

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

Danışman

Prof. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu

SEMEN ÖRNEKLERİNDE MİR-891A VE MİR-10A BELİRTEÇLERİNİN ÇEŞİTLİ  
KOŞULLARDA DAYANIKLILIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG AHMET CAN KURT

İSTANBUL, 2024

İstanbul, 09 Ocak 2025

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
ADLİ TIP ve ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 36.maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Ana Bilim Dalı'nın yüksek lisans öğrencisi Ahmet Can KURT'un

**"Semen Örneklerinde miR-891a ve miR-10a Belirteçlerinin Çeşitli Koşullarda Dayanıklılığının Değerlendirilmesi"**

Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

Yukarıda adı geçen tezin ve tez savunmasının kabul edilmesine oy birliğiyle karar verilmiştir.

Prof.Dr. Emel Hülya YÜKSELOĞLU  
Jüri Başkanı  
Danışman

Prof.Dr. Beytullah KARADAYI  
Üye

Dr.Öğr.Üyesi Dilek SALKIM İŞLEK  
Üye

Dr.Öğr.Üyesi Filiz Ekim ÇEVİK  
Üye

Dr.Öğr.Üyesi Bahadır ERCAN  
Üye

Bu tez projesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

**Proje No: 37534**



## ÖNSÖZ

Başta yüksek lisans eğitimim boyunca kendisinden adli bilimler adına çok şey öğrendiğim, bana yol gösteren sevgili danışmanım Prof. Dr. Emel Hülya YÜKSELOĞLU'na

Alandaki bilgisini ve deneyimlerini paylaşan ve deney süresince her türlü desteği veren Dr. Öğr. Üyesi Bahadır ERCAN'a

Projenin ilerlemesi adına ellerinden gelen tüm desteği veren Dr. Ömer KARATAŞ'a ve Nazlı HÖLÜMEN'e

Verdiği önemli bilgiler ile deney aşamasında büyük yardımı dokunan Öğr. Gör. FATMA EBRU BEKİROĞLU'na

Laboratuvar imkânlarını bize sunan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı Çalışanları Cihan ŞAHİN ve Rojda TANRIVERDİ'ye

Süreç boyunca yanımda olan, zorlukları beraber çözdüğümüz yol arkadaşım Bensu Damla AKSOY'a

Eğitim hayatım boyunca yanımda olan, elimden tutan annem İlkay KURT ve Mehmet KURT'a teşekkürü borç bilirim.

Biyolog Ahmet Can KURT

## İçindekiler

<b>ÖZET</b> .....	11
<b>SUMMARY</b> .....	13
<b>1. Giriş ve Amaç</b> .....	15
<b>2. Genel Bilgiler</b> .....	17
<b>2.1- Vücut Sıvılarının Tayini</b> .....	20
<b>2.1.1- Vücut sıvısı tayininde kullanılan testler</b> .....	21
<b>2.1.2 Vücut sıvıları tayininin önemi</b> .....	22
<b>2.1.3 Vücut sıvıları tayininde karşılaşılan zorluklar</b> .....	23
<b>2.2 Semen</b> .....	24
<b>2.2.1 Semen üretimi</b> .....	24
<b>2.2.2 Semen içeriği</b> .....	26
<b>2.2.3 Sperm morfolojisi</b> .....	27
<b>2.3 Adli Bilimlerde Semen Analizi</b> .....	28
<b>2.3.1 Ön tarama testleri</b> .....	29
<b>2.3.2 Doğrulama testleri</b> .....	31
<b>2.4 Adli Bilimlerde RNA</b> .....	33
<b>2.4.1 Ribo Nükleik Asit (RNA)</b> .....	33
<b>2.4.2 Adli bilimlerde RNA ile ilgili yapılan çalışmalar</b> .....	38
<b>3. Gereç ve Yöntem</b> .....	41

3.1 RNA izolasyonu .....	43
3.2 cDNA eldesi .....	44
3.3 Kantitatif Analiz.....	45
3.4 İstatistiksel Analizler.....	46
4. Bulgular .....	47
4.1 Ct ve $\Delta$ Ct bulguları .....	47
4.1 İstatistiksel bulgular.....	55
4.2 Kat değişimi (Fold Change) bulguları .....	55
5. Tartışma.....	63
6. Sonuç.....	68
7. KAYNAKÇA .....	70
Ekler.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	94

**TABLULAR DİZİNİ**

<b>Tablo I:</b> Kan, semen ve tükürük için kullanılan ön tarama testleri .....	21
<b>Tablo II:</b> Kan, semen ve tükürük için kullanılan doğrulama testleri .....	22
<b>Tablo III:</b> Semen içeriğinde bulunan bileşikler ve kaynak dokuları.....	26
<b>Tablo IV:</b> RNA moleküllerinin sınıflandırılması .....	34
<b>Tablo V:</b> Çalışmada kullanılan örnek grupları .....	42
<b>Tablo VI:</b> Hedef miRNA sekans bilgileri .....	46
<b>Tablo VII:</b> Spermogram sonuçları .....	47
<b>Tablo VIII:</b> Örneklerin Ct değerleri ve grupların ortalama Ct değerleri.....	48
<b>Tablo IX:</b> Örneklerin miR-10a'ya göre $\Delta$ Ct değerleri .....	49
<b>Tablo X:</b> Örneklerin miR-891a'ya göre $\Delta$ Ct değerleri.....	50
<b>Tablo XI:</b> One-way ANOVA testi sonuçları.....	55

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Memeli sperm hücresi morfolojisi .....	28
Şekil 2: miRNA biyogenez yolağı (92) .....	37
Şekil 3: O grubu örneklerinde $\Delta$ Ct değerlerinin sütun grafiğinde gösterimi .....	51
Şekil 4: T grubu örneklerinde $\Delta$ Ct değerlerinin sütun grafiğinde gösterimi .....	51
Şekil 5: S grubu örneklerinde $\Delta$ Ct değerlerinin sütun grafiğinde gösterimi .....	52
Şekil 6: Y grubu örneklerinde $\Delta$ Ct değerlerinin sütun grafiğinde gösterimi .....	52
Şekil 7: RNU6b ortalama Ct değerlerinin koşullara göre grafik üzerinde gösterimi.....	53
Şekil 8: miR-10a ortalama Ct değerlerinin koşullara göre grafik üzerinde gösterimi .....	53
Şekil 9: miR-891a ortalama Ct değerlerinin koşullara göre grafik üzerinde gösterimi .....	54
Şekil 10: S2 numaralı örnekte kat değişimi .....	56
Şekil 11: S4 numaralı örnekte kat değişimi.....	57
Şekil 12: S5 numaralı örnekte kat değişimi .....	58
Şekil 13: T2 numaralı örnekte kat değişimi.....	59
Şekil 14: T4 numaralı örnekte kat değişimi .....	60
Şekil 15: T5 numaralı örnekte kat değişimi .....	61
Şekil 16: Gruplar üzerinde kat değişimleri ortalamalarının grafik üzerinde gösterimi.....	62

## KISALTMALAR

$\mu$ L: Mikrolitre

ALS: Alternatif Işık Kaynakları (Alternative Light Sources)

AP: Asit Fosfataz

ATP: Adenozin Trifosfat

cDNA: Tamamlayıcı DNA (Complementary DNA)

circRNA: Circular RNA

Ct: Cycle Treshold

DDT: Diklorodifeniltrikloroetan

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon (Follicle Stimulating Hormone)

Kb: Kilobaz

LH: Luteinleştirici Hormon

LTR: Uzun Tandem Tekrarlar (Long Tandem Repeats)

miRNA: Mikro Ribonükleik Asit

mRNA: Mesajcı Ribonükleik Asit

ORF: Open Reading Frame

PCR: Polimeraz Zicir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PIC: Ön Başlatma Kompleksi (Preinitiation Complex)

piRNA: Piwi-interacting RNA

PSA: Prostat Spesifik Antijen

RISC: RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi (RNA Induced Silencing Complex)

RNP: Ribo Nükleoproteinler

Rpm: Revolutions Per Minute

RT-PCR: Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR)

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphisms)

STR: Kısa Tandem Tekrarlar (Short Tandem Repeats)

UTR: Translasyona Uğramayan Bölgeler (Untranslated Regions)

UV: Ultraviyole

VNTR: Değişik Sayılı Tandem Tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats)

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

## ÖZET

Adli soruşturmalarda biyolojik deliller, faillerin tespiti ve suç faaliyetlerinin ardındaki gerçeğin ortaya çıkarılması açısından büyük önem taşımaktadır. Sağlık alanındaki teknolojik gelişmeler ile birlikte biyolojik örneklerden DNA analizinin yapılması mümkün olmuş ve hukuki açıdan daha kesin ve güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Günümüzde olay yerinden toplanan örneklerden DNA analizi yapılmadan önce insan kaynaklı bir biyolojik örnek olduğunun kesinleşmesi gerekmektedir. Bunun için geliştirilmiş çeşitli fiziksel, immünolojik, histo-kimyasal, mikroskopik testler bulunmaktadır. Ancak bu testler, eser miktardaki örneklerle çalışıldığında, örnek içerisindeki DNA yapısının bozulmasına ve örnek miktarında azalmaya sebep olabilmektedir. Ayrıca yeterince spesifik olmayan testlerde yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar elde etmek mümkündür. Tüm bu dezavantajlar göz önüne alındığında adli bilimlerde yeni nesil moleküler uygulamalara başvurulmuştur. Doku spesifik ekspresyon özellikleri nedeniyle RNA molekülleri, bu testlere alternatif olarak öne sürülmüştür. Tıpkı mRNA gibi miRNA'lar da doku spesifik ekspresyon özellikleri nedeniyle vücut sıvısı tayininde kullanılmaya uygun moleküllerdir. miRNA'lar daha küçük boyutları ve enzim kompleksiyle korunmasından dolayı mRNA'lara göre daha dayanıklı ve stabil moleküllerdir. Bu nedenle degrade koşullarda daha iyi sonuç vermektedir. Olay yerindeki degrade edici koşulların özellikleri göz önüne alındığında, bu tür belirteçlerin bu ortamlarda stabiliteilerinin değerlendirilmesi adli bilimler için oldukça önemlidir. Bu sebeple çalışmamızda en sık karşılaşılan olay yeri senaryoları belirlenerek, bu koşullar üzerinde denemeler yapılmıştır.

Çalışmamızda, özellikle cinsel suçlarda önemli bir yer tutan bir biyolojik sıvı olan semen üzerinde, diğer vücut sıvılarından ayırt edici bir şekilde yüksek konsantrasyonlarda bulunan miR-10a ve miR-891a belirteçlerinin, degrade edici koşullarda stabiliteileri değerlendirilmiştir. Semen örnekleri gönüllülük esasıyla çalışmaya katılan beş sağlıklı (normospermi) bireyden toplanmıştır. Her bir bireyden alınan semen örneği, %100 pamuklu beyaz kumaşlara

damlatılmış ve bu kumaşlar olay yerleri taklit edilerek oluşturulan koşullarda bekletilmiştir. Kontrol grubu olarak kullanılan O grubu örnekleri oda sıcaklığında, S grubu örnekleri Büyükçekmece gölünden alınan su içerisinde, T grubu örnekleri standart bahçe toprağında gömülü olacak şekilde 20 gün bekletilmiştir. Y grubu örnekleri, ev tipi çamaşır makinesi içerisinde 90 °C yıkama programında 1 saat toz deterjanla birlikte yıkanmıştır. Kumaş örneklerinden, hedeflenen süre sonunda total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonunun ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Kantitatif analiz için RT-PCR cihazında miR-10a ve miR-891a bölgelerinin amplifikasyonu gerçek zamanlı olarak görüntülenmiş ve Ct değeri elde edilmiştir. Karşılaştırma için referans olarak RNU6b kullanılmıştır. miRNA konstantrasyon karşılaştırmaları için  $\Delta Ct [Ct_{(miRNA)} - Ct_{(RNU6b)}]$  ve  $\Delta\Delta Ct$  değerleri hesaplanmış ve miR-10a ile miR-891a stabiliteleri,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülüyle hesaplanan kat değişimi (fold change) prensibiyle yorumlanmıştır. Ct değeri 35 ve üstü çıkan örnekler için kat değişimi ve istatistiksel analizler uygulanmamıştır. Kat değişimi verilerine göre miR-891a ekspresyonunun, miR-10a'ya göre daha fazla olduğu ve daha stabil bir belirteç olduğu yorumlanmıştır. Çamaşır makinesinde yıkanan örneklerde ise ortam sıcaklığının fazla olması ve çamaşır deterjanı gibi nükleik asit yapısına zarar veren kimyasalların bulunmasından dolayı miRNA degradasyonu daha fazla gerçekleşmiştir ve bu grupta miRNA eldesi yapılamadığı için karşılaştırmalı analizlere dahil edilmemiştir. İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 programı ile farklı çevresel koşulların, miRNA konsantrasyonunda anlamlı bir fark yaratıp yaratmadığının belirlenmesi için normallik testi (Shapiro–Wilk) ve One-way ANOVA ve Post-hoc Tukey ile test edilmiştir. One-way ANOVA testi sonuçlarına göre test edilen çevresel koşullar, miRNA stabilitesi üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değildir ( $p>0,05$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Semen, miRNA, Vücut Sıvılarının Tayini, Adli Biyoloji, Degradasyon.

## SUMMARY

Forensic investigations rely heavily on biological evidence to identify perpetrators and uncover the truth behind criminal activities. Advances in healthcare technologies have made it possible to analyze DNA from biological samples, enabling more definitive and reliable results in legal contexts. Today, before DNA analysis is performed on evidence collected from a crime scene, it is necessary to confirm that the sample originates from a human biological source. Various physical, immunological, histochemical, and microscopic tests have been developed for this purpose. However, when working with trace amounts of samples, these tests can damage the DNA structure and reduce the sample quantity. Furthermore, tests that are not sufficiently specific may yield false-positive or false-negative results. Considering these disadvantages, forensic sciences have turned to next-generation molecular applications. RNA molecules have emerged as alternatives due to their tissue-specific expression characteristics. Like mRNA, miRNAs are also suitable for the identification of bodily fluids due to their tissue-specific expression features. miRNAs are more resilient and stable than mRNAs because of their smaller size and protection by enzyme complexes. Therefore, they produce better results under degraded conditions. Given the degrading environmental conditions at crime scenes, evaluating the stability of such markers in these environments is crucial for forensic sciences. For this reason, the most common crime scene scenarios were determined in our study, and experiments were conducted under these conditions.

In our study, the stability of miR-10a and miR-891a, which are markers found in significantly higher concentrations in semen compared to other bodily fluids, was evaluated under degrading conditions. Semen samples were collected from five healthy (normospermic) volunteers. The samples were deposited on 100% cotton white fabrics, which were then exposed to simulated crime scene conditions. As the control group, O-group samples were stored at room temperature. S-group samples were submerged in water obtained from Büyükçekmece Lake,

T-group samples were buried in standard garden soil, and Y-group samples were washed in a domestic washing machine at 90 °C with powdered detergent for 1 hour. After the target duration, total RNA was isolated from the fabric samples. Subsequently, cDNA synthesis was performed. Quantitative analysis was carried out using an RT-PCR instrument, where the amplification of miR-10a and miR-891a regions was monitored in real-time, and Ct values were obtained. RNU6b was used as a reference for comparison. For miRNA concentration comparisons,  $\Delta Ct$  [ $Ct(miRNA) - Ct(RNU6b)$ ] and  $\Delta\Delta Ct$  values were calculated, and the stabilities of miR-10a and miR-891a were interpreted using the fold-change principle calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formula. Samples with Ct values of 35 or higher were excluded from fold-change and statistical analyses. Based on fold-change data, it was observed that miR-891a expression was higher and more stable than miR-10a. In the samples washed in the washing machine, the high temperature and the presence of chemicals such as laundry detergent, which damage the nucleic acid structure, led to greater miRNA degradation. Therefore, miRNA could not be recovered from this group, and comparative analyses were not performed. Statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics 22 to determine whether different environmental conditions significantly affected miRNA concentrations. Normality was assessed with the Shapiro–Wilk test, while One-way ANOVA and Post-hoc Tukey tests were used for group comparisons. According to the results of the One-way ANOVA test, the tested environmental conditions did not have a significant impact on miRNA stability ( $p > 0.05$ ).

Keywords: Semen, miRNA, Identification of Bodily Fluids, Forensic Biology, Degradation.

## 1. Giriş ve Amaç

Adli bilimlerde, olay yerinde bulunan biyolojik kaynaklı deliller, suçun aydınlatılması ve kişi kimliklendirilmesi yapılabilmesi açısından oldukça önemlidir. Bulunan biyolojik deliller, özellikle doğru olarak toplandığında, uygun koşullarda laboratuvara gönderildiğinde ve analiz edildiğinde en güvenilir kanıtlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyolojik deliller olay yerinde kan, tükürük, semen, vajinal sekresyon, idrar gibi vücut sıvıları şeklinde bulunabilir. Cinsel suçlarda en çok karşılaşılan vücut sıvısı olan semen, kumaş veya bir obje üzerinde leke veya sıvı olarak bulunabileceği gibi vajinal, anal veya oral boşluklarda kalıntı halinde de bulunabilir. Ayrıca açık havada, üzerinden zaman geçmesi durumunda kuruyup şeffaf bir hal alabilir ve olay yerinde tespiti zorlaşabilir (1). Adli bilimlerde olay yerinde bulunan ve vücut sıvısı olma ihtimali olan örneklerden DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) analizi yapılmadan önce insan kaynaklı bir vücut sıvısı olduğunun kesinleşmesi gerekir. Bunun için belirli vücut sıvıları için ayrı olarak geliştirilmiş bazı fiziksel, kimyasal, immünolojik, mikroskobik ve spektrofotometrik testler bulunmaktadır. İnsan kaynaklı bir vücut sıvısı olduğu kesinleşen örneklerden daha sonra DNA analizi yapılmaktadır (2). Adli bilimlerde kullanılan test kimyasallarının, DNA yapısının bozulması ve çok küçük miktardaki örnekler üzerinde delil kaybına neden olabilmesi gibi dezavantajları vardır. Ayrıca kullanılan testin özgüllüğünün düşük olması durumunda yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. Testlerin dezavantajları göz önüne alındığında, özgüllüğün çok daha yüksek olduğu ve çoklu işlemlerin bulunmadığı yeni nesil moleküler genetik uygulamalar, adli biyolojide araştırılmaya başlanmıştır (3).

Adli bilimlerde RNA'nın (Ribo Nükleik Asit) kullanımı, biyolojik sıvıların tanımlanması ve orijinin belirlenmesinde kullanılan testlerin dezavantajlarının önüne geçilmesi için geliştirilmiş yeni nesil moleküler uygulamalardan birisidir. RNA temelli metotlar, özellikle

örnek miktarının çok az olması gibi durumlarda çok önemli bir yere sahiptir (4,5). RNA temelli metotlar içinde en sık çalışılan RNA türü olan mRNA (messenger RNA- mesajcı RNA) olmakla birlikte daha yeni bir konu olan miRNA (microRNA-mikroRNA), oldukça umut verici bulgular içermekte ve aynı zamanda mRNA'ya göre bazı avantajlara sahiptir. Ancak adli bilimlerde RNA temelli yöntemler, standardize analizlerin olmaması ve dünya çapında yeterli verilerin olmaması sebebiyle günümüzde rutin analizlerde kullanılmamaktadır. Bilim dünyasında bu amaçla kullanılacak belirteçler ve bu belirteçlerin nitelikleri çalışılmaya devam etmektedir (6). Tez çalışmamızda, miRNA'nın avantajları göz önünde bulundurularak, adli bilimler için oldukça önemli bir vücut sıvısı olan semen üzerinde, miR-10a ve miR-891a'nın stabiliteleri, farklı olay yeri senaryoları üzerinden hesaplanmıştır.

## 2. Genel Bilgiler

Adli bilimlerde olay yerinden toplanan örnekler suç, fail ve mağdur arasındaki ilişkiyi oluşturan, suçun aydınlatılmasını ve adalete hizmet edilmesini sağlayan temel unsurlardır. Olay yeri örneklerinin uygun bir şekilde toplanması, paketlenmesi, laboratuvara gönderilmesi, delil niteliğini kaybetmeden analizlerinin yapılması ve analizlerin doğru yorumlanması istenilen sonuca ulaşmak için dikkat edilmesi gereken hususlardır (4). Olay yerinde en çok karşılaşılan delil türlerinden biri olan biyolojik deliller, kişiye özgü özellikleri sayesinde suçun aydınlatılması açısından oldukça önemlidir. Biyolojik deliller, insan vücudunda bulunan herhangi bir dokudan elde edilen delillerdir. Kıl, kan, tükürük, semen, idrar, diş, kemik, ter gibi örnekler, olay yerinde karşılaşılan biyolojik delillere örnektir (7). Biyolojik örneklerden DNA yardımı ile kişinin tespit edilmesi, ilk olarak 20. yüzyılın sonlarında kullanılmaya başlanmıştır. Adli bilimlerde DNA'nın kanıt olarak kullanılmasından önce, özellikle kan örneklerinde kan grupları gibi bazı serolojik ve immünolojik yöntemler kullanılmış, daha sonraları ise bazı polimorfik enzim gruplarının ayırt edici özellikleri yer almaya başlamıştır (8,9). 1984 yılında Alec Jeffreys ve ekibinin DNA'da bazı bölgelerin oldukça polimorfik olduğunu, kişiler arası ayrımın yapılmasına olanak tanıdığını ve 'DNA parmak izi' tanımını belirtmesi üzerine, DNA molekülü adli bilimler içerisinde kendisine yer edinmiştir ve ilk kez 1987 yılında bir vakayı çözmek için kullanılmıştır (10,11). DNA'nın adli bilimler içerisine girmesi ile biyolojik örneklerden DNA'nın çalışılması vazgeçilmez hale gelmiştir. İlerleyen yıllarda teknolojinin gelişmesiyle birlikte ortaya çıkan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction (PCR) ) metodu ile daha polimorfik olan STR (Short Tandem Repeats-Kısa ardışık tekrarlar) ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism- tek nükleotid polimorfizmi) analizleri uygulanmış ve sonuçların güvenilirliği arttırılmıştır (12,13).

Bir insanın DNA dizisi incelendiğinde, istisnai durumlar hariç tüm dokularda aynı olduğu görülür. Adli vakalarda bir bireyi farklı doku tipleri kullanılarak kimliklendirebilmenin temel

sebebi budur. Aynı tür içinde DNA dizilimi, minimal varyasyon göstermektedir. Bireyler arasındaki bu varyasyonların, moleküler olarak tespit edilebilmesi adli vakalarda kullanılmasını sağlamaktadır (11). İnsanlar arasında her 1000 baz başına yaklaşık 1 baz farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar, polimorfizmler olarak karşımıza çıkarlar. Adli vakalarda DNA kimliklendirilmesinin temelinde, dünyada tek yumurta ikizleri haricindeki tüm bireylerde DNA'nın eşsiz olması yatar. DNA dizilimi tüm insanlarda yaklaşık %99,5 oranında aynıdır. Adli kimliklendirmeyi ilgilendiren kalan %0,5 lik kısım yani polimorfizmler kişilere özgüdür (14). Polimorfizmler, moleküler biyoloji teknikleriyle analiz edilebilmektedir ve paternite testlerinde, suç olaylarında suçlu tespitinde, toplu ölümler ve kayıp kişilerin teşhisinde, antropolojik çalışmalarda tarihi kişiler ile günümüzde yaşayan insanlar arasındaki akrabalık ilişkilerini belirlemek amacıyla kullanılan belirteçlerdir (15). Kromozomlarda, çeşitli bölgelerde belirli bir baz dizisinin sürekli bir biçimde tekrar ettiği görülmektedir. Bu dizilere VNTR (Variable Number of Tandem Repeats- Değişik sayılı ardışık tekrarlar) adı verilmektedir. İnsanlarda bu bölgelerin dizileri, tekrar sayıları veya buldukları bölgelerin kişiye spesifik olması nedeniyle, adli kimliklendirmede en çok kullanılan polimorfizmler olarak karşımıza çıkmaktadır. VNTR sekansları, içerdikleri baz tekrar sayılarının uzunluklarına göre iki sınıfta incelenirler. Tekrar dizisi 2-6 baz çifti arasındaysa Short Tandem Repeats (STR) , tekrar dizisi 6 baz çiftinden fazlaysa Long Tandem Repeats (LTR-Uzun ardışık tekrarlar) altında sınıflandırılır (16,17).

