



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

**VAJİNAL SIVININ SAPTANMASINDA KULLANILAN LACTOBACİLLUS
TÜRLERİNİN VARLIĞINI ETKİLEYEN FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Eren AKGÜNDÜZ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Behnan ALPER

ADANA-2016



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI**

**VAJİNAL SIVININ SAPTANMASINDA KULLANILAN LACTOBACİLLUS
TÜRLERİNİN VARLIĞINI ETKİLEYEN FAKTÖRLERİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Eren AKGÜNDÜZ

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Behnan ALPER**

**Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TTU-2016-
5499No'lu proje ile desteklenmiştir.**

ADANA-2016

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım da danışman öğretim üyesi olarak değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her zaman yanımda olduğunu hissettiğim hocam, Sayın Prof. Dr. Behnan Alper'e,

Asistanlığım süresince eğitimime sundukları katlarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr.Mete Korkut Gülmen'e, bilgi ve deneyimlerini her daim bizlerle paylaşan değerli hocalarım Prof.Dr. Necmi Çekin ve Prof.Dr. Ahmet Hilal'e,

Tez çalışmamın hem laboratuvar hem de yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Ayşe Serin'e ve yine laboratuvar aşamasında bana eşlik eden Dr. Hüsniye Canan ve çok değerli kardeşim Ayça Ulubay'a,

Dört yıllık asistanlık sürecinde birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve Adli Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına,

TTU-2016-5499 No'lu proje olarak bu çalışmanın düzenlenmesine katkı sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Beni bugünlere getiren, her anımda yanımda olan, maddi ve manevi yardımlarını karşılıksız sunan annem ve babama, varlıkları ile hayatıma renk getiren oğlum ve eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER LİSTESİ	v
GRAFİK LİSTESİ	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Vücut Sıvılarının Tanımlanmasının Önemi	3
2.3. Moleküler İdentifikasyonda Bakterilerin Kullanımı	4
2.4. Vajinal Sıvının Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler	4
2.5. Vajinanın Anatomik ve Fizyolojik Yapısı	5
2.6. Vajinal Ekosistem	6
2.7. <i>Lactobaciller</i>	8
2.7.1. <i>Lactobacillerin</i> Sınıflandırma ve Üreme Özellikleri	9
2.7.2. <i>Lactobacillerin</i> Ekolojik Özellikleri	9
2.7.2.1 <i>Lactobacillerin</i> Agregasyon ve Koagregasyonu	10
2.7.2.1 <i>Lactobacillerin</i> İnhibisyon Özelliği	10
2.8. Kadın Ürogenital Sistemlerinde Görülebilen Enfeksiyonlar	11
2.9. RNA'nın Çeşitleri ve Özellikleri	13
2.9.1. mRNA	14
2.9.2. tRNA	14
2.9.3. rRNA	14
2.9.4. Küçük RNA'lar	15
2.10. RNA İzolasyonu	16
2.11. Miktar Tayini(Kantitasyon)	16
2.12. cDNA Sentezi	17
2.13. PCR	18
2.14. Otomatik Kapiler Elektroforez	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Örneklerin Seçim Kriterleri	20
3.2. Örneklerin Alınması	20
3.3. Çalışmada kullanılan cihazlar	21
3.4. Çalışmada Kullanılan kimyasal maddeler	21
3.5. AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kiti ile DNA/RNA Ekstraksiyonu	22
3.5.1. Nükleik Asit İzolasyonu	22
3.5.2. Total RNA İzolasyonu	23
3.5.3. Genomik DNA İzolasyonu	24
3.6. RNA Kantitasyonu	24
3.7. cDNA Sentezi	25
3.8. PCR Protokolü	25
3.9. Örneklerin Otomatik Kapiler Elektroforez Cihazında Yürütülmesi	26
4. BULGULAR	27

4.1. <i>Lactobacillus gasseri</i>	27
4.2. <i>Lactobacillus crispatus</i>	29
4.3. <i>Lactobacillus jensenii</i>	30
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ	36
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	45
EK-1: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Onayı	46
EK-2: Aydınlatılmış Onam	47



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1. Sağlıklı vajinal ekosistemden sıklıkla izole edilen bakteriler	7
Çizelge 2. Sağlıklı kadınlarda hayatın farklı dönemlerinde vajinanın fizyolojik koşulları	8
Çizelge 3. Vajinal florada değişikliğe neden olan faktörler	12
Çizelge 4. Çalışmada kullanılan primerler	22
Çizelge 5. Yaş aralığı tablosu	27
Çizelge 6. <i>Lactobacillusların</i> birlikte bulunma durumları.....	31
Çizelge 7. <i>Lactobacillusların</i> en az varlık-yokluk durumları	32



GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1. <i>Lactobacillus gasserinin</i> Gruplara Göre Yüzdeler Dilimleri	28
Grafik 2. <i>Laktobacillus gasserinin</i> Gruplara Göre Saptanma Durumu	28
Grafik 3. <i>Lactobacillus crispatusun</i> Gruplara Göre Yüzdeler Dilimleri	29
Grafik 4. <i>Lactobacillus crispatusun</i> Gruplara Göre Saptanma Durumu	29
Grafik 5. <i>Lactobacillus jenseninin</i> Gruplara Göre Yüzdeler Dilimleri	30
Grafik 6. <i>Lactobacillus jenseninin</i> Gruplara Göre Saptanma Durumu	30
Grafik 7. <i>Lactobacillus</i> Türlerinin Gruplara Göre Saptanma Durumu	31



KISALTMA LİSTESİ

°C	: Celsius
µl	: Mikrolitre
APF	: Agregation Promiting Factor
BV	: Bakteriyel Vajinozis
cDNA	: Complementary DNA
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ESR-1	: Estrogen Reseptor-1
GAPDH	: Gliseraldehit Fosfat Dehidrogenaz
HBD-1	: Human Beta Defensin-1
<i>Lcris</i>	: <i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>Lgas</i>	: <i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Ljen</i>	: <i>Lactobacillus jensenii</i>
ml	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
MUC-4	: Mucin-4
PCR	: Polymerase Chain Reaction
pH	: Power of Hydrogen
RIA	: Rahim içi Araç
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal RNA
RT-PCR	: Revers Transkription- Polymerase Chain Reaction
tRNA	: Taşıyıcı RNA
UCE	: Ubiuquitin Konjugasyon Enzimi

ÖZET

Vajinal Sekresyonun Tanımlanmasında Kullanılan *Lactobacillus* Türlerinin Varlığını Etkileyen Faktörlerin Araştırılması

Amaç: Vücut sıvılarının tanımlanması adli araştırmalarda olay yerinin yeniden canlandırılması ve olayın nasıl olduğunun belirlenmesinde gereklidir. Vücut sıvılarının ve lekelerinin identifikasyonunda serolojik testlere ek olarak insan RNA analizine dayalı metotlar geliştirilmiştir. Vücut sıvılarının identifikasyonunda bakterilerin kullanımı da araştırılmış ve çalışmalar vajinal spesifik bakterilerin vücut sıvılarının identifikasyonunda kullanılabilecek umut vaat eden bir yol olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada, vajinal enfeksiyonlu kadınlar ile postmenoz dönemdeki kadınlardan alınan vajinal sürüntü örneklerinde *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus* ve *Lactobacillus jensenii*'nin dahil edildiği çeşitli *Lactobacillus* tiplerinin varlığı araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Doğum ve Hastalıkları Polikliniğine 04.04.2016-20.06.2016 tarihleri arasında gelen, yazılı ve sözlü onamı alınan 91 gönüllüden alınan vajinal sürüntü örnekleri dahil edilmiştir. Alınan örnekler 30 kontrol grubu, 31 enfeksiyon grubu, 30 post menopozal yaş grubu olarak sınıflara ayrılmıştır. Aradığımız *Lactobacillus* türlerine ait 16S-23S rRNA intergenic spacer bölgesinin, sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve PCR'ı yapılmıştır. PCR sonrası ürünler kapiller elektroforezde yürütülmüştür.

Bulgular: Kategorik ölçümlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Ki Kare test istatistiği kullanıldı. Kontrol grubunda yer alan 30 olgunun 28'inde *Lactobacillus gasseri* olduğu, enfeksiyon grubunda yer alan 31 olgunun 21'inde, post menopozal dönemdeki olguların 15'inde *Lactobacillus gasseri* olduğu görüldü. Yapılan istatistiksel analiz sonucu hem enfeksiyon grubunda hemde post menopozal grupta aradığımız *Lactobacillus gasserinin* saptanma oranında anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubunda yer alan 30 olgunun 29'unda *Lactobacillus crispatus* olduğu, enfeksiyon grubunda yer alan 31 olgunun 26'sında, postmenopozal dönemdeki olguların 16'sında *Lactobacillus crispatus* olduğu görüldü. Yapılan istatistiksel analiz sonucu kontrol ve enfeksiyon grubuna göre postmenopozal grupta aradığımız bakteri türünün saptanma oranında anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0,001$). Kontrol grubundaki 30 olgudan ancak 15'inde *Lactobacillus jenseninin* olduğu, enfeksiyon grubunda 31 olgunun 14'ünde, postmenopozal dönemdeki 30 olgudan sadece 2'sinde *Lactobacillus jensenii*'nin olduğu, istatistiksel analiz sonucu kontrol ve enfeksiyon grubuna göre postmenopozal grupta aradığımız bakteri türünün saptanma oranında anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0,001$).

Sonuç: Enfeksiyon tanısı alan örneklerin %12.9'unda, postmenopozal dönemdeki olguların %46.6'sında hiçbir *Lactobacillus* türünün tanımlanmamış olması, vajinal sıvının veya lekenin tanımlanmasında alınan negatif sonuçların vajinal sekresyonun dışlanmasında kullanılamayacağını, ancak pozitif sonuçların özellikle şu ana kadar vajinal sekresyonun tanımlanmasında hiç serolojik yöntem bulunmaması sebebi ile oldukça önemli olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Cinsel saldırı, *Lactobacillus*, RNA, Vajinal sekresyon, Vücut sıvılarının identifikasyonu

ABSTRACT

Investigation of Factors Affecting the Presence of *Lactobacillus spp.* used in Identification of Vaginal Secretion

Aim: Detection of human body fluids is necessary in forensic investigation for the reconstruction of crime scene and how the event happened. In addition to serological tests, methods based on human RNA analysis were developed for identification of body fluids and stains. The use of bacteria for the identification of body fluids was also being investigated and studies showed the promising use of vaginal specific bacteria as a way of identifying vaginal secretions. In this study, the presence of the various *Lactobacillus spp.* including *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus jensenii* were investigated in the vaginal swab samples taken from women with vaginal infections and with postmenopausal.

Material and Method: Vaginal swab samples taken from 91 volunteers who came to Çukurova University Medical Faculty Balcalı Hospital Gynecology and Obstetrics Clinic between 04.04.2016 and 06.20.2016 were used. Verbal and written consents were approved from these volunteers in this study. Samples were categorized as control group (30), infection group (31) and postmenopausal (30). RNA isolation, cDNA synthesis and PCR were done respectively to 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of the *Lactobacillus spp* we investigated. PCR products were run in capillary electrophoresis.

Results: Chi Square test was used for statistical analysis in comparison of categorical evaluation between groups. *Lactobacillus gasseri* was detected in 28 of 30 cases in control group, 21 of 31 cases in infection group and 15 of 30 in postmenopausal period group. As a result of statistical analysis, a significant reduction in detection rate of *Lactobacillus gasseri* in both infection group and postmenopausal period group was detected ($p < 0,001$). *L. crispatus* was detected in 29 of 30 cases in control group, 26 of 31 cases in infection group and 16 of 30 cases in postmenopausal period group. Statistical analysis showed that a significant reduction in detection rate of *Lactobacillus spp.* we investigated in postmenopausal period group in comparison with control group and infection group ($p < 0,001$). *Lactobacillus jensenii* was detected in only 15 of 30 cases in control group, 14 of 31 cases in infection group and only 2 of 30 in postmenopausal period group. Statistically significant reduction was found in detection rate of *Lactobacillus spp.* we investigated in postmenopausal period group in comparison with control group and infection group ($p < 0,001$).

Conclusion: It is thought that the negative results cannot be used to exclude the presence of vaginal secretion because of undetected any of *Lactobacillus spp* in 12.9% of infection diagnosed samples and 46.6% of postmenopausal period cases. However, positive results may be valuable especially because of no serological methods have been found in identification of vaginal secretion until now.

Key Words: Sexual assault, *Lactobacillus*, RNA, Vaginal secretion, Body fluid identification

1. GİRİŞ

Olay yerinden elde edilen vücut sıvılarından, DNA analizi aracılığıyla genetik profil ortaya koymanın yanında, vücut sıvılarının orijini hakkında da tayin yapılması gerekmektedir^{1,2}. Olayın nasıl gerçekleştiği ve olay yerinin yeniden canlandırılması konusunda orjinin tayini önemli bir yer tutmaktadır³.

Cinayet ya da intihar gibi olayların yanısıra cinsel saldırı olaylarının çözümlenmesi de olay yeri incelemesiyle kolaylaşmaktadır. Olay yerinden elde edilen vajinal sekresyonun nerede ve nasıl bir nesne üzerinde (giysi, mobilya) olduğu, biyolojik sıvıların ortamdaki bulunma alanlarına bakılarak cinsel aktivitenin gönüllü bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği konusunda, mağdur ya da şüphelinin beyanlarını destekleme anlamında önemlidir^{3,4}. Örneklerle açıklayacak olursak, menstrüel döneminde cinsel saldırıya uğrayan bir kadına ait menstrüel kanın, saldırıyı gerçekleştiren kişinin üzerinde saptanması ve sanığın avukatı tarafından bu kanın menstrüel kan mı, yoksa burun kanaması mı olduğu konusunda ayırım yapılmasının istenmesi, adli olayın sağlıklı bir şekilde çözümlenmesine aracı olacaktır^{5,6}. Aynı şekilde, semen lekesinin mağdur üzerinde bulunması ya da vajinal sıvının penil bir sürüntü de varlığı cinsel aktivite iddiasını doğrulayacaktır^{3,7}.

Diğer vücut sıvılarıyla kıyasladığımız taktirde vajinal sekresyonun identifikasyonu biraz daha karmaşıktır. Bu konu hakkında daha önceki yapılan çalışmalarda, lugol iyodin reaksiyonu ile vajinal epitel hücrelerinde bulunan glikojenin gösterilmesi hedeflenmiş olup şüpheli kişiden yapılacak penil sürüntü üzerinde vajinal sekresyonun tespiti hedeflenmiştir. Fakat, lugol pozitif hücrelerin aynı zamanda erkek üriner sisteminde de mevcut olması bu yöntemin adli tıp açısından uygulanmasının önüne geçmiştir^{8,9}. Vajinal sekresyonun tanımlanmasına yönelik son dönemlerde yapılan başka çalışmalarda, Human Beta Defensin-1 (HBD-1), Mucin (MUC-4), Estrogen Reseptor 1 (ESR 1) markerlarına ait mRNA'ların Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)'a bağlı identifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Fakat MUC-4 ve beraberinde HBD-1'in hedef doku dışında tükürükte de görülebildiğini bildiren araştırmalar da olmuştur^{7,10,11}.

Çalışmamızında konusu olan ve vajinal sekresyonun tanımlanmasında kullanılan bir başka yöntem ise *Lactobacillus* türlerinin tespitidir. *Lactobacilluslar* vajinal florada dominant olarak bulunan bakteriler olup gastrointetinal sistem florasında da bulunabilmektedir. *Lactobacillusların* vajinal sıvının identifikasyonunda kullanılabileceğini gösteren ilk çalışma

2009 yılında yapılmıştır¹²⁻¹⁴. Çalışmada *Lactobacillus* türü olan *Lactobacillus gasseri*(*Lgas*) ve *Lactobacillus crispatus*(*Lcris*) kullanılabileceği bildirilmiş olup bu bakterilerin 16S-23S rRNA intergenic spacer bölgesinin PCR'a dayalı olarak gösterilebileceği belirtilmiştir. *Lactobacillus* bu iki türü haricinde bir başka tür olan *Lactobacillus jenseni*(*Ljen*) de ek olarak çalışılmıştır¹⁵.

