle, yanmış kemiklerde olduğu gibi aşırı derecede degrade olmuş örneklerden DNA'nın elde edilebileceği tek

güvenilir bir yöntem maalesef hala mevcut değildir. Bu çalışma ile yeni bir çekitleme yöntemi geliştirilerek adli bilimlerde rutinde kullanılmak üzere önerilmiştir.



7. Kaynaklar

- 1) Eckert W.G., Bernstein M. Introduction to Forensic Sciences. (2nd ed.) Forensic Odontology. 1992;295-342.
- 2) Tuğ A., Doğan Y., Hancı H. Kriminalistik Kriminoloji Değildir. Ankara Barosu Dergisi. 2002;2:175-181.
- 3) Moenssenaa. Fingerprint Techniques. Chilton Book Co. 1983;17.
- 4) De Forest P.R., Gaensslen R.E., Lee H.C. Forensic Science; An Introduction to Criminalistics. McGraw-Hill Inc. New York. 1983;4-15.
- 5) Zonderman J. Suç İzlerinin Ötesinde. Phoenix Yayınevi. Ankara. 2001;85-89.
- 6) Gustavson G. Dental Identification, Forensic Odontology. Staples Press, London, 1996
- 7) Yaşar F., Hancı H. İ., Afşin H. Dişlerin İncelenmesinin Adli Yönden Önemi, Adli Tıp ve Adli Bilimler, Seçkin Yayınevi, Ankara. 2002;213-231
- 8) Afşin H, Günce E. M. Adli Diş Hekimliği Açısından Olay Yeri İncelemesi, Adli Tıp Dergisi. 2002;24:94-106
- 9) Mayal S.S, Agarwal P, Vashist P. Dental DNA Finger-printing in Identification of Human remains. Annals of Dental Specialty 2013;01:1
- 10) Datta P, Sood S, Rastogi P, Bhargava K., Bhargava D, Yadav M. DNA Profiling in Forensic Dentistry. J Indian Acad Forensic Med. 2012;34:2
- 11) Tuğ A, Yaşar F. Felaket kurbanlarının Kimliklendirilmesi Çalışmalarında Diş Hekimlerinin ve Diş İncelemelerinin Önemi” Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi., 2006;30:77-82.
- 12) Ricaut F.X, Tracqui C.K, Crubezy E, Ludes B, “STR-Genotyping from Human Medieval Tooth and Bone Samples.” Forensic Science International 2005;151:31-35.
- 13) Rohland N, Hofreiter M, “Ancient DNA Extraction from Bones and Teeth”. Nature Publishing Group, 2007

- 14) Silva R.H.A, Quiezi R, Bertolacini C.D.P, Carvalho S.P.M, Gasque K.C.S, Silva C.T.A, Bicudo L.A.R, “Human Identification Analysis Using PCR From the Root Portion of Dental Elements Under Different Conditions of Temperature and Exposure Time”. RSBO. Jan-Mar; 2012;9(1):67-73
- 15) Sajantila A, M. Stom, B. Budowle, P.J. Karhunen, L. Peltonen, The polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing: application of amplified D1S80 and HLA-DQA loci to the identification of fire victims, *Forensic Sci. Int.* 1991; 51: 23–34.
- 16) Adler C.J, Haak W, Donlon D, Cooper A. “Survival and Recovery of DNA From Ancient Teeth and Bones” *Journal of Archeological Science* 2011;38:956-964.
- 17) Hill, A.J, Lain R, Hewson I, “Preservation of dental evidence following exposure to high temperature”. *Forensic Science International* 2010;6185:4
- 18) Schwark T, Heinrich A, Preuße-Prange A, Von Wurmb-Schwark N., “Reliable genetic identification of burnt human remains”. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;5(5):393-9.
- 19) Issaquah, WA. Bohnert, M., Rost, T., Pollak, S. The degree of destruction of human bodies in relation to the duration of the fire. *Forensic Sci. Int.* 1998;95:11–21.
- 20) Christensen, A.M. Experiments in the combustibility of the human body. *J. Forensic Sci.* 2002;47:466-470.
- 21) DeHaan, J.D. Reconstruction of a Fatal Fire in a Parked Motor Vehicle. *Fire & Arson Investigator* 2003:42.
- 22) DeHaan, J.D. Repositioning of human bodies during res. In: *Proc. International Symposium on Fire Investigation Science and Technology*, Sarasota, FL., 2012
- 23) DeHaan, J.D., Icové, D.J. *Kirk’s Fire Investigation*, seventh ed. Brady Publishing, Upper Saddle River, NJ., 2012
- 24) Drysdale, D.D. *An Introduction to Fire Dynamics*, second ed. John Wiley & Sons, Chichester, 1999