#### 1- Long Tandem Repeats (LTR)

LTR'ler, yaklaşık 7-16 baz çiftinin ardışık olarak tekrar etmesiyle oluşmuş, VNTR'ın bir diğer alt sınıfıdır. 1985 te Alec Jeffrey tarafından, bu sekanslar uzunluk polimorfizmleriyle ilişkilendirilmiş ve minisatellit olarak isimlendirilmiştir (10). LTR sekansları, insanlarda telomerik bölgelere doğru kümelenme eğilimindedir (18). Günümüzde daha kısa DNA fragmentleri içeren, kısmen degrade örneklerde dahi sonuç

alnabilmesi, çalışma kolaylığı, birçok lokusun bir arada amplifiye edilebilmesi, yüksek ayırım gücü göstermesi gibi üstün özellikleri sayesinde STR lokusları adli amaçlı kimliklendirme ve nesep davalarında tercih edilen hâkim yöntem olmuştur (17).

## 2- Short Tandem Repeats (STR)

STR'ler, 1-6 baz çiftinin ardışık olarak tekrar etmesiyle oluşmuş, protein kodlamayan kromozom bölgeleridir. Mikrosattelit olarak da isimlendirilir. Genomda sık bulunması, yüksek polimorfik özellikleri, az sayıda ve degrade örneklerde iyi çalışması sebebiyle adli bilimlerde en sık kullanılan belirteçlerdir (19,20). STR'ler, çeşitli mutasyon risk seviyelerine sahiptir. Ama bir STR lokusunun, adli tıpta kullanılması için, düşük mutasyon oranına sahip olması gerekmektedir. İnsersiyon, delesyon gibi tekrar dizilerindeki değişiklik gösteren mutasyonlar, STR'lerde gözlenen mutasyon çeşitlerindedir. STR lokusları her jenerasyonda, yaklaşık  $1.2 \times 10^{-4}$  ile  $1.5 \times 10^{-2}$  arasında mutasyon oranına sahiptir. STR lokusunda tekrar sayısının artmasının, mutasyon oranını da arttırdığı varsayılmaktadır (21).

Bir biyolojik delilin, bir bireye ait olup olmadığının yorumunun yapılabilmesi için 13 veya daha fazla STR lokusunun analizi gereklidir. ABD merkezli CODIS (Combined DNA Index System) 12 farklı kromozom üzerinde bulunan 20 adet STR lokusunu barındıran arşiv kullanmaktadır. Ayırım gücünün fazla olması, çalışılan STR lokusunun fazlalığına ve çalışılan bölgelerin polimorfizm derecelerine bağlıdır (22,23).

## 3- Single Nucleotide Polymorphism (SNP),

SNP'ler polimorfizmlerin en basit formudur. Mayoz bölünmede DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hatalardan kaynaklanan bir nükleotidin farklılığıdır. İnsan genomunda her 275 baz çiftinde, ortalama bir adet SNP olduğu varsayılmaktadır. 3 milyar civarı baz çiftinden oluşan insan genomunda yaklaşık 10-11 milyon SNP bulunmaktadır. SNP'ler genellikle bialleliktir ve ortalama mutasyon oranı ( $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$ ) çok düşüktür. Bu

nedenle son zamanlarda sıkça kullanılmaya başlanmıştır (23,24). İnsanların DNA dizilerinde meydana gelen SNP'ler, insanların hastalıklarla olan ilişkisini ve patojenlere, kimyasallara, ilaçlara, aşılarla ve diğer ajanlara nasıl tepki verdiğini etkileyebilir (25).

İlerleyen yıllarda moleküler biyoloji teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, adli bilimler alanına yeni profillemeye metodlarının girilmesi hız kazanmıştır. İleri derecede bozunmuş veya yumuşak dokunun bulunamadığı, sadece sert dokuların (kemik, diş) bulunduğu örneklerde, genomik DNA haricinde Mitokondriyal DNA (mtDNA) belirteçlerinin kullanışlı olması ve maternal kalıtım gösterdiği için soy ağacı belirlemede, kitlesel ölümlerin yaşandığı olaylarda ve evrimsel çalışmalar içerisinde kendisine yer edinmiştir (26,27). Adli bilimlerde bu alanda birçok önemli olayı aydınlatmada kullanılmıştır (28–31).

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR, Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) teknolojisinin geliştirilmesi ile, RNA molekülleri de adli analizlere dahil olmuştur. Bu alanda yara yaşı tahmini, post-mortem interval analizi, biyolojik lekelerin yaş analizleri ve vücut sıvılarının tayininde, RNA molekülleri önemli belirteçler olarak karşımıza çıkmaktadır (32).

## **2.1- Vücut Sıvılarının Tayini**

Adli vakalarda en çok karşılaşılan biyolojik örnekler suçun türüne bağlı olmakla birlikte kan, semen, tükürük, vajinal sekresyon, idrar, doku parçaları, kemik, kıl gibi vücut parçalarıdır. Bu örneklerin gerçekten biyolojik materyal olup olmadığı bilinmeli ve orijini belirlenmelidir. Bunların tespiti için laboratuvarlarda spektrofotometrik, mikroskopik, immünolojik, fiziksel ve kimyasal birtakım testler uygulanır. Böylece delil niteliği taşımayan ve biyolojik örnek olmadığı tespit edilen materyaller dışlanmış

olur. Biyolojik örnek olduğu doğrulanan delillerden daha sonra DNA analizi yapılır (33,34). Biyolojik sıvılara yapılan testler iki grupta incelenir.

### 2.1.1- Vücut sıvısı tayininde kullanılan testler

#### 2.1.1.1 Ön tarama testleri

Bu testler temelde, o sıvının istenen biyolojik materyal olup olmadığını tayin etmektedirler. Bunun için sıvının içinde bulunabilecek bir maddenin tespiti gerçekleştirilir. Bu işlemin özgüllüğü, ancak tespit edilecek maddenin sadece o sıvıya ait olmasıyla sağlanabilir. Yeterince özgül olmayan testler yanlış pozitif veya negatif sonuçlar verebilirler. Delilin orijini konusunda kesin bir bilgi vermezler (34,35).

**Tablo I:** Kan, semen ve tükürük için kullanılan ön tarama testleri (35–37).

BİYOLOJİK MATERYAL	ÖN TARAMA TESTLERİ
Kan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Luminol ile UV ışık kullanılması</li> <li>• Benzidin testi</li> <li>• Fenolftalein testi</li> <li>• Peroksidaz testi</li> </ul>
Semen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Barberio testi</li> <li>• Kolin testi</li> <li>• Asit Fosfataz (AP) testi</li> </ul>
Tükürük	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phadebas amilaz testi</li> </ul>

### 2.1.1.2 Doğrulama testleri

Test edilecek biyolojik sıvının orijinin belirlenmesinde kullanılan doğrulama testleri, ön tarama testlerine göre daha pahalı, uzun gerektiren ve karmaşık ancak daha özelleşmiş testlerdir (38).

**Tablo II:** Kan, semen ve tükürük için kullanılan doğrulama testleri (38,39)

BİYOLOJİK MATERYAL	DOĞRULAMA TESTLERİ
Kan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kan hücrelerinin mikroskopta saptanması</li> <li>• Takayama testi</li> <li>• RSID-Blood İmmünolojik testi</li> </ul>
Semen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Spermatazoaların mikroskopta saptanması</li> <li>• Prostat spesifik antijen (PSA) testi</li> </ul>
Tükürük	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amilaz testi pozitif çıkan örnekler için mikroskopta epitel hücrelerinin saptanması</li> </ul>

### 2.1.2 Vücut sıvıları tayininin önemi

Adli analizlerde, vücut sıvılarını doğru şekilde analiz etmek büyük önem taşıyan bir aşamadır. Olay yerinden toplanıp, laboratuvarında analiz edilinceye kadar olan her adımda bulgular, delil niteliğini kaybetmeyecek şekilde toplanmalı ve ilgili laboratuvara transfer edilmelidir. Biyolojik materyallerden DNA analizi yapılmadan önce insan kaynaklı bir biyolojik materyal olduğunun kesinleşmesi gerekmektedir.

Böylece DNA analizine başvurulmadan önce diğer örneklerin elimine edilmesi sağlanır (33).

Olay yerinde bulunan biyolojik delillerin konumu, şekli, miktarı ve yaşının belirlenmesi uzmanların olay yerini, zamanını, kişi sayısını ve olay anını doğru şekilde yorumlamasına yardımcı olacak unsurlardır. Bu aşamada vücut sıvılarının tayini, suç türünü, mağdur, fail ve olay yeri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkaracaktır. Ayrıca vücut sıvılarının tayin edilmesi, olay yeri ile ilgisi olmayan veya olay ile ilgili bilgi vermeyen diğer vücut sıvılarının da ayrılmasını sağlar. Örneğin olay yerinde bulunan şeffaf bir lekenin, tükürük mü, ter mi, semen mi yoksa vajinal sekresyon mu olduğunun belirlenmesi, bir cinsel saldırı olup olmadığı hakkında çok önemli ipuçları verebilmektedir. Benzer şekilde olay bulunan bir kan lekesinin, venöz kan ya da menstrual kan olduğunun belirlenmesi, olay zamanına ve türüne ilişkin önemli bilgiler sunabilmektedir (40,41).

### **2.1.3 Vücut sıvıları tayininde karşılaşılan zorluklar**

Vücut sıvısı tayininde kullanılan testlerin bazı dezavantajları mevcuttur. Adli biyolojide kullanılan ön tarama testleri daha basit uygulanan, ucuz ve tek basamaklı yöntemlerdir. Ancak ön tarama testleri özgüllüğün düşük olduğu durumlarda bazı bileşiklerle yanlış sonuçlar verebilmektedir (42). Ayrıca degrade örneklerde vücut sıvısının özelliğini kaybetmesi durumunda yine testler işlevsiz kalmaktadır. Doğrulama testlerinde ise kullanılan test kimyasalları ile biyolojik örneğin DNA bütünlüğü zarar görebilmekte ve eser miktarda bulunan materyalin miktarında önemli ölçüde azalmaya sebep olabilmektedir (3,43).

Venöz kan, semen ve tükürük için geliştirilmiş ve rutinde de kullanılan testler bulunmasına karşın idrar, vajinal sekresyon ve ter için geliştirilmiş bu vücut sıvılarına özgül testler bulunmamaktadır. Ayrıca olay yerinin yorumlanmasında önemli bir yere sahip olan menstrual kan için de, venöz kandan ayrımını sağlayan test bulunmamaktadır (44,45).

## **2.2 Semen**

Semen erkek üreme organları tarafından üretilen içerdiği birçok yardımcı bileşikle beraber sperm hücrelerini döllenmeye hazır hale getiren, beyaz- gri renkli kompleks bir vücut sıvısıdır. Erkek üreme organları semen üretiminde organize halde çalışırlar (46).

### **2.2.1 Semen üretimini**

#### **1- Testis:**

Testis, erkek üreme sisteminde, spermatogenez ile olgun sperm hücrelerinin üretildiği seminifer tüpçüklerin bulunduğu kısımdır. Spermatogenez, diploid kromozoma sahip ana spermatogonyum hücrelerinin mayoz bölünme geçirerek, haploid kromozomlu olgun sperm hücrelerine dönüştüğü biyolojik bir süreçtir. Spermatogonyum, yaklaşık 40 gün sonra olgun sperm hücrelerine dönüşür (46).

#### **2- Epididimis ve Vas deferens kanalları:**

Epididimis tüpleri, testisten olgun sperm hücrelerinin çıkış yaptığı yerdir. Sperm hücreleri, tüp içerisindeki yaklaşık 2 haftalık yolculuklarının sonunda, ejakülasyon gerçekleşinceye kadar, epididimisin distal kısmında depolanır. Epididimisin distal kısmından itibaren başlayan Vas deferens kanalları, yapısındaki düz kasların yardımıyla

sperm hücrelerini, epididimisten karın boşluğuna, oradan seminal keseciklerin bulunduğu kısma taşırlar (47,48).

### 3- Seminal kesecikler:

Seminal kesecikler, karın boşluğunda idrar kesesinin hemen yanlarında bulunan ikili bezlerdir. Bu kısımdan salgılanan moleküller, semen hacminin yaklaşık %60'ını oluşturur. Sperm hücrelerinin hareketi için gerekli ATP'nin kaynağı fruktoz şekeri ve üreme fonksiyonunda önemli yere sahip yağ asidi olan prostaglandin burada üretilir (48,49).

### 4- Prostat:

İdrar kesesinin altında üretrayı çevreleyen bezdir. Prostat sıvısı, semen hacminin yaklaşık %20'sini oluşturur. Burada bulunan çinko iyonları ( $Zn^{2+}$ ) ve sitrat, sperm hareketliliği, stabilitesi ve seminal sıvının sıvılaşması- pıhtılaşması dengesinin kurulması için önemli moleküllerdir (50).

### 5- Cowper (Bulbouretral) bezi:

Prostat bezinin altında bezelye büyüklüğünde bir bezdir. Salgıladığı pek çok glikoprotein yanında, cinsel uyarım sonrası mukus benzeri sıvı salgılayarak, üretranın asidik ortamını nötralize eder ve böylece sperm hücreleri için uygun ortam oluşturulur (51).

### 2.2.2 Semen içeriği

Protein ve karbonhidratça zengin olan semen içeriği, hücresel kısım ve hücresel olmayan kısım olmak üzere iki bölümde incelenir. Hücresel kısım, çekirdeğinin içinde DNA barındıran bölümdür. Olgunlaşmış sperm, lökositler ve genital doku kaynaklı epitel hücreler bu kısımda bulunur. Sperm, semenin en önemli bileşiği olmasına rağmen, total semenin yaklaşık %1-2'sini oluşturur. Hücresel olmayan kısım ise, salgılandiğı dokulara göre sınıflandırılır (52).

**Tablo III:** Semen içeriğinde bulunan bileşikler ve kaynak dokuları

DOKU ADI	TOTAL SEMEN HACMİNE ORANI	SALGILANAN BİLEŞİKLER
TESTİS	%1-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Olgun sperm</li> </ul>
EPİDİDİMİS	%5-10	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gliserofosfokolin (GPC)</li> <li><math>\alpha</math>-glikozidaz</li> <li>L- cornitin</li> <li>Epididimozom</li> </ul>
SEMİNAL KESECİKLER	%60-70	<ul style="list-style-type: none"> <li>Früktoz</li> <li>Semenogelin</li> <li>Prostoglandin</li> <li>Sorbitol</li> <li>C vitamini</li> <li>Sitokinler</li> </ul>
PROSTAT	%10-30	<ul style="list-style-type: none"> <li>Prostat Spesifik Antijen (PSA)</li> <li>Asit Fosfataz</li> <li>Çinko iyonları (<math>Zn^{2+}</math>)</li> <li>Sitrat</li> <li>Lipidler</li> <li>Spermin</li> </ul>
COWPER (BULBOURETRAL) BEZİ	%1-5	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mukus</li> <li>Galaktoz</li> </ul>

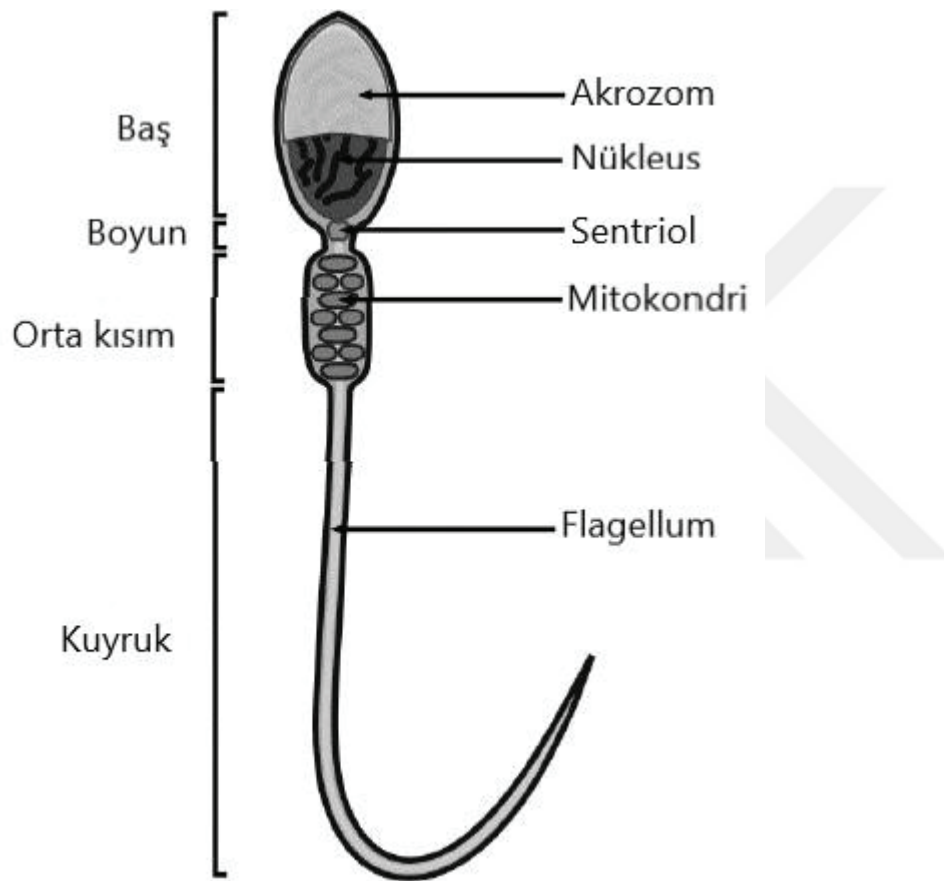
Semen içeriğinde bulunan bu bileşikler, sperm hücrelerinin yumurtaya başarılı bir şekilde ulaşmasında ve döllemenin gerçekleşmesinde önemli yere sahiptirler. Semen, yaklaşık 7,2-7,5'lik pH ile bazik bir ortama sahiptir ve sperm hücreleri bazik ortamda hayatta kalırlar. Semen içerisinde bulunan ve bir poliamin olan spermin, semenin bazik yapıda olmasını sağlayan en önemli bileşiklerden biridir (53).

### 2.2.3 Sperm morfolojisi

Sperm, erkek üreme sistemi tarafından üretilen ve dişi yumurta hücrelerini dölleyerek üremeyi sağlayan hücredir. Sperm hücreleri erkek üreme sisteminde testis içerisinde seminifer tüpçükler içerisinde spermatogenez adı verilen mitoz ve mayoz bölünmelerin gerçekleştiği süreçte üretilirler. Spermatogenezde, olgunlaşmamış ve diploid (2n) kromozom setine sahip spermatogonium hücrelerinden, haploid (n) kromozom setine sahip spermatidler üretilir. Spermatidler uygun koşullarda farklılaşarak hareketli spermatozoalara dönüşürler. İnsanlarda spermatogenezin uyarılması ve sperm hücrelerinin üretilmesinde, Sertoli ve Leydig hücreleri aracılığıyla algılanan FSH (Folikül Uyarıcı Hormon -Follicle-Stimulating Hormone), LH (Luteinizan hormon) ve testosteron hormonları görev yaparlar (54,55).

Olgun sperm hücreleri morfolojik olarak, plazma membranı tarafından bölünmüş baş ve kuyruk kısımlarından oluşur. Sperm baş kısmında, yumurta hücrelerine giriş yapabilmesi için bazı enzimleri bulunduran akrozom ve haploid sperm DNA'sını içeren nükleus bulunur (56). Sperm DNA'sı, somatik hücre DNA'larından farklı olarak histon değil protamin proteinleriyle çevrilidir ve oldukça sıkı paketlenmiştir (57). Spermin kuyruk kısmı, kamçı hareketleriyle sperm hücrelerinin yumurtaya taşınmasını sağlayan, protein

yapılı flagellum ve bol miktarda mitokondri içeren boyun kısmından oluşur. Mitokondriler, sperm hücrelerinin hareketi için gerekli olan ATP'nin sentezlenmesini sağlar (58).



**Şekil 1:** Memeli sperm hücresi morfolojisi

### 2.3 Adli Bilimlerde Semen Analizi

Adli bilimlerde semenin tespiti, özellikle cinsel suçların aydınlatılmasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Olay yerinde bulunan semenin miktarı, bulunduğu yeri ve biçimi, suçun detayları

hakkında bilgi vermektedir. Cinsel suçlarda semen, mağdurun vajinal veya anal boşluklarında bulunduğu gibi, bir obje veya kumaş üzerinde kurumuş leke şeklinde de bulunabilmektedir. Eskimiş ve kurumuş semen örneklerinde leke şeffaflaşabilir ve tespiti zorlaşabilir. Bu durumlarda öncelikle lekenin semen olup olmadığının tespitinin yapılması gerekmektedir. Adli biyolojide semenin analizi mikroskobik, immünolojik, spektrofotometrik, fiziksel ve kimyasal yöntemler ile yapılabilmektedir. Semen tespitinin temelinde, semen içerisinde diğer vücut sıvılarından ayıracak özellikte olan spesifik moleküller ya da çok daha yoğun olarak bulunan moleküller aranır (59,60).

### **2.3.1 Ön tarama testleri**

#### **1- Asit Fosfataz (AP) testi**

Asit fosfatazlar, asidik ortamda, fosfat monoesterlerin hidolizini katalizleyen ve hemen hemen tüm memeli dokusunda bulunan enzim ailesidir. Fakat semende, diğer vücut sıvılarına oranla oldukça yüksek oranda bulunması, adli bilimlerde semen tespitinde kolaylık sağlamaktadır. (61). Adli bilimlerde, asit fosfataz enzim varlığının tespiti için kullanılan renk testlerinin başında Brentamine Fast Blue B gelmektedir. Brentamine Fast Blue B, asit fosfataz enzim aktivasyonu ile,  $\alpha$ -naftil fosforik asidin o-dianisidine dönüşmesiyle, mor-menekşe renk elde edilir. Hızlı ve güvenilir bir ön-tarama testi olmasına karşın vajinal sekresyon, kan ve karnabahar gibi bazı bitkilerde de yanlış pozitif sonuç verebilmektedir (62).

#### **2- Barberio test**

Barberio testi, semen içerisinde spermin varlığına dayalı ön-tarama testidir. Semen üzerine damlatılan ve pikrik asit içeren Barberio belirteci, semen içerisindeki spermin moleküllerinin sarı kristal şeklinde mikroskopta görülmesine yardımcı olur. Yöntem

basit olmasına karşın hassasiyeti düşüktür ve diğer vücut sıvılarında yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir (35,62).

### 3- Kolin (Florence) test

19. yüzyılın sonlarında geliştirilen ve semen içerisindeki fosforilkolin varlığını tespit etmeye yarayan bir ön-tarama testi olan Florence test, iyodür içeren Florence kimyasalının, semen lekesi üzerine dökülmesi sonucu oluşan kahverengi renkteki kolin kristallerinin mikroskopta gözlenmesi ile tanımlanır. Fosforilkolin semende 2–300 mg/100 g oranında bulunmasında karşın daha düşük oranlarda idrar, süt gibi vücut sıvılarında ve ayrıca kabak, karnabahar, patates gibi bazı bitkilerde de bulunmaktadır. Bu nedenle testlerde yanlış negatiflik ve yanlış pozitiflik oluşmaması adına, asit fosfataz testi ile beraber kullanılması önerilir. Spesifikliği asit-fosfataz testine göre daha yüksektir (63).

### 4- Alternatif Işık Kaynakları

Alternatif ışık kaynakları (ALS) kullanılarak olay yerinde bir bulgu üzerinde biyolojik örnek olup olmadığının belirlenmesi, adli bilimler içerisinde oldukça yaygın bir ön tarama testidir. Bunun için örneğe UV gibi belirli dalga boylarında ışınlar gönderilip absorblaması sağlanır ve belirli filtreler altında biyolojik örnek görünür hale getirilir. ALS tekniği, özellikle tükürük ve semen gibi kurudukça şeffaflaşan biyolojik örnekleri görünür hale getirmek için oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Kurumuş bir semen lekesini tespit etmek için 320-500 nm arası dalga boyları yeterli olmakla birlikte en iyi sonuçlar turuncu filtreli gözlük ile 400-490 nm arasındadır (64,65). Ancak UV ışınlarının, DNA üzerindeki hasar yaratıcı etkisi dolayısıyla bu örneklerden tekrar

DNA analizi yapmak sonuçların hatalı çıkmasına sebep olabilecektir. Ayrıca birbirine yakın dalga boylarını absorblayan biyolojik örneklerin ayırt edilememesi ve belirli objeler üzerinde UV ışınlarının tespit edilememesi bu yöntemin dezavantajlarından (66).

### 2.3.2 Doğrulama testleri

#### 5- Işık mikroskopunda sperm tespiti

Sperm, sadece semen içerisinde bulunan erkek üreme hücresidir. Semene spesifik olduğundan, incelenen bir örnekte sperm hücresinin mikroskopta tanımlanması, örneğin semen olduğunu kanıtlamaya yeterli olan doğrulayıcı bir testtir. Sperm hücreleri, yapısal olarak eşsiz bir morfoloji gösterirler ve bu nedenle mikroskop altında tanımlanmaları kolaydır. Ancak sperm hücreleri, dış ortamda hızlıca canlılığını kaybetme, bozulma ve karakteristik özelliklerini kaybetme eğilimindedir. Bozulmaya başlayan bir sperm hücresinde baş ve kuyruk kısımları ayrılmaya başlar. Ayrı baş ve kuyruk kısımları, sperm tespitini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle mikroskopla sperm tespitinin, konu hakkında bilgili uzmanlar tarafından yapılması gerekmektedir .

Dış ortamda sperm hücrelerinin bozulma süresi, ortamın pH'ı ve sıcaklık gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Sperm hücreleri, semen gibi bazik ortamda yaşamaya uyum sağlamışlardır. Vajinal boşlukta, 3 ila 7 gün gibi sürelerde sperm hücresi canlılığını korumaktadır. Literatürde 17 ila 19 güne kadar hareket etmeyen sperm örneklerinin toplanabildiğine dair bulgular mevcuttur (67). Fakat adli bilimlerde, vajinal boşluktan alınan sperm örneklerinin delil özelliği gösterebilmesi için, olay gerçekleşikten sonra 72 saat içerisinde toplanması gerekmektedir (68). Literatürde, yapılan çalışmalarda oral sürüntülerde 6 saat, anal sürüntülerde 46 saat, rektal sürüntülerde ise 65 saate kadar spermatazoa tespiti yapılabilen çalışmalar mevcuttur (69).

Sperm hücrelerinin mikroskopta görünür kılınması için çeşitli boyama yöntemleri mevcuttur. Bu boyalar baş, kuyruk, nükleus gibi bölgeleri farklı renklerde boyayarak spermi görünür kılarlar. Bu boyalardan en yaygın kullanılan Christmas tree boyası, Nuclear Fast Red ve Picro İndigo Carmine reaktifleriyle birlikte, sperm hücrelerinin baş- akrozomal kısımlarını koyu pembeye boyarken kuyruk kısımlarını mavi-gri renge boyar. Sperm boyama için en güvenilir boyama yöntemlerinden biridir (70). Patoloji laboratuvarlarında, hücre çekirdeği morfolojisinin belirlenmesi için en çok kullanılan boya olan hemotoksilen- eozin, sperm hücrelerinde de çekirdek ve DNA içeren bölüm olan baş kısmı mavi- mor renkte boyayarak ayırt edilir. Uygulaması kolay, ucuz ve etkili bir boyama yöntemidir (71). Adli bilimlerde sperm hücrelerinin boyanması için alkalinfuksin (70), Paponicolau boyası (72), eosin-nigrosin (73) gibi pek çok boya çeşidi kullanılmaktadır (70,72,73). Ancak sperm bulunmayan semen örneklerinde (azospermi, oligospermi) mikroskopla gözlem yapılamaması en büyük dezavantajdır.

#### 6- Prostat Spesifik Antijen (PSA) testi

Prostat spesifik Antijen (PSA) ya da p30, prostat epitel hücreleri tarafından üretilen, serin- proteaz aktiviteli bir proteindir. Androjen düzenleyici olarak görev yapar (74). Prostat kaynaklı bir protein olmasından dolayı semen içerisinde çok yüksek oranda bulunur. Prostat spesifik antijenin tespiti, örneğin semen olduğuna dair doğrulayıcı bir test sunar. Ancak PSA'nın venöz kanda ve idrarda da çok düşük miktarlarda olsa bile bulunduğu ve yanlış pozitif verme ihtimali olduğu bilinmektedir. PSA testi, sperm içermeyen semen örneklerinde de pozitif sonuç vermesi, spermatazoa tespitine göre en büyük avantajdır. PSA tespiti, antijen-antikor eşleşmesine bağlı olarak ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay- Enzim bağlı immunosorbent analizi) ile yapılabilir. ELISA oldukça hassas olup 4 ng/mL ye kadar yoğunlukta ölçüm

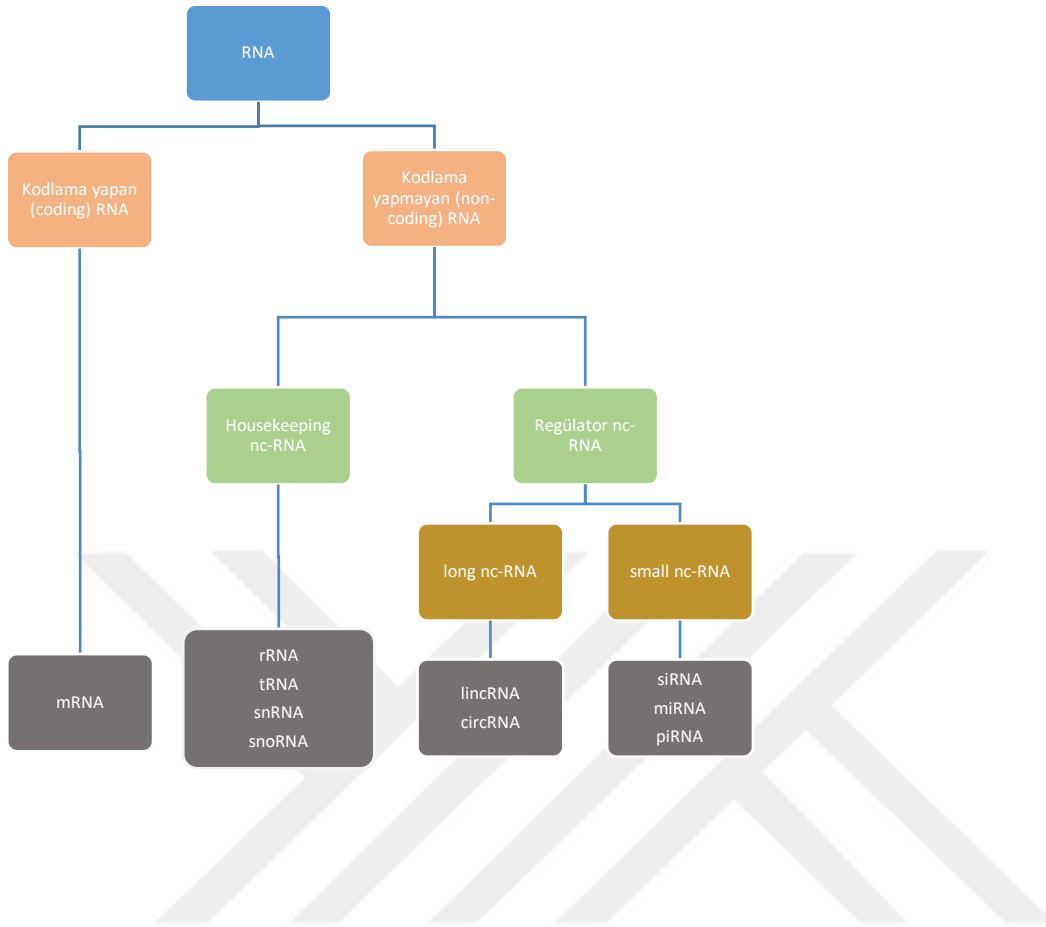
yapabilmektedir. ELISA testinin sonuç vermesi daha uzun sürdüğünden adli bilimlerde daha kısa sürede sonuç verebilen, immüno-kromatografik test kitleri geliştirilmiştir. Bu kitler, yaklaşık ELISA hassasiyetinde pozitif sonuç verebilmekte, uzun süre içerisinde beklemiş semen örneklerinde ve vajinal sürüntülerde dahi pozitif sonuç vermiştir (39).

## 2.4 Adli Bilimlerde RNA

### 2.4.1 Ribo Nükleik Asit (RNA)

Ribo Nükleik Asit (RNA), kalıp DNA zincirinden RNA polimeraz enzimi ile sentezlenen nükleik asittir. Yapısı DNA'ya benzer şekilde fosfodiester bağlarıyla birlikte şeker-fosfat omurgası ve şekere glikozit bağıyla bağlanan azotlu bazlardan oluşur. DNA'dan farklı olarak yapısında Deoksiriboz yerine Riboz şekeri bulunur. Timin yerine Urasil barındırır ve DNA'nın aksine çift iplikli sarmal yapısı yoktur. RNA'nın türüne bağlı olmakla birlikte çeşitli sekonder ve tersiyer yapılar da bulunabilmektedir (56,57).

RNA molekülleri, sentezinden belli bir süre sonra yıkılırlar. Bu yıkılma RNA çeşidine göre değişken olmakla birlikte, yarılanma ömürleri dakikalar, günler hatta haftalar kadar sürebilmektedir. Örneğin mRNA'lar birkaç dakika ile gün arasında değişen yarılanma ömrüne sahipken miRNA'lar birkaç gün ile hafta arasında değişen yarılanma ömrüne sahiptir (77).

**Tablo IV:** RNA moleküllerinin sınıflandırılması

### 2.4.1.1 mRNA

mRNA, ribozoma protein sentezi için gerekli genetik bilgiyi ileten RNA'dır. Ökaryotlarda mRNA, RNA polimeraz II enzimi ile sentezlenir ve kodlama yapan tek RNA türüdür. DNA'nın gen adı verilen bölgelerinden sentezlenir. RNA polimeraz II, tek başına gen bölgesini tanıyamaz. Bundan dolayı gen bölgesinin başladığı promotör bölgeden birkaç nükleotid öncesine transkripsiyon faktörleri adı verilen protein ailesi bağlanır. RNA polimeraz II, bu transkripsiyon faktörlerini tanıyarak DNA'ya bağlanır. Böylece Öncül Başlatma Kompleksi (PIC) oluşur ve RNA polimeraz II, gen bölgesini okuyarak 5'>3' yönünde yeni mRNA sentezini başlatır (78,79). Bu süreçte 3' ucuna yeni nükleotidler eklenerek mRNA sentezlenir. RNA polimeraz II, birkaç kb'lık uzamanın ardından defosforile olarak

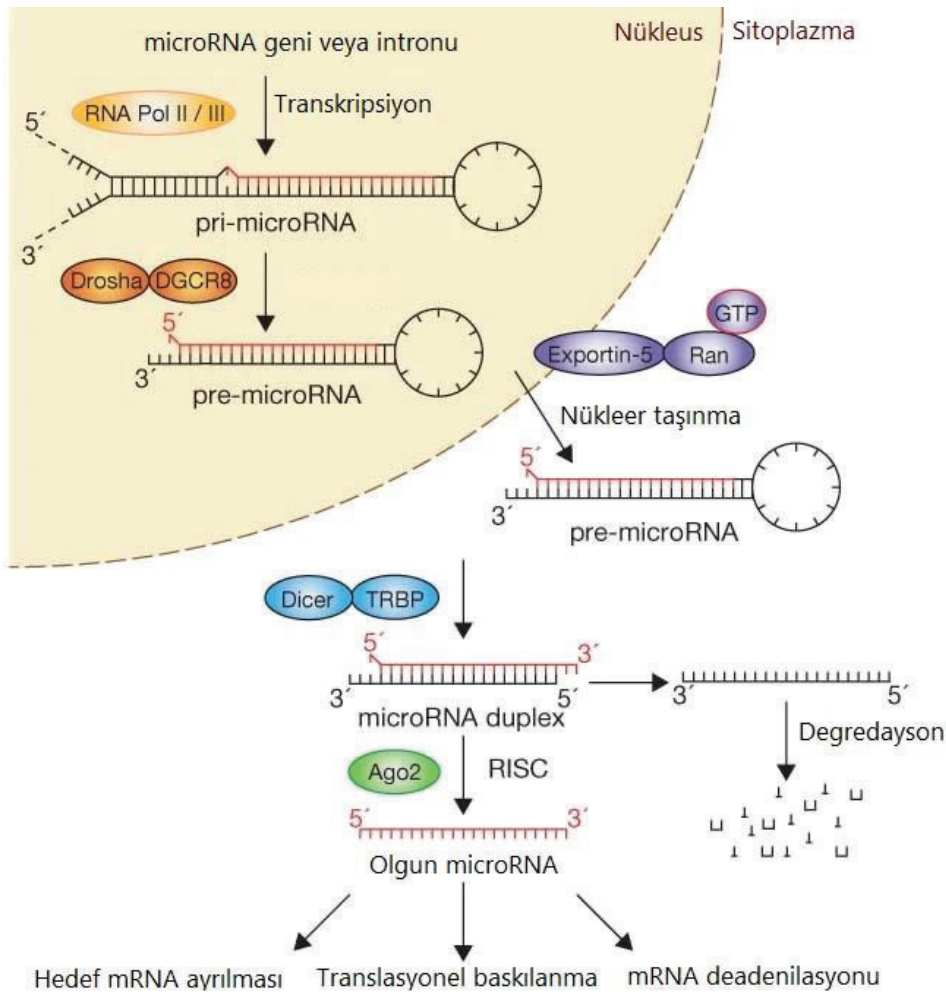
DNA zincirinden ayrılır ve transkripsiyon sonlanmış olur (80). mRNA'lar sentezlendiği andan itibaren olgunlaşmamış pre-mRNA olarak adlandırılır bir takım modifikasyonel süreçten geçerler. 3' ucuna yaklaşık 200 nükleotidlik Adenince zengin bir poli A kuyruğu, Poliadenilat Transferaz enzimleri aracılığıyla eklenir. Poli A kuyruğu, mRNA stabilizasyonu ve nükleustan sitoplazmaya geçiş için önemlidir (81). 5' ucuna, Guanilil Transferaz enzimi ile katalizlenen 5'-CAP adı verilen 7-metil guanozin eklenir. 5'CAP, ribozomun mRNA'yı tanınması, translasyonun başlaması ve mRNA stabilizasyonunu sağlayan moleküldür (82). pre-mRNA sekansının translasyona katılan, start kodonuyla başlayıp stop kodonuyla biten bölgesine Open Reading Frame (ORF) adı verilmektedir. ORF, intron ve ekzon olmak üzere iki farklı bölümden oluşmaktadır. Ekzonlar translasyona katılıp protein sentezi için gerekli bilgiyi içerirken, intronlar bazı Ribo Nükleoproteinlerin (RNP) yardımıyla pre-mRNA dizisinden çıkarılırlar. Böylece 5'CAP-ekzon-poli A kuyruğundan oluşan olgun mRNA ribozoma giderek protein sentezine katılır (83).

#### **2.4.1.2 miRNA**

MicroRNA'lar (miRNA), yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, kodlama yapmayan kısa RNA türüdür. İlk olarak 1990'lı yılların başında Lee ve ekibi tarafından *C. elegans* mRNA'larında keşfedilmiş ve mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak geni susturduğu keşfedilmiştir (84). Post-transkripsiyonel gen regülasyonunda görev alan miRNA'lar, çalışma yapılan bitki ve hayvan model organizmalarda, organ ve doku gelişimi, apoptoz ve büyüme faktörleri kontrolü, metabolizma, embriyonik farklılaşma gibi pek çok biyolojik süreçte görev alırlar (84,85). miRNA'ların hücre içerisindeki serüveni ise daha sonraki yıllarda

keşfedilmiş ve miRNA'nın transkripsiyonundan olgunlaşmasına kadar olan süreç miRNA biyogenezini adı verilmiştir. miRNA, tıpkı diğer RNA'lar gibi DNA'nın belli bir bölgesinden sentezlenir. Bu bölgeler çoğunlukla intergenik bölgeler ve intronlardan oluşur (86). miRNA'lar, mRNA'ların kodlanmasından da sorumlu olan RNA polimeraz II tarafından sentezlenirler. RNA polimeraz II tarafından sentezlenen miRNA, saç tokasına benzeyen ve 'sap ilmik' adı verilen bazı eşleşmelerinin bulunduğu, yaklaşık 1kb uzunluğunda "pri-miRNA" adı verilen öncül moleküldür. Pri-miRNA, transkripsiyonundan sonra tipik mRNA'ya benzer olarak 5' ucunda 7-metilguanozin ve 3' ucunda poli A kuyruğu barındırır. (87). Nükleus içerisinde pri-miRNA'nın RNase III enzim ailesinden olan Drosha tarafından, 3' ve 5' uçlarındaki poli A kuyruğu ile 7-metilguanozin bölgeleri kesilir ve yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA'lara dönüştürülür. Pre-miRNA'lar, sitoplazmaya taşınmak üzere, Ran-GTP bağımlı taşıyıcı protein olan ve çift zincirli RNA'ları taşıyan Exportin 5 ile nükleus porlarından dışarı çıkarılır (88). Sitoplazmadaki çift zincirli pre-miRNA'lar, Dicer enzimi ile saç tokası kısmı kesilerek, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda dupleks miRNA'ya dönüştürülür. Dicer, sitoplazmada RNA interferans ve diğer kodlama yapmayan küçük RNA'ların biyogenezini sağlayan sitoplazmik bir enzimdir (89). Dicer ile kesilmesinden sonra helikaz aktivasyonu ile oluşan iki ayrı RNA ipliğinden biri olgun miRNA'ya dönüşürken diğer iplik elenir. Olgun iplik çoğunlukla daha stabil olan ve Guanince daha zengin iplikten oluşmaktadır (90). Oluşturulan olgun miRNA'nın görevini yapabilmesi için RNA İndüklenmiş Susturma Kompleksi adı verilen, Argonaute proteinleri ve Dicer bulunduran RISC kompleksi ile etkileşir. Böylece aktif miRNA oluşur. RISC kompleksi ile birlikte, mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanarak geni susturur ya da proteine çevrilen kısım olan ORF

bölgesine (Open Reading Frame) bağlanarak mRNA'yı parçalar. RISC kompleksi ile korunması ve daha küçük moleküller olmasından dolayı miRNA'lar, mRNA'lara göre daha dayanıklı ve daha stabil moleküllerdir (91).



Şekil 2: miRNA biyogenez yolağı (92)

#### 2.4.2 Adli bilimlerde RNA ile ilgili yapılan çalışmalar

Adli bilimlerde RNA molekülünün ilk kez post-mortem invortal tespitinde kullanılabileceği öngörülmüş ve ölümden sonra geçen zamanın, nükleik asitlerin sentezinde değişime etkisi olduğuna dair çalışma yapılmıştır (93). RNA moleküllerinin nükleaz enzim aktivitesiyle bozunması ölüm zamanının tespiti için kolaylık sağlamaktadır. Ancak RNA moleküllerinin yavaş bozunması nedeniyle, ölüm zamanı tayininde yaklaşık 3-4 gün sonrasında yapılan çalışmalar anlamlı sonuç verebilmektedir (94,95).

Adli bilimlerde RNA molekülünün bir diğer kullanımı yara yaşı tahminidir. Adli tıpta yara yaşının tahmini, yara oluşum süresi, iyileşme derecesinin bilinmesi ve ante-mortem veya post-mortem olduğunun belirlenmesi oldukça önemlidir. Yara oluşumundan sonra bölgede hücresel ve moleküler düzeyde değişiklikler meydana gelir ve bu süreçte proteinler ve mRNA'ların sentezleri veya konsantrasyonları değişir. Moleküler biyoloji teknolojilerinin gelişmesinden önce çeşitli immüno-histokimyasal boyalar ile kantitatif analizler adli tıpta yaygın olarak kullanılmaktaydı. Gelişen teknolojiyle birlikte ilerleyen RNA analizleri ile günümüzde yara bölgesinde mRNA ekspresyon seviyeleri de ölçülebilir hale gelmiştir (96,97).

Vücut sıvılarının tanımlanması, bir bulgunun DNA analizi aşamasından önce tamamlanması gereken ve örneğin insan kaynaklı biyolojik bir materyal olduğunun belirlenmesine olanak sağlayan, adli bilimler için kritik bir basamaktır. Bulgunun değerlendirilmesi için adli bilimlerde ön tarama ve ardından doğrulama testleri uygulanmaktadır (33). Ön tarama testleri daha ucuz ve uygulanması kolay ancak spesifikliği düşük yöntemler iken doğrulama testleri spesifikliği daha yüksek olmasının yanında çoklu işlemler gerektirebilen testlerdir. Ancak, kullanılan kimyasallar ile delil üzerindeki DNA yapısının bozulabilme ihtimali, çok az örnekler ile çalışılmada DNA

analizi için yeterli ve kaliteli örnek kalmayabileceği ihtimali, bazı testlerde karsinojenik ve toksik maddelerle çalışılması, diğer bileşiklerle çapraz kontaminasyon riski bulunması ve karışım örneklerini ayırmada kısıtlı olması bu testlerin en büyük dezavantajlarından (43). Kullanılan testin özgüllüğünün düşük olması durumunda yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. Bu da delil miktarında önemli ölçüde kayba neden olacaktır. (3). Bu gibi dezavantajların önüne geçebilmesi için bazı yeni nesil moleküler uygulamalar geliştirilmiştir. Vücut sıvılarında RNA analizleri bu yöntemlerden biridir (98,99).

Bazı mRNA moleküllerinin hücreye dolayısıyla dokuya spesifik olarak sentezlendiği bilinmektedir (100). Bu sayede belirli mRNA'ların ekspresyon analizi ile hangi vücut sıvısına ait olduğunu belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Kan için HBB, SPTB, PBGD (101), tükürük için STATH ve HTN3 (98,102), vajinal sekresyon için MMP11 ve HBD1 (103), mensürel kan için MUC4 (103,104) mRNA'larının ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğu ve vücut sıvılarının tanımlanmasında kullanılabileceği belirlenmiştir. Semen için ise, Protamin-1 (PRM1) ve Protamin-2 (PRM2) genleri çalışılmıştır. PRM1 ve PRM2, memeli hücrelerinde 16. kromozom üzerinde bulunan genlerdir. Sperm DNA'sının sıkıca paketlenmesini sağlayan, spermatogenez sürecinde histon proteinlerinin yerine geçen moleküllerdir. Bu genlerde meydana gelecek bir bozukluk sperm morfolojisinde bozulmalara veya azospermiye sebep olmaktadır (105,106). Semen lekelerinde PRM1 ve PRM2 mRNA ekspresyon seviyeleri ölçüldüğünde semen için spesifik olduğu ve semen ile birlikte bulunan karışım örneklerinde semenin bulunduğunu gösteren önemli belirteçlerdir (3,104,107). RNA temelli metotlar içinde en sık çalışılan RNA türü olan mRNA olmakla birlikte daha yeni bir konu olan miRNA bu alanda bazı kolaylıklar sağlamaktadır. miRNA'lar kısa zincir yapıları ve protein kılıfla korunmaları gibi sebeplerden dolayı, degrade olma olasılıkları

daha azdır. Bu da miRNA belirteçlerini özellikle olay yerinin degrade edici koşullarına karşı daha dayanıklı ve adli bilimlerde daha kullanışlı moleküller yapar. miRNA'ların doku spesifik ekspresyon göstermeleri ile birden fazla miRNA belirteci çalışılarak, çok sayıda vücut sıvısının karışım olarak bulunduğu örneklerde, hangi vücut sıvılarının bulunduğu analiz tek seferde yapılabilmektedir. Vücut sıvısı tanımlamada venöz kan, tükürük, semen, vajinal sekresyon, menstürel kan, ter, idrar, anne sütü, amniyotik sıvı gibi pek çok vücut sıvısında farklı miRNA belirteçleri ve ekspresyon seviyeleri ölçülmüş ve uygun olan miRNA belirteçleri bulunmaya çalışılmıştır (108–111). mRNA ve miRNA moleküllerinin yanı sıra, vücut sıvısı tanımlamak için circRNA ve piRNA gibi diğer RNA türleri için de ekspresyon çalışmaları yapılmaktadır (112,113). Bugün RNA analizlerinde en sık RT-PCR metodu kullanılmasıyla birlikte, MicroArray analizleri, Northern Blot, in-situ hibridizasyon metodları da kullanılmaktadır (114,115).

Zubakov ve ekibi 718 insan miRNA'sında yaptığı microarray çalışmasında, semen için dört, menstrual kan ve vajinal sekresyon için iki, venöz kan ve tükürük için ise üç miRNA belirtecinin diğer vücut sıvılarında ayırt edici olarak yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu ve adli amaçlı vücut sıvısı tayinininde kullanabileceğini belirtmişlerdir. (109). Hanson ve ekibinin 2009 yılında yaptığı çalışmada 452 miRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmış venöz kanda, semende, menstrual kanda, tükürükte, vajinal sekresyonda bazı miRNA belirteçlerinin yüksek konstantrasyonda bulunduğu ve bu alanda kullanışlı olabileceği öne sürülmüştür (110). Bu alanda yapılan ilk çalışmalar, semen ve diğer vücut sıvıları için potansiyel miRNA belirteçlerini belirlemiş ve literatürdeki diğer çalışmaların temelini oluşturmuştur.

Literatürde, semen tespiti için miR-10a (109,116–119), miR-10b (99,120,121), miR-135a (116,119,122,123), miR-135b (110,111,124,125), miR-888 (118,123,126–128) ve miR-891a (129–136) olmak üzere 6 miRNA öne çıkmaktadır

### 3. Gereç ve Yöntem

Çalışmaya gönüllülük esası ile katılan 20-35 yaşları arasında 5 erkek birey dahil edildi. Bireyler arası farklılaşmayı minimize etmek için 25-35 yaş aralığındaki gönüllülerden örnek alındı. Semen içeriğini etkilediği bilinen sigara kullanımı gibi etmenler teyit edildi ve sigara kullanmayan bireyler tercih edildi. Bireyler, 72 saatlik cinsel perhizin sonunda mastürbasyon yoluyla plastik kaplara örnek verdi. Analizler İstanbul Ünirversitesi Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Öğrenci Laboratuvarında ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi.

miRNA ekspresyonunun, semen türüne göre farklılık gösterdiği bilinmektedir. Deneyin tutarlı olması için sadece normospermi özellik gösteren örnekler deneye dâhil edildi. Örneklerin normospermi kriterlerine uygun olduğunun belirlenmesi için ışık mikroskopunda sayı, morfoloji ve hareketlilik özellikleri bakımından incelendi ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirlediği kriterlere uyan örnekler seçildi (137). Semen örnekleri deney aşamasına kadar -80°C'de muhafaza edildi. Lekelendirme aşamasında beyaz renkli %100 pamuklu kumaş tercih edildi. Kumaş 5x5 cm ölçütlerinde toplam 20 parça olacak şekilde kesildi. Her bir kumaş parçasına, 200 µL semen damlatıldı. 4 farklı degradasyon koşulu bulunan örnekler Tablo V'te gösterildiği gibi gruplandırıldı ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. 24 saat sonunda örnekler, belirlenen koşullar altında muamele edilmek üzere hazırlandı. Her bir koşul için 5 tekrar olacak şekilde kumaşlar aşağıdaki koşullarda hazırlandı.

- 1- 20-25 ° C lik oda sıcaklığında 20 gün boyunca bekletildi. Bu gruptaki örnekler kontrol grubu olarak değerlendirildi.
- 2- İ.Ü-C Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü bahçesinden standart, hafif nemli toprak alındı. Cam beherlerin içerisinde, 15 cm'lik toprak derinliğinin tam ortasında olacak şekilde yerleştirildi ve 20 gün bekletildi.

3- Büyükçekmece gölünden alınan su 250 mL hacimli cam beherlerin içerisine eklendi, örnekler en dipte olacak şekilde yerleştirildi ve 20 gün bekletildi.

4- Örnekler aynı gün içerisinde, standart ev tipi çamaşır makinesinde 90 °C’de toz deterjan kullanılarak yaklaşık 1 saat yıkandı ve 20 gün boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Kumaş örneklerinden RNA izolasyonları spin-kolon yöntemi ile elde edildi. Kumaşlardan RNA moleküllerin tüp içerisine aktarımı için özel koruyucu solüsyonların içinde santrifüj edildi ve izolasyon bu solüsyon içerisinden gerçekleştirildi. Total RNA izolasyonu sağlandıktan sonra Poliadenilasyon yöntemi ile Reverse-Transkriptaz enzimi kullanılarak cDNA kütüphanesi oluşturuldu. İlgili miRNA bölgeleri, RT-PCR cihazında primerler yardımıyla çoğaltıldı. Ürünlerin çoğalması, reaksiyon karışımında bulunan ve çift zincirli cDNA’ya non-spesifik olarak bağlanan floresans boya ile gerçek zamanlı olarak izlendi. Örneklerden Ct değeri elde edildi ve diğer analizlerde Ct değerlerinden yararlandı.

**Tablo V:** Çalışmada kullanılan örnek grupları

ÇEVRESEL KOŞUL	ÖRNEK KODLARI
Oda sıcaklığında 20 gün bekletme	O1-O2-O3-O4-O5
Toprak altında 20 gün bekletme	T1-T2-T3-T4-T5
Göl suyunda 20 gün bekletme	S1-S2-S3-S4-S5
90 °C’de çamaşır makinesinde yıkama	Y1-Y2-Y3-Y4-Y5

## Kullanılan malzemeler

- Quick-RNA™ MiniPrep Plus Kit - Zymo Research
- ABM miRNA All-In-One cDNA Synthesis Kit
- BlasTaq™ Probe 2X qPCR MasterMix
- Roche LightCycler® 480 Multiwell Plates 96
- RT-PCR cihazı (Roche LightCycler® 480 Instrument II)
- Thermal Cycle cihazı (SimpliAmp™ Thermal Cycler- Applied Biosystems)
- Qubit® 2.0 Fluorometer- Invitrogen
- Santrifüj cihazı
- Vortex karıştırıcı
- -20 °C Buzdolabı
- -80 °C Buzdolabı
- Mikropipet seti
- DDT (Diklorodifeniltri-kloroetan)
- Etil alkol (%100)
- Distile su

### 3.1 RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için Quick-RNA™ MiniPrep Plus Kit içerisinde belirtilen protokoller uygulanmıştır.

- Kumaş örnekleri küçük parçalar halinde kesilip 400 µL DNA/RNA Shield içerisinde yaklaşık 10 dk bekletildi ve 13 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Hücresel kısmın sıvı ortama geçmesi sağlandı.
- Her bir örnek için 15 µL Proteinaz K, 30 µL PK Digestion Buffer ve 10 µL DDT eklenip oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Hücre lizisi gerçekleştirildi.
- İnkübasyondan sonra örnekler vortekslenip kirlilikten arındırmak için 12 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, temiz tübe aktarıldı.
- Süpernatant üzerine 300 µL RNA Liziz Tamponu eklendi.
- Çözelti, tüp içerisinde bulunan SpinAway™ Filter-1 içerisine eklendi ve 12 000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Genomik DNA uzaklaştırıldı.
- Kalan çözelti yeni bir tübe aktarıldı ve 1:1 hacim olacak şekilde %100'lük etanol eklenip vortekslendi.
- Çözelti, Spin™III-CG Column1 tüpüne aktarıldı. 12 000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Süzülen kısım uzaklaştırıldı.
- Filtre içerisine 400 µL RNA Prep Buffer eklendi. 12 000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Süzülen kısım uzaklaştırıldı.
- Filtre içerisine 700 µL RNA Wash Buffer eklendi. 12 000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Süzülen kısım uzaklaştırıldı.
- Filtre yeni bir tübe aktarıldı. 100 µL DNAase/RNAase-Free Water eklendi. 1 dakika inkübe edildi ve 12 000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi ve izole edilmiş RNA çözeltisi, cDNA sentez aşaması için kullanıldı.

### 3.2 cDNA eldesi

cDNA eldesi, Poli-A Polimeraz ve Poli-A kuyruğuna spesifik bağlanan Oligo d(T) primerleri kullanılarak, kit prosedürüne uygun olarak yapıldı.

- Her bir örnek için tüplere 10 µL 2X miRNA cDNA Synthesis SuperMix, 2 µL Enzyme Mix, izole RNA ve toplam hacim 20 µL olacak şekilde distile su eklenerek reaksiyon için hazır hale getirildi.
- Thermal Cycle cihazında 37 °C'de 30 dakika, 50 °C'de 15 dakika, 85 °C'de 5 dakika ve 4 °C'de 1 dakika inkübe edildi ve örnekler buz üstünde soğumaya bırakıldı.

### 3.3 Kantitatif Analiz

Kantitatif analiz (q-PCR) reaksiyon karışımı için 10 µL BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix, 0,5 µL Forward Primer, 0,5 µL Reverse Primer ve 3 µL cDNA olmak üzere toplam hacim 20 µL olacak şekilde distile su eklenerek hazırlandı. Reverse Primer Universal olup her bir reaksiyon için aynı primer kullanıldı. Çalışmada analiz edilecek olan miR-891a ve miR-10a Forward Primer sekansları miRBase veritabanından belirlendi. Hedef miRNA sekansları Tablo VI'da verilmiştir. İstatistiksel analizler için RNU6b referans gen olarak belirlendi ve veriler RNU6b ekspresyon seviyelerine göre hesaplandı.

PCR döngüsü prosedüre uygun olarak 95 °C'de 3 dakika (Enzim aktivasyonu), 95 °C 'de 15 saniye (Denatürasyon), 60 °C'de 1 dakika (Primer bağlanma ve uzama) olacak şekilde 40 döngüde uygulandı.

**Tablo VI:** Hedef miRNA sekans bilgileri

Hedef miRNA	Sekans	miRBase kodu
miR-891a	UGCAACGAACCUGAGCCACUGA	MIMAT0004902
miR-10a	UACCCUGUAGAUC CGAAUUUGUG	MIMAT0000253

### 3.4 İstatistiksel Analizler

qPCR cihazı ile elde edilen Ct değerleri kullanılarak  $\Delta Ct$  [Ct (miRNA) – Ct (RNU6b)] değerleri hesaplandı ve istatistiksel analiz için  $\Delta Ct$  verileri kullanıldı. Analizler IBM SPSS Statistics 22 programıyla yapıldı. Kullanılacak testler için örneklerin normal dağılıma uyduğu Shapiro–Wilk testi ile p değerleri ve Skewness- Kurtosis değerleri kullanılarak belirlendi ( $p > 0,05$ ). Ct değeri 35 ve üstü olan örnekler istatistiksel analizlere dahil edilmedi. miRNA  $\Delta Ct$  değerleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığı One-way ANOVA ve Post-hoc Tukey testi ile değerlendirildi. Yıkama grubu örneklerinde miRNA eldesi yapılamadığından bu gruptaki örnekler testte kullanılmadı.

#### 4. Bulgular

Gönüllülük esasına dayalı olarak 5 erkek bireyden semen örneği alındı. Çalışmaya katılanların yaş ortalaması  $30,2\pm 3,49$  olarak hesaplandı. Örneklerin normospermi özellik gösterdiğinin bilinmesi için ışık mikroskopunda sperm morfoloji, sayı ve hareketliliğine dayanan spermogram uygulandı. Spermogram sonuçları Tablo VII'de verilmiştir.

**Tablo VII:** Spermogram sonuçları

Örnek Numarası	Sperm sayısı/mL	Hareketli sperm oranı
1	$55\times 10^6$	%40
2	$25\times 10^6$	%45
3	$120\times 10^6$	%40
4	$65\times 10^6$	%40
5	$55\times 10^6$	%40

##### 4.1 Ct ve $\Delta$ Ct bulguları

Kumaş örneklerinden RNU6b, miR-10a ve miR-891a konsantrasyon analizi için RT-qPCR uygulandı ve her bir RNA için Ct değeri elde edildi. Ct değerleri Tablo VIII'de verilmiştir.

**Tablo VIII:** Örneklerin Ct değerleri ve grupların ortalama Ct değerleri

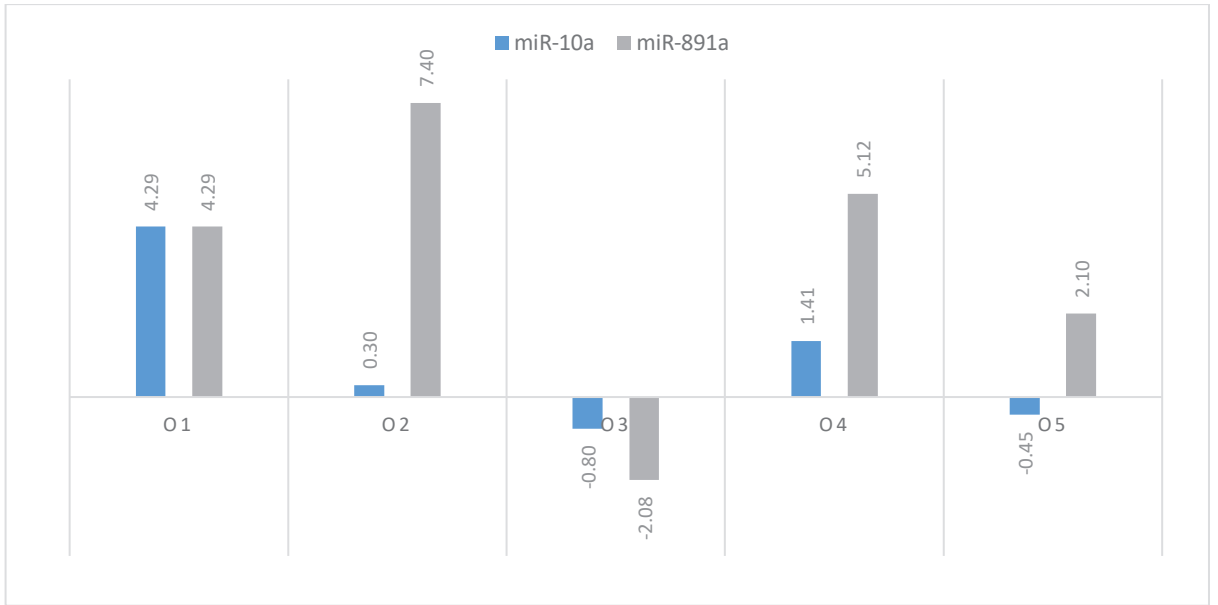
ÖRNEK	RNU6b Ct değerleri	RNU6b Ortalama Ct değeri	miR-10a Ct değerleri	miR-10a Ortalama Ct değeri	miR-891a Ct değerleri	miR-891a Ortalama Ct değeri
O1	30,71	<b>31,84</b>	35,00	<b>32,79</b>	35,00	<b>35,21</b>
O2	30,83		31,13		38,23	
O3	37,08		36,28		40,00	
O4	28,59		30,00		33,71	
O5	32,00		31,55		34,10	
S1	32,46	<b>32,54</b>	35,00	<b>33,20</b>	35,00	<b>35,17</b>
S2	29,43		29,19		35,48	
S3	36,90		35,03		36,83	
S4	30,69		33,75		34,15	
S5	33,24		33,04		34,40	
T1	31,92	<b>32,75</b>	35,00	<b>32,90</b>	35,00	<b>34,70</b>
T2	28,44		29,99		33,84	
T3	39,17		36,28		37,06	
T4	32,09		31,00		33,90	
T5	32,11		32,80		33,72	
Y1	35,00	<b>36,58</b>	35,00	<b>35,90</b>	35,00	<b>36,58</b>
Y2	37,06		38,87		37,91	
Y3	40,00		36,42		40,00	
Y4	35,00		35,00		35,00	
Y5	34,77		34,23		35,00	

**Tablo IX:** Örneklerin miR-10a'ya göre  $\Delta C_t$  değerleri

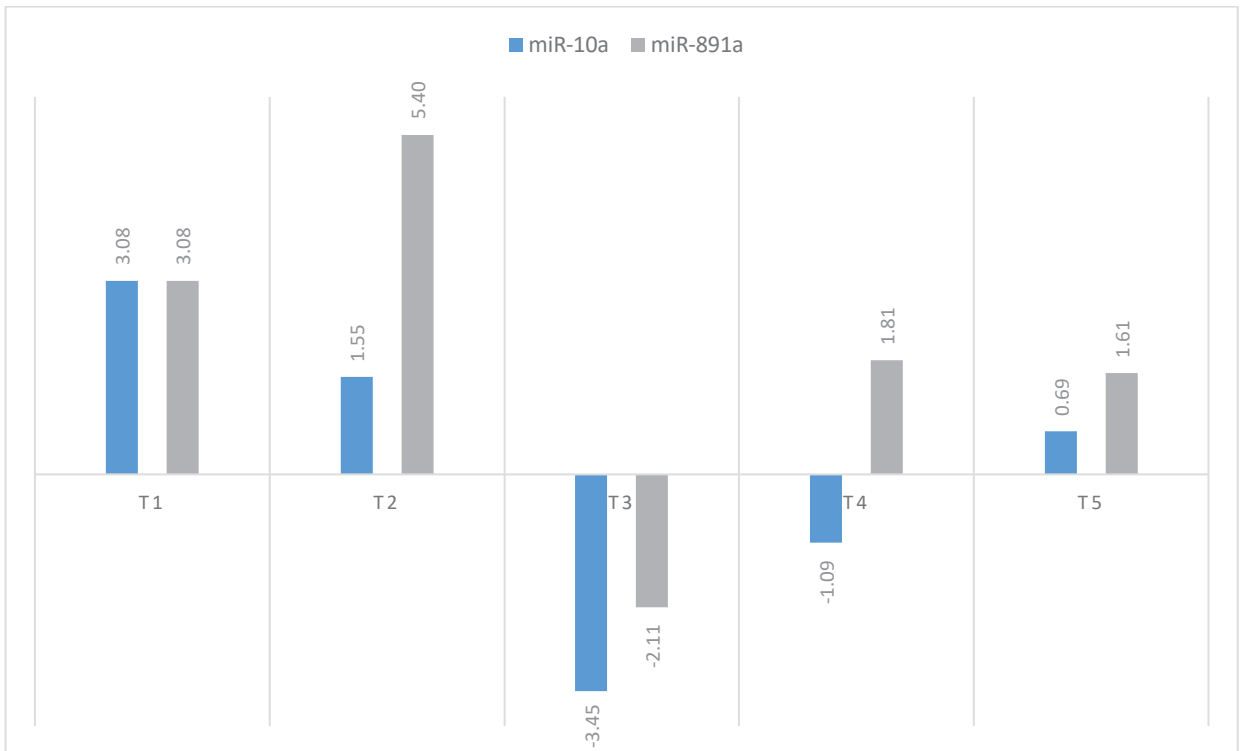
<b>O</b>	O1	4,29	0,95
	O2	0,30	
	O3	-0,80	
	O4	1,41	
	O5	-0,45	
<b>S</b>	S1	2,54	0,66
	S2	-0,24	
	S3	-1,87	
	S4	2,11	
	S5	-0,20	
<b>T</b>	T1	3,08	0,16
	T2	1,55	
	T3	-2,89	
	T4	-1,09	
	T5	0,69	
<b>Y</b>	Y1	0	-0,46
	Y2	1,81	
	Y3	-3,58	
	Y4	0	
	Y5	-0,54	

**Tablo X:** Örneklerin miR-891a'ya göre  $\Delta Ct$  değerleri

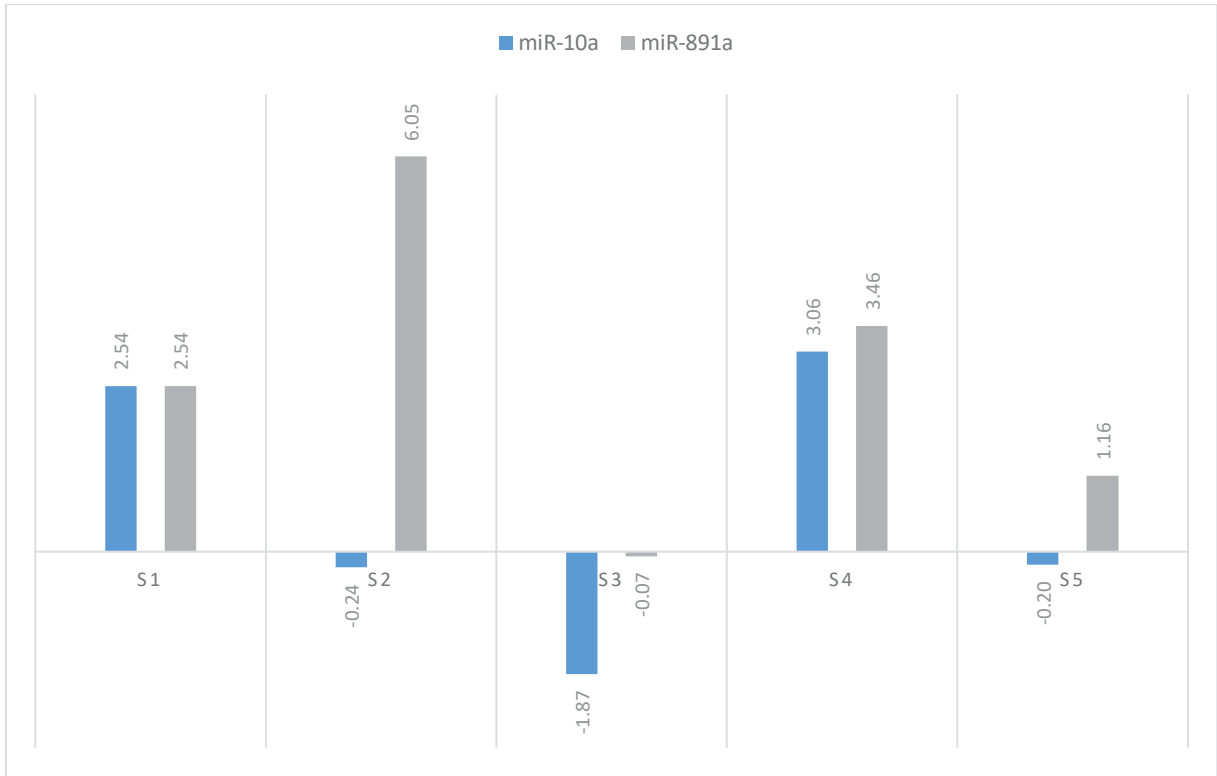
ÖRNEK GRUBU	ÖRNEK KODU	$\Delta Ct$ (Ct miR-891a – Ct RNU6b)	ORTALAMA $\Delta Ct$
<b>O</b>	O1	4,29	3,37
	O2	7,40	
	O3	-2,08	
	O4	5,12	
	O5	2,10	
<b>S</b>	S1	2,54	2,63
	S2	6,05	
	S3	-0,07	
	S4	3,46	
	S5	1,16	
<b>T</b>	T1	3,08	1,96
	T2	5,40	
	T3	-2,11	
	T4	1,81	
	T5	1,61	
<b>Y</b>	Y1	0	0,22
	Y2	0,85	
	Y3	0	
	Y4	0	
	Y5	0,23	



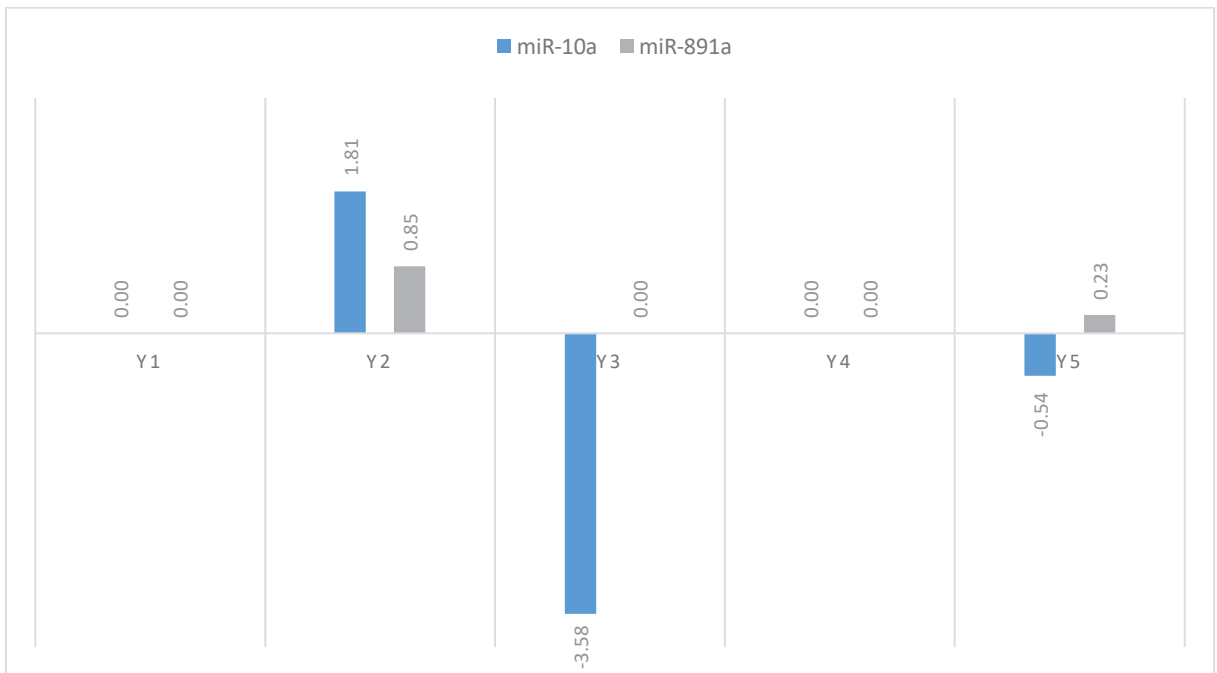
Şekil 3: O grubu örneklerinde  $\Delta C_t$  değerlerinin sütun grafiğinde gösterimi



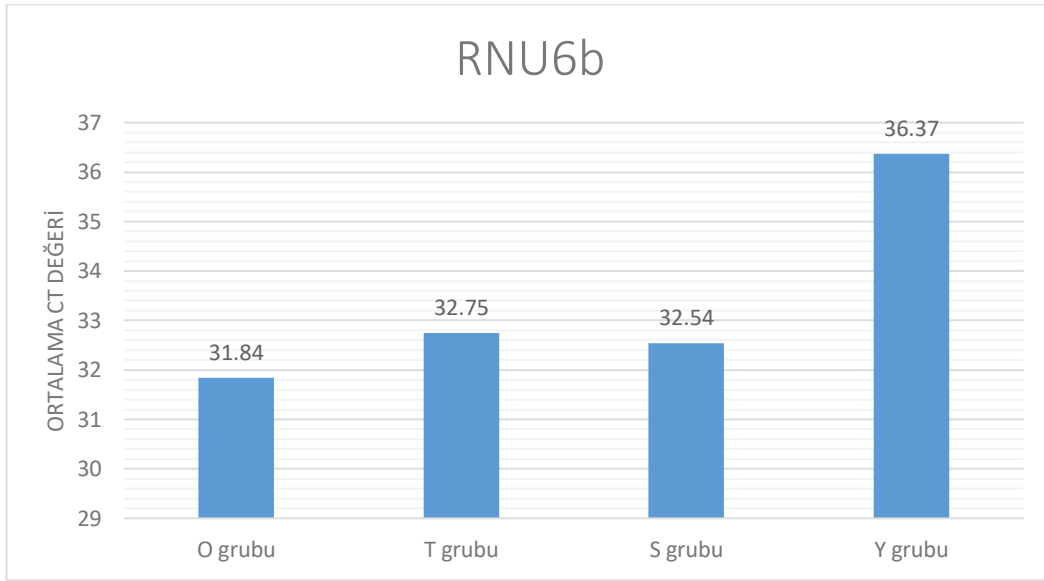
Şekil 4: T grubu örneklerinde  $\Delta C_t$  değerlerinin sütun grafiğinde gösterimi



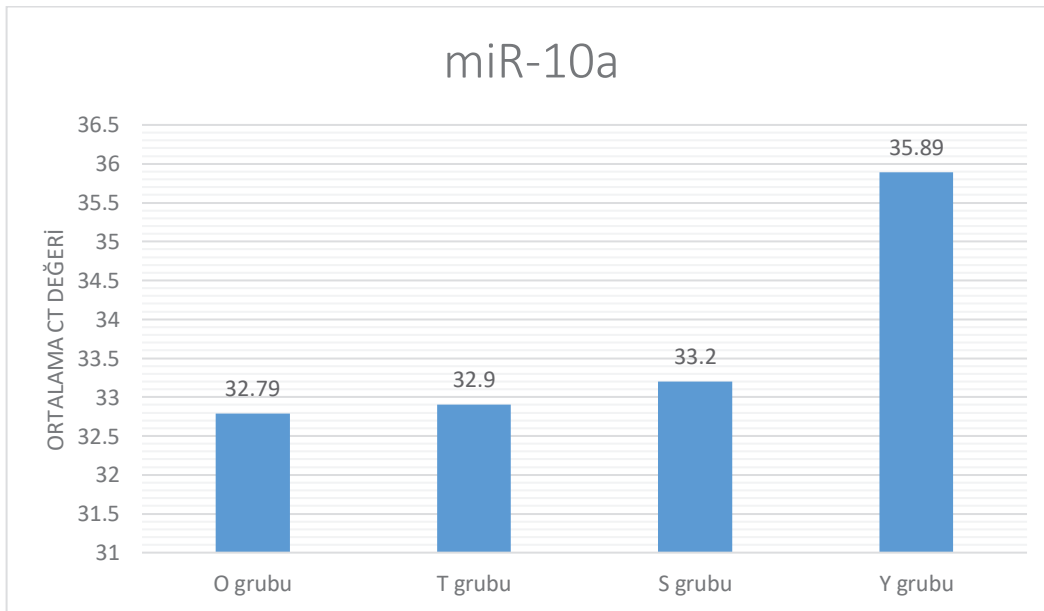
Şekil 5: S grubu örneklerinde  $\Delta C_t$  değerlerinin sütun grafiğinde gösterimi



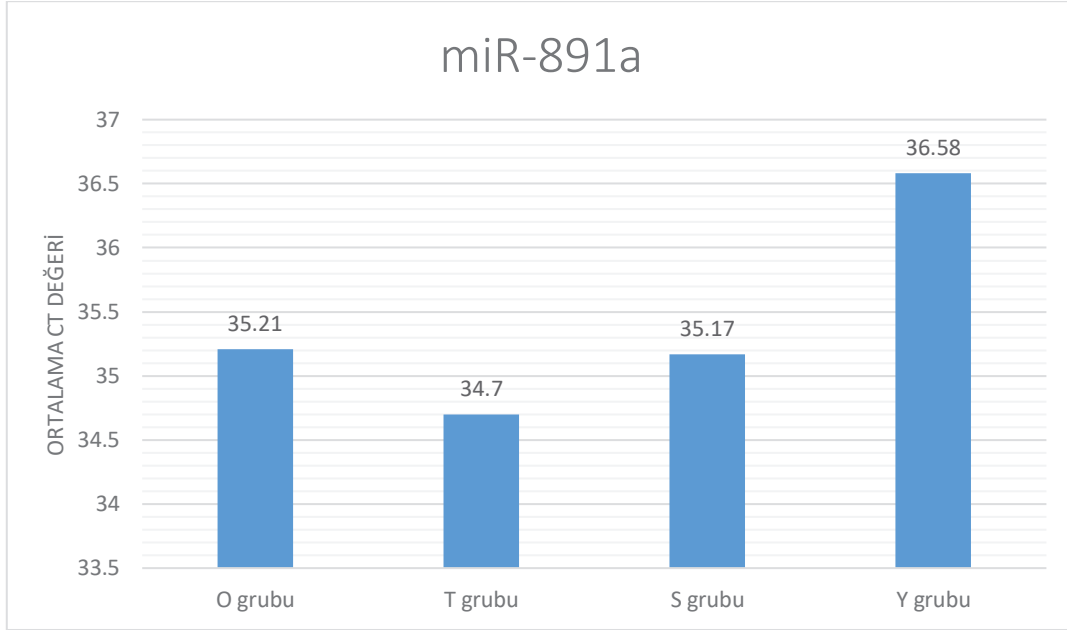
Şekil 6: Y grubu örneklerinde  $\Delta C_t$  değerlerinin sütun grafiğinde gösterimi



**Şekil 7:** RNU6b ortalama Ct değerlerinin koşullara göre grafik üzerinde gösterimi



**Şekil 8:** miR-10a ortalama Ct değerlerinin koşullara göre grafik üzerinde gösterimi



**Şekil 9:** miR-891a ortalama Ct değerlerinin koşullara göre grafik üzerinde gösterimi

#### 4.1 İstatistiksel bulgular

İstatistiksel analizlerde, her bir miRNA için koşullar arasındaki fark One-way ANOVA testi ile değerlendirildi. One-way ANOVA testi sonuçları Tablo XI’da gösterilmiştir.

**Tablo XI:** One-way ANOVA testi sonuçları

MiRNA belirteci	Karşılaştırılan koşullar	P değeri
miR-10a	O grubu-T grubu	0,971
	O grubu-S grubu	0,729
	T grubu-S grubu	0,733
miR-891a	O grubu-T grubu	0,381
	O grubu-S grubu	0,562
	T grubu-S grubu	0,759

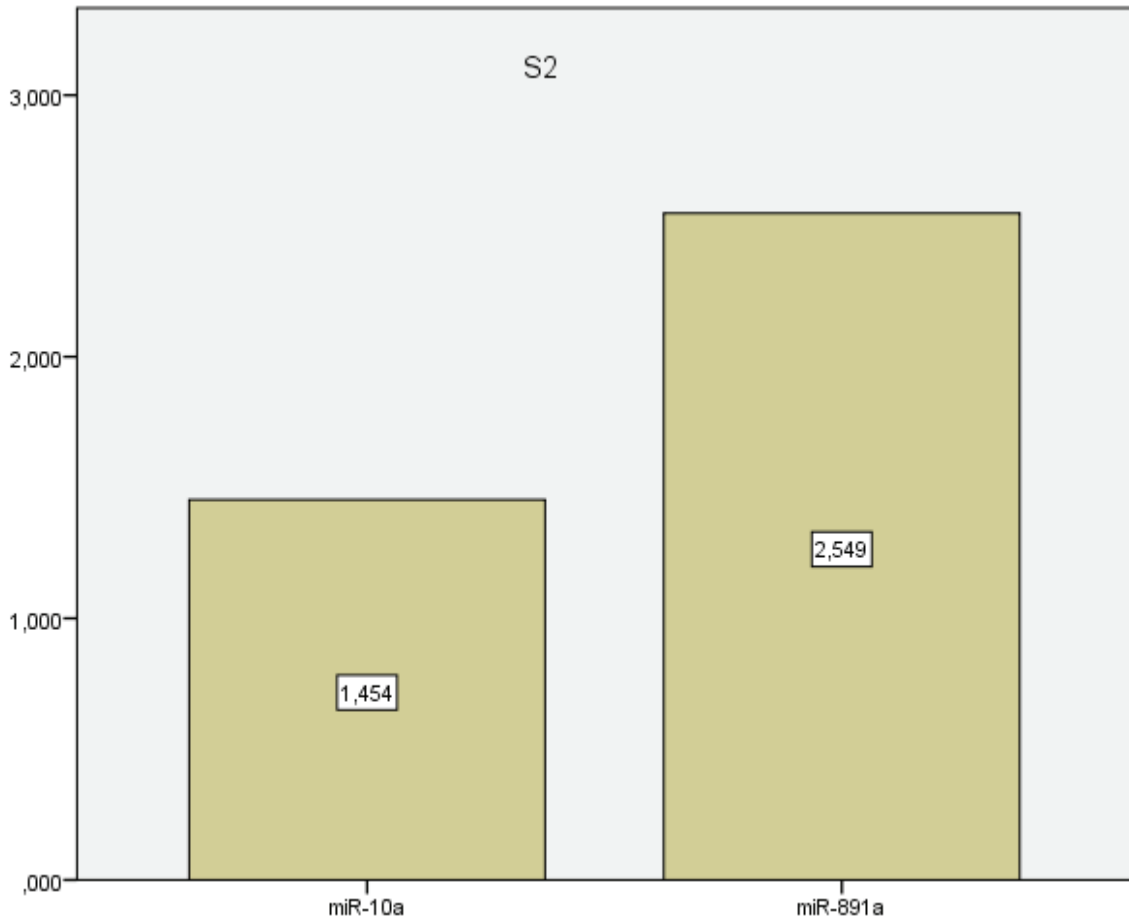
One-way ANOVA- Post hoc Tukey testleri sonucunda, p değerlerinin 0,05’ten büyük olması sebebiyle, çevresel koşulların miRNA stabiliteyi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı yorumlanır.

#### 4.2 Kat değişimi (Fold Change) bulguları

Birden fazla koşulun bulunduğu çalışmalarda, miRNA ekspresyonunu görmemiz için, Ct ve  $\Delta Ct$  verileri yetersiz kalmaktadır. Kat değişimi, iki farklı ölçek arasında miRNA ekspresyon değişimlerini sayısal olarak görmemizi sağlayan yöntemdir ve  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formülü ile hesaplanır.

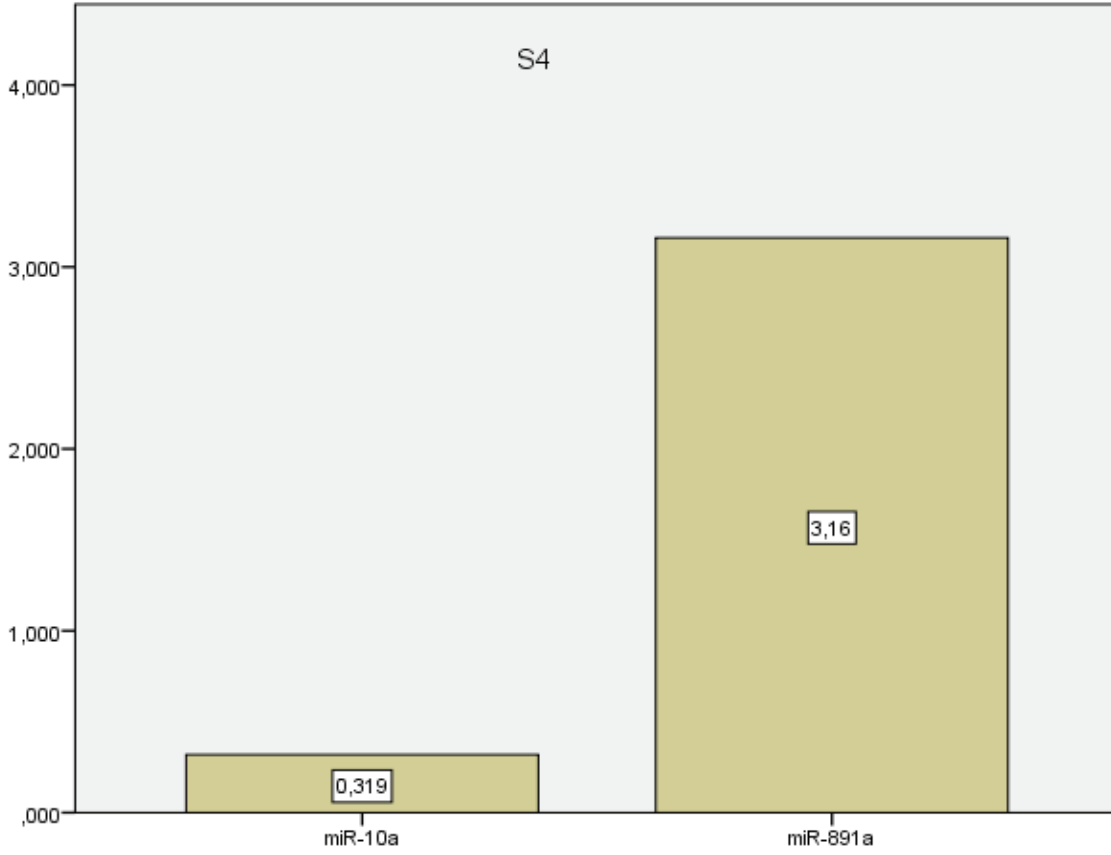
Çalışmamızda örneklerin normalizasyonu ve istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde etmek için, Ct değeri 35 ve üzerinde olan örnekler için kat değişimi yöntemi uygulanmamıştır. Y grubu örneklerinde miRNA eldesi yapılamadığından dolayı karşılaştırmalara dahil edilmemiştir. S ve T grubu örneklerinde miRNA kat değişimi karşılaştırmaları, O grubu referans alınarak yapılmıştır.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{(\text{deney grubu})} - \Delta CT_{(\text{kontrol grubu})}$$



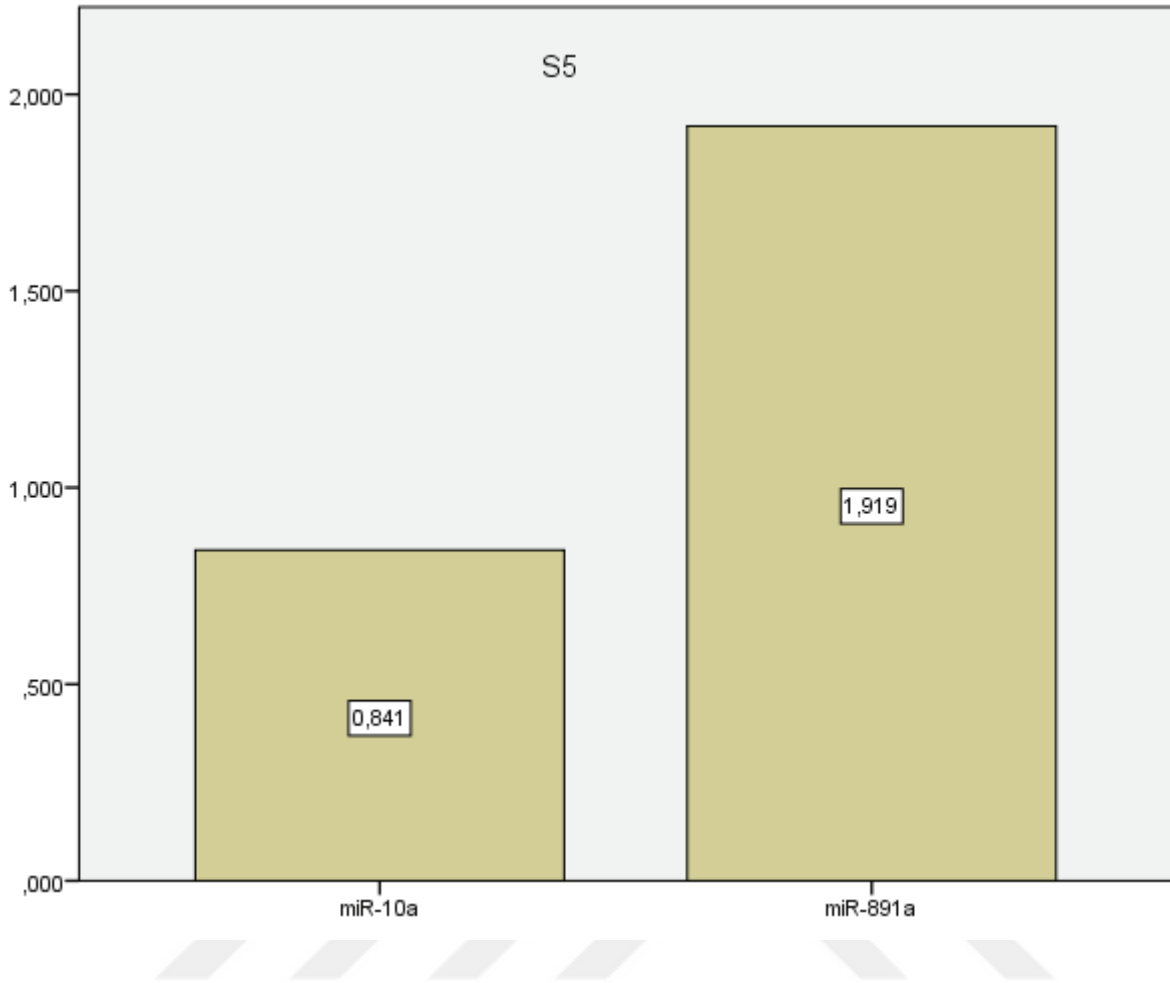
**Şekil 10:** S2 numaralı örnekte kat değişimi

S2 numaralı örnekte, hedef miRNA'ların kat değişimleri incelendiğinde miR-891a'nın, miR-10a'ya göre yaklaşık 1,75 kat daha fazla eksprese olduğu görülmektedir. Bu verilerin 1,00' den büyük olması ise bu gruptaki miRNA'ların, kontrol grubuna oranla daha yüksek bir ekspresyonu olduğunu göstermektedir.



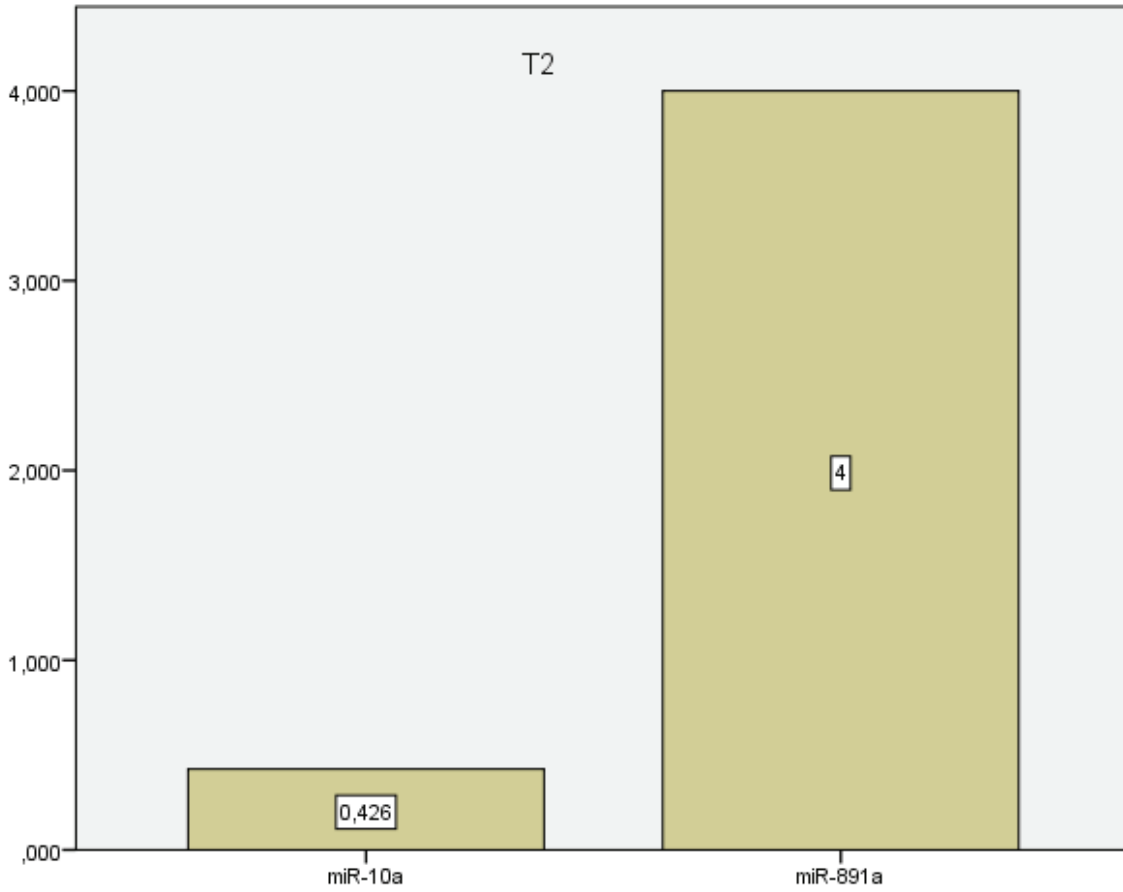
**Şekil 11:** S4 numaralı örnekte kat değişimi

S4 numaralı örnekteki miRNA kat değişimleri incelendiğinde miR-891a'nın, kontrol grubuna göre yaklaşık 3,16 kat daha fazla eksprese olduğu, miR-10a'nın ise yaklaşık 3,13 kat daha az eksprese olduğu görülmektedir.



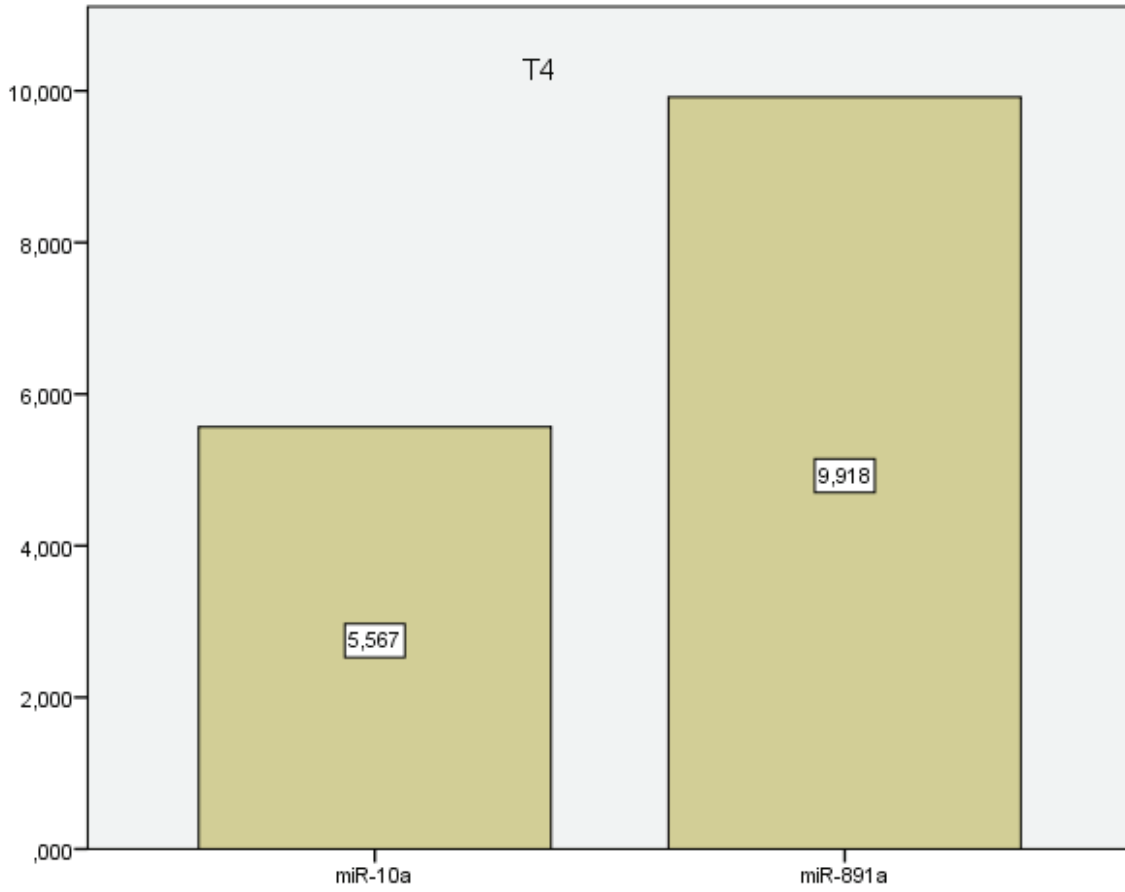
**Şekil 12:** S5 numaralı örnekte kat değişimi

S5 numaralı örnekte, tıpkı diğer su altında bekleyen örneklerdeki gibi miR-891a'nın artmış ekspresyonu görülmektedir. miR-10a ise, kontrol grubuna göre yaklaşık 1,19 kat daha az eksprese olmuştur.



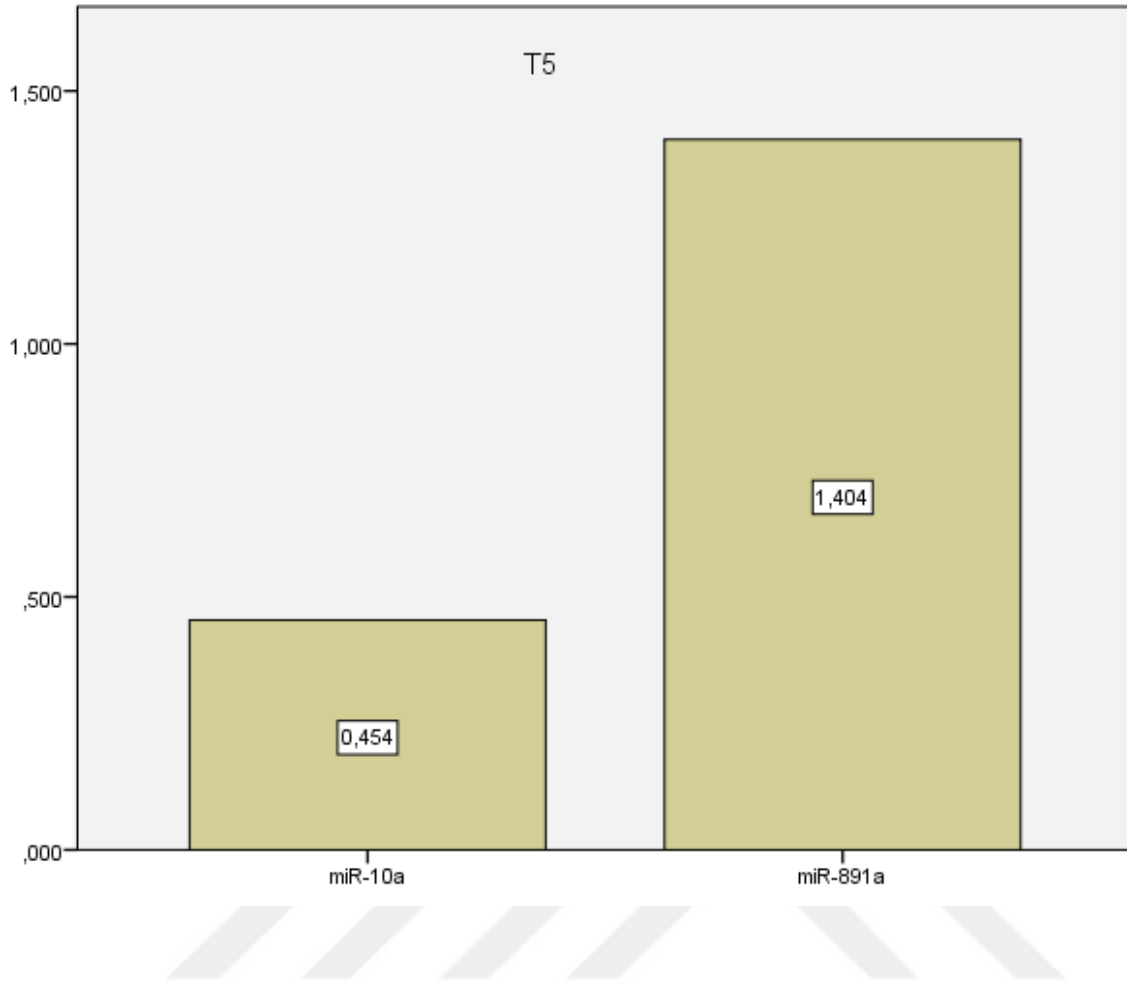
**Şekil 13:** T2 numaralı örnekte kat değişimi

T2 numaralı örnekte, miR-891a'nın miR-10a'ya göre yaklaşık 9,4 kat artmış ekspresyonu görülmektedir. miR-10a, kontrol grubuna göre yaklaşık 2,4 kat daha az eksprese olmuştur.



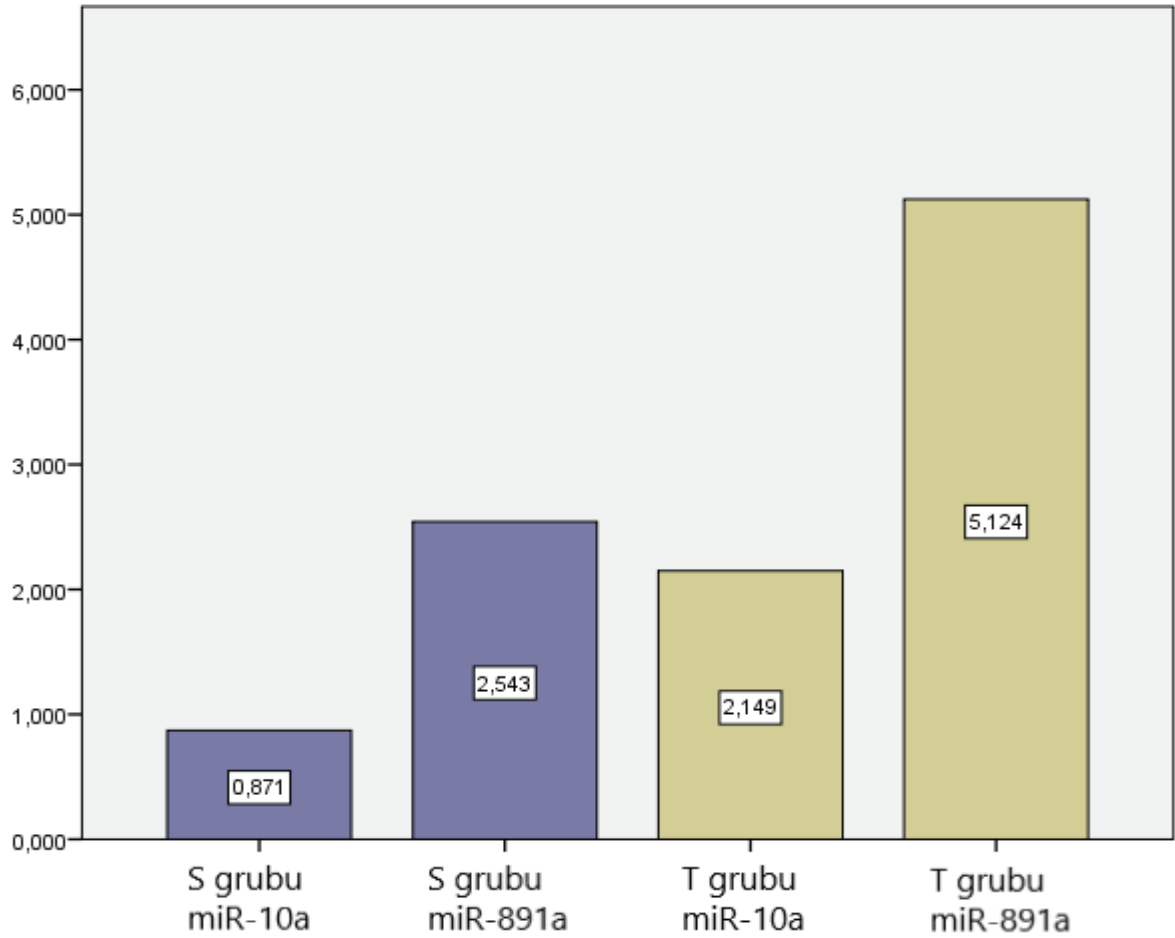
**Şekil 14:** T4 numaralı örnekte kat değişimi

Tüm örnekler içerisinde, hedef miRNA'ların en yüksek oranda artan ekspresyonunun görüldüğü örnek T4'tür. Kontrol grubuna göre miR-10a yaklaşık 5,6 kat, miR-891a ise yaklaşık 9,9 kat artış göstermiştir.



**Şekil 15:** T5 numaralı örnekte kat değişimi

Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, miR-891a'nın 1,404 katlık artmış ekspresyonu, miR-10a'nın ise 2,02 katlık azalmış ekspresyonu görülmektedir.



**Şekil 16:** Gruplar üzerinde kat değişimleri ortalamalarının grafik üzerinde gösterimi

Kat değişimi verileri kullanılarak çevresel koşulların miRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin daha iyi görülebilmesi için örneklerin ortalamaları alınmıştır. Bu grafiğe göre çevresel koşullarda miR-891a'nın, miR-10a'ya göre daha dayanıklı olduğunu söylemek mümkündür.

## 5. Tartışma

Adli bilimler içerisinde biyolojik örnekler, kişiye spesifik olan DNA'yı barındırması nedeniyle oldukça kıymetli olan deliller sınıfındadır. Biyolojik örneklerden DNA'nın delil olarak kullanılabilmesi için ise delil-teslim zincirinin oldukça dikkatli bir şekilde korunması gerekmektedir. Bu noktada delillerin toplanması, muhafaza edilmesi ve analiz edilecek laboratuvara gönderilmesinde, mutlaka bu alanda uzman kişilerin görev yapması gerekmektedir. Biyolojik delillerden DNA analizi yapılmadan önce, delillerin sınıflandırılması ve insan kaynaklı biyolojik olduğunun kesinleştirilmesi gerekmektedir. Bu analizler için adli biyolojide geliştirilmiş bazı testler bulunmaktadır. Cinsel suçların aydınlatılmasında oldukça önemli bir yere sahip olan semen için kullanılan testlerin mantığı, semen içerisinde asit fosfataz, fosforilkolin, spermin, prostat spesifik antijen (PSA) ve sperm hücreleri gibi diğer vücut sıvılarından ayırt edici oranda yüksek bulunan maddeleri saptamaya yöneliktir. Ancak adli biyolojide kullanılan bu testler bazı dezavantajlara sahiptir. Çok az veya degrade örneklerde testlerin uygulanması ve doğru sonuçlara ulaşılması zorlaşmaktadır. Testler yeterince özgül değilse yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir. Ayrıca bu alanda menstrual kan, vajinal sekresyon, ter gibi vücut sıvıları için geliştirilmiş bir test bulunmamaktadır. Gelişen teknolojiyle birlikte vücut sıvılarının tayini için alternatif bir yol bulunmaya çalışılmış ve dokuya özgü özellik gösteren ve DNA ile birlikte eş zamanlı olarak izole edilebilen RNA molekülünün kullanışlı olabileceği öngörülmüştür. Vücut sıvılarının tayini için ilk çalışılan mRNA olmuştur. Kan, semen, idrar, tükürük, vajinal sekresyon gibi pek çok vücut sıvısında çalışmalar yapılmış ve aday mRNA belirteçleri belirlenmiştir. Ancak mRNA, uzun zincirli olmasından dolayı çevresel koşullara fazla dayanamayan bir moleküldür. miRNA'lar ise protein kılıfla korunduğu ve mRNA'lardan daha küçük moleküller olduğu için, degrade edici koşullara ve yıkıcı nükleaz enzim aktivitesine karşı daha dayanıklı moleküllerdir (138). Yapılan mRNA/miRNA stabilite çalışmaları da bunu kanıtlar niteliktedir. Mayes ve ekibinin yaptığı

çalışmada, çevresel koşulların semen mRNA'sı (PRM1) ve miRNA'sı (miR-891a) üzerindeki etkileri ölçülmüş, özellikle aşırı sıcak ve neme karşı miR-891a'nın, PRM1'e göre daha dayanıklı olduğu gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada kumaş üzerindeki semen lekelerinden, çeşitli yıkama koşullarından sonra mRNA/miRNA konsantrasyon analizi yapılmış ve tüm yıkama koşullarında miR-891a, PRM1'e göre daha yüksek konsantrasyonda bulunmuştur (134). Bamberg ve ekibinin 2022 yılında yaptığı çalışmada vücut sıvılarında ve seyreltilmiş örneklerde, semen mRNA/miRNA ekspresyon analizi yapılmış, seyreltilmiş örneklerde semen mRNA'ları daha iyi sonuç verse de, degrade örneklerde miRNA'lar çok daha başarılı moleküller olarak bildirilmiştir (136). Yine benzer bir çalışmada semen mRNA'sının (PRM1), miRNA'ya (miR-135b) göre, seyreltme koşullarında daha iyi sonuç verdiği ancak degrade örneklerde miRNA belirteçlerinin daha başarılı olduğu belirlenmiştir (139). Bir vücut sıvısı tanımlamada bir belirtecin ideal bir örnek olması için, çeşitli çevresel koşullarda ne kadar stabil olduğuna dair çalışmalar yapılmalı ve veri tabanı oluşturulmalıdır. Tong ve ekibinin yaptığı çalışmada 1 yıllık bekleyen semen örneklerinde, miRNA'ların %80 oranında başarılı oldukları ve düşük total RNA miktarından (0,01 ng) dahi sonuç verdiği gözlenmiştir (120). Semen örneklerinin farklı bekleme koşulu ve süresi üzerine yapılan çalışmada Lancia ve ekibi, semen miRNA'ları üzerindeki degradasyon etkenlerinin, geçirilen süreden çok, örneklerin bulunduğu ortamla ilgili olduğunu ifade etmişler, miR-10a ve miR-891a'nın hem eskimiş örneklerde hem de karışım örneklerinde semeni ayırt edici nitelikte olduğunu ifade etmişlerdir (119). Degrade ve eser miktardaki örneklerle yapılan diğer çalışmaların (116,131,134,139–141) ortak özelliği, semen miRNA'larının zorlu ortam koşullarında dahi tespit edilebildiği ve adli bilimlerde bu konuda yardımcı olabilecek potansiyele sahip olmasını göstermesidir. Çalışmamızda kullanılan miR-10a ve miR-891a belirteçleri literatür taraması sonucu belirlenmiştir. miR-10a'nın semende yüksek oranda bulunduğu ve semen tespitinde iyi bir belirteç olduğu yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (109,116,119,123,142,143). miR-891a'nın ise semen tespiti

için en ideal belirteç olduğu, diğer vücut sıvılarına göre çok daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu literatürdeki pek çok çalışmada onaylanmıştır (127–130,133,143–147). Adli bilimlerde semen tespitinde karşılaşılabilecek bir diğer sorun ise azospermi, oligospermi gibi çeşitli semen türlerinin olması ve sağlıklı semen örneklerinde alınan sonucun alınamamasıdır. Azospermi, ejakülat içerisinde sperm hücresi bulunmayan ve erkeklerde infertiliteye sebep olan bir sağlık sorunudur. Oligospermi ise 1 mL içerisinde 5 milyon veya daha az sperm hücresi bulduran semen örneklerine verilen isimdir (148). Böyle durumlarda seçilecek ideal semen belirtecinin bu koşullarda da sonuç vermesi gerekmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar kısıtlı olsa da miR-10a/miR-891a (118,120), miR-10b/miR-135b (134), miR-888/miR-891a (119,120) kombinasyonlarının bu açıdan kullanışlı olduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda olay yeri koşulları taklit edilerek oluşturulan dört farklı senaryoda, semen örnekleri beyaz renkli %100 pamuklu kumaşa emdirilmiştir. Semen miRNA'larının maksimum kalitede izolasyonunun gerçekleşmesi için boya ve katkı maddesi gibi PCR inhibitörü olan maddelerin en az olduğu kumaş türü tercih edilmiştir. Farklı kumaş çeşitlerinin, izole edilen RNA miktarını ve kalitesini etkilediği çalışmalarda belirtilmiştir (119,149,150). RNA izolasyonu için spin-kolon temelli kit kullanılmış ve kitte belirtilen adımlar izlenmiştir. Kumaştan izolasyon için DNA/RNA Shield solüsyonu içerisinde inkübasyon süresi uzatılmıştır. Örneklerin izolasyondan sonra RNA miktarı ve kalitesinin düşük olduğu görülmüş olup hücre lizisini arttırmak için 10 µL DDT eklendikten sonra inkübe edilmiştir. DDT ile inkübe edilen örneklerin RNA miktar ve saflığında önemli ölçüde artış görülmesi üzerine diğer örneklere de aynı işlem uygulanmıştır. Elde edilen Ct değerleri sonucunda, 35 ve üstü Ct değerine sahip RNA'ların ekspresyonunun yapılmadığı yorumlanmıştır (127).

Oda sıcaklığında bekleyen (O grubu) kumaş örnekleri, ortalama Ct değerleri göz önüne alındığında en az degrade olan grup olarak değerlendirilebilir. Referans bölge (RNU6b) hedef miRNA'lara göre daha iyi korunmuştur. O grubu içinde miR-891a Ct değerlerinin

ortalamasının, miR-10a'ya göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Lancia ve ekibinin yaptığı çalışmada, farklı kumaş türleri üzerinde ve farklı zaman aralığında kurutulan semen örnekleri incelendiğinde, 25 yılı aşkın örneklerde dahi miR-10a ve miR-891a tespit edilebilmiştir. Bazı örneklerde miRNA'lar tespit edilemese de ( $Ct > 35$ ), çalışmanın genelinde miR-891a'nın, miR-10a'ya göre stabilitesinin daha fazla olduğu ve semen belirteci olarak daha kullanışlı olduğu görülmüştür. Araştırmacılar degradasyona asıl sebebin, geçirilen süreden çok örneklerin bulunduğu koşul olduğunu belirtmişlerdir (119). Mayes ve ekibinin yaptığı çalışmada pamuklu bezlerde kurutulan semen örneklerinde miR-891a belirtecinin karanlık ve kuru ortamda 180 güne kadar tespit edilebildiğini, açık havada nemli ortamda bekleyen örneklerde ise bu sürenin 60 güne kadar düştüğünü belirtmişlerdir (134). Tong ve ekibi yaptığı çalışmada, oda sıcaklığında bekleyen semen miRNA'larının 1 yıla kadar stabilitesini koruyabildiğini göstermiştir (120). Bekleme koşullarının genetik materyal üzerinde yaptığı degradasyonu ölçen çalışmalar bize sıcak, nemli ve ışık alan ortamın, genetik materyal üzerinde daha yüksek oranda yıkıcı etkisi olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda O grubu örnekleri, oda sıcaklığında, hava akışı sağlanan, karanlık bir ortamda 20 gün bekletilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında miRNA stabilitesinin beklenenden daha az olduğu görülmektedir.

Göl suyu içerisinde (S grubu) ve toprak altında (T grubu) bekleyen örneklerde, Ct değerleri sonuçlarına göre miR-10a'nın ortalamasının miR-891a'ya göre daha düşük olduğu ancak kat değişimi prensibi uygulandığında miR-891a'nın bu koşullar içerisinde daha avantajlı olduğu görülmektedir. Göl suyu ve toprak, nükleik asitlerin yapısını bozacak olan çok sayıda mikroorganizma ve nükleaz içermektedir. Ancak çalışma grubumuzdaki sonuçlarda bu degradasyonun beklenenden daha az olduğu görülmüştür. Su altında bekleyen örneklerde nükleik asitlerin degradasyon hızı, suyun sıcaklığına, mikroorganizma yoğunluğuna, pH seviyesine, suyun tuzluluk oranına ve suyun durgunluğuna göre değişmektedir. Borde ve ekibinin yaptığı çalışmaya göre, farklı su altı koşullarında kan ve semen lekeleri üzerinden STR

profilleri karşılaştırılmıştır. Tuzlu suda semen lekelerinde 7 güne kadar, tatlı suda ise 12 haftaya kadar STR profili elde edilebilmiştir (151).

Çamaşır makinesinde 90 °C’de yıkanan (Y grubu) örneklerde hem hedef miRNA’ların hem de referans genin Ct değerlerinin 35’ten büyük olduğu, dolayısıyla hedef miRNA’ların elde edilemediği görülmektedir. Yıkama işleminde Sodyum Lauril Sülfat etken maddeli ağartıcı içermeyen toz deterjan kullanılmıştır. Biyolojik örneklerdeki genetik materyal, yüksek sıcaklıktaki su ve deterjan gibi faktörlerden dolayı yüksek oranda degrade olmaktadır. Mayes ve ekibi yaptığı çalışmada yıkanan örneklerde, semen lekesi üzerinde miR-891a belirtecini gözlemleyebilmişlerdir. Ancak yıkama esnasında sıcaklığın artmasıyla, miRNA konsantrasyonunda önemli bir azalış gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir (134). Yıkanan kumaş örneklerinde yapılan diğer çalışmalarda (152–155), 60 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda yapılan yıkamanın, genetik materyal üzerinde oldukça yıkıcı etkisi olduğunu ve bir delil olarak vücut sıvılarının özelliklerini kaybettiklerini belirtmişlerdir.

miR-891a, adli bilimlerde vücut sıvısı tanımlama çalışmalarının birçoğunda semene özgü ekspresyon ile ilişkilendirilmiş ve semen tespiti için en ideal miRNA belirteci olduğu belirtilmiştir. Adli biyoloji çalışmalarında, daha az konstantrasyonlarda vajinal sekresyon içerisinde de ekspresyonunun olduğu tespit edilmiştir (119,136,156). miR-891a, 7 miRNA ile birlikte (miR-888, miR-890, miR-892c, miR-892a, miR-892b, miR-891a, miR-891b), miR-888 ailesinin üyesidir ve bu grupta yer alan miRNA’ların epididimis kökenli olduğu bilinmektedir. Bu gruptaki miRNA’lar, erkek üreme sisteminde prostat ve testis kanseri, infertilite gibi pek çok klinik araştırmada önemli belirteçler olarak öne çıkmaktadır (157,158). Epididimis kökenli olması nedeniyle miR-891a, adli biyolojide sperm bulundurmayan semen örneklerinin tespiti için umut vadeden bir belirteç olmuştur (109,130,157).

## 6. Sonuç

Adli bilimlerde son derece önemli bir role sahip olan biyolojik örneklerin doğru şekilde yorumlanabilmesi için, delil teslim zincirinin bozulmadan, örneklerin delil özelliğini kaybetmeden laboratuvara gönderilmesi gerekmektedir. Ancak olay yerinde karşılaşılan örnekler fazla miktarda degrade olmuş olabilir. Nem, sıcaklık, mikroorganizmalar, kimyasal ajanlar biyolojik örnek yapısına ve genetik materyale zarar vermektedir. Çalışmamızda, literatürde çalışılmış olan iki hedef miRNA'nın farklı çevresel koşullarda ne kadar dayanıklı olduğuna dair bir veri oluşturulmuştur. Bu sonuçlara göre;

- Oda sıcaklığında, toprak ve tatlı su altında bekleyen semen örneklerinden, adli bilimler için gerekli miRNA eldesinin gerçekleşebildiği,
- Yüksek sıcaklıkta yıkanan kumaş örneklerinde ise elde edilen sonuçların yeterli olmadığı,
- miR-10a ve miR-891a'nın semen tespiti için kullanılacak belirteçler olduğu,
- Kat değişim prensibi kullanılarak yapılan modellemede, miR-891a'nın daha kullanışlı bir belirteç olduğu görülmüştür.

Adli bilimlerde çalışılan bir molekülün, bu gibi zorlayıcı koşullarda, mutlaka sınırlamalarının bilinmesi gerekmektedir. Örnekler genel olarak incelendiğinde, literatürdeki diğer çalışmalara göre miRNA'larda beklenenin üstünde bir degradasyon görülmektedir. Bu koşullardan en yüksek derecede verim alabilmek için bazı öneriler verilmiştir.

- 1- Degrade örnekler toplandığında, tıpkı diğer örneklerde olduğu gibi kontaminasyondan uzak tutulmalıdır.
- 2- Örneklerin taşınmasında soğuk ve kuru bir ortam tercih edilmeli, mümkünse genetik materyali koruyucu bir solüsyon kullanılmalıdır.

- 3- Hücresel materyal olabildiğince fazla parçalanmalı, özellikle sperm gibi kompakt hücrelerde DDT gibi hücre lizisini sağlayan kimyasallar kullanılmalıdır.
- 4- cDNA sentezi ve RT-PCR aşamasında, degrade olmayan miRNA'ları korumak için her adım soğuk ortamda gerçekleştirilmelidir.
- 5- Yıkanmış örneklerde yapılacak çalışmalarda, hedef miRNA sayısının artırılması, istenilen sonuca yaklaşmayı kolaylaştırabilir.
- 6- Yapılacak diğer çalışmalarda da daha kapsamlı bir sonuç elde etmek için örnek sayısı, çevresel koşul çeşidi ve hedef miRNA sayısı artırılabilir.

Yapılan çalışmalarla birlikte, miRNA'nın adli bilimlerde vücut sıvısı tanımlama için uygun bir aday olduğu söylenebilir. Henüz rutin analizlerde yer almasa da çalışma kapsamının genişletilmesi ve standart bir yöntemin oturtulması ile kendisine bu alanda yer bulabilir. Çalışmalar yapılırken, özellikle bu alandaki kısıtlamaları ve limitlerinin bilinmesi gerekmektedir.

## 7. KAYNAKÇA

1. Chapman B, Natale S. Sexual Assault and Semen Persistence. In: Encyclopedia of Forensic Sciences, Third Edition. Elsevier; 2023. p. 497–510.
2. Gefrides L, Welch K. Forensic Biology: Serology and DNA. In: Mozayani A, Noziglia C, editors. The Forensic Laboratory Handbook Procedures and Practice [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [cited 2024 Aug 18]. p. 15–50. Available from: [https://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-872-0\\_2](https://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-872-0_2)
3. SERİN A, CANAN H, ULUBAY A, ALPER B. An Investigation of Various Tissue Specific mRNA Markers in Body Fluid Identification. Turk Klin J Forensic Med. 2017;14(2):48–55.
4. 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 Jul;188(1–3):1–17.
5. Lynch C, Fleming R. RNA -based approaches for body fluid identification in forensic science. WIREs Forensic Sci. 2021 Jul;3(4):e1407.
6. Rocchi A, Chiti E, Maiese A, Turillazzi E, Spinetti I. MicroRNAs: An Update of Applications in Forensic Science. Diagnostics. 2020 Dec 26;11(1):32.
7. Lee HC, Ladd C. Preservation and collection of biological evidence. Croat Med J. 2001 Jun;42(3):225–8.
8. Kishi K, Yasuda T. Forensic applications of genetic polymorphisms detected in human body fluids (urine, semen and blood). Forensic Sci Int. 1996 Jun;80(1–2):89–97.

9. SENSABAUGH GF. Uses of Polymorphic Red Cell Enzymes in Forensic Science. *Clin Haematol.* 1981 Feb;10(1):185–207.
10. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature.* 1985 Mar;314(6006):67–73.
11. Butler JM. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers.* 2. ed., [Nachdr.]. Amsterdam Heidelberg: Elsevier, Acad. Press; 2006. 1–17 p.
12. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci Int.* 2000 Jul;112(1):17–40.
13. Sobrino B, Carracedo A. SNP Typing in Forensic Genetics: A Review. In: *Forensic DNA Typing Protocols* [Internet]. New Jersey: Humana Press; 2004 [cited 2024 Aug 18]. p. 107–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-867-6:107>
14. Alakoç YD. ADLİ BİLİMLERDE DNA ANALİZLERİ. *Ank Sağlık Hizmetleri Derg.* 2010;9(2):1–8.
15. Tracey M. Short tandem repeat-based identification of individuals and parents. *Croat Med J.* 2001 Jun;42(3):233–8.
16. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet.* 1991 Oct;49(4):746–56.
17. Kowalczyk M, Zawadzka E, Szewczuk D, Gryzińska M, Jakubczak A. Molecular markers used in forensic genetics. *Med Sci Law.* 2018 Oct;58(4):201–9.

18. Tautz D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: DNA Fingerprinting: State of the Science. Birkhäuser Basel; 1993. p. 21–8.
19. Haddrill PR. Developments in forensic DNA analysis. *Emerg Top Life Sci.* 2021 Sep;5(3):381–93.
20. Steely CJ, Watkins WS, Baird L, Jorde LB. The mutational dynamics of short tandem repeats in large, multigenerational families. *Genome Biol.* 2022 Dec;23(1):253.
21. Ellegren H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):400–2.
22. Wyner N, Barash M, McNevin D. Forensic Autosomal Short Tandem Repeats and Their Potential Association With Phenotype. *Front Genet.* 2020 Aug;11.
23. Canturk KM, Emre R, Kinoglu K, Başpınar B, Sahin F, Ozen M. Current Status of the Use of Single-Nucleotide Polymorphisms in Forensic Practices. *Genet Test Mol Biomark.* 2014 Jul;18(7):455–60.
24. Pontes L, Sousa JC de, Medeiros R. SNPs and STRs in forensic medicine. A strategy for kinship evaluation. *Arch Forensic Med Criminol.* 2017;67(3):226–40.
25. Alwi ZB. The Use of SNPs in Pharmacogenomics Studies. *Malays J Med Sci MJMS.* 2005 Jul;12(2):4–12.
26. Samsuwan J, Somboonchokepisal T, Akaraputtiporn T, Srimuang T, Phuengsukdaeng P, Suwannarat A, et al. A method for extracting DNA from hard tissues for use in forensic identification. *Biomed Rep [Internet].* 2018 Sep 13 [cited 2024 Jan 6]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2018.1148>

27. Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2013 Aug;1833(8):1979–84.
28. Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet.* 1996 Apr;12(4):417–20.
29. King TE, Fortes GG, Balaesque P, Thomas MG, Balding D, Delsler PM, et al. Identification of the remains of King Richard III. *Nat Commun.* 2014 Dec 2;5(1):5631.
30. Stoneking M, Hedgecock D, Higuchi RG, Vigilant L, Erlich HA. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet.* 1991 Feb;48(2):370–82.
31. Deng YJ, Li YZ, Yu XG, Li L, Wu DY, Zhou J, et al. Preliminary DNA Identification for the Tsunami Victims in Thailand. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2005;3(3):143–57.
32. Jawad M, Noreen S, Ashraf MF, Asif M, Asif HM, Ali S, et al. Application of Ribonucleic Acid (RNA) in Forensic Sciences. *BIOMEDICA.* 2020 Sep 30;36(3):232–47.
33. Gomes C, López-Matayoshi C, Palomo-Díez S, López-Parra AM, Cuesta-Alvaro P, Baeza-Richer C, et al. Presumptive tests: A substitute for Benzidine in blood samples recognition. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2017 Dec;6:e546–8.
34. Harbison S, Fleming R. Forensic body fluid identification: state of the art. *Res Rep Forensic Med Sci.* 2016 Feb;11.

35. KARADAYI B, KARADAYI Ş, SEZGİN N. Presumptive and Confirmatory Tests Used in Identification of Biological Evidence and the Latest Developments in This Topic. *Turk Klin J Forensic Med Forensic Sci.* 2018;15(2):80–92.
36. Prakash A, Lewis SE, Hickman DL. Use of the Phadebas amylase test to assess the presence of rodent saliva. *Lab Anim.* 2016 Nov;45(11):433–4.
37. Yang J, Messinger DW, Dube R. Bloodstain detection and discrimination impacted by spectral shift when using an interference filter-based visible and near-infrared multispectral crime scene imaging system. *Opt Eng.* 2018 Mar;57(03):1.
38. Idris B, Goodwin WH. Evaluating the sensitivity of presumptive and confirmatory tests for body fluids. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2022 Dec;8:276–8.
39. Hochmeister MN, Budowle B, Rudin O, Gehrig C, Borer U, Thali M, et al. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. *J Forensic Sci.* 1999 Sep;44(5):1057–60.
40. Sijen T, Harbison S. On the Identification of Body Fluids and Tissues: A Crucial Link in the Investigation and Solution of Crime. *Genes.* 2021 Oct;12(11):1728.
41. Williams GA. Body fluid identification: A case for more research and innovation. *Forensic Sci Int Rep.* 2020 Dec;2:100096.
42. Tobe SS, Watson N, Daéid NN. Evaluation of Six Presumptive Tests for Blood, Their Specificity, Sensitivity, and Effect on High Molecular-Weight DNA. *J Forensic Sci.* 2007 Jan;52(1):102–9.
43. Glynn CL. Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA.* 2020 Jan;26(1):1–9.

44. Bexon KJ. Forensic MicroRNA Analysis of Body Fluids Relating to Sexual Assaults. 2017;
45. Sakurada K, Watanabe K, Akutsu T. Current Methods for Body Fluid Identification Related to Sexual Crime: Focusing on Saliva, Semen, and Vaginal Fluid. *Diagnostics*. 2020 Sep;10(9):693.
46. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*. 2016 Jan;96(1):1–17.
47. Bedford JM, Calvin H, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl*. 1973 Jul;18:199–213.
48. Mohanty SK, Singh R. Overview of the Male Reproductive System. In: *Male Infertility: Understanding, Causes and Treatment*. Springer Singapore; 2017. p. 3–12.
49. Cosentino MJ, Emilson LBV, Cockett ATK. Prostaglandins in semen and their relationship to male fertility: a study of 145 men. *Fertil Steril*. 1984 Jan;41(1):88–94.
50. Verze P, Cai T, Lorenzetti S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol*. 2016 Jul;13(7):379–86.
51. Zukerman Z, Weiss DB, Orvieto R. Does Preejaculatory Penile Secretion Originating from Cowper's Gland Contain Sperm? *J Assist Reprod Genet*. 2003;20(4):157–9.
52. Gupta S, Kumar A. The Human Semen. In: *Basics of Human Andrology*. Springer Singapore; 2017. p. 163–70.
53. Samanta L, Parida R, Dias TR, Agarwal A. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018 Dec;16(1):41.

54. Kretser DM de, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Hum Reprod.* 1998 Apr;13(suppl 1):1–8.
55. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol.* 2016 Nov;59:10–26.
56. Nimlamool W, Bean BS, Lowe-Krentz LJ. Human sperm CRISP2 is released from the acrosome during the acrosome reaction and re-associates at the equatorial segment. *Mol Reprod Dev.* 2013 Jun;80(6):488–502.
57. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SEM. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online.* 2011 Dec;23(6):724–34.
58. Lehti MS, Sironen A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects†. *Biol Reprod.* 2017 Oct;97(4):522–36.
59. Gonçalves ABR, De Oliveira CF, Carvalho EF, Silva DA. Comparison of the sensitivity and specificity of colorimetric and immunochromatographic presumptive methods for forensic semen detection. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2017 Dec;6:e481–3.
60. Stefanidou M, Alevisopoulos G, Spiliopoulou C. Fundamental issues in forensic semen detection. *West Indian Med J.* 2010 Jun;59(3):280–3.
61. Buchwald SL, Saini MS, Knowles JR, Etten RLV. Stereochemical course of phospho group transfer by human prostatic acid phosphatase. *J Biol Chem.* 1984 Feb;259(4):2208–13.
62. Atasoy S. Lekelerde Sperm İdentifikasyonu. *Adli Tıp Derg.* 1989;1(2):49–66.

63. Hardinge P, Allard J, Wain A, Watson S. Optimisation of choline testing using Florence Iodine reagent, including comparative sensitivity and specificity with PSA and AP tests. *Sci Justice*. 2013 Mar;53(1):34–40.
64. Fiedler A, Rehdorf J, Hilbers F, Johrdan L, Stribl C, Benecke M. Detection of Semen (Human and Boar) and Saliva on Fabrics by a Very High Powered UV-/VIS-Light Source. *Open Forensic Sci J*. 2008 Apr;1(1):12–5.
65. Rodriguez JJRB, Calacal GC, Laude RP, Ungria MCAD. Integrating presumptive and confirmatory semen tests into DNA profiling of sexual assault evidence: a Philippine example. *Egypt J Forensic Sci*. 2019 Dec;9(1):45.
66. Gršković B, Zrnec D, Popović M, Petek MJ, Primorac D, Mršić G. Effect of ultraviolet C radiation on biological samples. *Croat Med J*. 2013 Jun;54(3):263–71.
67. DiFrancesco J, Richards E. Persistence of spermatozoa: lessons learned from going to the sources. *Sci Justice*. 2018 May;58(3):244–7.
68. Ingemann-Hansen O, Charles AV. Forensic medical examination of adolescent and adult victims of sexual violence. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2013 Feb;27(1):91–102.
69. Willott GM, Allard JE. Spermatozoa — their persistence after sexual intercourse. *Forensic Sci Int*. 1982 Mar;19(2):135–54.
70. Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rougé D. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J Forensic Sci*. 2001 Mar;46(2):349–51.

71. Lingappa HA, Govindashetty AM, Krishnamurthy A, Puttaveerachary AK, Manchaiah S, Shimoga IC, et al. Quest for an ideal, simple and cost-effective stain for morphological assessment of sperms. *J Clin Diagn Res.* 2015 Oct;9(10):EC01–4.
72. Singh S, Sharma S, Jain M, Chauhan R. Importance of Papanicolaou Staining for Sperm Morphologic Analysis. *Am J Clin Pathol.* 2011 Aug;136(2):247–51.
73. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Eosin-Nigrosin Staining Procedure. In: *Andrological Evaluation of Male Infertility* [Internet]. Springer International Publishing; 2016. p. 73–7. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-26797-5\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-26797-5_8)
74. Yousef GM, Diamandis EP. The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: Structure, Function, and Association to Disease\*. *Endocr Rev.* 2001 Apr;22(2):184–204.
75. Markham R, Smith JD. The structure of ribonucleic acids. 2. The smaller products of ribonuclease digestion. *Biochem J.* 1952 Dec;52(4):558–65.
76. Townshend RJL, Eismann S, Watkins AM, Rangan R, Karelina M, Das R, et al. Geometric deep learning of RNA structure. *Science.* 2021 Aug;373(6558):1047–51.
77. Vennemann M, Koppelkamm A. mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Sci Int.* 2010 Dec;203(1–3):71–5.
78. Buccitelli C, Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet.* 2020 Oct;21(10):630–44.
79. Lemon B, Tjian R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* 2000 Oct;14(20):2551–69.

80. Cramer P, Zaher H. Transcription | Gene Expression in Eukaryotes: RNA Polymerase II Structure. In: Encyclopedia of Biological Chemistry III. Elsevier; 2021. p. 475–9.
81. Tian B, Hu J, Zhang H, Lutz CS. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(1):201–12.
82. Efimov VA. Detection of the 5'-cap structure of messenger RNAs with the use of the cap-jumping approach. *Nucleic Acids Res.* 2001 Nov;29(22):4751–9.
83. Lee Y, Rio DC. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem.* 2015 Jun;84(1):291–323.
84. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec;75(5):843–54.
85. Bartel DP. MicroRNAs. *Cell.* 2004 Jan;116(2):281–97.
86. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003 Sep;425(6956):415–9.
87. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004 Oct;23(20):4051–60.
88. BOHNSACK MT, CZAPLINSKI K, GÖRLICH D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 2004 Feb;10(2):185–91.
89. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002 Sep;21(17):4663–70.

90. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*. 2003 Oct;115(2):209–16.
91. Winter J, Diederichs S. Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biol*. 2011;8(6):1149–57.
92. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009 Mar;11(3):228–34.
93. Oehmichen M, Zilles K. Postmortale DNS- und RNS-Synthese: Erste Untersuchungen an menschlichen Leichen. *Z Für Rechtsmed*. 1984 Feb;91(4):287–94.
94. Bauer M, Gramlich I, Polzin S, Patzelt D. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Leg Med*. 2003 Dec;5(4):220–7.
95. Madea B, Saukko P, Oliva A, Musshoff F. Molecular pathology in forensic medicine—Introduction. *Forensic Sci Int*. 2010 Dec;203(1–3):3–14.
96. Ohshima T. Forensic wound examination. *Forensic Sci Int*. 2000 Sep;113(1–3):153–64.
97. Sato Y, Ohshima T. The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation (II). *Int J Legal Med*. 2000 May;113(3):140–5.
98. Haas C, Klessner B, Kratzer A, Bär W. mRNA profiling for body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2008 Aug;1(1):37–8.

99. Bai P, Deng W, Wang L, Long B, Liu K, Liang W, et al. Micro RNA profiling for the detection and differentiation of body fluids in forensic stain analysis. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2013;4(1).
100. Seashols-Williams S, Lewis C, Calloway C, Peace N, Harrison A, Hayes-Nash C, et al. High-throughput miRNA sequencing and identification of biomarkers for forensically relevant biological fluids. *ELECTROPHORESIS.* 2016 Oct;37(21):2780–8.
101. Haas C, Hanson E, Bär W, Banemann R, Bento AM, Berti A, et al. mRNA profiling for the identification of blood—Results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet.* 2011 Jan;5(1):21–6.
102. Sakurada K, Ikegaya H, Fukushima H, Akutsu T, Watanabe K, Yoshino M. Evaluation of mRNA-based approach for identification of saliva and semen. *Leg Med.* 2009 May;11(3):125–8.
103. Jakubowska J, Maciejewska A, Pawłowski R, Bielawski KP. mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Feb;7(2):272–8.
104. Juusola J, Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci Int.* 2005 Aug;152(1):1–12.
105. Engel W, Keime S, Kremling H, Hameister H, Schlüter G. The genes for protamine 1 and 2 (PRM1 and PRM2) and transition protein 2 (TNP2) are closely linked in the mammalian genome. *Cytogenet Genome Res.* 1992;61(2):158–9.
106. Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod.* 2000 Mar;6(3):219–25.

107. Kubo S, Niimi H, Kitajima I. Rapid detection of blood and semen mRNA markers by reverse transcription-recombinase polymerase amplification. *Forensic Sci Int Genet.* 2022 May;58:102665.
108. Silva SS, Lopes C, Teixeira AL, Sousa MJCD, Medeiros R. Forensic miRNA: Potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet.* 2015 Jan;14:1–10.
109. Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, Kuijk PFV, Wiemer EAC, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med.* 2010 May;124(3):217–26.
110. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem.* 2009 Apr;387(2):303–14.
111. Wei S, Hu S, Han N, Wang G, Chen H, Yao Q, et al. Screening and evaluation of endogenous reference genes for miRNA expression analysis in forensic body fluid samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2023 Mar;63.
112. Zhang Y, Liu B, Shao C, Xu H, Xue A, Zhao Z, et al. Evaluation of the inclusion of circular RNAs in mRNA profiling in forensic body fluid identification. *Int J Legal Med.* 2018 Jan;132(1):43–52.
113. Wang S, Wang Z, Tao R, He G, Liu J, Li C, et al. The potential use of Piwi-interacting RNA biomarkers in forensic body fluid identification: A proof-of-principle study. *Forensic Sci Int Genet.* 2019 Mar;39:129–35.
114. Parker GJ, McKiernan HE, Legg KM, Goecker ZC. Forensic proteomics. *Forensic Sci Int Genet.* 2021 Sep;54:102529.

115. Precazzini F, Detassis S, Imperatori AS, Denti MA, Campomenosi P. Measurements Methods for the Development of MicroRNA-Based Tests for Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 25;22(3):1176.
116. Sauer E, Reinke AK, Courts C. Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. *Forensic Sci Int Genet*. 2016 May;22:89–99.
117. Tian H, Lv M, Li Z, Peng D, Tan Y, Wang H, et al. Semen-specific miRNAs: Suitable for the distinction of infertile semen in the body fluid identification? *Forensic Sci Int Genet*. 2018 Mar;33:161–7.
118. Fujimoto S, Manabe S, Morimoto C, Ozeki M, Hamano Y, Hirai E, et al. Distinct spectrum of microRNA expression in forensically relevant body fluids and probabilistic discriminant approach. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1).
119. Lancia M, Severini S, Tommolini F, Carnevali E. The appropriateness of analysing some known micro-RNAs to detect the presence of semen in old stains. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2019 Dec;7(1):498–500.
120. Tong D, Jin Y, Xue T, Ma X, Zhang J, Ou X, et al. Investigation of the application of miR10b and miR135b in the identification of semen stains. *PLoS ONE*. 2015 Sep;10(9).
121. Iroanya OO, Olutunde OT, Egwuatu TF, Igbokwe C. Stability of selected microRNAs in human blood, semen and saliva samples exposed to different environmental conditions. *Forensic Sci Int*. 2022 Jul;336.

122. Zubakov D, Boersma AWM, Choi Y, Kuijk PFV, Wiemer EAC, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med.* 2010 May;124(3):217–26.
123. Tian H, Lv M, Li Z, Peng D, Tan Y, Wang H, et al. Semen-specific miRNAs: Suitable for the distinction of infertile semen in the body fluid identification? *Forensic Sci Int Genet.* 2018 Mar;33:161–7.
124. Bai P, Deng W, Wang L, Long B, Liu K, Liang W, et al. Micro RNA profiling for the detection and differentiation of body fluids in forensic stain analysis. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2013;4(1).
125. Al-Mawlah YH, Jebor MA, Abdulla AA. The Effect of Mixing Seminal Fluid and Vaginal Secretion on the Expression of miRNA Markers in a Simulated Forensic Scientific Detection [Internet]. Vol. 25. 2021. p. 11477–82. Available from: <http://annalsofrscb.ro>
126. Li Y, Zhang J, Wei W, Wang Z, Prinz M, Hou Y. A strategy for co-analysis of microRNAs and DNA. *Forensic Sci Int Genet.* 2014;12:24–9.
127. Wang Z, Zhang J, Luo H, Ye Y, Yan J, Hou Y. Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2013 Jan;7(1):116–23.
128. Wang Z, Zhao X, Hou Y. Exploring of microRNA markers for semen stains using massively parallel sequencing. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2017 Dec;6:e107–9.
129. Park JL, Park SM, Kwon OH, Lee H chul, Kim J young, Seok HH, et al. Microarray screening and qRT-PCR evaluation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Electrophoresis.* 2014 Nov;35(21–22):3062–8.

130. Mayes C, Seashols-Williams S, Hughes-Stamm S. A capillary electrophoresis method for identifying forensically relevant body fluids using miRNAs. *Leg Med.* 2018 Jan;30:1–4.
131. Layne TR, Green RA, Lewis CA, Nogales F, Cruz TCD, Zehner ZE, et al. microRNA Detection in Blood, Urine, Semen, and Saliva Stains After Compromising Treatments. *J Forensic Sci.* 2019 Nov;64(6):1831–7.
132. Lewis CA, Layne TR, Seashols-Williams SJ. Detection of microRNAs in DNA Extractions for Forensic Biological Source Identification. *J Forensic Sci.* 2019 Nov;64(6):1823–30.
133. O`Leary KR, Glynn CL. Investigating the Isolation and Amplification of microRNAs for Forensic Body Fluid Identification. *MicroRNA.* 2018 May;7(3):187–94.
134. Mayes C, Houston R, Seashols-Williams S, LaRue B, Hughes-Stamm S. The stability and persistence of blood and semen mRNA and miRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples. *Leg Med.* 2019 May;38:45–50.
135. He H, Han N, Ji C, Zhao Y, Hu S, Kong Q, et al. Identification of five types of forensic body fluids based on stepwise discriminant analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2020 Sep;48.
136. Bamberg M, Bruder M, Dierig L, Kunz SN, Schwender M, Wiegand P. Best of both: A simultaneous analysis of mRNA and miRNA markers for body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2022 Jul;59.
137. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 6th ed. Geneva: World Health Organization; 2010.
138. Courts C, Madea B. Micro-RNA – A potential for forensic science? *Forensic Sci Int.* 2010 Dec;203(1–3):106–11.

139. Chen X, Xu H, Zhu B. Forensic validation of a combined analysis of mRNA and miRNA markers for precise tissue origin inferences of five kinds of body fluids by RT-qPCR. *Electrophoresis*. 2023;
140. Iroanya OO, Olutunde OT, Egwuatu TF, Igbokwe C. Stability of selected microRNAs in human blood, semen and saliva samples exposed to different environmental conditions. *Forensic Sci Int*. 2022 Jul;336.
141. Al-Mawlah YH, Jebor MA, Abdulla AA. The Effect of Mixing Seminal Fluid and Vaginal Secretion on the Expression of miRNA Markers in a Simulated Forensic Scientific Detection [Internet]. Vol. 25. 2021. p. 11477–82. Available from: <http://annalsofrscb.ro>
142. Fujimoto S, Manabe S, Morimoto C, Ozeki M, Hamano Y, Hirai E, et al. Distinct spectrum of microRNA expression in forensically relevant body fluids and probabilistic discriminant approach. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1).
143. Fujimoto S, Manabe S, Morimoto C, Hamano Y, Tamaki K. Effect of the absence of spermatozoa on microRNA-based semen identification. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. 2017 Dec;6:e238–40.
144. Li Y, Zhang J, Wei W, Wang Z, Prinz M, Hou Y. A strategy for co-analysis of microRNAs and DNA. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;12:24–9.
145. Lewis CA, Layne TR, Seashols-Williams SJ. Detection of microRNAs in DNA Extractions for Forensic Biological Source Identification. *J Forensic Sci*. 2019 Nov;64(6):1823–30.
146. He H, Han N, Ji C, Zhao Y, Hu S, Kong Q, et al. Identification of five types of forensic body fluids based on stepwise discriminant analysis. *Forensic Sci Int Genet*. 2020 Sep;48.

147. Liu Y, He H, Xiao ZX, Ji A, Ye J, Sun Q, et al. A systematic analysis of miRNA markers and classification algorithms for forensic body fluid identification. *Brief Bioinform.* 2021 Jul;22(4).
148. Wosnitzer MS. Genetic evaluation of male infertility. *Transl Androl Urol.* 2014 Mar;3(1):17–26.
149. Kulstein G, Schacker U, Wiegand P. Old meets new: Comparative examination of conventional and innovative RNA-based methods for body fluid identification of laundered seminal fluid stains after modular extraction of DNA and RNA. *Forensic Sci Int Genet.* 2018 Sep;36:130–40.
150. C. Zapico S, Dytso A, Rubio L, Roca G. The Perfect Match: Assessment of Sample Collection Efficiency for Immunological and Molecular Findings in Different Types of Fabrics. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 14;23(18):10686.
151. Borde YM, Tonnany MB, Champod C. A Study on the Effects of Immersion in River Water and Seawater on Blood, Saliva, and Sperm Placed on Objects Mimicking Crime Scene Exhibits. *Can Soc Forensic Sci J.* 2008 Jan;41(3):149–63.
152. Brayley-Morris H, Sorrell A, Revoir AP, Meakin GE, Court DS, Morgan RM. Persistence of DNA from laundered semen stains: Implications for child sex trafficking cases. *Forensic Sci Int Genet.* 2015 Nov;19:165–71.
153. Karadayi S, Moshfeghi E, Arasoglu T, Karadayi B. Evaluating the persistence of laundered semen stains on fabric using a forensic light source system, prostate-specific antigen Semiquant test and DNA recovery-profiling. *Med Sci Law.* 2020 Apr;60(2):122–30.

154. Kulstein G, Wiegand P. Comprehensive examination of conventional and innovative body fluid identification approaches and DNA profiling of laundered blood- and saliva-stained pieces of cloths. *Int J Legal Med.* 2018 Jan;132(1):67–81.
155. Sapan TÜ, Güngör A, Sandıkçı N, Kocabaş A, Atasoy S. DNA recovery and human identification from semen stains washed at different temperatures. *Int J Legal Med.* 2023 Mar;137(2):303–10.
156. Liu Y, He H, Xiao ZX, Ji A, Ye J, Sun Q, et al. A systematic analysis of miRNA markers and classification algorithms for forensic body fluid identification. *Brief Bioinform.* 2021 Jul;22(4).
157. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell.* 2007 Jun;129(7):1401–14.
158. Hasegawa T, Glavich GJ, Pahuski M, Short A, Semmes OJ, Yang L, et al. Characterization and Evidence of the miR-888 Cluster as a Novel Cancer Network in Prostate. *Mol Cancer Res.* 2018 Apr 1;16(4):669–81.

## Ekler

**Ek 1:** İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa Etik Kurul Onay Belgesi



## Ek 2- Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

### BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

"Bir araştırma çalışmasına katılmak için davet edilmiş bulunmaktasınız. Aşağıdaki bilgileri okuduktan sonra çalışmaya katılmak isterseniz, bu formu imzalayınız. Formu imzalamanız çalışmanın kapsamı ve riskleri hakkında bilgilendirildiğinizi ve kararınızı serbestçe verdiğinizi belirtmektedir. Bu onay formunun bir kopyası size verilecektir. Bu formda anlamadığınız ifadeler varsa çalışmadaki araştırmacılara sorarak bilgi ediniz."

**BGOF asgari olarak aşağıda belirtilen başlıkları, açıklamaları ve bölümleri içermelidir:**

1. **"Semen örneklerinde miR-891a ve miR-10a belirteçlerinin çeşitli koşullarda dayanıklılığının değerlendirilmesi"**  
adli çalışmaya davet edilmiş bulunmaktasınız.
2. **Çalışmanın bir araştırma olduğu**  
Yapılacak çalışma akademik amaçlı bir araştırmadır
3. **Araştırmanın amacı**  
Adli bilimlerde, biyolojik kaynaklı deliller, suçun aydınlatılması, kişi kimliklendirilmesinin yapılması ve adaletin sağlanması açısından en önemli delillerdir. Biyolojik deliller olay yerinde kan, tükürük, semen, vajinal sekresyon, idrar gibi vücut sıvıları şeklinde bulunabilir. Cinsel suçlarda en çok karşılaşılan vücut sıvısı semendir. Semen, yapı gereği bulunduğu ortama göre kuruyup şeffaf bir hal alabilir ve olay yerinde tespiti zorlaşabilir. Bir biyolojik delilden DNA analizi yapılmadan önce, biyolojik delil olup olmadığı kesinleşmelidir. Bunun için bazı ön testler uygulanır. Ancak bu testler özgün olmama, delilin yapısını bozma, zaman alıcı olma ve çok az miktardaki delilden DNA analizini zorlaştırma gibi bazı dezavantajlara sahiptir ve yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir. Testlerin dezavantajları göz önüne alındığında, özgünlüğün çok daha yüksek olduğu ve çoklu işlemlerin bulunmadığı yeni moleküler genetik uygulamalar, adli biyolojide kullanılmaya başlanmıştır. Adli bilimlerde RNA'nın kullanımı, biyolojik sıvıların tanımlanması ve orijinin belirlenmesinde kullanılan testlerin dezavantajlarının önüne geçilmesi için geliştirilmiş, yeni nesil moleküler uygulamalardan birisidir. RNA bazlı metotlar, özellikle örnek miktarının çok az olması gibi durumlarda çok önemli bir yere sahiptir. RNA temelli metotlar içinde en sık çalışılan RNA türü olan mRNA olmakla birlikte daha yeni bir konu olan microRNA (miRNA), oldukça umut verici bulgular içermekte ve aynı zamanda mRNA ya göre bazı avantajlara sahiptir. Yapmayı planladığımız çalışmada miRNA'nın avantajları göz önünde bulundurularak, adli bilimler için oldukça önemli bir vücut sıvısı olan semen üzerinde, miR-10a ve miR-891a'nın stabiliteyi, farklı olay yeri senaryoları üzerinden hesaplanması amaçlanacaktır.
4. **Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre,**  
Gönüllünün kabul ettiği semen örneğini vermesi dışında araştırmaya devam etmesi için öngörülen bir süre yoktur.
5. **Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı,**  
Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı 5 olarak belirlenmiştir.
6. **Araştırmada uygulanacak tedaviler,**  
Araştırmada tedavi yöntemi uygulanmayacaktır.
7. **Varsa farklı tedaviler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığının bulunduğu,**  
Gönüllülere tedavi yöntemi uygulanmayacaktır.
8. **Araştırma sırasında uygulanacak olan invazif yöntemler dâhil olmak üzere izlenecek veya gönüllüye uygulanacak yöntemlerin tümü,**  
Araştırma için gönüllülerden sadece vermeyi kabul ettiği vücut sıvısı örneği/örnekleri alınacaktır. Araştırma sırasında gönüllülerden swab ile tükürük örneği ve semen örneği (ejakulat) alınacaktır.
9. **Araştırmanın deneysel kısımları,**  
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nu imzalayan, aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, 20-35 yaş arası rastgele seçilmiş yaklaşık 5 erkek gönüllüden semen (ejakulat), çalışma zamanına kadar +4 °C'de muhafaza edilecektir. Semen örnekleri alındıktan sonra su banyosunda 20 dakika bekletilerek akışkan hale getirilecek ve örneklerden 200 uL 5x5 cm'lik pamuklu bezlere pipetlenecektir. Örnekler belirlenen koşullarda bekletilecek ve sonrasında pamuklu bezlerden kit ile microRNA (miRNA) izolasyonu yapılacaktır. İzolatlardan cDNA kütüphanesi oluşturulacak ve miR-10a ve miR-891a belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri Real Time PCR (qRT-PCR) ile belirlenecektir. Ekspresyon değerlendirmesinde  $C_T$ ,  $\Delta C_T$  değerleri ve  $\Delta\Delta C_T$  yöntemi kullanılacaktır. Karşılaştırmalarda snRNA U6 gen ekspresyonları referans olarak kullanılacaktır. One-way ANOVA- Post hoc Tukey teti ile hasta ve kontrol grubu ekspresyon ortalamaları ve dağılımları ( $C_T$ ,  $\Delta C_T$  ve  $\Delta\Delta C_T$  değerleri) bakımından anlamlı bir fark ( $P<0,05$ ) olup olmadığı araştırılacaktır.
10. **Gönüllünün maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacak ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar dahil olmak üzere),**  
Gönüllülerin maruz kalacağı herhangi bir risk veya rahatsızlık öngörülmemektedir.

11. **Araştırmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak gönüllü açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığında gönüllünün bu durum hakkında bilgilendirileceği,**  
Çalışmada gönüllünün sağlayabileceği bir klinik yarar bulunmamaktadır.
12. **Gönüllüye uygulanabilecek olan alternatif yöntemler veya tedavi şeması ve bunların olası yarar ve riskleri,**  
Gönüllüye uygulanabilecek alternatif tedavi yöntemleri bulunmamaktadır.
13. **İlgili mevzuat gereğince gerekiyorsa gönüllüye verilecek tazminat (sigorta) ve / veya sağlanacak tedaviler,** Çalışmada herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.
14. **Varsa, gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler hakkındaki bilgiler,**  
Gönüllülerin ulaşım, yemek gibi masraflarına ilişkin bir ödeme yapılmayacaktır.
15. **Gönüllülerin sorumlulukları,**  
Gönüllülerin semen ve tükürük örneği vermeleri dışında hiçbir sorumlulukları bulunmamaktadır.
16. **Gönüllünün araştırmaya katılımının isteğe bağlı olduğu ve gönüllünün istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebileceği veya araştırmadan çekilebileceği,**  
Gönüllünün araştırmaya katılımı isteğe bağlı olup, istediği zaman herhangi bir yaptırma maruz kalmaksızın araştırmadan çekilebilecektir. Ayrıca, araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcı araştırma dışı bırakılabilir.
17. **Gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanamayacağı; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliğinin gizli kalacağı,**  
Gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanmayacaktır; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.
18. **İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, etik kurul, kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimlerinin bulunabileceği, ancak bu bilgilerin gizli tutulacağı, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya kanuni temsilcisinin söz konusu erişime izin vermiş olacağı, İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, etik kurul, kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri olacaktır. Ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.**
19. **Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya kanuni temsilcisinin zamanında bilgilendirileceği,**  
Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya kanuni temsilcisinin zamanında bilgilendirileceğini taahhüt ederim.
20. **Gönüllünün; araştırma, kendi hakları veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bu kişilere ait günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları,**  
Gönüllünün; araştırma, kendi hakları veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler proje yürütücüsü Ahmet Can KURT, Danışman Prof. Dr. Emel Hülya YÜKSELOĞLU'dur. 24 saat boyunca ulaşabilecekleri telefon numaraları sırası ile XXX, XXX'dir.
21. **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler,**  
Gönüllülerin araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek herhangi bir durum veya neden bulunmamaktadır.
22. **Çalışma sonrası araştırma ürünlerine erişim,**  
Çalışma sonrası araştırma ürünlerine yapılacak tez çalışması ile ulaşılabilir.
23. **Gönüllülerden alınacak biyolojik materyallerin ne olduğu, hangi amaçla alındığı ve analizlerinin nerede yapılacağına dair bilgiler (analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceğinin açıklanması),**  
Gönüllülerden semen örneği toplanacaktır. Bu biyolojik örneğin seçilme amacı, tıbbi personel gerekmezken daha kolay toplanabilir ve muhafaza edilebilir olmasıdır. Çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü'nde toplanacak ve analiz edilecektir. Analizler yurtdışında yapılmayacaktır.
24. **BGOF'nin imza bölümünde;**  
**“Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum”**ifadesi gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.
25. **“Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum”**ifadesi gönüllünün kendi el yazısı ile yazılacaktır.

26. Gönüllünün adı / soyadı / imzası / tarih,

27. Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının adı / soyadı / imzası / tarih,

28. Gerekliyse olur işlemine tanık olan kişinin adı / soyadı / imzası / tarih,

29. Gerekliyse anne ve baba veya kanuni temsilcinin adı / soyadı / imzası / tarih,

**İleride yapılacak araştırmalar için;**

30. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilirim veya kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından da araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

“Semen örneklerinde miR-891a ve miR-10a belirteçlerinin çeşitli koşullarda dayanıklılığının değerlendirilmesi” adlı araştırma kapsamında alınan semen örneğinin, (Gönüllü tarafından uygun olan şık işaretlenmelidir.)

- Sadece yukarıda bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.  
 İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.  
 Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Gönüllünün Adı:

Yetkin Araştırmacının Adı: Biyolog Ahmet Can

Gönüllünün Soyadı:

Yetkin Araştırmacının Soyadı: KURT

Gönüllünün Cinsiyeti: Kadın  Erkek

Gönüllünün Yaşı:

Yetkin Araştırmacının İmzası:

Tarih:

Gönüllünün İmzası:

**Pediyatrik çalışmalar için;**

31. Bu çalışma pediyatrik popülasyonda yürütülmeyecektir.