Bu çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Doğum ve Hastalıkları Polikliniğine gelen 91 gönüllüden alınan vajinal sürüntü örneklerinde, *Lgas*, *Lcris* ve *Ljen*'nin vajinal enfeksiyon varlığında ya da postmenopozal dönem yaş grubunda saptanma durumunun etkilenip etkilenmediği araştırıldı. Bakteri RNA'larının dışında Ubiuquitin Konjugasyon Enzimi (UCE) ve Gliseraldehit Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) internal kontrol olarak kullanıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Adli bilimlerde DNA kullanımını 1984 yılı sonrası hızlı bir ilerleme göstermiş ve daha çok kimliklendirme de kullanılan rutin serolojik testlerin de bütünüyle gündemden düşmesine neden olmuştur. Bu dönemde adli örnek analizinde RNA kullanımının mümkün olmadığı, bunun nedeninin ise RNA'nın hızlı bir şekilde basit parçalara ayrılması olduğu öne sürülmüştür¹⁶.

RNA kullanımına yönelik ilk adli araştırmanın 1984 yılında yapıldığı ve postmortem RNA sentezi ile alakalı olduğu, adli bilimlerde RNA kullanımına yönelik ikinci çalışmanın ise bu tarihten 10 sene sonra 1994 yılında yapıldığı, araştırmanın postmortem dokuda gen ekspresyon analizi konusunda olduğu görülmektedir¹⁷⁻¹⁹. İlerleyen dönemlerdeki teknolojik gelişmeler sayesinde RT-PCR tekniği kullanılarak, yara yeri iyileşmesi sırasında meydana gelen moleküler değişimler ve vücut sıvılarının tanımlanmasına yönelik çalışmalar yapılmış olup bu iki alanda RNA'nın kullanılabilmesini gösteren sonuçlara ulaşıldığı ifade edilmiştir²⁰. Elde edilen olumlu sonuçlar adli camianın ilgisini çekmiş ve RNA ile ilgili gitgide artan oranlarda moleküler çalışmaların da yapılmasını sağlamıştır. Araştırmaların kapsamı vücut sıvılarının identifikasyonu ve yara iyileşmesindeki moleküler değişimlerle sınırlı kalmayıp, biyolojik lekelerde yaş tayini, postmortem interval, normal ve patolojik gen ekspresyonları arasındaki farkların belirlenmesini de içermektedir.

2.2. Vücut Sıvılarının Tanımlanmasının Önemi

Herhangi bir olay yeri incelemesinden elde edilen biyolojik örnekteki Deoksiribonükleik Asit (DNA) aracılığıyla şüpheli ya da mağdurun genetik yönden profili ortaya konmaktadır. DNA analizi ile kimlik tespiti yapılabilmesi için ortamda çok az sayıda çekirdekli hücrenin bulunması yeterli olurken, biyolojik örneğin ne olduğu konusunda herhangi bir tespit yapılamamaktadır²¹.

Olay yerinden elde edilen vücut sıvılarından, DNA analizi aracılığıyla genetik profil ortaya koymanın yanında, vücut sıvılarının orijini hakkında da tayin yapılması gerekmektedir^{1,2}. Olayın nasıl gerçekleştiği ve olay yerinin yeniden canlandırılması konusunda orjinin tayini önemli bir yer tutmaktadır³.

Örneklerle açıklayacak olursak, menstrüel döneminde cinsel saldırıya uğrayan bir kadına ait menstrüel kanın, saldırıyı gerçekleştiren kişinin üzerinde saptanması ve sanığın avukatı tarafından bu kanın menstrüel kan mı, yoksa burun kanaması mı olduğu konusunda ayırım yapılmasının istenmesi, adli olayın sağlıklı bir şekilde çözümlenmesine aracı olacaktır^{5,6}. Aynı şekilde, semen lekesinin mağdur üzerinde bulunması ya da vajinal sıvının penil bir sürüntü de varlığı cinsel aktivite iddiasını, mağdur üzerinde saptanacak tükürük ile de ısırik izinin bulunduğu ortaya konacaktır^{3,7}.

Olay yerinin yeniden canlandırılması cinsel saldırı olaylarının çözümlenmesine yardımcı olmaktadır. Olay yerinden elde edilen vajinal sekresyonun nerede ve nasıl bir nesne üzerinde(giysi, mobilya) olduğu, biyolojik sıvıların ortamdaki bulunma alanlarına bakılarak cinsel aktivitenin gönüllü bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği konusunda, mağdur ya da şüphelinin beyanlarını destekleme anlamında önemlidir^{3,4}.

2.3. Moleküler İdentifikasyonda Bakterilerin Kullanımı

Özel bir bakteri popülasyonunun steril olmayan vücut sıvılarındaki varlığı göz önüne alındığında, mikrobial türlerin belirlenmesi bir numunenin kaynağını belirlemede yardımcı olabilir. Son 5-10 yıl boyunca PCR ve DNA dizilerinin büyük ölçüde tespiti, klinik ve çevresel açıdan bakterilerin tanımlanmasına imkân sağlamıştır²⁸. Örneğin, *Staphylococcus aureus* insan derisindeki mikrobiyal topluluğun baskın ve kalıcı bir unsurudur. *Staphylococcus aureus*'un saptanması ve bu sayede cilt dokusunun identifikasyonuna yönelik adli çalışmalar yapılmaktadır²²⁻²⁶. Benzer şekilde 6 yıl süre ile saklanmış olan eski adli örneklerde (tükürük lekesinde) *Streptokokus salivarius* ve *Streptokokus mutans*'in varlığı ortaya konarak tükürük sıvısının saptanabileceği gösterilmiştir^{27,28}. *Enterococcus* cinsi bakterilerin de tanımlanması ile fekal bulaşın olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmaktadır²³.

2.4. Vajinal Sıvının Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler

Diğer vücut sıvılarının aksine vajinal sekresyonun identifikasyonu biraz daha karmaşıktır. Bu konu hakkında daha önceki yapılan çalışmalarda, lugol iyodin reaksiyonu ile vajinal epitel hücrelerinde bulunan glikojenin gösterilmesi hedeflenmiş olup şüpheli kişiden yapılacak penil sürüntü üzerinde vajinal sekresyonun tespiti hedeflenmiştir. Fakat, lugol

pozitif hücrelerin aynı zamanda erkek üriner sisteminde de mevcut olması bu yöntemin adli tıp açısından uygulanmasının önüne geçmiştir^{8,9}.

Vajinal sekresyonun tanımlanmasına yönelik son dönemlerdeki çalışmalarda, HBD-1, MUC-4, ESR 1 markerlarına ait mRNA'ların RT-PCR'a bağlı identifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun dışında MUC-4 ve beraberinde HBD-1'in hedef doku dışında tükürükte de görülebildiğini bildiren araştırmalar da olmuştur^{7,10,11}.

Çalışmamızda konusu olan ve vajinal sekresyonun tanımlanmasında kullanılan bir başka yöntemisel *Lactobacillus* türlerinin tespitidir. *Lactobacilluslar* vajinal florada dominant olarak bulunan bakteriler olup gastrointetinal sistem florasında da bulunabilmektedir. *Lactobacillus*'ların vajinal sıvının identifikasyonunda kullanılabileceğini gösteren ilk çalışma 2009 yılında Fleming ve Harbison tarafından gerçekleştirilmiştir^{13,14}. Fleming ve Harbison *lactobacillus*'ların iki türü olan *Lgas* ve *Lcris*'in kullanılabileceğini bildirmiş olup bu bakterilerin 16S-23S rRNA intergenic spacer bölgesinin PCR'a dayalı olarak gösterilebileceğini belirtmişlerdir. *Lactobacillus*'un bu iki türü haricinde bir başka tür olan *Ljen* de ek olarak çalışılmıştır¹⁵. Bizde çalışmamızda bu üç bakteri (*Lgas*, *Lcris*, *Ljen*) türünün vajinal sekresyonda varlığının enfeksiyon ve postmenopozal dönemde etkilenip etkilenmediğini araştırdık.

2.5. Vajinanın Anatomik ve Fizyolojik Yapısı

Kadınlardaki dış üreme sisteminin önemli bir organı olan vajina; ön tarafta üretra ve mesane ile arka tarafta rektum ve anal kanal arasında uzanmaktadır. Serviks uteri ile vücut dışı arasında bağlantı sağlayan 7-10 cm uzunluğunda fibromüsküler tüptür^{29,30}.

Vajinanın tabakaları 3 katmandan oluşmakta olup bunlar içten dışa doğru, tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisyadır. Keratinize olmayan yassı epitel ile kaplı olan vajen mukozası, östrojene bağlı olarak artan ya da azalan miktarlarda glikojen içeren epitel hücrelerine sahiptir. İdentifikasyonunu yapmaya çalıştığımız vajinal sekresyon, daha çok servikal sekresyonlar ve hücreler arasındaki kılcal damarlardan transuda aracılığı ile oluşmaktadır. Vajen duvarında salgı bezi olmadığından vajinanın kendisi tarafından sekresyon yapılamamaktadır^{31,32}.

Vajinal sekresyonun içeriğinde; %90-95 su, yağ asitleri, albüminler, organik ve inorganik tuzlar, lizozim, demir, dökülen epitel hücreleri, karbonhidratlar, immunglobulinler bulunmaktadır. Karbonhidratlar arasında basit ve kompleks şekerler bulunmakta olup glikojen, glukoz ve maltoz bunların bazılarıdır³³.

2.6. Vajinal Ekosistem

Ekosistem açısından dengeli bir floraya sahip olan vajina, hormonal ve fizyolojik nedenlere bağlı olarak florası etkilenirken, flora da vajinal ekosistemi düzenlemektedir^{34,35}. Bazı dönemlerde hormonal etkilere bağlı olarak vajinal florada bakteriyel farklılıklar ve yoğunluk açısından çeşitlilikler görülebilmektedir(çizelge 1). Hayatın farklı evrelerinde östrojen ve östrojene bağlı olarak glikojenin varlığı ya da östrojenin olmaması nedeniyle glikojen yokluğu, vajinal mukozadaki epitelyum hücrelerinde ve florada önemli değişimlere sebep olabilmektedir.

Bu değişimlerin olduğu dönemler, doğum sonrası anneden geçiş yoluyla ilk bir haftalık kısım, doğumun bir hafta sonrasında puberteye kadar olan dönem, puberteden menopoza kadar uzanan evre ve post menopozal dönemlerdir (çizelge 2). Laktik asit bakterileri olan *Lactobaciller*, *Difteroidler*, *Streptokok* ve *Stafilokok* östrojenin yoğun olduğu evrelerde miktarlarında artış gösterirler^{36,37}.

Glikojen miktarında bir azalma olduğunda, vajinal floranın asidik yapısı alkaliye doğru kaymaktadır. Glikojenin yokluğu nedeniyle laktik asit bakterileri miktarı azaltmakta ve anaerop bakterilerin sayısı artış göstermektedir^{36,38}.

Çizelge 1. Sağlıklı kadınlarda vajinal ekosistemden sıklıkla izole edilen bakteri türleri³⁹

Gram Pozitif Fakültatif anaerob bakteriler	Gram Pozitif Zorunlu anaerob bakteriler
<i>Lactobacillus gasseria</i> <i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Lactobacillus iners, Lactobacillus casei</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptokoklar, Enterococcus faecalis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Eubacterium spp.</i> <i>Peptococcus niger</i>
Gram Negatif Fakültatif anaerob bakteriler	Gram Negatif Zorunlu anaerob bakteriler
<i>Eschericia coli</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae, Morganelle morganii</i> <i>Proteus mirabilis, Proteus vulgaris</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Veilonella spp. Prevotella bivia</i>

Birçok faktöre bağlı olarak vajinal flora değişebilmektedir. Bunlardan bazıları, vajen epitelyum hücrelerindeki glikojen, Rahim İçi Araç (RİA), doğum kontrol hapları (OC), puberte dönemi, cinsel aktivite esnasındaki travmalar, antimikrobial tedavi, sigara kullanımı, ilerleyen yaş, artmış cinsel aktivite, doğum, vajinal duş, kontrolsüz diyabet olup florada değişimlere neden olabilmektedir²⁹.

Çeşitli nedenlere bağlı olarak vajinal flora dengesinde meydana gelecek bir bozulma, patojen bakterilerin ortamda çoğalmasına ve bu nedenle vajinal enfeksiyonlara yol açabilmektedir^{40,41}.

Reproduktif dönemdeki sağlıklı bir kadında vajen asidik yapıdadır. Flora bakterileri ile vajinanın epitel hücrelerinde yer alan glikojen metabolize edilerek laktik asit oluşturulur. Üretilen laktik asit vajen pH'sını 4.5'in altına düşürerek ortamda patojen bakterilerin üremesine engel olmaktadır^{42,43}.

Menopoz, premenopoz, menstrüel siklus döneminde hormonal değişimlere bağlı olarak, vajina epitelyum hücre tabakasında incelme ve içeriğindeki glikojenin azalmasına bağlı olarak vajinal pH ve sekresyonda değişiklikler olmaktadır^{29,44}.

Çizelge 2. Sağlıklı kadınlarda hayatın farklı dönemlerinde vajinanın fizyolojik koşulları^{31,42}

	Yenidoğan	Puberte Öncesi	Puberte Sonrası	Menopoz sonrası
Östrojen Seviyesi	++++	+	+++	+
Glikojen Miktarı	++++	+	+++	+
Vajinal pH	<5.0	>5.0	<5.0	>5.0
Epitel Kalınlığı	Artmış	Azalmış	Artmış	Azalmış
Lactobaciller	Artmış	Azalmış	Artmış	Azalmış

Çeşitli nedenlere bağlı olarak laktik asit üreten bakterilerde meydana gelebilecek bir azalma, vajinal flora asiditesinde düşmeye hatta 4.5'in altında olması gereken vajen pH'sının 7'yi geçmesine sebep olmaktadır. Artan pH nedeniyle menopoz sonrası üropatojenler baskın pozisyona geçmektedirler. Patojen bakteri popülasyonundaki artışa bağlı olarak ürogenital sistem enfeksiyonları gözlenebilmektedir⁴⁵. Bazı durumlarda fekal bulaşa bağlı olarak vajinal enfeksiyonlar gelişebildiği, östrojen ile tedavi sonrası *Lactobacillusların* tekrar oluşumu sağlanarak hem genital hem üriner sistem enfeksiyonlarının azaldığı gösterilmiştir³¹.

2.7.Lactobaciller

Doğal bir denge ortamının hakim olduğu vajinal flora, *Lactobacillus* türlerinin baskın olarak bulunduğu bir ekosisteme sahiptir. *Lactobaciller* vajen florasında ilk olarak 1892 yılında saptanmıştır. Döderlein tarafından keşfedilen bu bakteri türlerine belli bir dönem döderlein basili de denilmiştir⁴⁶.

2.7.1. *Lactobacillus*ların Sınıflandırma ve Üreme Özellikleri

Lactobaciller hareketsiz, sporsuz, gram pozitif, katalaz ve oksidaz negatif, oksijen kullanımını yönünden anaerop veya mikroaerofilik yapıda, %10 CO₂'li ortamda oldukça iyi bir üreme özelliği gösteren bakterilerdir⁴⁷.

Lactobacillerin dış ortamda çoğalmaları zor olduğundan, besiyerlerine eklenen inhibitörlerle optimum şartlar sağlanmaktadır. *Lactobaciller* en iyi De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agarda üremekle birlikte en iyi üreme sıcaklığı 37 °C olup kan, serum gibi protein açısından zengin içerikli materyallere ihtiyaç duymaktadır. 48 saat ve 10 inkübasyon döngüsünden sonra yuvarlak, beyaz renkli koloniler oluşturarak ürerler. Fermantasyon özelliği olan *Lactobacillerin* karbon kaynağı glikoz olup laktik asit üretimi yapmaktadırlar⁴⁸. *Lactobaciller* früktoz, mannoz, laktoz, riboz ksiloz gibi şekerleri fermente etme durumlarına göre grup A, B, C şeklinde sınıflandırmaları yapılmıştır⁴⁹. Grup A'da *L.acidophilus*, *L.cris* ve *L.jen*, Grup B'de *L.plantarum* ve *L.casei*, Grup C'de *L.brevis* ve *L.fermentum* gibi türler bulunmaktadır^{47,49}.

2.7.2. *Lactobacillus*ların Ekolojik Özellikleri

Lactobacillerin yaşadıkları ortamlar çoğunlukla karbonhidrat yönünden zengin içerikli alanlardır. Gastrointestinal sistem, ağız, vajen gibi mukozal alanlar *Lactobaciller* için uygun yaşam alanlarıdır. Gastrointestinal sistemde bulunan *Lactobaciller*, *L.fermentum*, *L.jen*, *L.cellobiosus*, *L.cris*, *L.acidophilus* iken ağız florasında *L.salivarius*, *L.fermentum*, *L.acidophilus* bulunmaktadır^{48,49}.