- 25) Icove, D.J., DeHaan, J.D. Forensic Fire Scene Reconstruction. Brady Fire. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ., 2009
- 26) Turner, C.F., McCreery, J.W. The Chemistry of Fire and Hazardous Materials. Allyn and Bacon, Boston, MA., 1981
- 27) A. Sajantila, M. Strohm, B. Budowle, P.J. Karhunen, L. Peltonen, The polymerase chain reaction and post-mortem forensic identity testing: application of amplified D1S80 and HLA-DQA loci to the identification of fire victims, *Forensic Sci. Int.* 1991;51:23-34.
- 28) K.A. Brown, K. O' Donoghue, T.A. Brown, DNA in cremated bones from an early bronze age cemetery cairn, *Int. J. Osteoarchaeol.* 1995;5:181-187.
- 29) T. Tsuchimochi, M. Iwasa, Y. Maeno, H. Koyama, H. Inoue, I. Isobe, R. Matoba, M. Yokoi, M. Nagao, Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2002;23(3):268-271.
- 30) A. Alonso, S. Andelinovic, P. Martin, D. Sutlovic et al., DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples, *Croat. Med. J.* 2001;42:260-266.
- 31) A.S. Bouwman, E.R. Chilvers, K.A. Brown, T.A. Brown, Brief communication: identification of the authentic ancient DNA sequence in a human bone contaminated with modern DNA, *Am. J. Phys. Anthropol.* 2006;131:428-431.
- 32) H. Pfeiffer, P. Forster, C. Ortmann, B. Brinkmann, The results of an mtDNA study of 1200 inhabitants of a German village in comparison to other Caucasian databases and its relevance for forensic casework, *Int. J. Legal Med.* 2001;114:169-172.
- 33) N.Adachi,K.Umetsu,W.Takigawa,K.Sakaue,Phylogenetic analysis of the human ancient mitochondrial DNA, *J. Archaeol. Sci.* 2001; 31:1339-1348.

- 34) T.C. Boles, C.C. Snow, E. Stover, Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala, *J. Forensic. Sci.* 1995;40:349-355.
- 35) S. Pañábo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Despres, et al., Genetic analyzes from ancient DNA, *Annu. Rev. Genet.* 2004;38:645-679.
- 36) H.N. Poinar, The top 10 list: criteria of authenticity for DNA from ancient and forensic samples, *Int. Congr. Ser.* 2003; 1239:575-579.
- 37) Holck P. Cremated Bones. A medical-anthropological study of an archaeological material on cremation burials. 2nd ed. *Anthropologiske skrifter nr. 1b.* Oslo: Anatomical Institute, University of Oslo; 1996.
- 38) Devlin JB, Herrmann NP. Bone color as an interpretive tool of the depositional history of archaeological cremains. In: Schmidt CW, Symes SA, editors. *The Analysis of Burned Human Remains.* London: Academic Press; 2008;109-128.
- 39) Walker PL, Miller KWP, Richman R. Time temperature, and oxygen availability: an experimental study of the effects of environmental conditions on the color and organic content of cremated bone. In: Schmidt CW, Symes SA, editors. *The Analysis of Burned Human Remains.* London: Academic Press; 2008;129-135.
- 40) Dehaan JD. Fire and bodies. In: Schmidt CW, Symes SA, editors. *The Analysis of Burned Human Remains.* London: Academic Press; 2008;1-13.
- 41) Fairgrieve SI. The cremation process. In: Fairgrieve SI, ed. *Forensic Cremation – Recovery and Analysis.* Boca Raton: CRC Press; 2008;37–60.
- 42) Fairgrieve SI. Heat-induced alterations of bone microstructure. In: Fairgrieve SI, ed. *Forensic Cremation – Recovery and Analysis.* Boca Raton: CRC Press; 2008;131-140.
- 43) Byers SN. Postmortem changes to bone. In: Byers SN, ed. *Introduction to Forensic Anthropology.* 2nd ed. Boston: Pearson; 2004;383-405.

- 44) Thompson T. Burned human remains. In: Blau S, Ubelaker DH, editors. *Handbook of Forensic Anthropology and Archaeology*. Walnut Creek (CA): Left Coast Press; 2009;295-303.
- 45) Mayne Correia PM. Fire modification of bone: a review of the literature. In: Hagland WD, Sorg MH, editors. *Forensic Taphonomy – The Postmortem Fate of Human Remains*. Boca Raton: CRC Press; 1997;275-293.
- 46) Ellingham STD, Thompson RJU, Islam M, Taylor G. Estimating temperature exposure of burnt bone – a methodological review. *Sci Justice*. 2015;55:181-188.
- 47) Ubelaker DH. The forensic evaluation of burned skeletal remains: a synthesis. *Forensic Sci Int*. 2009;183:1-5.
- 48) Thompson TJU. Recent advances in the study of burned bone and their implications for forensic anthropology. *Forensic Sci Int*. 2004;146(Suppl):203-205.
- 49) Fairgrieve SI. Scene recovery. In: Fairgrieve SI, editor. *Forensic Cremation – Recovery and Analysis*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2008;61-90.
- 50) Mundorff AZ. Anthropologist-directed triage: three distinct mass fatality events involving fragmentation of human remains. In: Adams BJ, Byrd JE, editors. *Recovery, Analysis, and Identification of Commingled Human Remains*. Totowa (NJ): Humana Press; 2008;123-144.
- 51) Mayne Correia PM, Beattie O. A critical look at methods for recovering, evaluating, and interpreting cremated human remains. In: Hagland WD, Sorg MH, editors. *Advances in Forensic Taphonomy – Method, Theory, and Archaeological Perspectives*. Boca Raton: CRC Press; 2002;435-450.
- 52) Dirkmaat DC. Recovery and Interpretation of The Fatal Fire Victim: The Role Of Forensic Anthropology. In: Hagland WD, Sorg MH, editors. *Advances in Forensic Taphonomy – Method, Theory, and Archaeological Perspectives*. Boca Raton: CRC

- Press; 2002;451-472.
- 53) Warren M. Detection of Commingling In Cremated Human Remains. In: Adams BJ, Byrd JE, editors. Recovery, Analysis, and Identification of Commingled Human Remains. Totowa (NJ): Humana Press; 2008;185-197.
 - 54) Owsley DW. Identification of The Fragmentary, Burned Remains of Two US Journalists Seven Years After Their Disappearance In Guatemala. J Forensic Sci. 1993;38(6):1372–1382.
 - 55) Imaizumi K, Taniguchi K, Ogawa Y. DNA Survival and Physical and Histological Properties of Heat-Induced Alterations In Burnt Bones. Int J Legal Med. 2014;128:439–446.
 - 56) Holden JL, Phakey PP, Clement JG. Scanning Electron Microscope Observations of Heat-Treated Human Bone. Forensic Sci Int. 1995;74:29-45.
 - 57) Stiner MC, Kuhn SL. Differential Burning, Recrystallization, and Fragmentation of Archaeological Bone. J Archaeol Sci. 1995;22:223-237.
 - 58) Strydonck MV, Boudin M, De Mulder G. The Carbon Origin of Structural Carbonate in Bone Apatite of Cremated Bones. Radiocarbon. 2010;52:578-586.
 - 59) Quatrehomme G, Bolla M, Muller M, et al. Experimental Single Controlled Study of Burned Bones: Contribution Of Scanning Electron Microscopy. J Forensic Sci. 1998;43(2):417-422.
 - 60) Schwark T, Heinrich A, Preuße-Prange A, Wurmb-Schwark NV. Reliable Genetic Identification of Burnt Human Remains. Forensic Sci Int Genet. 2011;5:393-399.
 - 61) Holden JL, Phakey PP, Clement JG. Scanning Electron Microscope Observations of Incinerated Human Femoral Bone: A Case Study. Forensic Sci Int. 1995;74:17-28.