Herhangi bir hastalığı olmayan kadınlara ait vajen florasında birkaç *lactobacillus* beraber bulunabilmektedir. Daha sonra *Lactobacillus* türleri çeşitli nedenlere bağlı olarak değişim gösterebilir, farklı *Lactobacillus* kombinasyonları vajen florasına hakim olabilir. Vajinal florada bulunan *Lactobacillerle* ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Türkiye ve Amerika'da yaşayan kadınlardan alınan vajinal sürüntü örneklerinde en çok *Lgas*, *L.cris*, *L.jen* olduğu, bir başka çalışmada ise vajen florasında en çok bulunan türün *Lgas* olduğu gösterilmiştir^{50,51}.

Lactobacillusların vajen florasındaki görevi patojen bakterilerin çoğalmasını ve vajinal ekosistemin bozulmasını engellemek olarak söyleyebiliriz. Bu görevi antagonist iki farklı yolla göstermektedir⁴⁸. Bu yolları inceleyecek olursak;

2.7.2.1. *Lactobacillerin* Agregasyon ve Koagregasyonu

Vajen florasında yer alan *Lactobaciller*, patojen bakterilerin vajen epiteline tutulmalarını önlemek amacıyla buldukları bölgeye ve birbirlerine tutunarak doğal bir bariyer oluşturmaktadır. Koagregasyonla birlikte vajene giriş yapan patojen bakteriler tutularak etkisiz hale getirilir ve bakteriyel toksinler ile bakteriyel invazyon önlenmiş olur⁵². Yapılan bazı çalışmalarda vajende yer alan bazı *Lactobacillus* türlerinden Agregation Promiting Factor (APF) salınımı sayesinde otoagregasyon gösterdiği bildirilmektedir^{52,53}.

2.7.2.2. *Lactobacillerin* İnhibisyon Özelliği

Patojen bakterilere karşı antimikrobial bir yaşam alanı oluşturan *Lactobaciller*, hidrojen peroksit (H_2O_2), laktik asit, bakteriosin, bakteriosin benzeri maddeler, biosürfaktan sentezleyerek bu görevi yerine getirmektedirler^{33,54-56}.

Glukoz başta olmak üzere çeşitli karbonhidratları kullanarak laktik asit üretimi yapan *Lactobaciller*, vajen pH'sını düşürerek *G.vajinalis*, *E.coli*, *C.albicans*, *Mobilincus* gibi patojen bakterin ekosisteme yerleşmesini ve üremesini önlemede önemli bir görev almaktadır^{33,54,55}.

Vajinal florada meydana gelen bir değişim doğal olarak vajen florasının koruyucu özelliğini kaybetmesine neden olmaktadır³³. *Lactobaciller* katalaz enzimine sahip olmadıklarından hidrojen peroksiti (H_2O_2) parçalayamaz ve kendileri için de toksik etki gösteren hidrojen peroksiti vajinal flora aktarırlar. H_2O_2 ve bakteriosinler sayesinde invaze olmaya çalışan bakterilerin hücre duvarları bozularak üremeleri duracak ve bunun sonucunda da vajinal ekosistemin korunması sağlanacaktır⁵⁷⁻⁵⁹.

Kadınlarda en çok görülen vajinal enfeksiyon türü Bakteriyel Vajinozis (BV)'dir. Vajen florasında *Lactobacillus* bulunan kadınlarda BV görülme durumu ciddi şekilde azalmaktadır^{33,54,55}. Vajinal floradaki *Lactobacillus* türlerinden olan *Lcris* ve *Ljen*, H_2O_2 üretiminin %90'luk bölümünü gerçekleştirmektedir. Bu sayede bakteri, virüs ve mantara karşı toksik etki oluşmakta ve üreme durmaktadır⁶⁰.

Yapılan bazı çalışmalarda BV tanısı alan olgularda H_2O_2 üreten *Lactobacillerin* %6 gibi düşük oranlarda olduğu, sağlıklı bireylerden çalışılan kontrol grubunda ise %86 seviyesinde olduğu gösterilmiştir⁶¹.

H_2O_2 üretimi yapan *Lactobacillerle* ilgili olarak yapılan bir çalışmada; Human Immünodeficiency Virus(HIV) pozitif olan olgularda, HIV negatif olgulara kıyasla daha az sayıda H_2O_2 üreten *Lactobacillus* türü olduğu, bu nedenle H_2O_2 üretimindeki düşüşe bağlı

viral enfeksiyon geişişinin kolaylaştığı gsterilmiřtir⁶². Benzer şekilde H₂O₂ reten *Lactobaciller* sayesinde cinsel yolla bulaşan bir başka virüs olan Human Papilloma Virüs (HPV)'ye karşı da koruma sağlandığı grlmřtir⁶³. Viral etkenler dışında *Gardnerella vaginalis* ve *Neisseria Gonore* gibi bakteriyel etkenlere karşı da hidrojen peroksitin ldr etkisi olduğu dřnlmektedir⁶⁴.

Lactobaciller, patojen bakterilerin vajende üremesini durdurmak amacıyla laktik asit ve H₂O₂ dışında bakteriosin denilen bir madde daha sentezlemektedir. Bu madde aracılığıyla mantar, gram pozitif ve negatif bakterilerin üremesinin önlendiği, yapılan bir çalışmada posterior forniksten elde edilen *Lactobacillerden* salınan bakteriosin ile *Candida albicansın* remesinin durduğu, bu sayede candida vajinitinin gelişmesinin önlendiği gsterilmiştir^{56,65}.

2.8.Kadın rogenital Sistemlerinde Görülebilen Enfeksiyonlar

Vajinal enfeksiyonlara sebep olan mikrobial ajanlara arasında *Gardnerella vaginalis*, *Stafilokok* türü bakteriler, *Trichomonas vaginalis* gibi parazitler, candida cinsi mantarlar yer almaktadır^{66,67}. BV daha sık görülmekle birlikte, candida vajiniti ve trikomonyazis vajinal enfeksiyonların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır.

Bakteriyel Vajinozis

Vajinal florada dominant olarak bulunan *Lactobacillus* trlerinin vajinal kondom, diyafram gibi yabancı materyallerin kullanımı ya da vajinal duş için kullanılan kimyasallara bağlı olarak yerini *G. vaginalise* bırakması sonucu BV gelişmektedir (izelge 3). Klinik olarak asemptomatik olabildiği gibi kötü kokulu akıntı, kaşıntı şeklinde bulgularda verebilmektedir⁶⁸.

Çizelge 3. Vajinal florada değişikliğe neden olan faktörler⁶⁹

Yabancı cisimler (RİA, Diyafram, Tampon vb.) ve spermisit ajanlar
Tedavi, yaşlanma veya oral kontraseptif kullanımı nedeniyle olan hormonal değişiklikler
Antibiyotik, sitostatik, kortikosteroid, antiviral, antifungal ilaçlar ve radyoterapi
Vajen duşu
Kontrolsüz diyabet
Cerrahi ve radyoterapi sonrası gelişen malformasyon ve anatomik deformiteler
Kistler, himen, polipler
İmmünyüpresyon durumları(AIDS, vb)

Kandida Vajiniti

Vajinanın doğal florasında mantarlarda yer almaktadır. Vajinal mantarların içerisinde en sık görülen ve vajinal enfeksiyona neden olan tip *Candida albicans*'tir. *Lactobacillerden* salgılanan H₂O₂ nin *C. albicans* üzerinde inhibisyon etkisinin kalkması sonucu candida vajiniti gelişmektedir^{70,71}. Çeşitli nedenlere bağlı olarak vajinal floradaki *Lactobaciller* üzerinde meydana gelebilecek bir değişim *C. albicans*'ın vajindeki sayısının artmasına neden olacaktır⁶⁸.

Candida vajiniti daha çok;

-Gebe kadınlar,

-Diyabeti olan hastalar,

-Enjektabil ya da oral kontraseptif kullanımı,

-Daha çok ampisilin ve tetrasiklin türü antibiyotik kullanan kadınlarda daha sık gözlenmektedir⁷².

Trikomoniyazis

Cinsel yolla bulaşan hastalıklardan olan trikomoniyazisin etkeni *T. vaginalis*'tir. Bir tür parazit olup vajen pH'sı bazik ve zayıf asidik olan floralarda gelişim gösterebilmektedir. Cinsel aktif dönem kadınlarda görülen trikomoniyazis, enfekte olan kişinin salgılarına veya kontamine olan yabancı cisim aracılığıyla geçiş göstermektedir. Herhangi bir semptom olmadığı gibi, vajinal akıntı, kaşıntı gibi semptomlarla da kendini gösterebilmektedir^{72,73}.

Toksik Şok Sendromu

Staphylococcus aureus nedenli bir vajinal enfeksiyon türü toksik şok sendromu, vajinal tampon ve kötü hijyen koşullarına sekonder ortaya çıkabilmektedir. Diğer vajinal enfeksiyonlarda olduğu gibi *Lactobacillusun*, *S. aureus* üzerindeki baskılayıcı etkisinin azalması bu hastalığın ortaya çıkmasını tetiklemektedir^{72,74}.

İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü ve AIDS

AIDS'e neden olan HIV etkeninin geçişi cinsel yolla ve kan yoluyla mümkün olabilmektedir⁷⁵. HIV'in cinsel yolla geçişiyle alakalı yapılan bazı çalışmalarda *Lactobacillerin* etkili olduğu gösterilmiştir. 657 hayat kadınının %26'sında *Lactobacillus* türlerinin görüldüğü, *Lactobacillerin* olmadığı geri kalan grupta HIV-1'le geçişin kolaylaştığı, bu durumun *Lactobacillerden* salgılanan laktik asit ve H₂O₂ ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir⁷⁶.

2.9. RNA Çeşitleri ve Özellikleri

RNA nükleotitlerden oluşan polimer yapıda bir nükleik asittir. Nükleotitlerin her birinde Adenin, Guanin, Sitozin veya Urasil bazlarından biri, beş karbonlu riboz şeker ve bir trifosfat grubu yer almaktadır. Fosfodiester bağları ile birbirine bağlanan riboz şekerler RNA'nın tek zincirde uzamasını sağlamaktadır^{77,78}. RNA ile DNA arasındaki fark, DNA'da bulunan timin bazı yerine RNA'da urasil bazının bulunması, RNA'nın tek zincirli bir nükleik asit olup DNA'nın çift sarmal oluşudur. Farklı türde RNA'lar da bulunmakta olup inosin, pseudouridin gibi bazlar da kullanılabilir. RNA'lar hücre içerisinde protein sentezine aracılık eden ve bu süreci düzenleyen moleküllerdir⁷⁹.

RNA'nın üç farklı tipi olan mesajcı RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) yaygın bilinen RNA tipleri olsa da, gen ekspresyonu ve ekspresyon sürecinde düzenleme ile protein biyosentezinde de görevi olan farklı RNA tipleri de bulunmaktadır⁷⁹.

2.9.1. mRNA

mRNA sentezi, RNA polimeraz enzimi sayesinde DNA'nın transkripsiyonu sonucu gerçekleştirilmektedir. mRNA'lar, DNA'da kayıtlı olan genetik bilgiyi alan transkripsiyon ve translasyona katılan, almış olduğu genetik bilgiyi protein biyosentezi amacıyla ribozomlara taşıyan, tek zincirli bir nükleik asittir^{80,81}.

mRNA üzerinde yer alan nükleotit diziler aracılığıyla, aminoasitlerin sırası belirlenmekte, protein sentezi bu mesaja uygun şekilde yapılmaktadır. Ökaryotik hücrede 10000 farklı mRNA molekülü bulunmakta olup sitoplazmadaki ribozomlar üzerinden protein sentezine aracılık etmektedir^{82,83}.

2.9.2.tRNA

tRNA'lar, mRNA üzerindeki nükleotit dizilerine uygun aminoasitleri taşımakla görevlidir. İki ucu sap şeklinde olan üç yapraklı bir yoncaya benzeyen tRNA, tek zincirli ve çok kıvrımlı bir yapıdadır. Her tRNA'da spesifik bir antikodon dizisi bulunmaktadır⁸⁴. Molekül ağırlığı 23000-30000 dalton arasında olup 70 ile 99 arasında ribonükleotit bulundurmaktadır^{83,85}.

2.9.3. rRNA

rRNA, ribozomların yapısında bulunmakta ve ribozom ağırlığının büyük bölümünü oluşturmaktadır. Sitoplazmada bulunan RNA'ların %80'lik kısmı rRNA'dır. rRNA'nın görevi, mRNA'da kodlu olan bilgiye göre uygun aminoasiti getiren tRNA'larla etkileşimi sağlamak ve uzayan polipeptit zincirine aminoasitleri aktarmaktır⁸⁶. rRNA'nın tüm canlılarda korunması, nükleotid dizilerine bakılarak evrimsel çalışma yapılmasına olanak sağlamaktadır⁸⁷.

2.9.4. Küçük RNA'lar

mRNA, tRNA, rRNA'ya ek olarak birbirinden farklı görevleri olan küçük RNA'lar da bulunmaktadır⁸⁸. Bunlardan bazıları;

- **MicroRNA'lar (miRNA):** Uzunluğu yaklaşık olarak 21-23 nükleotit dizisi boyutunda olan tek iplikli RNA türüdür. miRNA'lar kodlama yapmayan, DNA transkripsiyonu olan protein çevirisi olmayan RNA'lardandır. Bu özelliği ile protein sentezini engellemektedir^{89,90}.
- **Short interfering RNA'lar (siRNA):** Yakın dönemde keşfedilen RNA türü olup miRNA gibi gen ekspresyonunun engellemektedir⁹¹.

Small nucleolar RNAs (snoRNAs), Small nuclear RNAs (snRNAs), PIWI interacting RNA (piRNA) diğer küçük RNA'lardır^{92,93}.

Adli genetikte, şu ana dek RNA türleri arasında faydalanabilecek yapıda olduğu düşünülen ve üzerinde çalışma yapılan RNA türlerinden mRNA ve miRNA'lar vücut sıvı ve dokularının tanımlanmasında, rRNA'ların ise tür identifikasyonunda kullanılabilir olup olmadığı araştırılmıştır^{94,95}.

Klasik testlerle kıyaslandığında mRNA belirteçlerinin kullanımı çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu avantajların ilki, çalışılacak olan bir örnekten aynı anda hem DNA hem de RNA izolasyonuna imkan sağlamasıdır. Vücut sıvılarının identifikasyonu amacıyla yapılan serolojik testler ile kıyaslandığında oldukça az bir miktarda numunenin varlığı yeterli olmaktadır. Bunun dışında bir numune de birkaç adet mRNA belirteci kullanılabilenekte, bu sayede olay yerinden elde edilen örnekten kazanç sağlanmakta, mali anlamda ve zaman açısından da tasarruf elde edilebilmektedir^{96,97}. Herhangi bir vücut sıvısının tanımlanması işleminde en az ikişer adet mRNA belirteci ve internal kontrol belirtecinin kullanılması ile yanlış pozitif sonuçların da önüne geçileceği belirtilmektedir⁹⁸.

RNA analizi 4 basamakla gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla;

- 1- RNA'nın izole edilmesi,
- 2- RNA miktarının tayini (kantitasyon),
- 3- Revers Transkriptaz ile cDNA sentezi (reverse transkripsiyon)
- 4- cDNA ile elde mRNA belirteçlerinin PCR ile çoğaltılmasıdır⁽⁹⁹⁾.

2.10. RNA İzolasyonu

RNA'nın izole edilebilmesi için öncelikle hücrelerin parçalanması ve bu işlem sırasında RNA'ların hasara uğratılmaması gerekmektedir. Trizol ya da guanidinium izotiyosiyanat gibi solüsyonlar kullanılarak hücrenin parçalanması sağlanırken RNA'ların bozulmasında önlenmiş olur. Daha sonra hücreler arasında yer alan RNA uygun presipitasyon yöntemlerinden biriyle izole edilir. Bu amaçla fenol kloroform, izopropanol ya da silika temelli izolasyon yöntemi kullanılabilir^{100,101}.

Hücrelerin yıkımı sonucu elde edilen RNA'lar kaliteli olmalıdır. Ayrıştırılan RNA'dan istenilen sekansı çoğaltabilmek için ortamın DNA'dan arındırılmış olması, kullanılacak revers transkriptaz enzimini olumsuz etkileyecek inhibitör bir maddenin olmaması, ilerleyen süreçte bir bozulmanın olmaması için nükleaz enziminin bulunmaması gerekmektedir¹⁰².

DNA ve RNA'nın birlikte izolasyonu ile numune kaybı önlenmektedir. DNA ve RNA ko-izolasyon kitleri bu iş için kullanılmaktadır. Parçalanmış hücrelerden ortama geçen DNA'lar bir silika kolona, RNA'lar da başka bir kolona bağlanmaktadır¹⁰³⁻¹⁰⁴.