- 62) Glassman DM, Crow RM. Standardization Model for Describing The Extent of Burn Injury To Human Remains. *J Forensic Sci.* 1996;41(1):152-154.
- 63) Thompson TJU. Heat-Induced Dimensional Changes in Bone and Their Consequences For Forensic Anthropology. *J Forensic Sci.* 2005;50(5):1008-1015.
- 64) Fredericks JD, Ringrose TJ, Dicken A, Williams A, Bennett P. A Potential New Diagnostic Tool To Aid DNA Analysis From Heat Compromised Bone Using Colorimetry: a preliminary study. *Sci Justice.* 2015;55: 124-130.
- 65) Fredericks JD, Bennett P, Williams A, Rogers KD. FTIR spectroscopy: A New Diagnostic Tool To Aid DNA Analysis From Heated Bone. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6:375-380.
- 66) Ortner DJ, Turner-Walker G. The biology of skeletal tissues. In: Ortner DJ, ed. *Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains.* 2nd ed. London: Academic Press; 2003;11-35.
- 67) Harvig L, Lynnerup N. On The Volume Of Cremated Remains – A Comparative Study of Archaeologically Recovered Cremated Bone Volume as Measured Manually And Assessed By Computed Tomography And By Stereology. *J Archaeol Sci.* 2013;40:2713–2722.
- 68) Grévin G, Bailet P, Quatrehomme G, Ollier A. Anatomical Reconstruction of Fragments of Burned Human Bones: A Necessary Means For Forensic Identification. *Forensic Sci Int.* 1998;96:129
- 69) Imaizumi K, Noguchi K, Shiraishi T, et al. DNA typing of bone specimens – the potential use of the profiler test as a tool for bone identification. *Legal Med.* 2005;7:31-41.
- 70) Tsuchimochi T, Iwasa M. Chelating Resin-Based Extraction of DNA From Dental Pulp And Sex Determination From Incinerated Teeth with Y-Chromosomal Alphoid Repeat and Short Tandem Repeats. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002;23(3):268-271.

- 71) Imaizumi K, Saitoh K, Sekiguchi K, Yoshino M. Identification of Fragmented Bones Based on Anthropological and DNA Analysis: case report. *Legal Med.* 2002;4:251-256.
- 72) von Wurmb-Schwark N, Preusse-Prange A, Heinrich A, Simeoni E, Bosch T, Schwark T. A New Multiplex-PCR Comprising Autosomal and Y-Specific STRs And Mitochondrial DNA To Analyze Highly Degraded Material. *Forensic Sci Int Genet.* 2009;3:96-103.
- 73) Gonçalves D. The Reliability of Osteometric Techniques for the Sex Determination of Burned Human Skeletal Remains. *Homo.* 2011;62:351-358.
- 74) Bender K, Schneider PM, Rittner C. Application of mtDNA Sequence Analysis in Forensic Casework for the Identification of Human Remains. *Forensic Sci Int* 2000;113:103
- 75) Acharya A.B. Teaching forensic odontology: An Opinion on Its Content and Format. *European Journal of Dental Education.* 2006;10:137-141.
- 76) Aka Ps, İşcan My. Diş Sağlığı ve Eğitimi Bulguları ile Kimliklendirme. *Adli Bilimler Dergisi.* 2007;6(1):79-82.
- 77) Alonso A., Martin P., Albarran C., Garcia P., Garcia O., Fernandez De Simon L., Garcia-Hirschfeld J., Sancho M., Rua C., Fernandez- PiQueras J. Real-Time PCR Designs to Estimate Nuclear and Mitochondrial DNA Copy Number in Forensic and Ancient DNA Studies. *Forensic Science International.* 2004;139:141-149.
- 78) Archer M.S., Bassed R.B., Briggs C.A., Lynch M.J. Social Isolation and Delayed Discovery of Bodies in Houses: The Value of Forensic Pathology, Anthropology, Odontology and Entomology in The Medico-Legal Investigations. *Forensic Science International.* 2005;151:259-265.
- 79) Bernstein M. Forensic Odontology. In *Introduction to Forensic Sciences.* (Ed.) Eckert W.G. Crc Pres. 1992;2:295-342.