Trizol ya da guanidinium izotiyosiyanat ile hücreler parçalandıktan sonra, karışım içerisinde yer alan DNA'nın silika temelli kolondan geçirilerek partiküllere bağlanması sağlanır. Alt fazda toplanan karışım uygun pH'daki solüsyonlarla karıştırıldıktan sonra, kit içinde bulunan RNA kolonundan geçirilir ve RNA'nın da tutunması sağlanmış olur. Daha sonra kolonlara bağlanan RNA ve DNA molekülleri ependorf tüplere aktarılır. Bu şekilde aynı numuneden hem RNA hem de DNA izole edilmiş olur^{105,106}.

2.11. Miktar Tayini (Kantitasyon)

PCR öncesinde RNA miktarının tespiti kaliteli bir sonuç elde edebilmek için önemlidir. Örneğin, RNA miktarının az olduğu bir durumda istenilen kalitede ürün elde edilemezken, cDNA miktarı fazla kullanıldığında ise yanlış piklerin oluşması söz konusu olabilmektedir. Araştırmacılar PCR'da kullanılacak cDNA konsantrasyonunun 2-10 ng arasında olmasının uygun olduğunu belirtmiştir^{107,108}.

RNA miktarının tespitine yönelik birkaç yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birinde, izole edilen RNA'nın 260 ile 280 nm'de ürün miktarı ve saflığı ölçülmektedir. Bir başka yöntemde 18S ve 28S rRNA'larının agaroz jel elektroforezi ile çalışılmasıdır. Fakat bu yöntemler adli amaçlı çalışmalarda zayıf kalmakta olup özgünlüğü ve hassasiyeti daha yüksek olan çip-bazlı kapiller elektroforez yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemle RNA bütünlük

numarası (RIN) veya RNA nitelik indeksi hesabı yapılmaktadır. Sadece rRNA pikleri değil muhtemel bozunma ürünleri de dahil edilerek hesaplanmaktadır. RIN ve RQI değerleri 1'den 10'a kadar değişmektedir. RIN/RQI oranında RNA bütünlüğü için ayırıcı değer olarak en 5 kullanılmaktadır¹⁰⁹.

2.12.cDNASentezi

Hücre içerisinde meydana gelen olaylardaki bilgi aktarma faaliyeti, DNA'dan RNA'ya, sonrasında proteinlere olacak şekildedir. Bunun yanısıra, RNA'dan DNA'ya bilgi akışının olduğu durumlarda söz konusudur. Bir RNA virüsü olan HIV, revers transkriptaz enzimi aracılığıyla RNA'daki bilgileri DNA şeklinde sitoplazmaya aktarmaktadır. Buradan hareketle revers transkriptaz enzimi kullanılarak in vitro ortamda mRNA'nın DNA'ya dönüşümü sağlanabilmektedir. Dönüşen bu moleküle komplementer cDNA denilmektedir¹¹⁰.

RNAazlar tarafından her ortamda parçalanabilen ve doğal şartlarda kolayca indirgenebilen RNA'nın tüm bu sebepler eşliğinde cDNA ile çok daha rahat çalışılabileceği ortaya konmuştur. dNTP'ler (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), primerler, reverse transkriptaz enzimi ve kalıplar halinde kullanılan izole RNA molekülleri, cDNA sentezinin in vitro sentezi için gereklidir. cDNA ilk zincir sentezinin sağlanabilmesi için hazırlanan karışımın optimum sıcaklıkta dinlendirilmesi, ilk sentezde meydana gelen cDNA'nın ikinci zincirinin sentezlenmesi içinse ortamdaki RNA'nın elimine edilmesi gerekmektedir¹¹¹.

Üç değişik primer cDNA sentezi için kullanılabilir. 3' polyA kuyruğuna sahip olan tüm RNA'ların eş zamanlı olarak cDNA'ya dönüşümü sağlanmak istenirse oligo-dT primerinin; tek bir RNA dizisinden cDNA dönüşümü sağlanmak istenirse de o RNA sekansına bağlanması sağlanacak özgül primerlerin kullanılması uygun olacaktır. Rastgele primerlerden oluşturulan karışımlar ise genoma dağılmış halde bulunan tüm RNA'lardan cDNA üretiminde gereklidir. Reverse transkriptazlar uzun RNA'ların 5' ucuna erişemeyeceğinden, RNA'nın 5' ucunun cDNA'ya dönüşme ihtimalinin artması ile kısa cDNA parçalarının da sentezi rastgele primer karışımları kullanımının en büyük kazanımıdır. Piyasalardan çok çeşitli olan özel cDNA sentez kitleri temin edilebilmekte, cDNA üretimi kolaylıkla yapılabilmektedir¹¹²⁻¹¹⁴.

2.13. PCR

İn vitro koşullarda DNA parçasının çoğaltılabilmesi yöntemine PCR denmektedir. Kalıp DNA, forward ve reverse primer çifti, reaksiyon tamponu, dNTP'ler, DNA polimeraz enzimi ve MgCl₂ PCR tekniği için gereklidir. Öncelikle yüksek sıcaklıkta (90-95⁰C) bekletilerek karışımdaki ikili DNA sarmalının birbirinden ayrılması sağlanır, devamında sıcaklığın derecesi azaltılır (50-70⁰C). Böylece çoğaltılacak DNA segmenti üzerinde oligonükleotid primerlerinin karşılıklı bağlanması gerçekleştirilmiş olur. Burada bilinmesi gereken PCR döngüleri arasındaki ikili sarmalın açılmasını sağlamak için uygulanan yüksek sıcaklık derecelerine, solüsyonda bulunan DNA polimeraz enziminin dayanıklı olduğudur¹¹⁵. Primerlerin bağlanmasını takiben sıcaklık polimerizasyon için uygun dereceye (70-75⁰C) getirilir. Bununla beraber primerlerin uzaması sağlanır ve iki primer arasındaki bölge sentezlenmiş olur. Sarmalların tekrar denatüre edilmesi, yeni primerlerin bağlanması ve DNA üretiminin seri olarak devam etmesi sağlanır. Seri 20'ye ulaştığında hedeflenen DNA segmenti 1 milyon katına çıkarılmış olur¹¹⁶.

İki farklı PCR yöntemi adli alanda RNA çalışması için kullanılmaktadır. İlki reaksiyon sonucunda ürün oluşması ya da oluşmamasına ait kalitatif/semi-kalitatif sonuçların elektroforez yöntemi ile elde edilebilen kalitatif PCR (end-point normal PCR), ikincisi kantitatif sonuçlar elde edebilen kantitatif real-time PCR (qRT PCR) yöntemidir¹¹⁷. İkinci PCR yönteminin normalden farklı olduğu noktalar, standart DNA kontrolleri aracılığıyla PCR işlemi boyunca hedef DNA değişim ve miktarının takibinin yapılabilmesi ve kullanılan floresan boyalardır. qRT-PCR işlemi sonrası üretilen DNA bantlarının gözlemlenmesi için özel elektroforez tekniklerine gerek yoktur. Tam da bu yöntemle çalışan bu prosedürde minimal miktarlardaki ürünler gösterilebilmekte, normal PCR'a kıyasla çok daha hassas olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmektedir¹¹⁸. Diğer yandan, farklı floresan boya kullanımı, normal PCR yönteminde de sağlanarak fazla sayıdaki örneğin eş zamanlı gösterimi multiplex PCR tekniği ile mümkün kılınabilmektedir.

Adli alanda minimal miktardaki örnekten azami yanıtların alınması çok fazla önem arz ettiğinden koşullar en uygun halde sağlanıp multiplex PCR reaksiyonları hazırlanmaktadır¹¹⁹. Spesifik primerlerin değişik renklerdeki floresan moleküller aracılığıyla boyanması ile hem aynı hem de farklı vücut sıvıları için belirlenmiş mRNA belirteçlerinin tümünün eş zamanlı analizini sağlamaktadır. Doku kimliklendirilmesi başta olmak üzere 19 mRNA belirtecinin eş zamanlı olarak analizinin sağlandığı çalışmalar rapor edilmektedir¹²⁰.

Multiplex PCR'da her seferinde aynı, kaliteli ve sağlıklı sonuçlar elde edebilmek için dikkat edilecek bazı hususlar mevcuttur. Bunlar arasında, cDNA konsantrasyonunun

düzenlenmesi, multiplex reaksiyon için en uygun PCR parametrelerinin ayarlanması, primer çiftlerinin karşılıklı inhibisyonunu engelleyecek konsantrasyonlarda hazırlanması bulunmaktadır. Ayrıca bir başka dikkat edilmesi gereken husus da multiplex PCR değerlendirmelerinin yapılmasına azami özenin gösterilmesidir¹²¹.

Son birkaç senedir vücut sıvıları kimliklendirmesinde yeni bir yaklaşım olan RT-PCR ile multiplex RNA profillemeye rapor edilmektedir^{122,123}. Çalışmalar, vücut sıvılarının kimliklendirmesinde RT-PCR uygulamasının katkısının olabileceğini de gözler önüne sermiştir.

2.14. Otomatik Kapiler Elektroforez

İnce kapiler kolonlarda elektroforezin sağlandığı elektrokinetik bir ayırıştırma yöntemidir. Bu yöntemin esası; kapiler kolon, detektör, yüksek voltaj kaynağı, örnek kabı, veri çıkışı, kaynak ve hedef şişeler, elektrodlar, yönetim cihazından oluşmaktadır (handling device). Elektrokinetik enjeksiyon yöntemi ile kolon içerisine alınan floresan boyalı PCR ürünlerinin boyutları dahilinde en küçük ürünün en çabuk şekilde kolonda bulunan polimer içerisinde ayırıştırılması, otomatik kapiler elektroforez cihazı ile elde edilmiştir. Bu eldenin sağlanmasındaki basamaklar, ayırıştırılmış ürünlerin kapiler kolon sonunda mevcut bir göz vasıtası ile lazer ışıkla karşılaştırılması, floresan boyalı PCR ürünlerden yayılan floresan ışığın kamera vasıtası ile bir araya getirilmesi ve bir araya getirilen verilerin bir yazılım vasıtası ile yorumlanmasıdır¹²⁴. Son derece hassas olan bu metot ile minimum miktardaki örneklerde azami verimliliğe sahip sonuçlar elde edilmiş olup, yürümenin diğer metotlara kıyasla çok daha seri gerçekleştiği saptanmıştır⁴.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya 04.04.2016-20.06.2016 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Kadın Doğum ve Hastalıkları Polikliniğine gelen gönüllülerden alınan vajinal sürüntü örnekleri dâhil edilmiştir. Alınan örnekler de 3 *Lactobacillus* tipinin (*Lgas*, *Lcris*, *Ljen*) vajinal enfeksiyon ve postmenopozal döneme bağlı olarak etkilenip etkilenmediği araştırılmıştır. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan gerekli izinler alınmıştır. Gönüllüler çalışma hakkında yazılı ve sözlü onamı alınarak bilgilendirilmiştir. Proje kodu TTU-2016-5499 olan bu çalışmanın yapılabilmesi için Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden maddi destek sağlanmıştır.

3.1. Örneklerin Seçim Kriterleri

Kadın Doğum ve Hastalıkları İnfertilite Polikliniğine gebe kalabilmek amacıyla gelen kadınlardan herhangi bir rahatsızlığı olmayan, yapılan fizik muayene ve tetkikler sonucunda, fiziksel ve hormonal açıdan normal, herhangi bir ilaç kullanımı söz konusu olmayan gönüllülerden alınan 30 örnek kontrol grubu olarak alınmıştır.

Kadın Doğum ve Hastalıkları Jinekoloji Polikliniğine yıllık menopoz kontrol muayenesi amacıyla gelen kadınlardan herhangi bir rahatsızlığı olmayan, yapılan fizik muayene ve tetkikler sonucunda, fiziksel açıdan normal, herhangi bir hormonal ilaç kullanımı söz konusu olmayan gönüllülerden alınan 30 örnek postmenopozal grup olarak alınmıştır.

Kadın Doğum ve Hastalıkları Jinekoloji Polikliniğine pis kokulu vajinal akıntı ve kaşıntı şikayetiyle gelen, yapılan muayene ve tetkikler sonrası vajinal enfeksiyon tanısı alan, antimikrobial tedavi öncesindeki gönüllü hastalardan 31 örnek alınarak enfeksiyon grubu oluşturulmuştur.

3.2. Örneklerin Alınması

Muayene öncesi sözlü ve yazılı onamı alınan gönüllülerden örnekler alınmıştır. Vajenden örnek alımında tek kullanımlık, steril, yağlanmamış ve ambalaj içerisinde yer alan spekulum kullanılmıştır. Litotomi pozisyonu verilerek spekulum vajene sokulmuştur. Steril pamuklu vajinal svap ile posterior forniks ve vajen duvarından 360° yavaşça döndürülmek

suretiyle örnekler alınmıştır. Alınan örnekler RNA izolasyonu yapılana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Kapillerelektroforez cihazı (3130 Genetic Analyzer, ABI)
- Vortex: Elektromag M16
- Derin dondurucu: Bosch GSD26116ID
- Mikropipet: Costar, ependorf
- Ependorf tüpleri: Isıya dayanıklı, hacim kapasiteleri sırasıyla 0,5ml, 1ml, 1,5ml ve 2 ml
- Pipet uçları: Steril filtrelili 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, pipet uçları
- Buzdolabı: Altus, Philco
- Mikrosantrifuj cihazı: Hettich Universal 30 Fleksiyon, EBA-12 (HettichZentrifugen),
- Termocycler cihazı: Applied Biosystem, GeneAmp PCR System 9700
- Beybi 21 no'lu bistüri ucu
- Qubit fluorometre (invitrogen)

3.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- RNA kantitasyon kiti (invitrogen a32855)
- Superscript VILO cDNA sentez kiti (Life Tech)
- Proteinaz K (Life Technologies)
- AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kiti (Qiagen)
- Performance optimized polymer (POP 7) (AppliedBiosystems)
- LIZ 500-Genescan Size Standard (AppliedBiosystems)
- Formamid (AppliedBiosystems)
- Dithiothreitol (Life Technologies)

Çizelge 4. Çalışmada kullanılan primerler (F: Forward, R: Reverse)

	mRNA belirteci	Primer dizisi (floresan boya)	Kaynak
Vajinal sekresyon	Ljen (16S ribozomal RNA)	F:PET- AAGTCGAGCGAGCTTGCCTATTGAAAT R:CGCCTTTTAAACTTCTTTCATGCGAAAGT AGC	Roeder 2013
Vajinal sekresyon	Lgas (16S-23S intergenic spacer region)	F: FAM- CATCGAGAAAGCCAAGCGGAAGC R: GATCATTGCTTACTTACTGCTCCCCG	Roeder 2013
Vajinal sekresyon	Lcris (16S-23S intergenic spacer region)	F:NED- GTATCCAGAGCAAGCGGAAGCACAC R:GCATCTCTGCATTGGGTTCCCCC	Roeder 2013
Kontrol gen 1	GAPDH	F: VIC-TCTTCACCACCACGGAGAA R: AGGGGGCAGAGATGATGAC	Haas 2009
Kontrol gen 2	UCE	F:VIC-AATGATCTGGCACGGGACC R:ATCGTAGAATATCAAGACAAATGCTGC	Fleming 2010

3.5. AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kiti ile DNA/RNA Ekstraksiyonu

Vajinal sürüntü örneklerinin tümünde DNA/RNA ekstraksiyonu sırasında kit protokolü izlendi.

3.5.1. Nükleik Asit İzolasyonu

1. Sürüntü çubuğuna ait pamuklu alanın yarısı, 21 no'lu steril bistüri ile ayrıştırıldıktan sonra 1.5 ml'lik tüpler içerisine yerleştirildi.
2. Daha önceden hazırlanan RLT Plus ve Dithiotreitol karışımından 350 µl, 1.5 ml'lik tüpler üzerine eklendi. Pamuk üzerinde yer alan sürüntü materyalinin sıvıya

geçmesi için 30 dakika kadar beklendi. Sonrasında 0.9 mm kalınlığında iğne ucuyla 1.5 ml'lik tüpe eklenmiş olan karışım 5 kez çekip bırakıldı.

3. Köpürmenin önlenmesi amacıyla örnekler 20000 devirde 30 saniye santrifüj edildi.
4. Alınan örnekler mor renkli 2 ml'lik DNA koleksiyon tüplerine aktarıldı. 30 saniye 20000xg'de santrifüj edildi. Tüpün alt kısmında kalan numune RNA izolasyonu için ayrıldı. Silika kolonlara tutunan numune ise daha sonra DNA izolasyonu amacıyla buzdolabına (+4⁰C) kaldırıldı.