- 80) Bowers C.M. Forensic Dental Evidence. An Investigator's Handbook. Elsevier Academic Press. New York. USA. 2004;32:22-58.
- 81) Butler J. M. Forensic DNA Typing. Biology And Technology Behind Str Markers. Academic Pres. 2001;4:39-43.
- 82) Burger J., Hummel S., Herrmann B., Henke W. DNA Preservation: A Microsatellite-DNA Study on Ancient Skeletal Remains. Electrophoresis. 1999;20:1722-1728.
- 83) Cipollaro M., Bernardo G., Galano G., Galderisi U., Guarino F., Angelini F., Cascino A. Ancient DNA in Human Bone Remains from Pompeii Archeological Site. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1998;247:901-904.
- 84) Cappellini E., Chiarelli B., Sineo L., Casoli A., Gioia A.D., Vernesi C., Biella M.C., Caramelli D. Biomolecular Study of The Human Remains From Tomb 5859 in the Etruscan Necropolis Of Monterozzi, Tarquinia (Viberto, Italy). Journal Of Archaeological Science. 2004;31:603-612.
- 85) Corte-Real A., Andrade L., Anjos M.J., Carvalho M., Vide M.C., Corte- Real F., Vieira D.N. The DNA Extraction From The Pulp Dentin Complex of Both With And Without Carious. International Congress Series. 2006;1288:710-712.
- 86) Çöloğlu S., İşcan M.Y. (1998). Adli Osteoloji. İstanbul Üniversitesi Rektörlük Yayınları 1998;5:113-148.
- 87) Çöloğlu S. Adli Olaylarda Kimlik Belirlenmesi. Adli Tıp Cilt 2. (Ed) Soysal Z., Çakalır C. İstanbul Üniversitesi Basımevi. İstanbul. 1999;31:73-92.
- 88) Waterfield J.D. Rates Of Putrefaction of Dental Pulp in The Northwest Coast Environment. Journal Of Forensic Sciences. 1991;36:1492-1502.
- 89) Garcia A.A., Munoz I., Pestoni C., Lareu M.V., Rodriguez Calvo M.S., Carracedo A. Effect of Environmental Factors on PCR-DNA Analysis From Dental Pulp. International Journal of Legal Medicine. 1996;109(3):125

- 90) MY İşcan, PS Kedici. The Human Skeleton in Forensic Medicine. Forensic Science International 2003;137(2);160-164
- 91) Martiniaková M, Grosskopf B, Omelka R, Vondráková M, Bauerová M. Differences among species in compact bone tissue microstructure of mammalian skeleton: use of a discriminant function analysis for species identification. J Forensic Sci. 2006;51(6):1235-1239.
- 92) Sawada J, Nara T, Nakajima T, Saito Y, Dodo Y, Hirata K. Histomorphological discrimination between human and nonhuman bones of fragmentary osteal remains: analyses of burnt bones from the ancient Heian site in the northern Tohoku district, Japan (in Japanese). Anthropol Sci. 2010;118(1):23-36.
- 93) Castillo RF, Ubelaker DH, Acosta JAL, de la Rosa RJE, Garcia IG. Effect of temperature on bone tissue: histological changes. J Forensic Sci. 2013;58(3):578-582
- 94) Gilbert M.T., Rudbeck L., Willerslev E., Hansen A.J., Smith C., Penkman K.E.H., Prangenberg K., Nielsen-Marsh C.M., Jans M.E., Arthur P., Lynnerup N., Turner-Walker G., Biddle M., Kjølbye-Biddle B., Collins M.J. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. Journal of Archeological Science. 2005;32;785-793
- 95) İşcan My., Aka Ps. Dental Characteristics in Turkey. (Oral) The 3rd Congress Of Balkan Academy of Forensic Sciences. BAFS 2-5 June, Constanta, Romania, 2005.
- 96) Heinrich A, Schwark T, Simeoni E, Schwark N.W. "Genetic identification of fire deaths". Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2009;2;253-254.
- 97) Klug, Ws., Cummings, Mr. Genetik Kavramlar, 6. Baskı. Prentice Hall, Prof. Dr. Cihan Öner, Ankara . ABD., 2000
- 98) Ubalaker D.H. "The forensic evaluation of burned skeletal remains: A synthesis". Forensic Science International 2009;183:1-5

- 99) GlobalFiler™ PCR Amplification Kit User Guide. Life Technologies, USA, 2016
- 100) AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit User Guide, Life Technologies, USA. 2007
- 101) AmpFlSTR® IdentiFiler™ PCR Amplification Kit User Guide, Life Technologies, USA, 2009
- 102) Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. The polymerase chain reaction In: 103) Recombinant DNA. Second Edition. New York. 1992;79-98
- 103) QIAamp® DNA Mini Kit, User Guide, Qiagen, USA, 2011
- 104) Genorise Bone DNA Extraction Kit User Manual, Genorise Scientific, Inc., USA, 2015
- 105) HiPurA Bone DNA Extraction Kit User Guide and Technical Data Sheet, Himedia Laboratories, India, 2014
- 106) Promega DNA IQ System Kit Protocol, Promega, USA, 2016
- 107) Hibrigen Blood Genomic DNA Isolation Kit Kullanım Kılavuzu, Hibrigen Biyoteknoloji ve Arge Ltd., 2015
- 108) Stratec Invisorb Spin Forensic Kit User Manual, Stratec Biomedical AG, Germany, 2011
- 109) GeneMATRIX Bone DNA Purification Kit Protocol, EURx Ltd., Poland, 2010
- 110) Ortner DJ, Turner-Walker G. The biology of skeletal tissues. In: Ortner DJ, ed. Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains. 2nd ed. London: Academic Press; 2003;11-35.
- 111) Gonçalves D, Thompson TJU, Cunha E. Implications of heat-induced changes in bone on the interpretation of funerary behaviour and practice. J Archaeol Sci 2011;38;1308-1313
- 112) Grevin G, Bailet P, Quatrehomme G, Ollier A. Anatomical reconstruction of fragments of burned human bones: a necessary means for forensic identification. Forensic Sci Int. 1998;96:129-134