3.5.2. Total RNA İzolasyonu

1. 2 ml'lik DNA koleksiyon tüplerinin alt fazında kalan sıvı üzerine RNA izolasyonu için 50 µl Proteinaz K eklendi. Daha sonra pipetle birkaç kez karıştırıldı.
2. Bu karışıma 200 µl saf etanol ilave edildikten sonra yine çekip bırakarak birkaç kez daha karıştırıldı.
3. Elde edilen karışım oda sıcaklığında (20-25⁰C arasında) 10 dakika beklemeye bırakıldı.
4. 400 µl'lik saf etanol, 10 dakika bekletilen karışıma eklendi. Birkaç kez çek-bırak işlemi uygulandı.
5. Karışım daha sonra RNA kolonlarına aktarılıp 20000 x g'de 15 saniye santrifüje edildi. Alt fazda kalan kısım döküldü.
6. RNA kolonlarına 500 µl Buffer RPE eklendi. 20000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Alt fazda kalan kısım döküldü.
7. Farklı bir tüpe 10 µl DNaz-1 stok solüsyonu ile 70 µl Buffer RDD eklendikten sonra çek-bırak şeklinde birkaç kez karıştırıldı. Elde edilen karışım (80 µl) RNA kolonuna aktarıldı ve 15 dakika beklemeye bırakıldı.
8. RNA kolonlarına 500 µl Buffer FRN eklendi. 20000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Alt fazda kalan kısım döküldü.
9. 2 ml'lik yeni alt tüp çıkartıldı. Santrifüje edilen kolon filtre boş filtre üzerine aktarıldı, alt faz kolona yeniden konuldu. Daha sonra 20000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Alt fazda kalan kısım döküldü.
10. RNA kolonlarına 500 µl Buffer RPE eklendi. 20000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Alt fazda kalan kısım döküldü.

11. 500 µl saf etanol kolonlara eklendi. 20000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi.
12. Her örneğe bir adet boş tüp olacak şekilde, silika kolon boş tüplere yerleştirildi. Tüpler 20000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi.
13. Boş tüpler üzerine alınan silika kolonlara 30µl RNaz-free su eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 8000 x g'de 1 dakika santrifüje edildi. Kolondan elde edilen RNA daha sonra cDNA çalışılmak üzere derin dondurucuda (-20°C) saklandı.

3.5.3. Genomik DNA İzolasyonu

1. Nükleik asit izolasyonu aşamasında DNA izolasyonu için buzdolabına kaldırılan DNA bağlı silika kolonların üzerine 350 µl Buffer AW1 eklendi. 20000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Alt fazda kalan kısım döküldü.
2. Farklı bir tüpte her bir örnek için 20 µl Proteinaz K ve 60 µl Buffer AW1 pipetle birkaç kez çek bırak şeklinde karıştırıldı ve örneklere eklendi.
3. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilen kolon filtrele 350 µl yıkama tamponu (Buffer AW1) eklendi. 20 000 x g de 15 saniye santrifüj edildi. Alt fazda kalan kısım döküldü.
4. Kolonlara yıkama tamponu olarak 500 µl Buffer AW2 eklendi. 20000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi.
5. Kolonlar yeni bir tüpe alındı. Filtre üzerine 100 µl Buffer EB elüsyon tamponu eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında beklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Elde edilen DNA örnekleri PCR yapılana kadar derin dondurucuya (-20°C) kaldırıldı.

3.6. RNA Miktar Tayini

1. Her bir örnek için Quant-iT™ tamponundan 199 µL ve Quant-iT™ RNA ayırıcından 1 µL alınarak çalışma solüsyonu hazırlandı.
2. Bu karışımdan hazırlanan 190 µL ependorf tüplere dağıtıldı.
3. 1µL RNA ve 9 µL TE tamponu tüplere eklendi.
4. 2-3 saniye vorteks ile karıştırıldı.
5. Oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi.
6. Qubit fluorometre ile örneklerin RNA miktarları okundu.

3.7. cDNA Sentezi

Superscript VILO cDNA sentez kiti kullanılarak ekstrakte edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi aşağıda belirtilen miktarlara göre “GeneAmp PCR System 9700” PCR cihazında yapıldı.

<u>Kullanılan malzemeler</u>	<u>miktar</u>
5X VILO™ Reaksiyon karışımı	4 µl
RNA örneği	100 ng
10X SuperScript®Enzim karışımı	2 µl

Toplam hacim geri kalan miktar için saf su kullanılmak suretiyle 20 µl'ye tamamlandı.

RT-PCR protokolü (cDNA sentez protokolü)

1. Aşama: 25°C’de 10 dakika
2. Aşama : 42°C’de 60 dakika
3. Aşama 85°C’de 5 dakika

3.8. PCR Protokolü

cDNA sentezi yapılan ürünlerin PCR’ı toplam 10 µl’lik reaksiyon hacminde olacak şekilde aşağıda belirtilen miktarlarda malzeme kullanılarak hazırlandı. Multiplex reaksiyonlarda eklenen her primer çifti için belirlenen 0.1 µl için suyun hacmi azaltıldı.

<u>Kullanılan malzemeler</u>	<u>miktar</u>
PCR master mix	5 µl
<u>Hedef markırlar</u>	
<i>L. gasseri</i>	10 nmol
<i>L. crispatus</i>	5 nmol
<i>L.jenseni</i>	10 nmol

İnternal kontrol markırları

UCE	5nmol
GAPDH	5nmol
cDNA	1 µl

Toplam hacim geri kalan miktar için saf su kullanılmak suretiyle 10 µl'ye tamamlandı.

Hazırlanan karışım için uygulanan PCR döngü parametresi altta aktarılmıştır.

PCR parametresi

1. Aşama: 95°C'de 15 dakika
2. Aşama : 94°C'de 30 saniye
57°C'de 90 saniye } 35 döngü
72°C'de 60 saniye
3. Aşama 72°C'de 10 dakika

3.9. Örneklerin Otomatik Kapiler Elektroforez Cihazında Yürütülmesi

PCR ile elde edilen ürünler için kapiller elektroforezinde kullanılmak üzere aşağıda belirtilen miktarlarda karışımlar hazırlanmıştır. Örnekler 3130 kapiler elektroforez cihazında 3 kV enjeksiyon voltajı, 10 saniye enjeksiyon süresi ve 15 kV yürüme voltajında yürütüldü.

<u>Kullanılan malzemeler</u>	<u>miktar</u>
Formamid	4.7 µl
LIZ 500	0.1 µl
PCR ürünü	<u>0.2 µl</u>
Toplam	5.0 µl

4. BULGULAR

İstatistiksel olarak anlamlı sonuca erişebilmek adına her grup için en az 30 örnek alınması hedeflenmiştir. Bu noktada çalışmamıza katılan gönüllülerden sırasıyla kontrol grubu için 30, enfeksiyon grubu için 31, postmenopozal grup için 30 örnek alınmıştır. Gruplar yaş ortalamaları ve *Lactobacillus* türlerinin varlığına göre incelenmiştir. Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümlerse ortalama ve standart sapma olarak özetlendi. Kategorik ölçümlerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Ki Kare test istatistiği kullanıldı.

Kontrol grubunun yaş aralığı 21-45 yaş arasında olup yaş ortalamasının 31.8 olduğu, enfeksiyon grubunun yaş aralığı 19-47 yaş arasında olup ortalamasının 37.2 olduğu, postmenopozal grubunun yaş aralığı 44-70 yaş arasında olup yaş ortalamasının 56.8 olduğu görüldü (çizelge 5).

Çizelge 5. Yaş aralığı tablosu

GRUP	OLGU	YAŞ ARALIĞI	YAŞ ORT.
Kontrol	30	21-45	31.8 ±5.9
Enfeksiyon	31	19-47	37.2 ±9.3
P.Menopoz	30	44-70	56.8 ±7.4

Araştırdığımız *Lactobacillus* türleri olan *Lgas*, *Lcris*, *Ljen* oluşturulan 3 gruba göre sırasıyla incelendi.

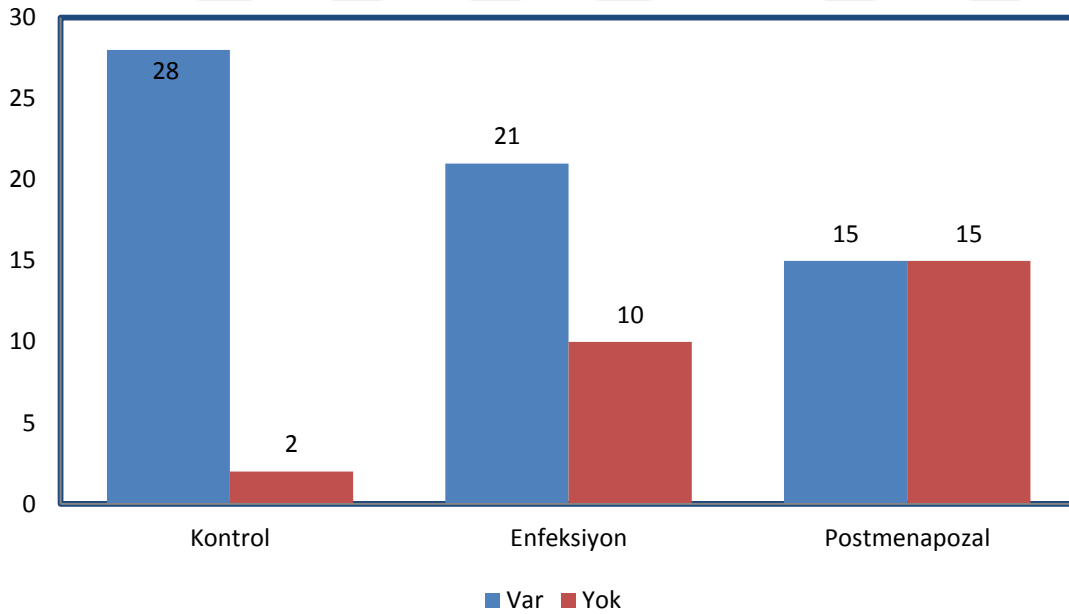
4.1. *Lactobacillus gasseri*

Kontrol grubunda yer alan 30 olgunun 28'inde *Lgas* olduğu, yalnızca 2 olgu da aradığımız bakterinin olmadığı görüldü. Kontrol grubuna göre enfeksiyon ve postmenopozal yaş grubu analizine baktığımızda; enfeksiyon grubunda yer alan 31 olgunun 21'inde *Lgas* pozitif olduğu, 10 olgu da ise bakterinin saptanamadığı görüldü (grafik 2).

Benzer şekilde post menopozal dönemdeki olguların 15'inde *Lgas* saptanırken 15'inde olmadığı görüldü. Yapılan istatistiksel analiz hem enfeksiyon grubunda hemde postmenopozal grupta aradığımız bakteri türünün saptanma oranında anlamlı bir azalma olduğunu göstermiştir ($p<0,001$).



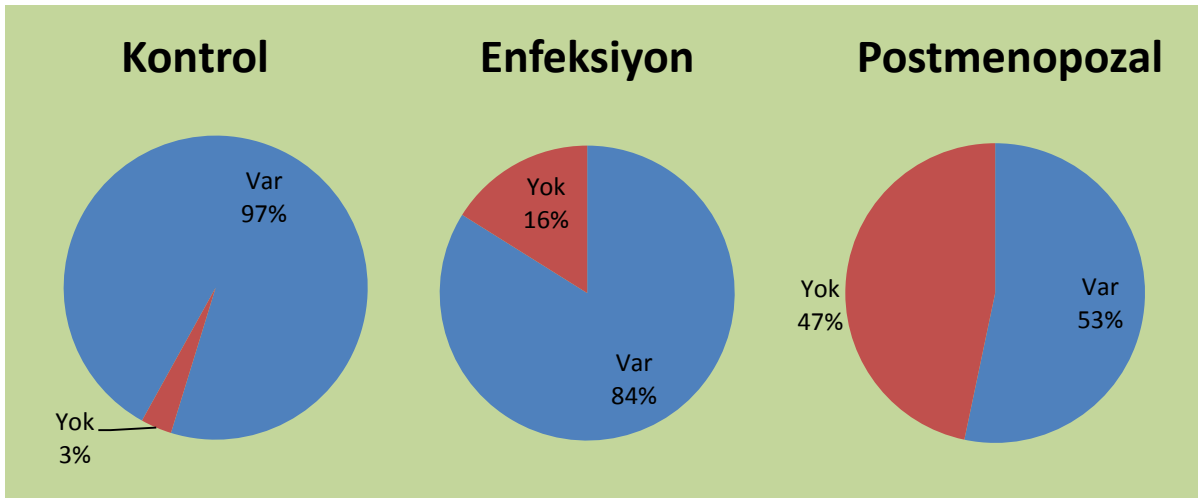
Grafik 1. *Lactobacillus gasseri*'nin Gruplara Göre Yüzdeler Dilimleri



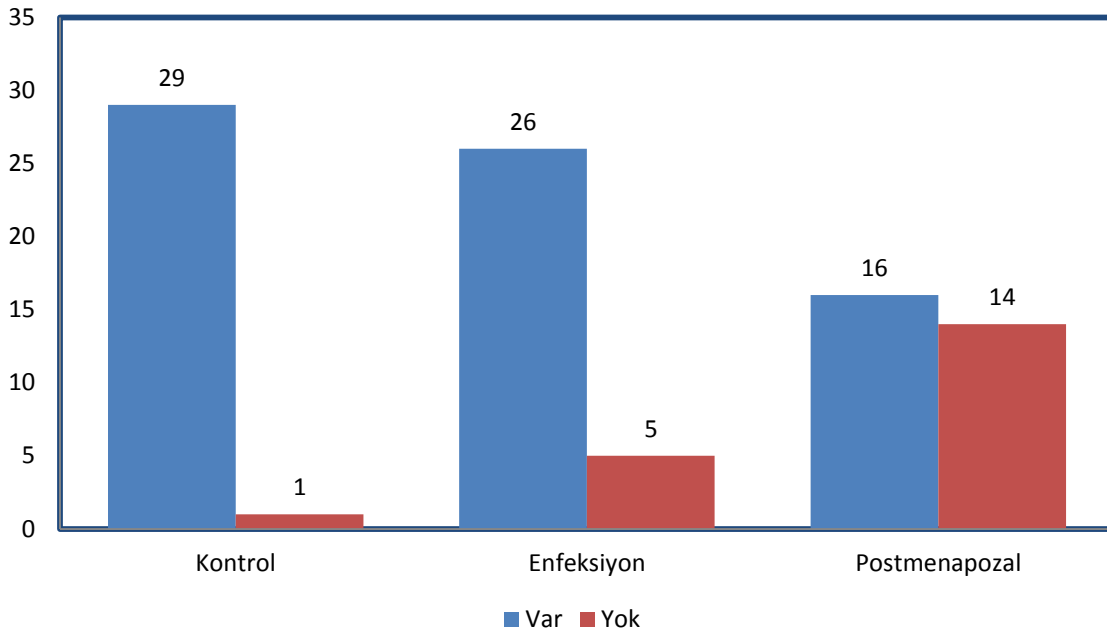
Grafik 2. *Lactobacillus gasseri*'nin Gruplara Göre Saptanma Durumu

4.2. *Lactobacillus crispatus*

Kontrol grubunda yer alan 30 olgunun 29'unda *Lcris* olduğu, yalnızca 1 olgu da aradığımız bakterinin olmadığı görüldü. Kontrol grubuna göre enfeksiyon ve postmenopozal yaş grubu analizine baktığımızda; enfeksiyon grubunda yer alan 31 olgunun 26'sında *L.cris*'in pozitif olduğu, 5 olgu da ise bakterinin saptanamadığı görüldü. Postmenopozal dönemdeki olguların 16'sında *Lcris* saptanırken, 14'inde olmadığı görüldü. Yapılan istatistiksel analiz sonucu kontrol ve enfeksiyon grubuna göre postmenopozal grupta aradığımız bakteri türünün saptanma oranında anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0,001$).



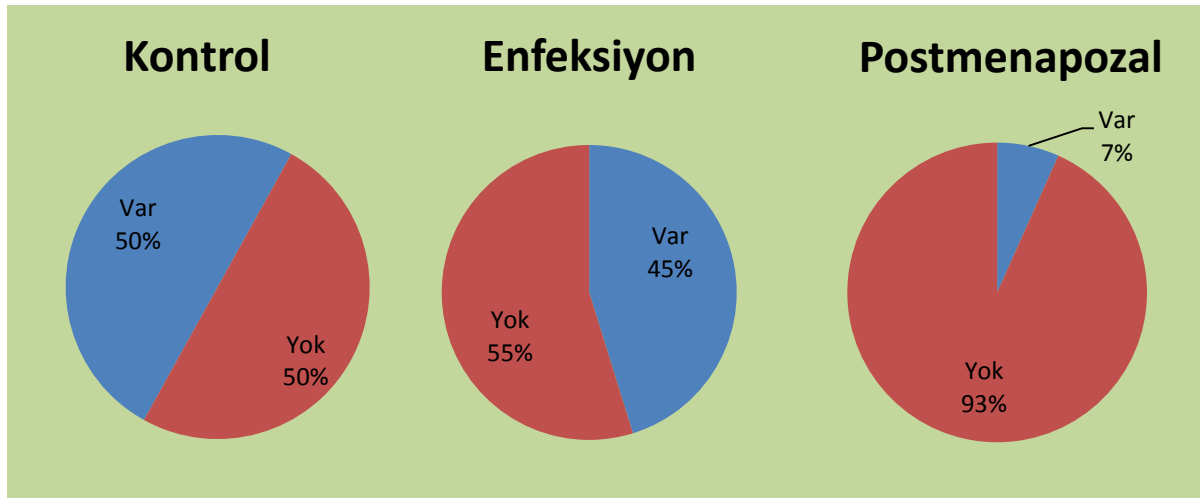
Grafik 3. *Lactobacillus crispatusun* Gruplara Göre Yüzdelerle Dilimleri



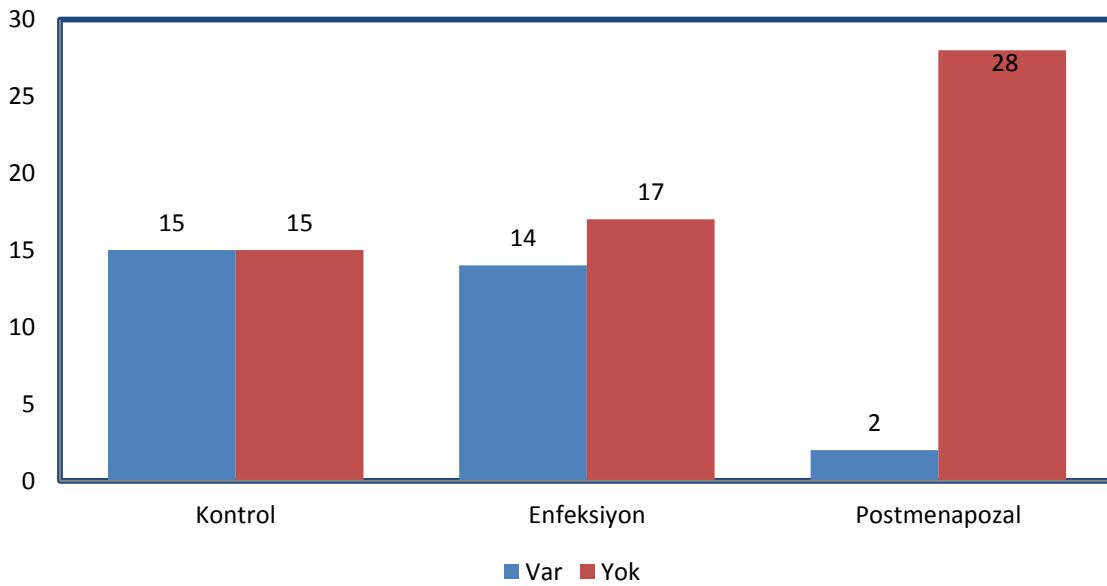
Grafik 4. *Lactobacillus crispatusun* Gruplara Göre Saptanma Durumu

4.3. *Lactobacillus jensenii*

Diğer iki bakterinin aksine kontrol grubunda da düşük oranda saptandı. 30 olgudan ancak 15'inde *Ljen*'in olduğu, 15'inde ise olmadığı görüldü. *Lcris*'te olduğu gibi kontrol grubu ile enfeksiyon grubunda anlamlı bir fark olmadığı, 31 olgunun 14'ünde *Ljen*'in pozitif olduğu, 17'sinde saptanamadığı görüldü. Postmenopozal dönem olgularında ciddi bir azalma olup 30 olgudan sadece 2'sinde *Ljen* saptanırken 28'inde olmadığı görüldü. Yapılan istatistiksel analiz sonucu kontrol ve enfeksiyon grubuna göre postmenopozal grupta aradığımız bakteri türünün saptanma oranında anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0,001$).

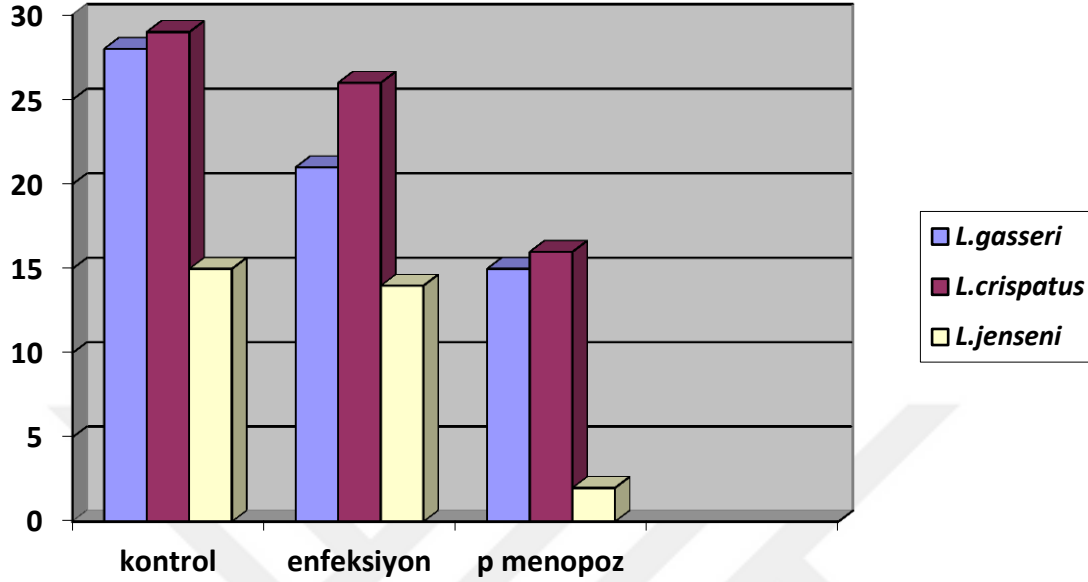


Grafik 5. *Lactobacillus jenseninin* Gruplara Göre Yüzelik Dilimleri



Grafik 6. *Lactobacillus jenseninin* Gruplara Göre Saptanma Durumu

Her üç *Lactobacillus* türü birlikte değerlendirildiğinde *Lgas* enfeksiyon durumunda duyarlılığının daha fazla olduğu, postmenopozal dönemde ise tüm bakteri türlerinin saptanma oranında azalma olduğu görüldü.



Grafik 7. *Lactobacillus* Türlerinin Gruplara Göre Saptanma Durumu

Çalışmamız da her üç bakteri türünün ikili ve üçlü kombinasyonuna bakıldığında, *Lgas* ve *Lcris*'in her üç grupta birlikte bulunma oranlarının daha yüksek olduğu, *Lgas*, *Lcris* ve *Ljen*'in oluşturduğu üçlü kombinasyon ile *Lgas* ve *Ljen*'in oluşturduğu ikili kombinasyonlarda ise *Ljen*'in saptanma oranlarındaki düşüşe bağlı olarak düşüş olduğu görüldü (Çizelge 6).

Çizelge 6. *Lactobacillus*ların birlikte bulunma durumları

GRUP	KONTROL	ENFEKSİYON	P.MENOPOZAL
Lgas+Lcris+Ljen	15	10	2
Lgas+Lcris	28	20	15
Lgas+Ljen	15	10	2

Gruplar içerisinde *Lactobacillus*ların hiç olmadığı ya da en az bir veya iki bakterinin bulunduğu durumlara bakıldığında, kontrol grubundaki olguların %3.3'ünde, enfeksiyon

olgularının %12.9'unda, menopoz sonrası olgularda ise %46.6'sında hiçbir bakterinin saptanamadığı görülmektedir (çizelge 7).

Çizelge 7. *Lactobacillusların* varlık-yokluk durumları

GRUP	KONTROL	ENFEKSİYON	P.MENOPOZAL
Herhangi iki bakterinin olduğu	28	24	15
En az bir bakterinin olduğu	29	27	16
Hiçbir bakterinin olmadığı	1	4	14

5. TARTIŞMA

Adli olaylarda vücut sıvı identifikasyonu, olay yerinin reanimasyonu ve olayın aydınlığa kavuşmasında ciddi öneme sahiptir. Örnek verecek olursak; spesifik bir madde üzerindeki genital spesmen varlığı cinsel aktiviteyi, maktul üzerindeki tükürük varlığı ısırilma eylemini düşündürebilir^{3,125}.

Vajinal spesmenin hangi nesne üzerinde mevcut olduğu da (kıyafet, mobilya) cinsel saldırı varlığı düşünülen olgularda önem arz etmektedir. Bu şekildeki biyolojik örneğin spatial lokalizasyonu eylemin istemli veya istemsiz olduğu konusunda kanaatimizi veyahut şüphelinin/mağdurun beyanını güçlendirebilir^{3,4}.

Günümüzde immünolojik ve enzimatik kitlerden çok çeşitli biyolojik sıvının identifikasyonunda faydalanılmaktadır. Semende semegolin antijeni/prostat spesifik antijeni, tükürük sıvısında amilaz, lekelerde kana ait glikoforin/hemoglobin gösterilmesi ile idrarda Tamm-Horsfall protein varlığını kanıtlayan spesifik antikolar üretilmiştir. Vajinal sıvı varlığının gösterilmesi için kullanılan yöntemler ise çok daha karmaşıktır⁸. Suçlu olduğu öne sürülen şahsın penisi üzerinde vajinal sekresyon artığının gösterilmesi için ilk olarak vajina epitel hücresinde mevcut glikojenin Lugol-iyodin reaksiyonu ile tanımlanması ilk kullanılan yöntemlerdendir. Lakin, erkeğin üriner sisteminde de Lugol pozitif boyanan epitel hücre mevcudiyetinin gösterilmesi ile adli tıp uygulamalarında bu metodun kullanımını azaltılmıştır⁹. MUC-4, HBD-1, ESR-1 mRNA'larının RT-PCR aracılı araştırmaları vajinal sekresyonun tanımlanmasında kullanılmıştır.

Son dönemlerde, vajinal sıvının tanımlanmasında *Lgas*, *Lcris* ve *Ljen* bakterisi RNA'larının kullanılabileceğini destekleyen çalışma sonuçları alınmıştır. Bu çalışmada bu üç bakteri türünün normal popülasyonda, vajinal enfeksiyonu olan olgularda ve post menopozal yaş grubunda bulunma durumlarına bakılarak adli amaçlı vajinal sıvıların tanımlanmasında rutin olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Vajinal ortamda dominant olarak bulunan *Lactobacillus* türleri etnik gruplara göre farklılık gösterebilmektedir. Amerika'da beyazlar, siyahlar, asyalı ve ispanyolca konuşan ırklar üzerinde yapılan çalışmalarda *L.iners*, *Lcris*, *Lgas* ve *Ljen*'in gruplar arasında değişen düzeylerde olduğu tespit edilmiştir¹²⁶. Bir çalışmada sağlıklı kadınların vajinal florasında *L.acidophilus*, *Lcris* ve *Ljen*'i en yaygın vajinal *Lactobacil* türleri olarak tanımlamışlardır⁵⁴. Vajinal floradaki baskın *Lactobacillus* türlerinin tespitine yönelik bir başka çalışmada Türkiye

ve Amerika'da *Lgas* ve *Lcris*'in en baskın kombinasyon oldukları belirtilmiştir^{50,51}. Çalışmalarda da görüldüğü üzere baskın olan *Lactobacillus* türleri değişebilmekle birlikte *Lcris* tüm popülasyonlarda varlığı gösterilmiştir.

Yaptığımız bu çalışmadaki kontrol grubunda; *Lgas* ve *Lcris* birlikte saptanma oranlarının %93.3 olduğu, *Ljen* ile birlikte her üç bakterinin bulunma oranının ise %50 seviyesinde kaldığı görüldü. *Ljen* dışındaki diğer iki bakterinin vajinal sekresyonun tanımlanmasında ideal bir kombinasyon olduğu anlaşılmıştır. Daha önce vajinal sıvının identifikasyonuna yönelik her üç bakteri mRNA'larının araştırıldığı 41 örneklik bir çalışmada; örneklerin menstrüel siklusun farklı evrelerinde alındığı, *Lgas*'ın %73.2, *Lcris*'in ise %68.3 oranından olduğu¹²⁵, bir başka çalışmada 14 vajinal sürüntü örneğinin tamamında, bir diğer çalışma da ise 10 vajinal sürüntünün hepsinde *Lgas* ve *Lcris*'in birlikte saptandığı görülmüştür^{127,128}. Çalışmamızda da görüldüğü üzere *Lgas* ve *Lcris* birlikte çok yüksek oranda tespit edilebilmektedir.

Çalışmamızda vajinal enfeksiyon tanısı alan olgulara bakıldığında; *Lgas* %68, *Lcris* %84, *Ljen* %45 oranında saptandığı görüldü. *Lgas*'ın diğer iki *Lactobacillus* türüne kıyasla enfeksiyon durumunda anlamlı oranda azaldığı, hassasiyetinin daha fazla olduğu, *Lcris* ve *Ljen*'de anlamlı oranda olmasa da bir miktar azalma olduğu görüldü. Vajinal florada değişiklik yapan nedenler arasında; antibiyotik, sitostatik, kortikosteroid, antiviral, antifungal ilaçlar ve radyoterapi, vajen duşu, cerrahi ve radyoterapi sonrası gelişen malformasyon ve anatomik deformiteler, kistler, himen, polipler, immunsupresyon durumları (AIDS, vb) tedavi, yaşlanma veya oral kontraseptif kullanımı nedeniyle olan hormonal değişiklikler, kontrolsüz diyabet, yabancı cisimler (RİA, Diyafram, Tampon vb.) ve spermisit ajanlar bulunmaktadır⁶⁹. Bu faktörlere bağlı olarak vajinal florada baskın olan *Lactobacilluslar* azalmaktadır. *Lactobacillusların* diğer patojen mikroorganizmaların epitel hücre reseptörlerine tutunmalarını engellemesi, hidrojen peroksit, bakteriosin, bakteriosin benzeri maddeler ve biosümfaktanlar gibi antimikrobiyal maddeleri üreterek mikroçevreyi yaşanamaz hale getirmeleri vajinal enfeksiyon oluşumunu engellemektedir^{33,54-56}. Fakat azalan *Lactobacilluslarla* birlikte BV, candida vajiniti, trikomoniyazis gibi vajinal enfeksiyonlar ortaya çıkabilmektedir. Çalışmamızda da görüldüğü üzere *Lgas*'da daha fazla olmakla birlikte her 3 *Lactobacillus* türünün saptanma oranlarında düşüşler olmuştur.

Bu çalışmada araştırılan bir başka grup ise menopoz sonrası dönemdir. Menopoz sonrası dönemdeki *Lactobacillus* türlerinin saptanma durumuna bakıldığında kontrol ve enfeksiyon grubuna kıyasla menopoz döneminde *Lactobacillus* varlığının anlamlı derecede azaldığı, oranların ise *Lgas* için %50, *Lcris* için %53, *Ljen* için %7 olduğu saptanmıştır. Sağlıklı kadınlarda hayatın farklı evrelerinde vajinanın fizyolojik koşulları da değişebilmektedir. Puberte öncesi ve sonrası ile menopoz sonrası dönemde hormonal düzeylerdeki değişim ve bunun sonucunda östrogen miktarındaki artış ya da azalış beraberinde *Lactobacillus*ları da etkilemektedir. Yenidoğan ve postpubertal dönemde *Lactobacillus*larda artış görünürken, prepubertal ve postmenopozal dönemde ise azaldığı görülmektedir^{31,129}. Bu çalışmada benzer şekilde her üç *Lactobacillus* türünde de hormonal etkilere bağlı olarak saptanma oranında düşüşler olmuştur.