- 113) Waterhouse K. Post-burning fragmentation of calcined bone: implications for remains recovery from fetal fire scenes. *J Forensic Leg Med.* 2013;20:1112-1117.
- 114) Pope EJ, Smith OC. Identification of traumatic injury in burned cranial bone: an experimental approach. *J Forensic Sci.* 2004;49(3):431-440.
- 115) Amadasi A, Merli D, Brandone A, Cattaneo C. Chromatic variation of soot soiling: a possible marker for gunshot wounds in burnt bone. *J Forensic Sci.* 2014;59(1):195-198.
- 116) Cattaneo C, DiMartino S, Scali S, Craig OE, Grandi M, Sokol RJ. Determining the human origin of fragments of burnt bone: a comparative study of histological, immunological and DNA techniques. *Forensic Sci Int.* 1999;102:181-191.
- 117) M&M 47. Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dimhofer R. Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) from compact bone and human remains. *J Forensic Sci* 1991;36:1649-61.
- 118) Cobb Jc. Ancient DNA Recovered by a Non Destructive Method. *Ancient Biomolecules.* 2002;4(4):169-172
- 119) Ricaut F.X, Tracqui C.K, Crubezy E, Ludes B. "STR-Genotyping from Human Medieval Tooth and Bone Samples." *Forensic Science International* 2005;151:31-35.
- 120) Pötsch L., Meyer U., Rothschild S., Schneider P.M., Rittner C. Application of DNA techniques for identification using human dental pulp as a source of DNA. 1992;105:139-145.
- 121) Silva R.H.A, Queizi R, Bertolacini C.D.P, Carvalho S.P.M, Gasque K.C.S, Silva C.T.A, Bicudo L.A.R, "Human Identification Analysis Using PCR From the Root Portion of Dental Elements Under Different Conditions of Temperature and Exposure Time". *RSBO.* 2012;9(1):67-73
- 122) Corte-Real A., Andrade L., Anjos M.J., Carvalho M., Vide M.C., Corte-Real F., Viera D.N. The DNA extraction from the pulp dentin complex of both with and without carious. *International Congress Series.* 2006;1288:710-712.

- 123) Shirama C.Y, Fielding C.G, Lewis J.A, Gleisner M.R, Dunn K.N. “A Minimally Destructive Technique for Sampling Dentin Powder for Mitochondrial DNA Testing”. J Forensic Sci. 2004;49:4
- 124) Tilatta F, Brousseau P, Lepereur E, Yasukawa K, Mazancourt P. “A Comparative Study of Two Methods of dental Pulp Extraction for Genetic Fingerprinting”. Forensic Science International 2010;202:39-43
- 125) Alakoç Y.D, Aka P.S, “Orthograde Entrance Technique to Recover DNA from Ancient Teeth Preserving the Physical Structure”. Forensic Science International 2009:96-98
- 126) Pinchi V, Torricelli F, Nutini A.L, Conti M, Lozzi S, Norelli G. A, “Techniques of Dental Extraction: Some Operative Experiences” Forensic Science International 2011;204:111-114

8. EKLER

EK 1. Aydınlatılmış Onam Formu

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü'nde doktora tezi amacıyla yapılacak bir araştırmaya katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağını çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer çalışmaya katılmaya karar vererseniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Formu imzalamanız çalışmanın kapsamı ve riskleri hakkında bilgilendirildiğinizi ve kararınızı serbestçe verdiğinizi belirtmektedir. Bu onay formunun bir kopyası size verilecektir. Bu formda anlamadığınız ifadeler varsa çalışmadaki araştırmacılara sorarak bilgi edinebilirsiniz.

Gönüllünün Adı Soyadı:

Gönüllünün İmzası

Tarih:

Yetkin Araştırmacının Adı-Soyadı: Kadir DAŞTAN

Yetkin Araştırmacının İmzası:

Tarih:

EK 2. ETİK KURULU ONAYI ÜST YAZILARI



İ.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



İstanbul/...../.....

Sayı : 83045809/604/02-7830
Konu:

26 Mart 2014

İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü
Müdürlüğüne

İlgi: 20.02.2014 tarih, 86669574/272 sayılı yazınıza;

Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Emel Hülya YÜKSELOĞLU'nun danışmanlığında Doktora Öğrencisi Kadir DAŞTAN'ın yürütücülüğünde "Adli Bilimlerde Yüksek Isıya Maruz Bırakılmış İnsan Kemiklerinde ve Diş Örneklerinde Organik ve İnorganik Temelli DNA Çekitleme Tekniklerinin Karşılaştırılması ve DNA Profillemesindeki Önemi" başlıklı Doktora Tezi (Araştırma Fonu) hakkında ilgi yazınız ve ekleri 04 Mart 2014 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim

Prof.Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı

Eki:
1 dosya

ASLININ AYNIĞIDIR



TC SAĞLIK BAKANLIĞI
BAKIRKÖY
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Değerlendirme Formu

BAKIRKÖY DR. SADI KONUK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL DEĞERLENDİRME FORMU

BASVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Adli Bilimlerde yüksek ısıya maruz bırakılmış insan kemiklerinde ve des örneklerinde organik ve inorganik temelli DNA ekleme tekniklerini karşılaştırılması DNA profillemesindeki önemi
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	2014/29
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/AD/SOYADI	Doç.Dr.Emel Hülya Yükseloğlu,Kadir Daştan,Doç.Dr. Cevdet Aykan,Uz.Dr.Mustafa Gökhan Bilgili,Uz.Dr.Engin,Uz.Dr.Musa Çırak,Dr.Dr.Ayşegül Yurdakoş
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Adli Tıp
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
DESTEKLEYİCİ	
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLÇİSİ	
ARAŞTIRMANIN FAZİ	
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Diğer ise belirtiniz: Prospektif
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐ ÇOK MERKEZLİ ☒ ULUSAL ☐ ULUSLAR ARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	07.02.2014	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	07.02.2014	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLUR RAPOR FORMU	07.02.2014	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐
	DİĞER	☐

KARAR BİLGİLERİ

Karar No:2014/03/01 **Tarih: 10.02.2014**

Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, faydasını ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkez/lerde gerçekleştirilmesinde etik açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkçe ila, ve Tabii dilde bilgilendirme imkanı olup alınması gerekmektedir.

ASLI GİBİDİR

Yıldız ŞİMŞEK
Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
İdari ve Mali Hizmetleri
Sıdık No: MM2014/03/01

ÇALIŞMA ESASI

BASKANIN UNVANI/ ADI/ SOYADI: **BEAH KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**
Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
Uz. Dr. Gülsüm Oya HERGÜNEL

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Uz. Dr. Gülsüm Oya HERGÜNEL	Anesteziyoloji	BEAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Sadık Sami HATİPOĞLU	Çocuk Hastalıkları	BEAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Ayşe KAVAK	Dermatoloji	BEAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr. Fatma Tülin KAYHAN	K.B.B.	BEAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç.Dr. Özlem KAPTANOĞULLARI	İç Hastalıkları	BEAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Osman KARAKAYA	Kardiyoloji	BEAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Uzman Dr. Anurcan GEDİKBAŞI	Biyokimya	BEAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr. Ufuk EMEKLİ	Plastik Ve Estetik Cerrahi	I.Ü.İst. Tıp Fak	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof.Dr. Gülsüm Nuhhan İNCE	Halk Sağlığı	I.Ü.İst. Tıp Fak	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Uz. Dr. Gulay ÖZGÖN	Farmakolog	I.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Abdülkâfi KUMBASAR	İç Hastalıkları	I.Ü.İst. Tıp Fak	E ☒ K ☐	F ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Can ÇELİK	Biyomedikal	Dijimed Bil Çöz	E ☒ K ☐	F ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Rana KONYALIOĞLU	Biyostatistik	ARK İst. Danış	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Avukat Özkan TUM	Hukuk	İst. Sağ. Müd.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Abdullah Türk	Mecis Müşaviri	TBMM (Doğanbahiçe Sarayı)	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	

Evrak Tarih ve Sayısı: 18/02/2014-663



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İstanbul İli Beyoğlu Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
İstanbul İl Özel İdaresi Ağız ve Diş Hastahkları Hastanesi

Sayı : 87281459-240.01-
Konu : Diş Örnekleri hk.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ REKTÖRLÜĞÜ
(Klinik Araştırmalar Etik Kurulu)

İlgi : 14/02/2014 tarihli dilekçe.

Üniversiteniz Adli Tıp Enstitüsü Fen Bölümleri Anabilim Dalı doktora öğrenciniz Kadir DAŞTAN'ın "Adli Bilimlerde yüksek ısıya maruz bırakılmış insan kemiklerinde ve diş örbeklerinde organik ve inorganik temelli DNA çekitleme tekniklerinin karşılaştırılması ve DNA profillemesindeki önemi" konulu doktora tez çalışmasında kullanılmak üzere diş örneği toplanması hususunda Hastanemize vermiş olduğu ilgi tarihli dilekçeye istinaden Hastanemizde çekilmiş diş örneklerinin tarafına verilmesinde sakınca yoktur.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Dt. Hasan ÜLGEN
Hastane Yöneticisi

Güvenli Elektronik
İmza ile
18.02.14
TKHK
İstanbul İl Özel İdaresi Ağız ve Diş Hastahkları Hastanesi
Genel Sekreterliği
Dr. Hasan ÜLGEN
Hastane Yöneticisi

Danışmanlık Cad. Günel Mahallesi Kağıthane / İSTANBUL
Telefon 212 320 10 43
e-Posta: istanbuldisi@saglik.gov.tr
Elektronik imzalı suretine: <http://ebys.beyoglubirligi.gov.tr/envislon/Dogrula/SAHAS4> erişebilirsiniz.

Ayrıntılı bilgi için irtibat: Aylin KAPLAN
İdare ve Evrak Kayıt Birimi

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

EK 3. ÖZGEÇMİŞ

Name: Kadir DAŞTAN

Date of Birth: 31.05.1979

Official Title: Instructor

Languages: Turkish, English

E-mail: kadirdastan@gmail.com

Education

Institution	Year Attended	Major Field
Istanbul University, Institute of Forensic Sciences	2011	Forensic Genetics
Istanbul University, Institute of Forensic Sciences	2004	Forensic Genetics
Istanbul University, Cerrahpasa Medical Faculty	1998	Medical & Biological Sciences

Academic Qualifications

Instructor

Selected Publications

Erkan, I., Daştan, K., “Real-Time PCR Detection of Genetically Modified Organisms in Several Food Products and Their Environmental Effects in Turkey”, Fresenius Environmental Bulletin (SCI Expanded), 2017

Itir Erkan, Kadir Dastan, Sedat Tanju Karadeniz, Yemliha Yıldız, Dilek Alpsar, Emel Hülya Yükseloğlu, "Mitochondrial DNA Analysis of the Domestic Dogs in Turkey", European Journal of Forensic Sciences, 2016

M. Özlem Kolusayın, B. Karadayı, A. Kaya, M.B. Doğan, Ş. Karadayı, K. Daştan, T. Zorlu, D. Salkım İşlek, E. Ozar, I. Erkan, E.H. Yükseloğlu, “Adli Olgularda Biyolojik Delil Alınması, Saklanması Ve Gönderilmesinde Acil Servis Çalışanlarının Farkındalıklarının Değerlendirilmesi” Medicine Science, 2014

Muzaffer Berna Doğan, Ayşe Selcen Güçhan, İtir Tanı Cömert, İtir Erkan, Özlem Kolusayın Ozar, Kadir Daştan, Emel Hülya Yükseloğlu “Emergency Healthcare Teams’ Approach to Crime Scene and Evidences in Forensic Cases: A Descriptive Study in Turkey” Taylor & Francis, Forensic Science Policy & Management: An International Journal, Volume 4, Issue 3-4, pages 87-95, 2013

Handan Tuncel, Ahmet Özyaydın, İlhan Onaran, Kadir Daştan, Mehmet Ali Körpınar, Mustafa Tunaya Kalkan, “Superoxide Dismutase Activity and Malondialdehyde Level of Rat Experimental Colon Tumor Tissues Exposed To Sinusoidal Magnetic Field”, Fresenius Environmental Bulletin (FEB), Vol.21, pp.3757-60, 2012