Vajinal sekresyonun tespitine yönelik son dönemlerde vajinal mukusun majör komponenti olan MUC-4 ile vajinal antimikrobiyalpeptit olan HBD-1 kullanılmaktadır^{10,120,130,131}. Özellikle MUC-4 üzerine yapılan bazı çalışmalara bakıldığında, reproduktif dönemdeki kadınlardan alınan vajinal sürüntü örneklerinin tamamında MUC-4'ün görülebildiği, menopozal dönemdeki kadınların ise hiç birinde saptanamadığı görülmüştür. Yaşları 25 ile 50 arasında değişen kadınlardan alınan vajinal sürüntü örneklerinin 33'ünde MUC-4 saptanırken 9'unda olmadığı belirtilmektedir. MUC-4'ün saptanamadığı bu 9 olgunun ise tamamının postmenopozal dönem kadınlara ait olduğu ifade edilmiştir⁷. Bu durum hormonal etkilere bağlı olarak gelişen vajinal atrofi ve vajinal kuruluk nedenli olarak açıklanmıştır. Fakat bizim çalışmamızda ise özellikle *Lgas* ve *Lcris* kombinasyonunun postmenopozal dönemde azalmasına rağmen %50'lere varan oranlarda saptandığı görülmüştür.

Bunun dışında MUC-4 ve beraberinde HBD-1'in hedef doku dışında tükrükte de görülebildiği, bu nedenle tükrüğe spesifik olan STATH ve HTN3 markırlarının da kullanıldığı, mevcut materyalin saliva olmadığı anlaşıldıktan sonra vajinal sıvı olabileceği belirtilmektedir^{7,10,11}. Araştırdığımız *Lactobacillus* türlerinin tükrük ve semende olmaması, MUC-4 ve HBD-1'e kıyasla bir avantaj olup ekstra bir markır kullanımına gerek duyulmamaktadır 4-12 yaş arası puberte öncesi alınan vajinal sürüntülerde ve antibiyotik kullanımı sonrası *Lactobacillus*ların azaldığı olgularda MUC-4'ün saptanabildiği, bu gibi durumlarda kullanımının daha etkili olabileceği belirtilmektedir¹²⁵.

6. SONUÇ

1. Kontrol grubu olarak seçilen olguların %93'ünde *Lgas* ve *Lcris* bakteri RNA'larının her ikisi de bulunurken, her üç bakterinin bulunma oranı %50'ye düşmüştür; ancak örneklerin tamamında her üç bakteriden ikisi saptanmıştır.
2. Enfeksiyon tanısı alan olgularda *Lgas* bakteri RNA'sının saptanma oranında anlamlı bir azalma olmakla birlikte; diğer iki bakterinin bulunma oranlarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Bununla birlikte; enfeksiyon tanısı alan olguların %12.9'unda test edilen üç bakteriden hiçbiri saptanmamıştır.
3. Çalışılan postmenopoz dönemdeki olguların ancak %6.6'sında her üç bakteri RNA'sı tanımlanabilmiştir. Bununla birlikte *Lgas/Lcris* kombinasyonu ise %50'dir. Bakterilerden herhangi birinin bulunma oranı ise %53.3 iken hiç bakteri bulunmama oranı %46.6'dır.
4. Sonuç olarak enfeksiyon tanısı alan %12.9 oranında örneklerle postmenopoz olguların %46.6'sında hiç bakteri tanımlanmamış olması, vajinal sıvının veya lekenin tanımlanmasında alınan negatif sonuçların vajinal sekresyonun dışlanmasında kullanılamayacağını, ancak pozitif sonuçların özellikle şu ana kadar vajinal sekresyonun tanımlanmasında hiç serolojik yöntem bulunmaması sebebiyle oldukça önemli olabileceği düşünülmektedir.
5. Cinsel saldırıya maruz kalan olguların yaş grubunun çoğunlukla puberte sonrası dönem olduğu dikkate alındığında, olguların büyük bir kısmında vajinal sıvının tespiti hakkında tahmin yapabilmeyi sağlayabileceği düşünülmektedir.
6. Vajinal sekresyonun tanımlanmasında ise her üç *Lactobacillus* türünün birlikte analizinin yapılmasının uygun olacağı, herhangi iki *Lactobacillus* varlığının gösterilmesinin de lekenin veya biyolojik materyalin vajinal kaynaklı olma ihtimalini destekleyeceği sonucu çıkarılabilir.

6. KAYNAKLAR

1. **E. Hanson, J. Ballantyne.** RNA profiling for the identification of the tissue origin of dried stains in forensic biology. *Forensic Sci. Rev.*, **2010**; 22: 145–157.
2. **Virkler K, Lednev IK.** Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int*, **2009**; 188:1–17.
3. **Hanson EK, Ballantyne J.** Highly specific mRNA biomarkers for the identification of vaginal secretions in sexual assault investigations. *Sci Justice*, **2013**; 53:14-22.
4. **Williams Graham, Uchimoto Mari L, Coult Natalie, Damien World, Beasley Emma, Avenell Philip.** Characterisation of body fluid specific microRNA markers by capillary electrophoresis. *Forensic Sci Int: Genet Supplement Series*, **2013**; 4: 274-275.
5. **C. Meissner, S. Ritz-Timme.** Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci. Int*, **2010**; 203:34–43.
6. **Joanna Jakubowska, Agnieszka Maciejewska, Krzysztof P. Bielawski, Ryszard Pawlowski.** mRNA heptaplex protocol for distinguishing between menstrual and peripheral blood. *Forensic Sci Int: Genet*, **2014**; 13:53–60.
7. **G. Hadzic, A. Lukan, K. Drobnic.** Practical value of the marker MUC4 for identification of vaginal secretion in penile swabs. *FSI Genet. Suppl. Series*, **2011**; 3:222–223.
8. **M C Taylor, J S Hunt.** Forensic identification of human urine by radioimmunoassay for Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. *Journal of the Forensic Sci Society*, **1983**; 23:67-72.
9. **Pothof J, Verkaik NS, van IW W, EA Ta VT, van der Horst GT, Jaspers NG, van Gent DC, Hoeijmakers JH, Persengiev SP.** MicroRNA-mediated gene silencing modulates the UV-induced DNA - damage response. *Embo J*, **2009**; 28:2090–2099.
10. **C. Cossu, U. Germann, A. Kratzer, W. Bar, C. Haas.** How specific are the vaginal secretion mRNA markers HBD1 and MUC4? *Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Ser. 2* (**2009**) 536–537.
11. **C. Nussbaumer, E. Gharehbaghi-Schnell, I. Korschineck.** Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR, *Forensic Sci. Int.* **157** (**2006**) 181–186.
12. **M.L.L. Richard, K.A. Harper, R.L. Craig, A.J. Onorato, J.M. Robertson, J. Donfack.** Evaluation of mRNA marker specificity for the identification of five human body fluids by capillary electrophoresis, *Forensic Sci. Int. Genet.* **6** (**2012**) 452–460.
13. **Mun Su Rhee, Brélan E. Moritz, Gary Xie, T. Glavina del Rio, E. Dalin, H. Tice, D. Bruce, L. Goodwin, O. Chertkov, T. Brettin, C. Han, C. Detter, S. Pitluck, Miriam L. Land, Milind Patel, Mark Ou, Roberta Harbrucker, Lonnie O. Ingram, and K. T. Shanmugam.** Complete Genome Sequence of a thermotolerant sporogenic lactic acid bacterium, *Bacillus coagulans* strain 36D. *Stand Genomics Sci*, **2011**; 3: 331-340
14. **Fleming RI, Harbison S.** The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Sci Int Genet*, **2010**; 4:244-256.
15. **Haas C, Hanson E, Anjos MJ, Ballantyne KN, Banemann R, Bhoelai B, Borges E, Carvalho M, Courts C, De Cock G, Drobnic K, Dötsch M, Fleming R, Franchi C, Gomes I, Hadzic G, Harbison SA, Harteveld J, Hjort B, Hollard C, Hoff-Olsen P, Hüls C, Keyser C, Maroñas O, McCallum N, Moore D, Morling N, Niederstätter H, Noël F, Parson W, Phillips C, Popielarz C, Roeder AD, Salvaderi L, Sauer E, Schneider PM, Shanthan G, Court DS, Turanská M, van Oorschot RA, Vennemann M, Vidaki A, Zatkalíková L, Ballantyne J.** RNA/DNA co-analysis from human

menstrual blood and vaginal secretion stains: Results of a fourth and fifth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet*, **2014**; 8:203-212.

16. **V.S. Catts, S.V. Catts, H.R. Fernandez, J.M. Taylor, E.J. Coulson, L.H. Lutz-Mann.** A microarray study of post-mortem mRNA degradation in mouse brain tissue, *Brain Res. Mol. Brain Res*, **2005**: 138:164–177.
17. **Bauer M.** RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet*, **2007**; 1:69–74.
18. **M. Oehmichen, K. Zilles.** Postmortale DNS and RNS-synthese. Erste untersuchungen an menschlichen leichen, *Z. Rechtsmed*, **1984**; 91:287–294.
19. **T.W. Phang, C.Y. Shi, J.N. Chia, C.N. Ong.** Amplification of cDNA via RTPCR using RNA extracted from postmortem tissues, *J. Forensic Sci*, **1994**; 39:1275–1279.
20. **C. Haas, B. Klessner, A. Kratzer, W. Baar.** mRNA profiling for body fluid identification. *Forensic Sci Int: Genet Suppl*, **2008**; 1: 37–38.
21. **J.H. An, K.J. Shin, W.I. Yang, H.Y. Lee.** Body fluid identification in forensics. *BMB Rep*, **2012**; 45:545–553.
22. **M. Kemp, K.H. Jensen, R. Dargis, J.J. Christensen.** Routine ribosomal PCR and DNA sequencing for detection and identification of bacteria, *Future Microbiol.* 5 (**2010**) 1101–1107.
23. **E. Frahm, U. Obst.** Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples, *J. Microbiol. Methods* 52 (**2003**) 123–131.
24. **W.E. Kloos, M.S. Musselwhite.** Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin, *Appl. Microbiol.* 30(**1975**) 381–385.
25. **N. Fierer, C.L. Lauber, N. Zhou, D. McDonald, E.K. Costello, R. Knight.** Forensic identification using skin bacterial communities, *PNAS* 107 (**2010**) 6477–6481.
26. **K. Kupferschmidt, Epidemiology.** Outbreak detectives embrace the genome era, *Science* 333 (**2011**) 1818–1819.
27. **H. Nakanishi, A. Kido, T. Ohmori, A. Takada, M. Hara, N. Adachi, K. Saito.** A novel method for the identification of saliva by detecting oral *Streptococci* using PCR, *Forensic Sci. Int.* 183 (**2009**) 20–23.
28. **H. Nakanishi, T. Ohmori, M. Hara, A. Takada, H. Shojo, N. Adachi, K. Saito.** A simple identification method of saliva by detecting *Streptococcus salivarius* using loop-mediated isothermal amplification, *J. Forensic Sci.* 56 (**2011**) S158–S161.
29. **VALENTA, C.** The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv Drug Del. Rev.* **2005**; 57 : 1692-1712
30. **BRANNON-PEPPAS, L.** Novel vaginal drug release applications. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **1993**; 11: 169-177.
31. **MCGROARTY, J.A.** Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol. Med. Mic.* **1996**; 6: 251-264.
32. **KNUTH, K., AMIJI, M., ROBINSON. R.** Hydrogel delivery systems for vaginal and oral applications. Formulation and biological considerations. *Adv. Drug Del. Rev.* **1993**; 11: 137-167.
33. **BORIS S. BARBES C.** Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection*, **2000**; 543-546.

34. **Schwebke JR, richey CM, Weiis HL.** Correlation of behaviors with microbiological changes in vajinal flora. *J.Infect Dis.* **1999**; 180 (5) : 1632-6
35. **Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ.** Characterization of vajinal microbial communities in adult healty women using cultivation-indepent methods. *Microbiology.* **2004**; 150 (8): 2565-73.
36. **Ustaçelebi Ő.** *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* Güneş Kitabevi, **1999**; 115, 595, 656, 657, 661, 662.
37. **Piot P, Vandyke E, Godts P, Vanderheyden J.** The vajinal microbial flora in non-spesifik vaginitis. *Eur J Clin Microbiol.* **1982**; 1:301-306.
38. **Jawetz E., Melnick JL., Adelberg EA., Brooks GF., Butel JS., Ornston NL.** *Review of medical microbiology.* Prentice-Hall International, Inc. **1987**.
39. **Faro S.** Vajinit Ayırıcı Tanı ve Tedavi, ev. Ed. Oral E, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri **2006**:13-35.
40. **Hill LH., Ruperelia H., and Embil JA.,** Nonspesifik vaginitis and other genital infections in three clinic populations. *Sex Transm Did.* **1983**; 10: 114-118.
41. **Nieves B.** Bacterial vaginosis. *Anaerobe,* **1999**; 5: 343-345.
42. **Lopez, R.V., Cook, L.R and Sobel D.j.** Emering role of Lactobacill, in the control and maintenance of the vajinal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.* **1990**; 12(5): 856-872.
43. **MURATHANOĞLU, O.** *Histoloji.* İ.Ü.Fen Fakültesi Basımevi. İstanbul. **1996**; 277.
44. **BRIZZOLARA, S., KILLEN, J., SEVERINO, R.** Vajinal pH and parabasal cells in postmenopasal women. *Obstet. Gynecol.,***1999**; 94: 700-703.
45. **Ustaelebi Ő.** *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji,* GneŐ Kitabevi, **1999**; 115, 595, 656- 657, 661- 662.
46. **Döderlein A.** Das Scheidensekret und seine Bedeutung fr das puerperal fieber, Leipzig. **1892**.
47. **Dicks .L.M.T., Silvester M., Lawson P.A., Collins M.D.** Lactobasillus fornicalis sp. Nov., isolated from the posterior fornix of the human vagina. *International of systematic and evolutionary microbiology.* **2000**; 50: 1253-1258.
48. **Larsen B, Monif GR.** Understanding the bacterial flora of the genital tract. *Clin Infect Dis,* **2001**; 32 (4): 69-77
49. **Hammes, W. P., Vogel, R. F.** The genus Lactobacillus. In “The Genera of Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria Volume: 2”, Editors: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H., Chapman& Hall, 2-6 Boundary Row, London, **1995**; 1(8):19-55.
50. **Kılı AO., Pavlova S.I., Alpay Ő., Kılı S.S., Tao L.** Comparative study of vajinal *Lactobacillus* phages isolated from women in the United States and Tukey: Prevalance, morphology, host range and DNA homology. *Clin. Dian. Lab. Immun.* **2001**; 8:31-39.
51. **Aslım B., Kılı E.** Some probiotic properties of vajinal lactobacilli isolated from healty women. *Jpn. Infect. Dis.* **2006**; 59: 249-253.
52. **Boris S., Suarez J.E. And Barbes C.** Characterization of the agregation promiting factor from *Lactobacillus gasseri*, vajinal isolate. *J. Appl. Microb.* **1997**; 83: 418-420.

53. **Davis JD, Connor EE, Clark P., Wilkinson EJ., Duff P.** Correlation between cervical results and Gram stain as diagnostic tests for bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* **1997**; 177: 532-535.
54. **Famularo G., Pieluigi M., Coccia R., Mastroiacovo P., De Simone C.** Microecology, bacterial vaginosis and probiotics : perspectives for bacteriotherapy. *Medical Hypotheses.* **2001**; 56(4): 421-430.
55. **Ocana VS., Nader-Macias ME.** Vajinal lactobacilli: self and co-aggregating ability. *Br J Biomed Sci.* **2002**; 59(4): 183-190.
56. **Pybus V. Onderdonk A.B.** Microbial interactions in the vaginal ecosystem with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Microbes and Infection.* **1999**; 1: 285-292.
57. **Felten A., Barreau C., Bizet C., Lagrange P.H., Philppon A.** *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J Clin Microbiol.* **1999**; 37(3) : 729-733.
58. **Song Y.L., Kato N., Matsumiya Y., Liu C.X., Kato H., Watanabe K.** Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J Clin Microbiol.* **1999**; 37(9): 3062-3064.
59. **Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Hold J.G.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams & Wilkins, Baltimore U.S.A. **1986**; 2: 1208-1234.
60. **Klebanoff S.J., Hillier S.L., Eschanbach D.A., Waltersdorff A.M.** Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂ –generating lactobacilli. *J.Infect. Dis.* **1991**; 164: 94-100.
61. **Eschanbach D.A., Davick P.R., Williams BL., Klebanoff S.J., Young-Smith K., Critchlow C.M., Holmer K.K.** Prevalence of hydrogen peroxide producing *Lactobacillus* species in normal women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* **1989**; 27: 251-256.
62. **Knezevic A., Stepanovic S., Cupic D., Jevtovic D., Rann J., Jovanovic T.** Reduced quantity and hydrogen peroxide production of vaginal lactobacilli in HIV positive women. *Biomed. Pharmacother.* **2005**; 59: 523.
63. **Martin HL., Richardson BA.** Vajinal laktobacilli microbial flora and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J. Infect. Dis.* **2000**; 180(6): 1863-1868.
64. **Hawes S.E., Hillier S.L., Benedetti J., Stevens C.E., Koutsky L.A., Wolner-Hanssen P. and Holmes K.K.** Hydrogen peroxide producing Lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J.Infect. Dis.* **1996**; 174:1058-1063.
65. **Okkers D.J.** Characterization of Pentocin TV35b bacteriocin like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. App. Microbiol.* **1999**; 87: 726
66. **Murathanoğlu, O.,1996.** Histoloji.İ.Ü.Fen Fakültesi Basımevi İstanbul 277s.
67. **Lopez, R.V., Cook, L.R. and Sobel D.J., 1990.** Emerging role of Lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.*,12(5), 856-872.
68. **Neyzi, O. ve Yolsal N., 1997.** cinsel yolla bulaşan hastalıklar tanı ve tedavi rehberi. İnsan Kaynağı Geliştirme Vakfı. İstanbul.
69. **Mardh PA.** The vaginal ecosystem. *Am J Obstet Gynecol,* **1991**;165:1163-8.
70. **Berry, D. R. and Fitzsimmons N., 1994.** Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus* evidence for the involvement of a peroxidase system. *Microbios,* 80,125-133.

71. **Okkers, D. J.,1999.** Characterization of Pentocin TV 35b bacteriocin like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. App. Microbiol.*, 87,726-734.
72. **Ustaçelebi, Ş.,1999.** Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara, 1083s.
73. **Kocatürk, U.,1991.** Açıklamalı Tıp Terimleri Sözlüğü. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
74. **Ocana, S. Virginia, Pesce de Ruiz Holgado A.Aida, Nader-Macias E. Maria,1999.** Selection of vaginal H₂₂ – generating *Lactobacillus* species for probiotic use. *Curr. Microbiol.*,38, 279-284.
75. **Martin, H. L., Richardson B. A., 2000.** Vaginal lactobacilli microbiol flora and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J. Infect. Dis.*,180(6), 1863-1868.
76. **Hilier, L. S. and Hughes V. L. Hughes, M. T., 1990.** Microbiologic characteristics of *Lactobacillus* products used for colonization of the vagina. *Obstetrics &Gynecology*, 75 (2), 244-248.
77. **Lee JC, Gutell RR (2004).** "Diversity of base-pair conformations and their occurrence in rRNA structure and RNA structural motifs". *J. Mol. Biol.* 344 (5): 1225–49.
78. **Barciszewski J, Frederic B, Clark C (1999).** *RNA biochemistry and biotechnology*. Springer. s. 73–87.
79. **R.E. Gaensslen.** *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry, US Government Printing Office, NIJ, 1983.*
80. **Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002).** *Biochemistry* (5th edition bas.). WH Freeman and Company. s. 118–19, 781–808.
81. **Rossi JJ (2004).** "Ribozyme diagnostics comes of age". *Chemistry & Biology* 11 (7): 894–95.
82. **Alberts B., Bray D., Lewis J.** *Molecular biology of the cell, Garland Publishing, New York, 1994.*
83. **J.S. Mattick, G.J. Michael.** The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms, *Mol. Biol. Evol.* **2001**; 18:1611–1630.
84. **Felsenfeld G, Cantoni G (1964).** "Use of thermal denaturation studies to investigate the base sequence of yeast serine sRNA". *Proc Natl Acad Sci USA* **51**: 818–26.
85. **B.P. Lewis, C.B. Burge, D.P. Bartel.** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are micro RNA targets, *Cell*, **2005**; 120:15–20.
86. **R. Milo, P. Jorgensen, U. Moran, G. Weber, M.** The database of key numbers in molecular and cell biology, *Nucleic Acids Res*, **2010**; 38:750–753.
87. **Nihat Dilsiz.** *Moleküller Biyoloji*.Palme yayıncılık, Ankara, **2004.**
88. **D. Voet, J. Voet, C. Pratt, U. Hahn.** *Lehrbuch der Biochemie.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2002.**
89. **Sarah S. Silva, Cátia Lopes, A.L. Teixeira, M.J Carneiro de Sousa, R. Medeiros.** Forensic miRNA: Potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int: Genet*, **2014**; 14:1–10.
90. **Beuvink I, F.A. Kolb, W. Budach, A. Garnier, J. Lange, F. Natt, U. Dengler, J. Hall, W. Filipowicz, J. Weiler.** A novel microarray approach reveals new tissue specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res*, **2007**; 35:52.

91. **J. Rossi.** Mammalian Dicer finds a partner, *EMBO Rep.*,**2005**; 6:927–929.
92. **Marielle Vennemann, Antje Koppelkamm.***Forensic Sci Int*, **2010**; 203:71–75.
93. **L.Wu, J.G. Belasco.** Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs, *Mol. Cell.*,**2008**; 29:1–7.
94. **John S. Mattick and Igor V. Makunin.** Non-coding RNA. *Oxford Journals, Medicine & Health & Science & Mathematics, Human Molecular Genetics*, **2006**;15:17-29.
95. **Gao LL, Li YY, Yan JW, Liu YC.** Application and progress of RNA in forensic science. *Fa Yi Xue Za Zhi*, **2011**; 27:455-459.
96. **C. Haas, E. Hanson, M.J. Anjos, et al.,** RNA/DNA co-analysis from human saliva and semen stains results of a third collaborative EDNAP exercise, *Forensic Sci Int. Genet.*,**2013**; 7:230–239.
97. **M. van den Berge, A. Carracedo, I. Gomes, E.A.M. Graham, C. Haas, B. Hjort, P. Hoff-Olsen, O. Maroñas.** A collaborative European exercise on mRNA-based body fluid/skin typing and interpretation of DNA and RNA results. *Forensic Sci Int, Gen*, **2014**; 10:40–48.
98. **Jaiprakash G, Shewale, Ray H. Liu.** Forensic DNA Analysis. Current Practices and Emerging Technologies. *CRC Press*, **2014**; 81–101
99. **A.M. Flohr, T. Hackenbeck, C. Schlueter, P. Rogalla, J. Bullerdiek.** DNase I treatment of cDNA first strands prevents RT-PCR amplification of contaminating DNA sequences. *BioTechniques*,**2003**; 35:920-926.
100. **Simone Gauch, Ralf Hermann, Petra Feuser, Uwe Oelmüller, Helge Bastian.** Isolation of Total RNA Using Silica-Gel Based Membranes. *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, **1998**; 67-70.
101. **Nicosia A, Tagliavia M, Costa S.** Regeneration of total RNA purification silicabased columns. *Biomed Chromatogr*, **2010**; 12:1263-1264.
102. **Macherey-Nagel.** Nucleospin RNA Clean-up XS User Manual. Bethlehem, PA. **2008**.
103. **M. Alvarez, J. Juusola, J. Ballantyne.** An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Anal. Biochem*,**2004**; 335:289–298.
104. **C. Haas, E. Hanson, M.J. Anjos, R. Banemann, A. Berti, E. Borges, A. Carracedo, M. Carvalho, C. Courts, G. De Cock, M. Dotsch, S. Flynn, I. Gomes, C. Hollard, B. Hjort, P. Hoff-Olsen, K. Hribikova, A. Lindenbergh, B. Ludes, O. Maronas, N. McCallum, D. Moore, N. Morling, H. Niederstatter, F. Noel, W. Parson, C. Popielarz, C. Rapone, A.D. Roeder, Y. Ruiz, E. Sauer, P.M. Schneider, T. Sijen, D.S. Court, B. Sviezena, M. Turanska, A. Vidaki, L. Zatkalikova, J. Ballantyne.**RNA/DNA co-analysis from human 67 saliva and semen stains – results of a third collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int. Genet.*,**2013**; 7:230–239.
105. **Bowden A, Fleming R, Harbison SA.** A method for DNA and RNA coextraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ™ system. *Forensic Sci Int Genet*, **2011**; 5:64–68.
106. **C. Parker, E. Hanson, J. Ballantyne.** Optimization of dried stain co-extraction methods for efficient recovery of high quality DNA and RNA for forensic analysis. *Forensic Sci Int: Genet Suppl Series*, **2011**; 3:309-310.
107. **Haas C, Klessner B, Maake C, Bär W, Kratzer A.** mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci Int Genet*,**2009**; 3:80-88.

- 108. Jane Juusola, Jack Ballantyne.** messenger RNA profiling: Body identification using multiplex real-time PCR. *2National Center for Forensic Science*, **2007**.
- 109. Jane Juusola, Jack Ballantyne.** mRNA Profiling for Body Fluid Identification by Multiplex Quantitative RT-PCR. *J of Forensic Sci*, **2007**; 7: 1252–1262.
- 110. Noh Jin Park, Xiaofeng Zhou, Tianwei Yu, Brigitta M.N. Brinkman, Bernhard G. Zimmermann, Visswanathan Palanisamy, David T. Wong.** Characterization of salivary RNA by cDNA library analysis. *Archives of Oral Biology*, **2007**; 52:30-35.
- 111. Vesna Evtimova, Constanze Stadler, Manuela Poignée-Heger.** cDNA Synthesis with the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit from FormalinFixed Paraffin-Embedded Tissue (FFPET) Samples. *Biochemica*, **2006**; 1.
- 112. Judith E Meis, Anupama Khanna.** RNA amplification and cDNA synthesis for qRT-PCR directly from a single cell. *Nature Methods*, **2009**; 6.
- 113. Joseph Donfack, Anissa Wiley.** Mass spectrometry-based cDNA profiling as a potential tool for human body fluid identification. *Forensic Sci Int: Genet*, **2015**; 16: 112–120.
- 114. Sauder C, Pedras-Vasconcelos J, Puig M, Verthelyi D.** The IP10 (CXCL10) specific cDNA probe of the mCK-5c multiprobe RNase protection assay kit carries two nucleotide insertions that complicate the interpretation of results. *Cytokine*, **2008**; 2:182-186.
- 115. M. Bauer, D. Patzelt.** Identification of menstrual blood by real time RT-PCR: technical improvements and the practical value of negative test results, *Forensic Sci. Int.*, **2008**; 174:55–59.
- 116. Darelle Thomson, Ralf G. Dietzgen.** Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *J of Virological Methods*, **1995**; 54:85-95.
- 117. Seong-Min Park, Seong-Yeon Park, Jeong-Hwan Kim, Tae-Wook Kang, Jong-Lyul Park, Kwang-Man Woo, Jong-Sik Kim, Han-Chul Lee, SeonYoung Kim, Seung-Hwan Lee.** Genome-wide mRNA profiling and multiplex quantitative RT-PCR for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int: Genet*, **2013**; 7: 143 -150.
- 118. Furtado M.R, R. Fang , C.F. Manohar , C.Shulse , M.Brevnov , A.Wong O.V Petrauskene, P. Brzoska.** Real-time PCR assays for the detection of tissue and body fluid specific mRNAs. *International Congress Series*, **2006**; 1288:685– 687.
- 119. Haas C, Hanson E, Ballantyne J.** Capillary electrophoresis of a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction to target messenger RNAmarkers for body fluid identification. *Methods Mol Biol*, **2012**; 830:169-83.
- 120. Lindenbergh A, de Pagter M, Ramdayal G, Visser M, Zubakov D, Kayser M, Sijen T. A.** multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces. *Forensic Sci Int Genet*, **2012**; 6:565-577.
- 121. Rachel Fleming, Sally Ann Harbison.** The development of an mRNA amplification positive control for the identification of body fluids. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, **2014**; 2: 37-45.
- 122. J. Juusola, J. Ballantyne.** mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR, *J. Forensic Sci.*, **2007**; 52:1251–1262.
- 123. Patrick Danaher, Robin Lynn White, Erin K. Hanson, Jack Ballantyne.** Facile semi-automated forensic body fluid identification by multiplex solution hybridization of anoStringbarcode probes to specific mRNA targets. *Forensic Sci Int: Genet*, **2014**; 14:18–30.

124. **Eunmi Ban, Eun Joo Song.** Capillary electrophoresis methods for microRNAs assays: A review. *Analytica Chimica Acta*, **2014**; 852: 1-7.
125. **Jakubowska J, Maciejewska A, Pawlowski R, Bielawski KP.** mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification. *Forensic Sci Int Genet*, **2013**; 7:272-278.
126. **Jacques Ravel, Pawel Gajer, Zaid Abdo, G. Maria Schneider, Sara S. K. Koenig, Stacey L. McCulle, Shara Karlebach, Reshma Gorle, Jennifer Russell, Carol O. Tacket, Rebecca M. Brotman, Catherine C. Davis, Kevin Ault, Ligia Peralta, and Larry J. Forney.** Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proceedings of the national Academy of Sciences. **2015**.
127. **Rachel I. Fleming, SallyAnn Harbison.** The use of bacteria for the identification of vaginal secretions. *Forensic Science International: Genetics* 4 (**2010**) 311–315.
128. **Vüqar Hüseynov.** Vücut sıvılarının tanımlanmasında spesifik mRNA belirteçlerinin kullanılabilirliğinin araştırılması. Adli Tıp Doktora Programı Doktora Tezi. **2015**.
129. **Reid G., Burton J.** Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenetic bacteria. *Microbes Infect.* **2002**; 4: 319-324.
130. **J. Juusola, J. Ballantyne,** Multiplex mRNA profiling for the identification of bodyfluids, *Forensic Sci. Int.* 152 (2005) 1–12.
131. **C. Haas, B. Klessner, C. Maake, W. Bar, A. Kratzer,** mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription end-point PCR and realtime PCR, *ForensicSci. Int. Genet.* 3 (2009) 80–88.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Eren Akgündüz

Doğum Tarihi ve Yeri: 07.03.1986, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Adres: Kışla Mah. DSİ TOKİ konutları DG-7A kat:5 no:11 Yüreğir/Adana

Telefon: 0 531 627 37 12

E posta: dreren86@hotmail.com

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi

Görev Yerleri: Yeşilhisar Devlet Hastanesi, Yeşilhisar/Kayseri

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, Adana

Dernek Üyelikleri: Adana Tabip Odası

Adli Tıp Uzmanlar Derneği

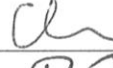



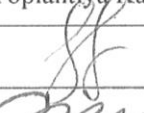
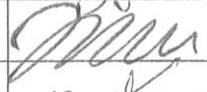

Yabancı Dil: İngilizce

EK 1: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Onayı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Tarih
47	6 Kasım 2015

KARAR NO 29- Adli Tıp Anabilim Dalı'nda, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nın bilimsel işbirliğiyle, Prof. Dr. Behnan Alper yönetiminde, Doç. Dr. Ayşe Serin'in, Doç. Dr. İbrahim Ferhat Ürünsak'ın katkılarıyla, Araş. Gör. Dr. Eren Akgündüz tarafından yürütülmesi öngörülen, "Vajinal Sekresyonun Tanımlanmasında Kullanılan Laktobacillus Türlerinin Varlığını Etkileyen Faktörlerin Araştırılması" başlıklı tıpta uzmanlık tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	Doç Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Davut Alptekin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Prof Dr Mehmet Kanadaşı Kardiyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyostatistik Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Doç Dr Suat Gezer Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

EK 2. Aydınlatılmış Onam Formu

Vajinal Sekresyonun Tanımlanmasında Kullanılan

Laktobacillus Türlerinin Varlığını Etkileyen Faktörlerin Araştırılması

Biyolojik delillerin tanımlanması adli açıdan önemlidir. Vajinal sekresyonun diğer vücut sıvılarından ayırımında lactobacillus bakterileri kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı lactobacillusların vajen florasında bulunmasını etkileyen faktörlerin araştırılmasıdır. Vajinal enfeksiyon ve postmenopozal dönem kadınlarda lactobacillusların varlığı araştırılacaktır. Böylece vajinal sekresyon belirteci olarak kullanılan lactobacillusların saptanamama durumları ortaya konmaya çalışılacaktır.

Bu çalışma kapsamında sizden vajinal sürüntü örneği alınacaktır. Sonuçlar öncelikle bilimsel amaçla kullanılacak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacaktır. Parasal bir bedel ödemenizi gerektirmeyen ve size de bir ödeme yapılması söz konusu olmayan bu çalışmaya katılmama ve katıldıktan sonra çekilme hakkınız bulunmaktadır. Ek bilgi talebiniz olursa sözlü olarak karşılanacaktır.

Araştırmamıza katılmayı kabul ediyorsanız, lütfen aşağıdaki bölüme adınızı-soyadınızı yazıp tarih ve imza atınız. Teşekkür ederiz.

SÖZ KONUSU ARAŞTIRMAYA, YUKARIDA BELİRTİLEN KOŞULLAR
ÇERÇEVESİNDE HİÇBİR BASKI VE ZORLAMA OLMAKSIZIN KENDİ RIZAMLA
KATILMAYI KABUL EDİYORUM.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tarih:

Tel:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza