

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

**ADLİ AMAÇLI MENSTRÜEL KAN İDENTİFİKASYONUNDA
KULLANILAN TANIMLAMA YÖNTEMLERİNİN ÇEŞİTLİ
AÇILARDAN KARŞILAŞTIRILMASI**

AYŞE ÇOŞKUN

BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof.Dr.Behnan ALPER

ADANA-2024

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

**ADLİ AMAÇLI MENSTRÜEL KAN İDENTİFİKASYONUNDA
KULLANILAN TANIMLAMA YÖNTEMLERİNİN ÇEŞİTLİ
AÇILARDAN KARŞILAŞTIRILMASI**

AYŞE ÇOŞKUN

BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof.Dr.Behnan ALPER

ADANA-2024

KABUL VE ONAY

Adli Bilimler Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan

“Adli Amaçlı Menstrüel Kan İdentifikasyonunda Kullanılan Tanımlama Yöntemlerinin Çeşitli Açılardan Karşılaştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 20/09/2024

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof.Dr.Behnan ALPER

Çukurova Üniversitesi

Başkan

Prof.Dr.Ayşe SERİN

Çukurova Üniversitesi

Üye

Prof.Dr.Hülya YÜKSELOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Üye

Yukarıdaki tez,Yönetim Kurulunun 20/09/2024 tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Sunay FIRAT

Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitü Müdürü

TEŐEKKÖR

Tez çalıőmamda danıőmanım olarak yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, değerli bilgi ve zamanını esirgemeyen Prof.Dr.Behnan ALPER hocama, Prof.Dr.Ayşe SER N ve Dr.Hüsniye CANAN hocalarıma, ve her daim yanımda olan,desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma ve aileme teőekkürü bir borç bilirim.

Ayşe ÇOŞKUN

İÇİNDEKİLER

ÖZET

ABSTRACT

ŞEKİL LİSTESİ

TABLO LİSTESİ

KISALTMALAR

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. ADLİ BİLİMLER VE MENSTRÜEL KAN	3
3.1 Vajinal Epitel Hücreleri	3
3.2 Menstrüasyon ve Menstrüel Kanın Bileşimi	5
3.3 Menstrüel Kanı İnceleme Metotları	7
3.3.1 Mikroskopik yöntemler	8
3.3.1.1 Lugol İyot Boyama Yöntemi	8
3.3.1.2 Dane'in Boyama Yöntemi	10
3.3.2 Moleküler Yöntemler	11
3.3.2.1 Laktat Dehidrojenaz İzoenzimlerinin Elektroforetik Tanımlaması	11
3.3.2.2 Fibrinolitik Ürünlerin Tespiti	13
3.3.2.3 RNA'ya Dayalı Yöntemler	16
Biyobelirteçler	16
RT-qPCR	18
RT-qPCR ürün analizi	20

4. MATERYAL ve METOT	21
4.1 LGC ParaDNA Body Fluid ID Test	22
Kullanılan mRNA belirteçleri	22
HyBeacons floresan prob teknolojisi	24
4.2 SERATEC PMB Test	25
4.3 DIMERTEST Lateks Test	30
5. BULGULAR	33
6. TARTIŞMA	36
6.1 Hız	36
6.2 Güvenlik	36
6.3 Hassasiyet	37
6.4 İşgücü	37
6.5 Maliyet	37
6.6 Taşınabilirlik	38
6.7 Laboratuvara adaptasyon	38
7.SONUÇLAR	39
8.KAYNAKLAR	40

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: İnsan vajinal dokularının histolojik yapısı

Şekil 2: Menstrüel Döngü Sırasında Endometriyal Histoloji

Şekil 3: Bir menstrüel siklus sırasında uterus mukozasının işlevselliğindeki değişiklikler

Şekil 4: Glikojen yapısı

Şekil 5: Glikojen-iyot kompleksinin diyagramı

Şekil 6: Lugol'ün iyot çözeltisi ile boyanmış epitel hücreleri

Şekil 7: Farklı hücrelerin Dane'in boyama yöntemi ile boyanması

Şekil 8: Laktat dehidrogenaz (LDH) izozimlerinin elektroforetik ayrımı

Şekil 9: LDH izoenzim yapıları

Şekil 10: Fibrinoliz yoluyla D-dimer oluşumu

Şekil 11: Bir fibrin polimerinin oluşumu ve bozunumu

Şekil 12: Menstrüasyon kanında D-dimer'in tanımlanması için immünokromatografik analiz çalışma prensibi

Şekil 13: RT-PCR aşamaları

Şekil 14: LGC ParaDNA Body Fluid ID Test cihazı

Şekil 15: HyBeacons sürecinin temsili

Şekil 16: HyBeacon probunun yapısı ve hedef tespit yöntemi

Şekil 17: Test aşaması ve sonuç değeriendirme için belirlenmiş alanlar

Şekil 18: Test uygulama aşamaları

Şekil 19: SERATEC PMB Testi için negatif sonuç

Şekil 20: SERATEC PMB Testi için pozitif sonuç

Şekil 21: SERATEC PMB Testi için pozitif sonuç

Şekil 22: SERATEC PMB Testi için pozitif sonuç

Şekil 23: SERATEC PMB Testi için geçersiz sonuç

Şekil 24: Farklı D-Dimer kit ve test cihazları

Şekil 25: DIMERTEST Lateks Testi için Sonuçlar

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Menstrüel kan identifikasyonu için literatürde bulunan bazı mRNA ve miRNA biyobelirteçleri

Tablo 2: ParaDNA Body Fluid ID Testide analiz edilebilen RNA biyobelirteç listesi

Tablo 3: Değerlendirilen metotların belirli kriterlere göre karşılaştırılması

KISALTMALAR

A: adenin

ALAS2: Aminolevulinalesentaz 2

C: kontrol çizgisi

CD93: CD93 molekülü

cDNA: Komplementer DNA

DKK4: Dickkopf homolog 4

DNA: Deoksiribonükleik asit

ECM: Hücre dışı matris

FDP: fibrin-fibrinojen bozunma ürünleri

FEU: Fibrinojen eşdeğer birimi

G: guanin

HBA1: Alfa 1 hemoglobin

HBB: Beta hemoglobin

Hb: hemoglobin

IL19: İnterlökin 19

KI: potasyum iyodür

LDH: Laktat Dehidrojenaz enzimi

M: D-dimer kontrol çizgisi

miRNA: mikroRNA

MMP: Matriks metalloproteinazlar

mRNA: mesajcı RNA

MUC4: Müsin 4

MYOZ1: Myozenin 1

NGS: yeni nesil dizileme

P: pozitif

PBGD: Porfobilinojen deaminaz

PC: Performans kontrol

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

qPCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

RNAaz: Ribonükleaz

SPTB: Beta spektrin

U: urasil

UV: ultraviyole

XL-FDP: çapraz bağlı fibrin parçalanma ürünleri

ÖZET

Adli Amaçlı Menstrüel Kan İdentifikasyonunda Kullanılan Tanımlama Yöntemlerinin Çeşitli Açılardan Karşılaştırılması

Adli uygulamalarda sıklıkla kullanılan vücut sıvılarının tanımlanması suçun/suçlunun belirlenmesinde ve bilimsel çalışmalarda oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Olay yerinden elde edilebilecek en önemli kanıtlar arasında olan kan, semen, tükürük, vajinal sekresyon gibi biyolojik bulgular tanımlanma/kimliklendirme sürecini de beraberinde getirir. Kan, olay yerlerinde en sık bulunan vücut sıvılarından biridir. Bu bulgular biyolojik olduklarından örneğin alınması aşamasından itibaren başlayan bu süreçte bozunmaya uğrama, kontamine olma gibi muhtemel sorunları en aza indirmek ve bu vücut sıvılarının tanımlanması aşamasında başarılı ve hızlı bir yöntem seçmek çok önemlidir. Bu çalışmada menstrüel kanın tespiti için kullanılan yöntemler sıralanmış ve farklı açılardan kıyaslanarak hangisinin menstrüel kanın tanımlanmasında hangi açıdan avantajlı veya dezavantajlı olduğu tartışılmıştır. Kullanılan yöntemler mikroskobik ve moleküler yöntemler olarak ikiye ayrılmış ve 3 ticari test kiti incelenip karşılaştırılmıştır. Bunlar ParaDNA Body Fluid ID Test, SERATEC PMB Testi ve DIMERTEST Lateks Testi'dir. Çalışma sonucunda metotlar hız, hassasiyet, güvenlik, iş gücü, maliyet, taşınabilirlik ve rutin laboratuvara adaptasyon gibi kriterlere göre tartışılmış ve metotlar sıralanan kriterlere göre yapılan değerlendirmede menstrüel kanın tanımlanmasında SERATEC PMB Testi ve DIMERTEST Lateks Test hızlı taramada öne çıkarken, ParaDNA BF ID Testi ile diğer RNA dayalı ters transkriptaz kantitatif PCR'ın yüksek başlangıç maliyetine sahip olsa da yanlış pozitif olasılığını düşük olması ve minimum numune kaybı ile uzun vadede maliyet etkinliği sunduğu anlaşılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Adli bilimler, Biyobelirteçler, Kimlik tespiti, Mikro RNA, Vücut sıvılarının tanımlanması

ABSTRACT

Comparison of Identification Methods Used in Menstrual Blood Identification for Forensic Purposes from Various Perspectives

Identification of body fluids, which are frequently used in forensic applications, plays a very important role in determining the crime/criminal and in scientific studies. Biological findings such as blood, semen, saliva, saliva, saliva, vaginal secretions, which are among the most important evidence that can be obtained from the crime scene, bring along the identification process. Blood is one of the most common body fluids found at crime scenes. Since these evidences is biological, it is very important to minimize possible problems such as deterioration and contamination in this process starting from the sampling stage and to choose a successful and fast method for the identification of these body fluids. In this study, the methods used for the identification of menstrual blood were listed and evaluated according to different criteria (speed, sensitivity and sample quantity, safety, workforce, cost, portability and adaptability to the routine laboratory) and the advantages/disadvantages of each criteria for different methods. The methods used were divided into microscopic methods and molecular methods and 3 commercial test kits were compared. These kits are ParaDNA Body Fluid ID Test, SERATEC PMB Test and DIMERTEST Latex Test. As a result of the study, the methods were discussed according to criteria such as speed, sensitivity, safety, workforce, cost, portability and adaptability to routine laboratory use. In the evaluation of the methods according to the criteria listed, SERATEC PMB Test and DIMERTEST Latex Test stand out in rapid screening for the identification of menstrual blood, while ParaDNA BF ID Test and other RNA-based reverse transcriptase quantitative PCRs have a high initial cost, but offer cost-effectiveness in the long term with low false positive probability and minimal sample loss.

Keywords: Forensic science, Biomarkers, Identification, Micro RNA, Body fluid identification

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Vücut sıvılarının tanımlanması, bir şüphelinin kimliğinin belirlenmesine yardımcı olabileceği ve gerçekleşen suç faaliyetinin türü hakkında bilgi sağlayabileceği için adli bilimlerin çalışmalarının önemli bir yönüdür. Olay yerinde en sık karşılaşılan vücut sıvıları arasında periferik kan, menstrüasyon kanı, seminal ve vajinal sıvı ile gözyaşı ve tükürük yer alır. Kan görsel olarak diğer sıvılardan kolayca ayırt edilebilirken, periferik kan ile menstrüasyon kanını birbirinden ayırmak için daha detaylı analiz gerekmektedir. Periferik kanın varlığı travmatik bir nedene işaret edebilir veya bir şiddet eyleminin gerçekleşmiş olma olasılığını destekleyebilir. Menstrüel kan varlığı ise cinsel saldırı iddiası söz konusu olduğunda önemli bir bulgu olabilir.

Adli bilimlerde süregelen gelişmeler ve zamanla değişen ve gelişen teknoloji ile vücut sıvılarının tanımlanmasında daha hızlı ve daha güvenilir metotlar geliştirilmiştir. Bu çalışmada günümüzde menstrüel kanın tanımlanması amacıyla kullanılan yöntemlerin farklı kriterler açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Vücut sıvıları, failin kimliğini tespit etmek için kullanılabilecek değerli DNA kanıtları içerir. Vücut sıvısı ile DNA profili arasında bir bağlantı kurulması bu kanıta daha fazla ağırlık kazandırır¹. Adli bilimlerde vücut sıvılarının tanımlanması büyük önem taşır. Adli topluluğun karşılaştığı zorluklardan biri, Adli tıp camiasının karşılaştığı zorluklardan biri, güvenilir bir biyobelirtecini nasıl bulunacağı ve vücut sıvılarının hızlı bir şekilde tanımlanması için doğru bir yöntemin nasıl geliştirileceğidir.² Olay yerinde bulunan biyolojik materyalin tanımlanması, suçun/olayın yeniden yapılandırılmasında kullanılabilir. Belirli bir vücut sıvısının mevcut olup olmadığının belirlenmesi ve daha sonra bunun tanımlanması, adli bilimler araştırmalarında genellikle DNA profilinin çıkarılmasından önceki ilk adımdır³.

Vücut sıvıları serolojik testlerle, doğal formlarında (sıvı veya sıvı-katı karışmış şekilde) veya olay yerindeki kalıntılar (kurumuş leke, başka sıvı veya katı maddelerle karışmış vs.) olarak tespit edilebilir ve tanımlanabilir⁴. Vücut sıvısı içerdiğinden şüphelenilen bulgular serolojik testler ve DNA analizi için laboratuvarlara gönderilir. Fakat serolojik analiz aşaması öncesinde eşyaların serolojik teste tabi tutulup tutulmayacağı veya doğrudan DNA analizine gönderilmesi gerekip gerekmediğinin belirlenmesi gerekmektedir⁵. Her vücut sıvısı, güvenilir DNA analizi için spesifik metot ve prosedür gerektirir.

Birçok farklı vücut sıvısı olay yerinde bulunabilir. Kan, tükürük, meni, vajinal salgılar ve idrar gibi biyolojik deliller olay yerine suçlu ve/veya kurban tarafından bırakılır. Örneğin, bir hırsız kendini yaralayabilir ve olay yerinde kan bırakabilir veya bir vandalizm eylemi olarak evin eşyaları üzerine tuvaletini yapabilir^{6,7}. Cinsel saldırı olayını içeren bir başka olayda vücut sekresyonları olay yerinde ve/veya mağdurun vücudunda görülebilir. Olay yerinden ve/veya şüpheli/mağdurdan alınan bulguların analizlerinin serolojik analizi varsayımsal ve doğrulayıcı testler ile gerçekleştirilir. Varsayımsal testler, hassas ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilen metodolojilere dayanır, ancak vücut sıvısına özgü değildir. Varsayımsal testler yalnızca sıvının mevcut olup olmadığını gösterebilir. Diğer yandan, doğrulayıcı testlerin tanımlanması istenen vücut sıvısına özgü olması beklenir.

3. ADLİ BİLİMLER VE MENSTRÜEL KAN

Vücut sıvılarının tanımlanması, bir şüphelinin kimliğini belirlemenin yanı sıra, suçun niteliği hakkında bilgi sağladığı için büyük bir öneme sahiptir. Olay yerinde en yaygın karşılaşılan vücut sıvıları arasında venöz kan, menstrüel kan, meni, vajinal sekresyon ve tükürük bulunmaktadır. Kan, olay yerinde en sık rastlanan vücut sıvılarından biridir ve diğer sıvılardan görsel olarak kolayca ayırt edilebilir. Periferik kan ile menstrüel kanın ayrımında daha spesifik bir yöntem ihtiyacı olduğundan bu iki farklı vücut sıvısının ayrımının doğru yapılması önemlidir. Olay yerinde periferik kanın varlığı, bir travmanın veya şiddet eyleminin gerçekleşmiş olabileceğini gösterirken, menstrüel kanın doğru tespiti, cinsel saldırı suçu söz konusu olduğunda önemli bir bulgu haline gelebilir ve olay yerinin yeniden canlandırılmasına ve bu yolla suç olayının dinamiklerinin anlaşılması için de önemli bir rol oynamaktadır katkıda bulunabilir.

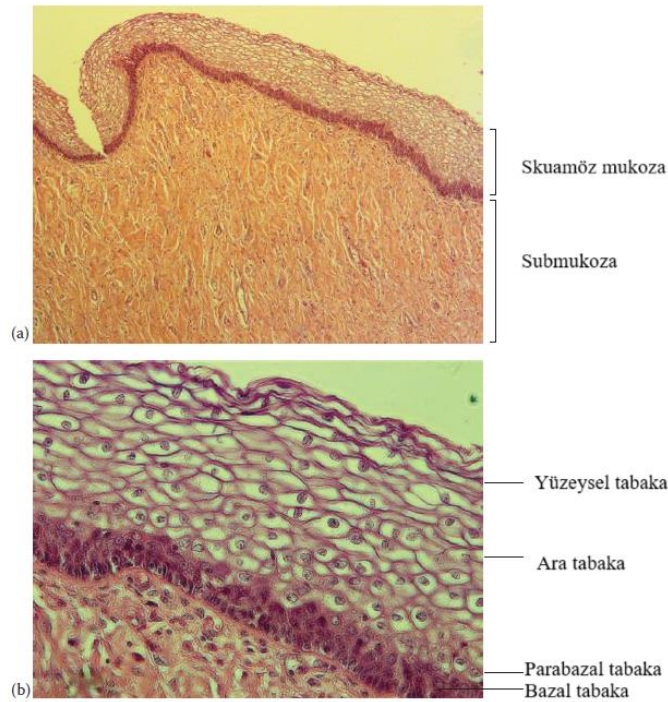
Örneğin, farklı vücut sıvılarının bulunduğu yer/yerler, olayın nasıl gerçekleştiği konusunda ipuçları verebilir ve kan lekelerinin dağılımı ise muhtemel bir saldırının yönü ve şiddeti hakkında bilgi sağlayabilir. Bu nedenle, adli bilimler uzmanları, olay yerindeki vücut sıvılarını inceleyerek, suçun aydınlatılmasına katkıda bulunabilirler. Sonuç olarak, vücut sıvılarının analizi, adli bilimlerde kritik bir yer tutmakta ve suçların çözülmesinde önemli bir araç olarak değerlendirilmektedir.

3.1 Vajinal Epitel Hücreleri

Normal bir insan vajinası, epitel dokudan oluşur ve skuamöz mukoza ile kaplıdır. Skuamöz mukozanın altında bol miktarda bağ dokusu ve kılcal damar içeren submukoza bulunur. Submukozanın altında düz kastan oluşan muskularis bulunur. Skuamöz mukoza çok sayıda hücre katmanından oluşur. Bazal hücreler küçük boyutlu olup nispeten büyük çekirdeklere sahiptir ve yüksek oranda proliferatiftir. Hücreler bazal tabakadan parabazal tabakaya doğru göç ettikçe, farklılaşmaya uğrar.

Ara tabakada hücreler düzleşir ve çekirdekleri sıkışır. Epitel hücreleri yüzeysel tabaka olan apikal tabakaya ulaştığında, hücreler küçük ve yoğun çekirdekleri ile tamamen farklılaşmıştır.

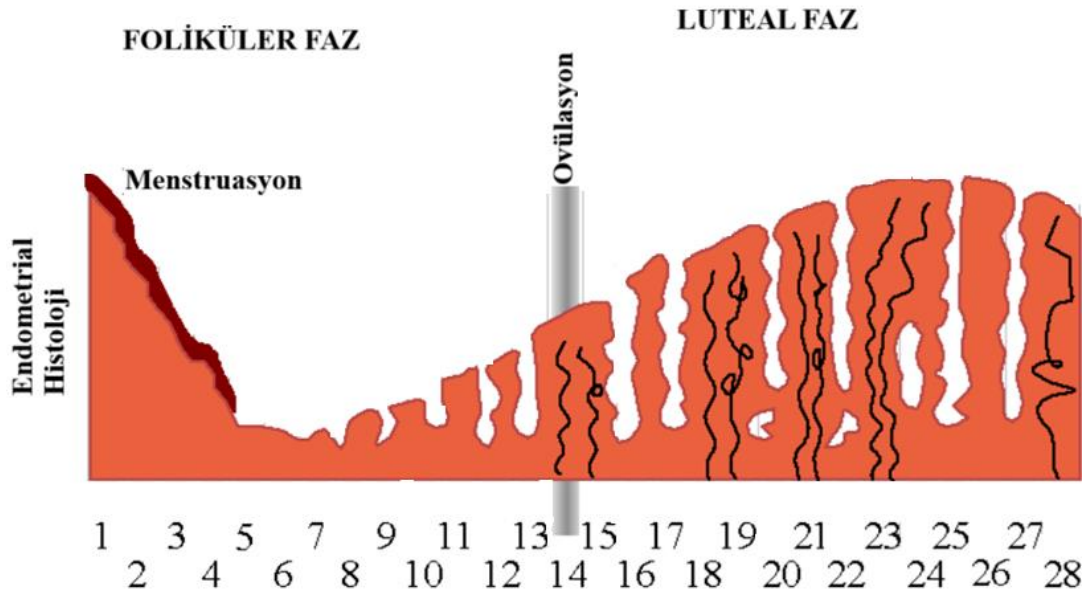
Vajinal epitel hücreleri deri hücrelerinden farklı olarak keratin depolamaz. Ara ve yüzeysel tabaka hücreleri sitoplazmalarında bol miktarda glikojen içerir. Bu hücrelerde glikojen bulunması normal gelişimin ve vajinal epitel hücrelerinin farklılaşmasının bir göstergesidir. Vajinal skuamöz mukozanın apikal yüzeyi genellikle epitelin derinliklerinde bulunan bezlerden salgılanan mukus ile kaplıdır (şekil 1). Apikal katmanlardaki hücreler zamanla parçalanır ve sürekli olarak daha derin katmanlardaki hücrelerle yer değiştirir. Bulgu toplanması sırasında vajinanın iç yüzeyinden örnek alındığında, genellikle az sayıda parabazal hücre içeren glikojenli hücreler elde edilir. Vajinanın yanı sıra ağız boşluğu, yutak, yemek borusu, anüs ve üretranın apeksinde de glikojenli yassı epitel hücreleri bulunur. Vajinal epitel hücrelerinin farklılaşması östrojen gerektirir. Ancak premenarş ve postmenopozal kadınlarda östrojen seviyeleri çok düşüktür; bu nedenle vajinal epitel hücreleri yalnızca parabazal hücrelere farklılaşır. Bu kişilerden alınan örneklerde öncelikle parabazal hücreler bulunur⁸.



Şekil 1: İnsan vajinal dokularının histolojik yapısı. (a) Skumöz mukoza ve Submukoza. (b) Skumöz mukozada çoklu hücre katmanları⁹

3.2 Menstrüasyon ve Menstrüel Kanın Bileşimi

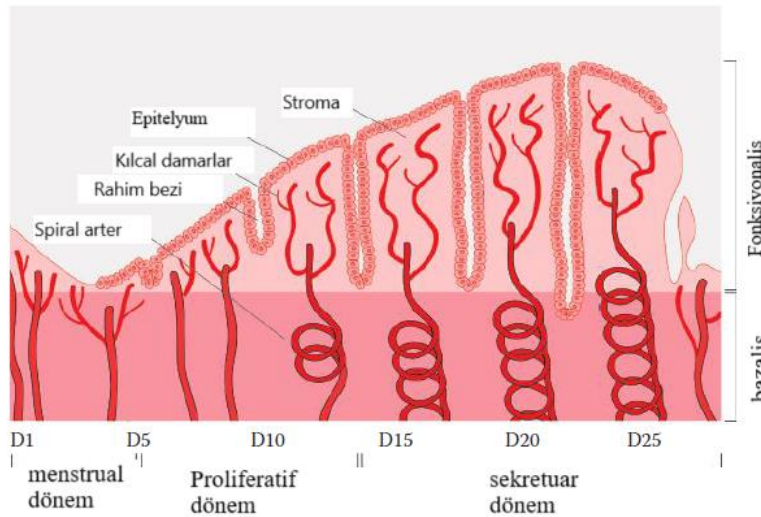
Menstrüasyon, üreme çağındaki kadınlarda aylık olarak meydana gelen rahim iç zarının dökülmesi olarak tanımlanır. Ortalama menstrüasyon döngüsü, bir döngünün ilk gününden diğerinin ilk gününe kadar ölçülen yaklaşık 28 gündür. İki veya üç günlük bir sapma yaygındır. Döngünün ritmi hormonlara bağlıdır. Rahim duvarı dışta perimetrium, ortada myometrium ve içte endometrium olmak üzere üç katmandan oluşur. Menstrüasyon sırasında, endometriyumun yüzeysel tabakası hormonal değişiklikler nedeniyle dökülür. Bu tabakada bulunan kan damarları dökülme işlemi sırasında hasar gördüğünden kanama meydana gelir. Şekil 2’de menstrüel döngü boyunca endometriyum kalınlığındaki farklılıkların görüldüğü endometriyum kesiti gösterilmektedir. Endometriyum, çoğu döküldüğü için kanamadan sonra en ince halini alır. Duvarın içindeki sarmal arterler de gösterilmiştir ve hasar gören ve kanamaya neden olan damarları temsil etmektedir. Kanama süresi 3-5 gündür ve ortalama kan kaybı yaklaşık 50-200 mL arasındadır¹⁰. Menarştan menopoza kadar, kadınlar üreme çağıları boyunca 400 kez menstrüasyon yaşayabilirler^{8,11}.



Şekil 2: Menstrüel Döngü Sırasında Endometriyal Histoloji¹¹

Endometrium miyometriyum (kas tabakası) üzerinde uzanan bazal tabaka (endometrium bazalis) ve uterus lümenine bakan fonksiyonel tabakadan (endometrium fonksiyonalis) oluşan iki bölgeye ayrılır. Endometrium fonksiyonalis, endometriyumun lüminal kısmıdır. Endometriyumdaki döngüsel değişikliklerin olduğu bölgedir ve menstrüasyon sırasında dökülür. Endometrium bazalis ise endometriyumun bazal kısmıdır ve menstrüasyon sırasında dökülmez. Bu bölge, bir sonraki döngü sırasında fonksiyoneli yenilemek için hücreler üretir. Uterus döngüsü sırasında, fonksiyonel kısımda tekrarlayan fizyolojik değişiklikler meydana gelir⁸.

Döngü üç evreye ayrılır: menstrüel, foliküler ve luteal faz evreler. Menstrüel kanamanın ilk günü menstrüel fazın başlangıcı olarak kabul edilir. Menstrüel faz sırasında, endometrium fonksiyonalis dejenere olur ve uterus duvarından sıyrılır ve kanamayı meydana getirir. Foliküler faz sırasında, endometriyum fonksiyonalis, spiral arterlerin de çoğaldığı rejenerasyona başlar. Salgı fazı sırasında spiral arterler daha da gelişir ve kıvrılır (şekil 3). Gebelik olmadığında, progesteron seviyesindeki azalma spiral arterlerin daralmasına yol açar ve fonksiyonel iskemi durumu oluşur (yetersiz kan akışı) ve hipoksiye (dokuda düşük oksijen seviyeleri) yol açar. Buna ek olarak, enzimatik bir bozunma sürecinin aktivasyonu, menstrüasyon sırasında fonksiyonelin yıkımına ve dökülmesine neden olur. Menstrüel sıvı kan, endometrium fonksiyonalis dokusu ve mukus içerir⁸.



Şekil 3: Bir menstrüel siklus sırasında uterus mukozasının işlevselliğindeki değişiklikler⁹ (D=gün)

Menstrüel kanda endometrium artıkları, katabolitler (yıkım ürünleri), prostoglandinler, enzimler, servikal mukus, vajinadan dökülen hücreler ve bakteriler bulunur. Kanama yüksek miktarda olmadıkça, endometrium tarafından salgılanan fazla miktardaki fibrinolizin adlı enzim tarafından menstrüel kanın pıhtılaşması önlenir. Fibrinolitik ürünler kan pıhtısı oluşumunun önlenmesi ile ilişkilidir. Normalde, bir doku veya damar yaralandığında, yüksek miktarda kan kaybını önlemek için pıhtılaşma mekanizması devreye girer. Endometriumdaki damarlar hasar gördüğünde pıhtılaşma süreci aktive olur. Kanın vajinadan dışarı akması ve rahimde birikmemesi için sıvı formda kalması önemlidir. Bu nedenle, menstrüel kanda fibrinolitik veya pıhtı çözücü maddelerin varlığı söz konusudur⁸.

3.3 Menstrüel Kan İnceleme Metotları

Menstrüel kanın tespiti için günümüze kadar çeşitli yöntemler araştırılmış ve kullanılmıştır. Bunlar arasında mikroskopik inceleme, laktat dehidrojenaz izoenzimlerinin elektroforetik tanımlanması, fibrinolitik ürünlerin tespiti ve mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ve mikro RNA (miRNA) profilinin çıkarılması yer almaktadır⁹.

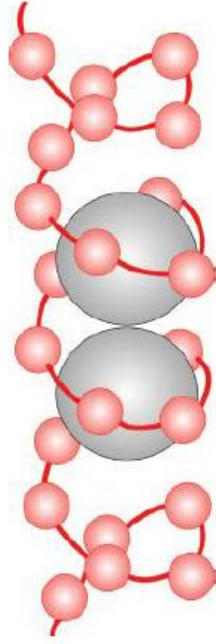
3.3.1 Mikroskopik Yöntemler

3.3.1.1 Lugol İyot Boyama Yöntemi

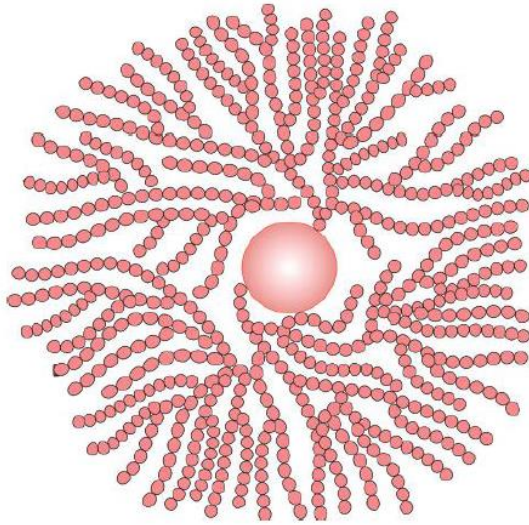
Adını Fransız doktor Jean Lugol'den alan Lugol iyot çözeltisi, adli uygulamalarda glikojenlenmiş vajinal epitel hücrelerinin tanımlanması için kullanılmıştır. Bu teknik, iyodun hücre içi glikojen ile reaksiyona girerek bir renk oluşturması prensibine dayanmaktadır. Glikojen, hayvan ve insan hücrelerinde glikozun temel depolama şeklidir ve birçok dokuda hücrelerin sitoplazmasındaki granüllerde bulunur. Şekil 4'te de görüldüğü gibi glikojen, D-glikoz birimlerinden oluşan bir polisakkarittir.

Lugol testi, çekirdekli skuamöz epitel hücrelerinde glikojeni tespit etmek için iyot bazlı bir testtir. Test, üreme döneminde (menarştan menopoza kadar) vajinal epitel hücrelerinin çok yüksek glikojen içeriğine sahip olduğu prensibine göre çalışır. Ortalama olarak vajinal hücrelerin %25'i glikojen varlığını gösterir¹².

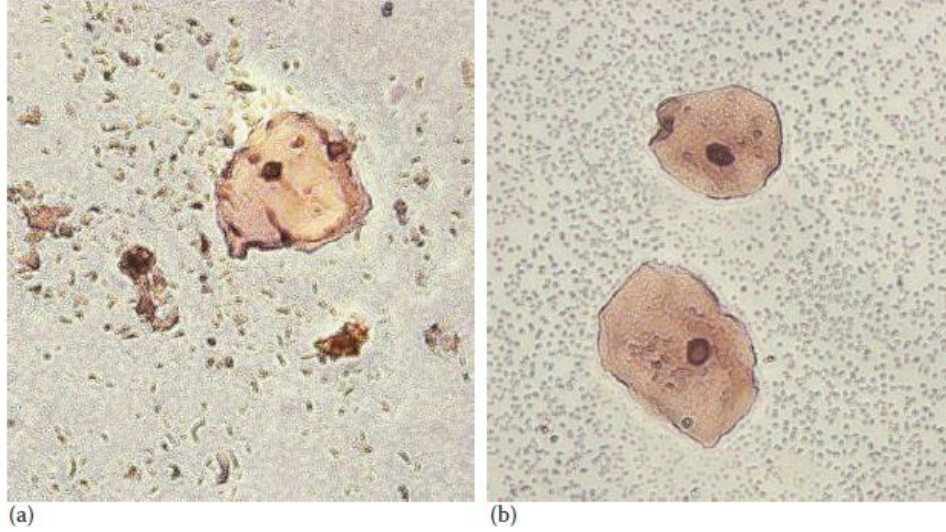
Lugol stok çözeltisi %5 iyot (I₂) ve %10 potasyum iyodür (KI) içeren sulu bir çözeltidir. Potasyum iyodür, triiyodür iyonu oluşumu yoluyla iyodun suda çözünür olmasını sağlar. Vajinal epitel hücrelerini boyamak için genellikle stok solüsyonun %5'i çalışma solüsyonu olarak kullanılır. İyot atomları, koyu kahverengi bir glikojen-iyot kompleksi oluşturmak üzere glikojen sarmallarına yerleşir (şekil 5). Hücresel sitoplazma, berrak, yuvarlak, lekesiz bir çekirdeğe sahip, görünüşte çikolata kahverengisidir; glikojenlenmemiş hücreler altın sarısı renkte boyanır. Glikojenli hücrelerin yaklaşık %10'unun saptanması, vajinal epitel varlığının olası bir göstergesi olarak kabul edilir. Çünkü ağızda, penis üretrasında ve rektumda daha düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır^{13,14}. Vajinal epitel hücrelerinin sitoplazması şekil 6'da görüldüğü gibi magenta renginde, çekirdeği ise mor renkte boyanır.



Şekil 4: Glikojen yapısı⁹



Şekil 5: Glikojen-iyot kompleksinin diyagramı ⁹

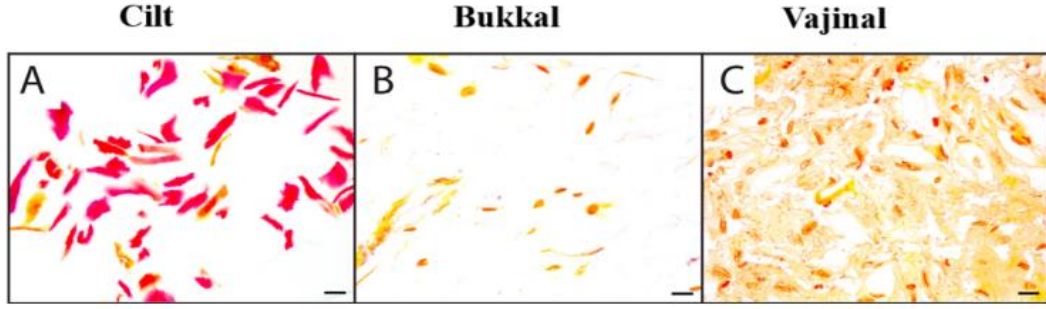


Şekil 6: Lugol'ün iyot çözeltisi ile boyanmış epitel hücreleri. (a) Vajinal ve (b) bukkal epitel hücreleri⁹

3.3.1.2 Dane'in Boyama Yöntemi

Deri, bukkal ve vajinal epitel hücrelerini içeren kanıtlar, özellikle cinsel saldırı vakalarında adli soruşturmalarda sıklıkla olay yerinden elde edilmektedir. Bu nedenle, bu hücreler arasında ayırım yapmak gereklidir. Deri, bukkal ve vajinal epitel hücreleri katmanlı skuamöz epitel hücreleridir.

Farklılaşmış deri epitel hücreleri keratinize olup keratinize yassı epitel hücreleri olarak sınıflandırılırken, bukkal ve vajinal epitel hücreleri keratinize olmayan yassı epitel hücreleridir. Ayrıca, deri epitel hücreleri farklılaşma sırasında çekirdeklerini ve diğer hücresel organellerini kaybeder. Buna karşın, bukkal ve vajinal hücreler çekirdek içerir. Morfolojilerine dayanarak, deri epitel hücrelerini bukkal ve vajinal epitel hücrelerinden ayırt etmek mümkündür. Ancak bukkal ve vajinal hücreler morfolojik olarak birbirlerinden ayırt edilemezler. Lugol'un iyot solüsyonu vajinal epitel hücrelerini boyayabilmesine rağmen, bu boyalar vajinal hücreleri ağız mukozasındaki ve idrar yollarındaki diğer glikojenli epitel hücrelerinden ayırt edemez. Her üç hücre tipini de ayırt etmek için Dane'in boyama yöntemi geliştirilmiştir. Deri hücreleri kırmızı ve turuncu; bukkal hücreler kırmızı çekirdekli ağırlıklı olarak turuncu-pembe; vajinal hücreler ise turuncu çekirdekli parlak turuncu olarak boyanır¹⁵ (şekil 7)



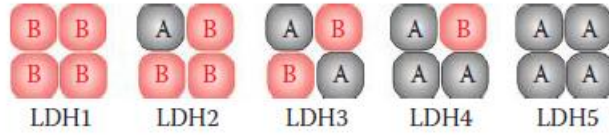
Şekil 7: Farklı hücrelerin Dane'in boyama yöntemi ile boyanması¹⁶

3.3.2 Moleküler Yöntemler

3.3.2.1 Laktat Dehidrojenaz (LDH) İzoenzimlerinin Elektroforetik Tanımlaması

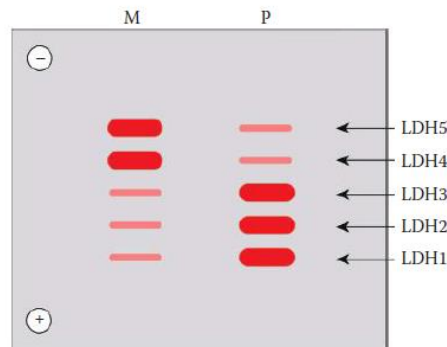
LDH enzimi, glikolizde önemli bir rol oynar ve birden fazla moleküler forma veya izoenzime sahip olduğu kabul edilen ilk enzimdir¹⁷. İnsanlarda LDH, oksijen miktarı sınırlı olduğunda pirüvatın laktata geri dönüşümlü indirgenmesini katalize eder. LDH'ler çeşitli insan dokularında bulunur. İnsan laktat dehidrojenazları dört alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir. Alt birimleriyle birlikte beş tip izozim gösterilmiştir. Kanda beş izoenzim bulunabilir. Şekil 9'da görüldüğü gibi LDH1 dört özdeş B alt biriminden oluşur; LDH2 bir A ve üç B alt biriminden oluşur; LDH3 iki A ve iki B alt biriminden oluşur; LDH4 üç A ve bir B alt biriminden oluşur ve LDH5 dört özdeş A alt biriminden oluşur. Beş izoenzim elektroforez kullanılarak, elektroforetik hareketliliklerine göre beş bant üretir. LDH1 en yüksek elektroforetik hareketliliğe (pozitif yüklü bir elektrot olan anoda doğru) ve LDH5 en düşük elektroforetik hareketliliğe sahiptir⁸ (şekil 8).

Periferik kanda LDH1, 2 ve 3 izoenzimlerin baskın iken, LDH4 ve 5 izoenzimleri minör düzeydedir. Buna karşılık menstrüel kanda LDH4 ve 5 izoenzimler baskın iken, LDH1, LDH2 ve LDH3 miktarları değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle LDH izozimlerin elektroforetik analizi ile menstrüel kanın periferik kandan ayırt edilebildiği belirtilmektedir⁸.



Şekil 8: LDH izozimlerinin elektroforetik ayrımı⁹

Menstrüel kan lekelerinde LDH-4 ve LDH-5 yüksekliğinin endometrial bileşenlerin varlığı ve yüksek lökosit konsantrasyonu ile ilişkili olduğu yapılmış çalışmalarla belirtilmiştir. LDH seviyeleri donörden donöre ve menstrüel döngünün farklı günlerinde farklılık gösterir. Araştırmalar ayrıca kan ve meni içermeyen vajinal sürüntülerin LDH-4 veya LDH-5'in varlığını gösterebileceğini ve periferik kan ve vajinal sekresyon karışımına pozitif sonuç verebileceğini göstermiştir¹⁶. Bu nedenle menstrüel kanı diğer vücut sıvılarından ayırmada bu yöntem yeterli değildir. LDH-4 ve LDH-5 toplamının ortalama değeri menstrüel kanında en yüksektir, bunu sırasıyla doğum sırasında dökülen kan, kadavra kanı ve normal kan takip etmiştir¹⁶.



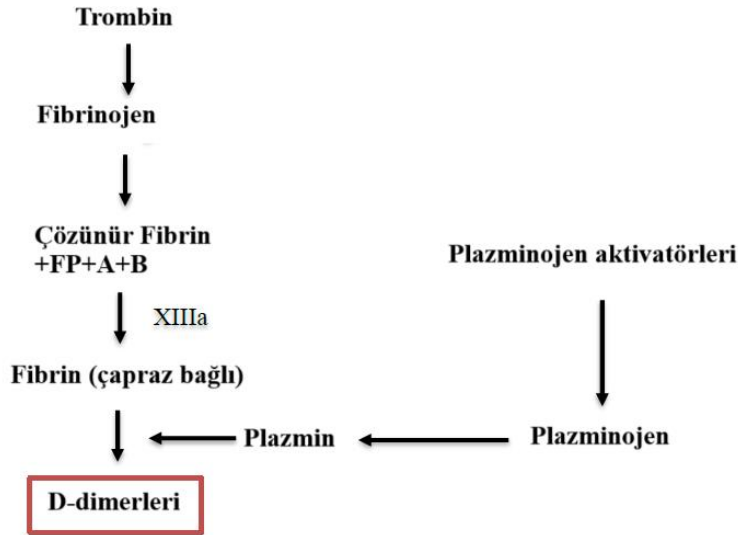
Şekil 9: LDH izoenzim yapıları ⁹

3.3.2.2 Fibrinolitik Ürünlerin Tespiti

Menstrüel kan ile periferik kan arasındaki en belirgin farklardan biri menstrüel kanının pıhtılaşmamasıdır¹⁸. Periferik kanda pıhtılaşma süreci üç ana adımdan oluşur:

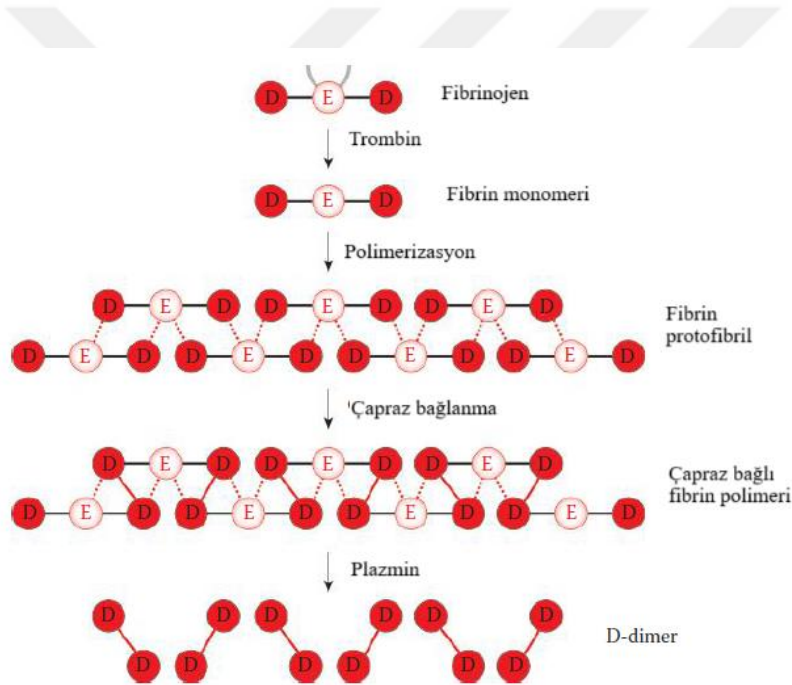
1. Damar hasarlandığında protrombin aktivatör kompleksi oluşur.
2. Bu kompleks, protrombinin proteolitik bir enzim olan trombine aktivasyonunu katalize eder.
3. Trombin, fibrinojeni, fibrin iplikleri üzerinde polimerleşerek pıhtıyı oluşturan peptitlere ayırır.

Birçok farklı pıhtılaşma faktörü daha bu sürece dahildir. Öte yandan pıhtı lizis süreci, plazminojenin plazmin enzimine aktivasyonunu gerektirir. Bu, D-dimer dahil olmak üzere çeşitli fibrin-fibrinojen bozunma ürünleri (FDP'ler) üretir (şekil 10). Menstrüel kan, periferik kanda bulunan çok sayıda pıhtılaşma faktöründen yoksundur. Menstrüel kanda protrombin, serbest trombin, fibrinojen ve fibrin yoktur. Bunun yerine menstrüel kan, doku plazminojen aktivatörü ve FDP'ler açısından zengindir. Bu menstrüel kanı daha az FDP içeren periferik kandan ayırmak için kullanılmıştır.

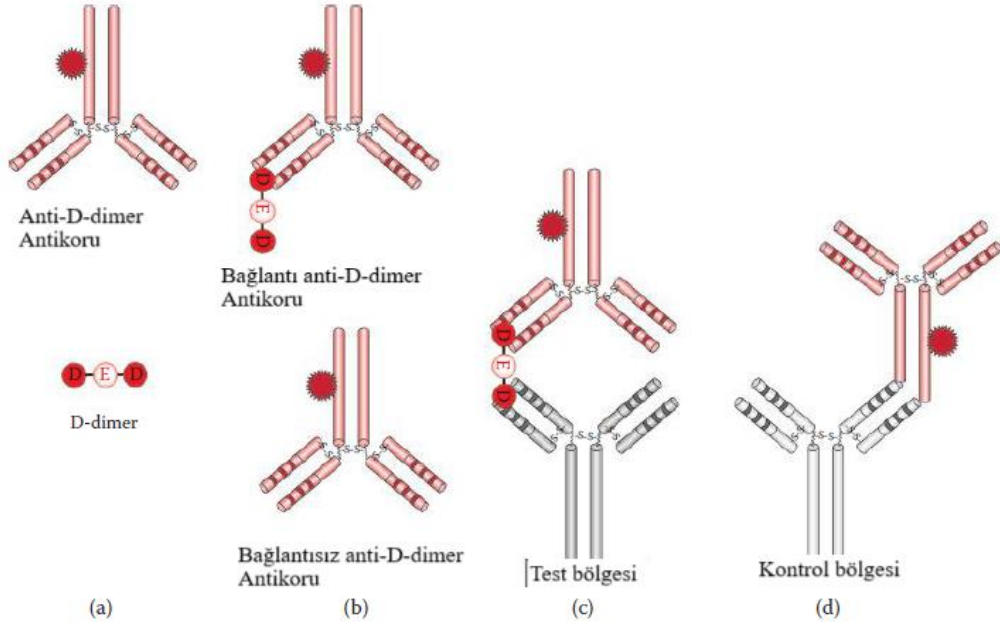


Şekil 10: Fibrinoliz yoluyla D-dimer oluşumu¹¹

Fibrinoliz sırasında, çapraz bağlı fibrin plazmin tarafından parçalanır ve D-dimer olarak bilinen bir bozunma ürünü üretilir (şekil 11). D-dimer parçaları için yapılan analizler, menstrüasyon kanının adli olarak tanımlanmasında kullanılmıştır. Lateks aglütinasyon deneyleri, aglütinasyon süreci sırasında kümeler oluşturmak üzere taşıyıcılar üzerinde bulunan antikorlar ve D-dimerlerin etkileşimine dayanır. İmmünokromatografik deneyler D-dimerlere özgü monoklonal antikorları kullanır (şekil 12). Bu immünokromatografik deney çok spesifik, hassas ve hızlıdır ve dakikalar içinde tamamlanabilir. İmmünokromatografik cihazlar taşınabilir ve bu nedenle potansiyel olarak olay yerinde kullanılabilir¹¹.



Şekil 11: Bir fibrin polimerinin oluşumu ve bozunumu⁹



Şekil 12: Menstrüasyon kanında D-dimer'in tanımlanması için immünokromatografik analiz çalışma prensibi ⁹

Miyaishi ve ark. menstrüel kanın ortalama D-dimer konsantrasyonunun periferik kandan 200 kat daha fazla olduğunu göstermiştir¹⁹. Bununla birlikte, FDP'lerin ve D-dimerlerin, tromboz gibi çeşitli koşullarda ve ölüm sonrası kanda periferik kandaki konsantrasyonu artar. Klinik tanıda fibrinojen için 500 ng/mL, D-dimer için 250 ng/mL eşik değer olarak kabul edilmektedir.

FDP ve D-dimer analizleri, minimum düzeyde eğitim gerektiren, menstrüel kanının tanımlanmasına yönelik hızlı, basit testler olma açısından hâlâ değer taşımaktadır. Ancak bu ürünlerin kullanımına ilişkin tüm araştırmalar klinik immünokromatografik testler kullanılarak yapılmıştır. Başlangıçta periferik kandaki D-dimerleri menstrüel kanın bir göstergesi olarak tespit etmek için geliştirilmiştir.

3.3.2.3 RNA'ya Dayalı Yöntemler

Menstrüel kan tanımlamasının bir yöntemi de mRNA ve miRNA belirteçlerini tespit etmektir.

Biyobelirteçler

Bir hücrede mRNA, genetik bilginin deoksiribonükleik asitten (DNA) proteinlere aktarılmasından sorumludur. Vücut sıvıları tipik olarak, mRNA transkriptlerinin karakteristik bir modelini ifade eden farklı hücre tipleri içerir. Yetişkin bir insanda farklı fonksiyonlar için özelleşen 210 farklı hücre tipi vardır. Bu farklı hücre tiplerinin bir arada olduğu çok hücreli transkriptomlardan yararlanarak vücut sıvılarının ayrımının mümkün olabileceği öngörülmüştür. Bu bağlamda Matriks metalloproteinazlardan MMP7, MMP10 ve MMP11'in menstrüel kanın tanımlanmasında potansiyel olarak kullanılabileceği öngörülmüştür²⁰. MMP'ler eksprese edilen çinko bağımlı endopeptidazlardır ve insan endometriyum dokularına özgü belirteçler olarak kabul edilir. Ayrıca sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi diğer proteinleri de parçalarlar. Birçok MMP, uterus döngüsü boyunca insan endometriyumunda ifade edilir. MMP gen ifadelerinin kalıpları, menstrüasyon sırasında endometriyum dokusunun parçalanmasındaki işlevleri ile ilişkilidir. MMP7 ağırlıklı olarak epitel hücrelerde eksprese edilirken, MMP11 endometriyumun stromal hücrelerinde eksprese edilir. MMP 7 ve 11'in menstrüel kan için güvenilir belirteçler olduğu gösterilmiştir²¹. MMP genlerinin ekspresyonunun menstrüel döngü boyunca değiştiği bulunmuştur, bu yüzden de numune menstrüasyonun ilk gününden alınmışsa MMP11 ile yanlış negatif sonuçların ortaya çıkabileceği gözlemlenmiştir. Hem MMP7 hem de MMP11 mRNA ekspresyonları menstrüel fazda yükselir ve proliferatif faz sırasında yüksek seviyelerde kalır. MMP mRNA'sının doğum sonrası, yara iyileşmesi ve metastatik kanser durumlarında yükselebileceği de bilindiğinden bu durumun potansiyel olarak menstrüel kanın yanlış pozitif olarak tanımlanmasına yol açabileceği unutulmamalıdır.

Menstrüel kanın tanımlanmasında mRNA'ya dayalı yaklaşımlar yanında miRNA'ya dayalı yaklaşımlar da test edilmiştir.

miRNA'lar, yaklaşık 23 nükleotid uzunluğunda olan ve mRNA'lara kıyasla bozulmaya karşı daha dayanıklı olan kısa RNA parçalarıdır. Tıpkı mRNA gibi dokuya özgü miRNA ifade profilleri gözlemlenmiştir²². Bu yaklaşımların ortak noktası, özgüllüğü doğrulamak için qPCR'nin kullanılmasıdır. Küçük boyutları, poli-A kuyruklarının olmaması ve diğer biyolojik faktörler nedeniyle miRNA'lar, mRNA'ya göre doğal olarak bozulmaya daha az duyarlıdır. Çoğu miRNA, DNA dizilerinden birincil miRNA'lara (pri-miRNA'lar) kopyalanır ve öncül miRNA'lara (pre-miRNA'lar) ve olgun miRNA'lara işlenir. Çoğu durumda, miRNA'lar ifadeyi baskılamak için hedef mRNA'ların 3' UTR'si ile etkileşime girer²³. Çoğu miRNA hücre içinde bulunur, ancak bazıları plazma, gözyaşı, beyin omurilik sıvısı ve tükürük dahil olmak üzere çeşitli vücut sıvılarında da bulunmuştur ve genellikle dolaşımdaki miRNA'lar olarak adlandırılmaktadır. Menstrüel kana spesifik olarak miR-205, miR-412 gibi örnekler vermek mümkündür²⁴. Dolaşımdaki bu miRNA'lar, paylaştıkları birkaç özellik nedeniyle avantajlıdır: ilk olarak, diğer RNA sınıflarının aksine, aşırı sıcaklık, pH ve kimyasal işlem koşullarında bile oldukça kararlıdır ve hücre dışı veziküllerde lipoprotein kompleksleri ve RNA bağlayıcı proteinler tarafından taşındıkları için endojen RNaz aktivitesinden korunurlar^{25,26}. Yakın zamanda yayınlanan ve adli vücut sıvısı tanımlaması için miRNA'ları inceleyen çalışmalarda mikroarray taramaları ve/veya ters transkripsiyon (RT)-qPCR kullanılmış ve çeşitli araştırma grupları tarafından adli olarak ilgili biyolojik sıvılar ve salgılar arasında ayırım yapabilen paneller tanımlanmıştır^{27,28}. Zubakov ve arkadaşları, miRNA'ların qPCR kullanılarak, mRNA'nın genel olarak tespit edilebilir sınırının çok altında, sadece pikogram toplam RNA'dan tespit edilebileceğini göstermiştir. Tablo 1'de literatürde bulunan ve menstrüel kanın tanımlanmasında kullanılabileceği belirtilen potansiyel mRNA ve miRNA biyobeliteleri aktarılmıştır²⁷.

miRNA	mRNA
miR-412	Matriks metalloproteinaz 7
miR-205	Matriks metalloproteinaz 10
miR-214	Matriks metalloproteinaz 11
miR-141-3p	

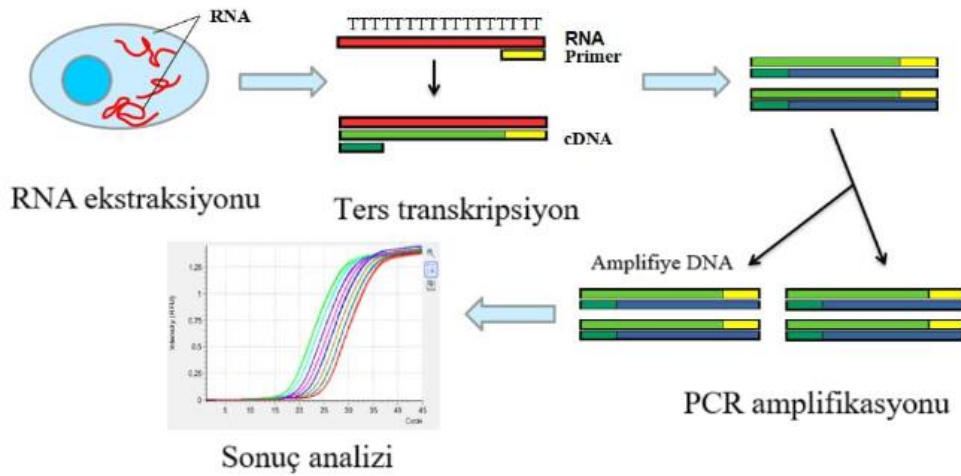
Tablo 1: Menstrüel kan identifikasyonu için literatürde bulunan bazı mRNA ve miRNA biyobelirteçleri²⁴

RT-qPCR

Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)), RNA'nın tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) ters transkripsiyonu ve PCR kullanılarak spesifik cDNA hedeflerinin amplifikasyonunu birleştiren güçlü bir laboratuvar tekniğidir. Bu yöntem öncelikle spesifik RNA miktarını ölçmek için kullanılır, bu da onu klinik teşhislerde gen ekspresyon analizi ve viral RNA nicel ölçümü için gerekli kılar. Süreç, ters transkriptaz enzimi kullanılarak RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesiyle başlar. cDNA sentezlendikten sonra, PCR amplifikasyonu için bir şablon görevi görür ve araştırmacıların RNA transkriptlerini yüksek hassasiyet ve özgüllükle tespit etmesine ve ölçmesine olanak tanır. RT-qPCR işlemi iki formatta gerçekleştirilebilir: tek adımlı ve iki adımlı reaksiyonlar. Tek adımlı RT-qPCR'de hem ters transkripsiyon hem de PCR

amplifikasyonu tek bir tüpte gerçekleşir, bu da kontaminasyon riskini en aza indirir ve işlem süresini azaltır (şekil 13). Bununla birlikte, bu yaklaşım daha az doğru olabilir ve RNA bozulmasına karşı daha hassastır. Buna karşılık, iki aşamalı RT-PCR, ters transkripsiyon ve amplifikasyon adımlarını farklı tüplere ayırarak daha fazla doğruluk ve cDNA'nın birden fazla deney için yeniden kullanılabilmesini sağlar^{9,29}.

RT-qPCR'nin avantajlarına rağmen, yanlış negatif potansiyeli ve primer tasarımının amplifikasyon verimliliği üzerindeki etkisi gibi sınırlamaları da vardır. RT-qPCR'nin avantajları arasında düşük miktardaki RNA'nın tespit edilmesini sağlayan yüksek hassasiyeti ve Northern blot gibi geleneksel yöntemlere kıyasla hızlı sonuç vermesi sayılabilir. Ayrıca, RT-qPCR kolayca otomatikleştirilebilir ve yüksek verimli uygulamalara olanak tanır. Bununla birlikte, kontaminasyonu önlemek için dikkatli deneysel tasarım gereksinimi ve doğru nicel ölçümü sağlamak için uygun kontrollere duyulan ihtiyaç dezavantajları arasındadır. Tek adımlı RT-qPCR stratejisi ile, tek adımlı tahlilde daha az reaktif gerekir ve bu da maliyeti düşürür. Ayrıca, iki ayrı sürecin tek bir adımda birleştirilmesi prosedürleri basitleştirebilir, zaman ve işçiliği azaltabilir. Tek adımlı reaksiyon potansiyel kontaminasyon risklerini de azaltabilir³⁰.



Şekil 13: RT-qPCR aşamaları³¹

RT-qPCR ürün analizi

RT-qPCR ürününün analizi, spesifik RNA transkriptlerinin varlığını ve miktarını belirlemede kritik bir adımdır. Ters transkripsiyon ve amplifikasyon işlemlerinden sonra, elde edilen cDNA tipik olarak agaroz jel elektroforezi kullanılarak analiz edilir. Agaroz jel elektroforezi PCR ürünlerinin büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlar; burada bantlar, boyutlarını tahmin etmek için önceden belirlenmiş DNA merdiveni ile karşılaştırılabilir. RT-PCR metodu numuneler arasında farklılıklar gösterebilir. Bunun nedeni, RNA transkriptlerinin farklı yapıları, çok küçük örneklerle çalışırken oluşan rastgele değişiklikler, RNA kalitesi ve engelleyici faktörlerin etkileri olabilir.

Buna karşılık, gerçek zamanlı qPCR, floresan sinyalleri aracılığıyla amplifikasyon sürecini gerçek zamanlı olarak izleyerek RT-PCR ürünlerinin daha nicel bir analizini sağlar. Bu teknik, araştırmacıların örnekteki başlangıç hedef RNA miktarı ile ilişkili olan eşik döngüsü (Ct) değerini belirlemelerini sağlar. Spesifik floresan boyaların veya probların kullanımı hassas nicel ölçüme olanak tanıyarak qPCR'yi gen ekspresyon seviyelerini ölçmek için tercih edilen bir yöntem haline getirir. Her iki yöntemin de avantajları olmakla birlikte, sınırlamaları da vardır. Sonuçların yorumlanması primer verimliliği ve reaksiyon karışımındaki inhibitörlerin varlığı gibi faktörlerden etkilenebilir.

4. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada menstrüel kanın tanımlanması için farklı metotlara dayanarak geliştirilen üç ticari kitin etkinliği karşılaştırılmıştır. Bunlardan birincisi önce DNA analizi için geliştirilen ve daha sonra vücut sıvılarının tanımlanmasına da olanak tanıyan mRNA'ya dayalı bir testtir. Diğer iki test kanın pıhtılaşma ve parçalanma sürecinde yer alan D-dimer protein parçacığının gösterilmesine dayalı immünokromotografik ve serolojik aglütinasyon testleridir.

1. Literatür Tarama:

- Menstrüel kanın identifikasyonu üzerine yapılan araştırmalar, Google Akademik, PubMed, ScienceDirect, ProQuest, NCBI, ResearchGate gibi bilimsel veri tabanları kullanılarak taranmıştır.
- Tarama sonucunda elde edilen tez, kit kullanım klavuzları ve makaleler, çalışmanın amacına uygunluklarına göre seçilmiştir.

2. Veri Analizi:

- Literatür taraması sonucu elde edilen çalışmalar, kullanılan yöntemler, ticari kitler ve elde edilen sonuçlar açısından analiz edilmiş, menstrüel kanın identifikasyonu için kullanılan yöntemler detaylandırılmıştır ve kıyaslanmıştır.

3. Teorik Çerçeve:

- Menstrüel kanın tanımlanması için kullanılan metodolojik yaklaşımlar ve ticari kitler açıklanmıştır.

4. Sonuçların Değerlendirilmesi:

- Literatürden elde edilen bulgular, hız, hassasiyet, güvenlik, işgücü, maliyet, taşınabilirlik ve rutin laboratuvara adaptasyon kriterleri açısından kıyaslanıp, avantajları ve sınırlamaları tartışılmıştır ve bu metotlar ve kitler kriterlere uygunluk açısından sıralanmıştır.

4.1 LGC ParaDNA Body Fluid ID Test

ParaDNA cihazı, yazılımı çalıştıran temel bir masaüstü bilgisayar veya dizüstü bilgisayarla birlikte kullanılan kompakt bir termal döngü cihazıdır. Şekil 14'te görüldüğü gibi numuneler ParaDNA Numune Toplayıcı kullanılarak toplanır ve reaksiyon plakalarına yerleştirilir. Bu plakalar daha sonra analiz için cihaz kafasına yüklenir.



Şekil 14: LGC ParaDNA Body Fluid ID Test cihazı³²

Kullanılan mRNA Belirteçleri

Daha önce belirtildiği gibi mRNA, belirli proteinlere ve dolayısıyla belirli vücut sıvılarına özgü olduğundan vücut sıvısının tanımlanmasında faydalıdır. Menstrüel kanın tespiti için LGC ParaDNA Body Fluid ID Test için kullanılan mRNA belirteci MMP10'dur. Aşağıdaki tabloda farklı vücut sıvıları için belirteçler belirtilmiştir.

mRNA Marker	Tanımlanan Vücut Sıvısı
SEMG1	Semen
PRM2	Sperm
CYP2B7P1	Vajinal sekresyon
MMP10	Menstrüel kan
ALAS2	Periferik kan
HTN3	Tükürük

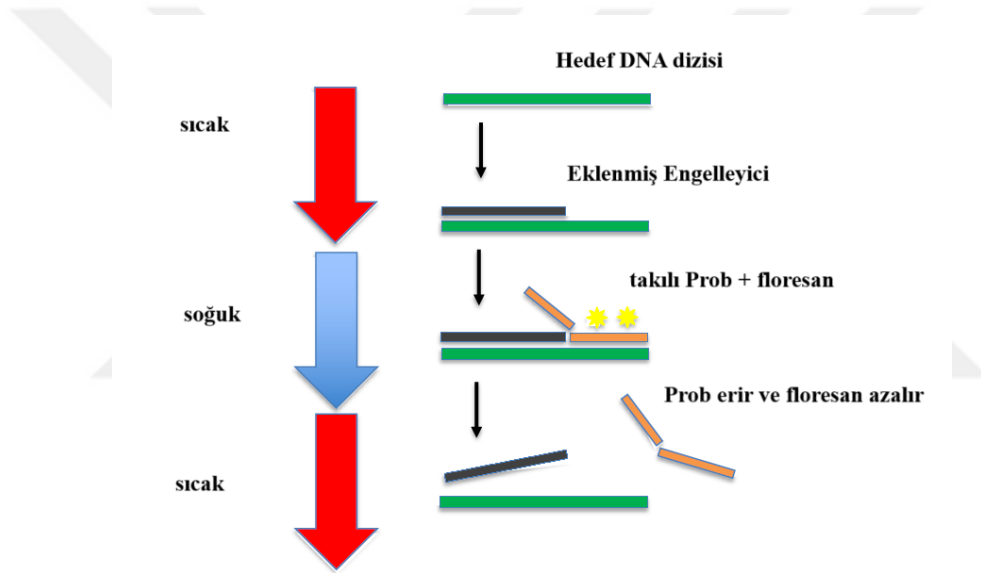
Tablo 2: ParaDNA Body Fluid ID Testide analiz edilebilen mRNA biyobelirteç listesi

ParaDNA Body Fluid ID Testi, aynı anda birden fazla vücut sıvısını tarayabilme yeteneğine sahip olup, belirli sıvıların varlığını doğrulama işlemini gerçekleştirmektedir.

Vücut sıvıları, spesifik bir vücut sıvısına özgü mRNA belirteçleri kullanılarak tanımlanır. Çoğu mRNA profillemeye yöntemi, RNA analizi ve yorumlama konusunda deneyimli uzmanlar gerektirir ve çok aşamalıdır. ParaDNA Body Fluid ID Testi, yaklaşık 90 dakika içinde otomatik sonuçlar veren hızlı, tek adımlı, kullanımı kolay bir yöntemdir. Tükürük, periferik kan, menstrüel kan, vajinal sıvı, seminal sıvı ve spermatozoa olmak üzere altı farklı vücut sıvısını tanımlayabilir³³.

HyBeacons Floresan Prob Teknolojisi

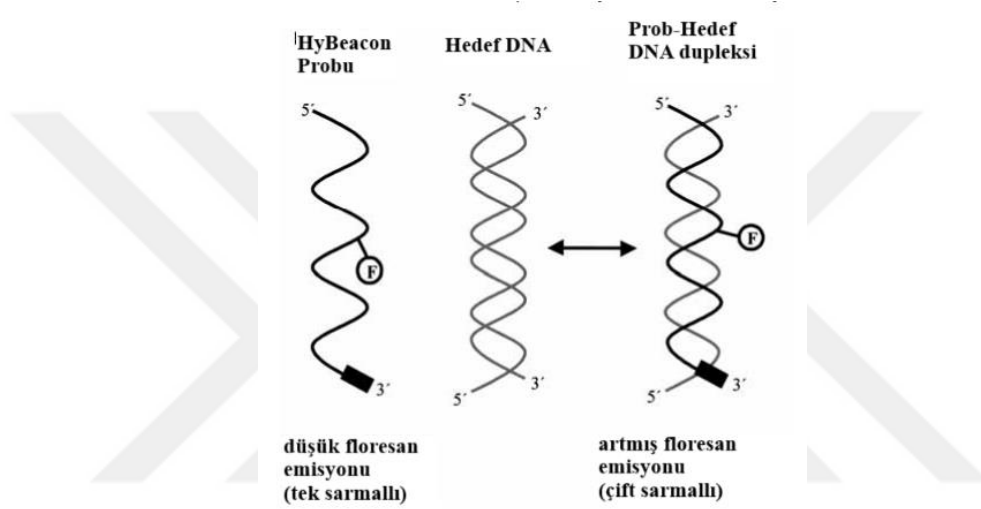
LGC tarafından geliştirilen HyBeacons Teknolojisi, gerçek zamanlı PCR (qPCR) uygulamalarında belirli nükleik asit dizilerinin tespiti için kullanılır. Bu teknoloji, hedef DNA'larıyla hibridizasyon sırasında floresan veren HyBeacons olarak bilinen florojenik hibridizasyon problemlerini kullanır. Bu floresans, PCR amplifikasyonunun gerçek zamanlı olarak hassas bir şekilde izlenmesini sağlayarak genetik dizilerin doğru ve etkili bir şekilde tespit edilmesini sağlar (şekil 15).



Şekil 15: HyBeacons süreci temsili ³⁴

ParaDNA BF ID Test, verileri işlemek için LGC'nin tescilli HyBeacons floresan prob teknolojisini kullanır. HyBeacons, floresan boyalarla etiketlenmiş, sentezlenmiş DNA'nın kısa molekülleridir. Bu moleküller tamamlayıcı DNA'ya bağlandıklarında parlak bir şekilde floresan ışık saçarlar (şekil 16).

Floresan boya etiketli probalar, HyBeacons teknolojisine uygunlukları nedeniyle seçilen tamamlayıcı DNA zincirinde bulunan spesifik bilgilendirici RNA işaretleyici dizilerini hedefler³⁵. cDNA üzerindeki bu diziler PCR kullanılarak çoğaltılır ve soğuduktan sonra hedef DNA dizisine bir bloker molekül bağlanır. Bloker moleküller, hedef diziye rekabetçi bir şekilde bağlanan oligonükleotitlerdir. Daha sonra HyBeacons probu kalan diziye bağlanır ve boyanın floresans vermesine neden olur. Sıcaklık arttıkça prob hedef diziye eriterek floresansta ölçülebilir bir azalmaya neden olur³⁴.

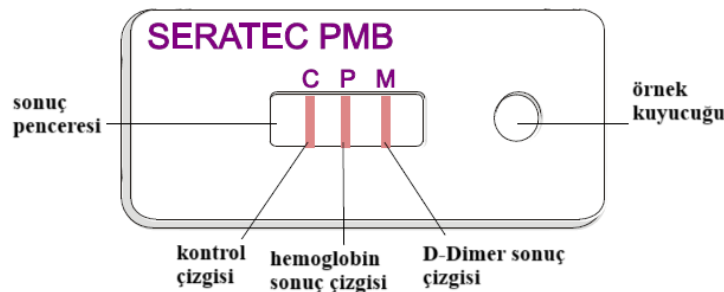


Şekil 16: HyBeacon probunun yapısı ve hedef tespit yöntemi³⁶

4.2 SERATEC PMB Testi

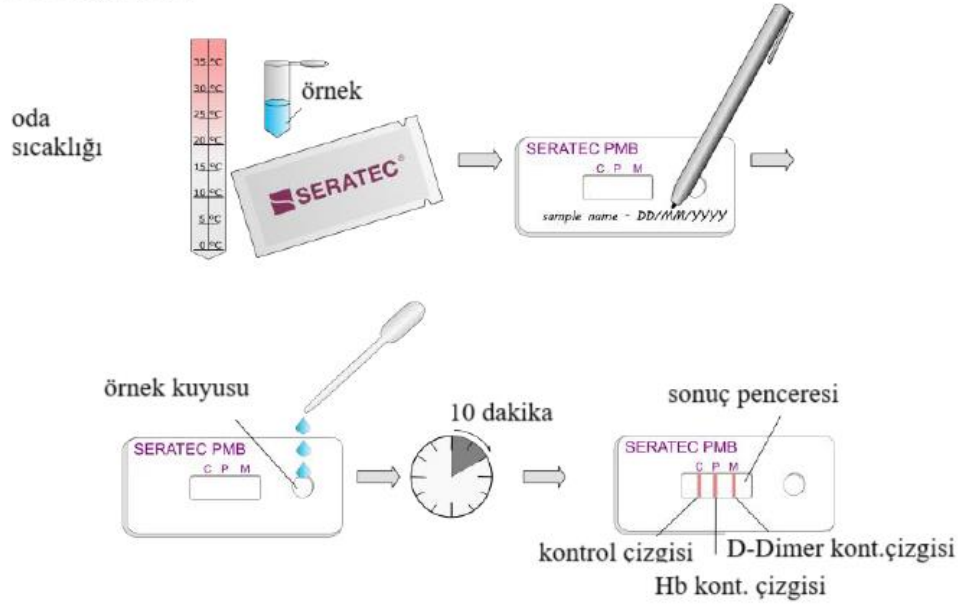
İnsan hemoglobininin varlığını tespit eden ve dolayısıyla kanın varlığını tespit eden immünokromatografik testtir. Bu, D-dimeri tespit etmek ve dolayısıyla menstrüel kanını tespit etmek için bir testin geliştirilmesinde temel olarak kullanılmıştır³⁴. SERATEC PMB Testi, çift yönlü kromatografik immünolojik testtir. İnsan hemoglobini ve D-dimerin varlığını tespit eder. Testin kullanımı kolaydır ve 10 dakika içerisinde hızlı sonuç verir. Test yüksek hassasiyete sahiptir ve 20 ng/ml'ye kadar insan hemoglobinin ve 400 ng/ml'ye kadar D-dimeri tespit eder.

Ayrıca numune ekstraktının geri kalan kısmı DNA ekstraksiyonu ve profil oluşturma için uygundur. PMB test kaseti bir örnek kuyucuğu ve bir sonuç penceresi içerir. Sonuç penceresinde "C" etiketli bir kontrol çizgisi, periferik kan için "P" etiketli hemoglobin sonuç satırı ve menstrüel kanı için "M" etiketli D-dimer sonuç satırı bulunur. Test dört monoklonal ve iki poliklonal antikor içerir. İnsan hemoglobini ve D-dimerinin ilgili epitopları için iki altın etiketli monoklonal antikor numune alanında bulunur ve iki monoklonal antikor test çizgisine sabitlenir. İki poliklonal antikorlar kontrol hattına sabitlenir. Bu test antikor antijen-antikor sandviç yöntemini kullanır. Numunedeki antijen, numune kuyucuğunda bir antijen-antikor kompleksi oluşturmak için boya etiketli antikora bağlanır. Bu kompleks test bölgelerine göç eder ve orada hareketsiz kalan antikorlarla bir kompleks oluşturur. Bu boya etiketli kompleksin birikmesi pembe bir çizginin oluşmasına neden olur. Bağlanmamış etiketli antikor, kontrol bölgesindeki poliklonal antikorlara bağlanarak başka bir pembe çizgi oluşturur. Üç renkli çizgi (her biri C, P ve M'de) insan hemoglobini ve D-dimerin varlığını gösterir; bu da menstrüel kanının veya insan periferik kanı ile menstrüel kanı karışımının varlığını güçlü bir şekilde belirtir. C ve P'de iki renkli çizgi ve M'de çizgi olmaması, insan hemoglobininin varlığını gösterir ve insan periferik kanının güçlü bir göstergesidir. C ve M'de iki renkli çizgi ve P'de çizgi olmaması, D-dimer'in tespit edildiği anlamına gelir; ancak böyle bir durumda menstrüel kanında her zaman hemoglobin bulunacağından hemoglobin konsantrasyonunun tespit eşiğinin altında olması pek olası değildir (şekil 17 ve 18). Bu durumda yanlış pozitif sonuç ve yüksek doz 'kanca etkisi' nedeniyle hemoglobin sinyalinin düşmesi ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır³⁷. Test için ekstrakte edilen örnekler daha ileri analizler için saklanabilir. Çıkarılan örnek DNA analizleriyle uyumludur. Ayrıca, daha ileri analiz için örnek pedinden DNA elde etmek mümkündür³⁸.



Şekil 17: Test aşaması ve sonuç değerlendirmesi için belirlenmiş alanlar³⁹

Test Uygulaması



Şekil 18: Test uygulama aşamaları³⁹

Sonuçların etkili biçimde yorumlanması için yayımlanmış kılavuzlar mevcuttur, farklı durumlarda sonucun nasıl yorumlanması gerektiği belirtilmiştir.

- Hb sonuç çizgisi (P): yalnızca numune Hb-pozitif olduğunda görünür; çizginin renk yoğunluğu değişebilir ve numunenin Hb konsantrasyonuna bağlıdır.
- D-dimer sonuç çizgisi (M): yalnızca numune D-dimer pozitif olduğunda görünür; çizginin renk yoğunluğu değişebilir ve numunenin D-dimer konsantrasyonuna bağlıdır.
- Kontrol çizgisi (C): Olası uygulama hataları ve test bileşenlerinin bütünlüğü için kontrol anlamında gereklidir.

Buna göre;

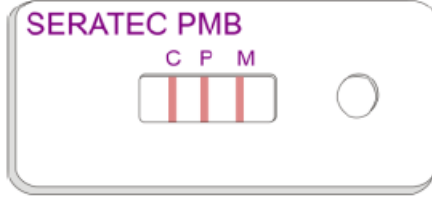
- A. Negatif sonuç (örnekteki hemoglobin ve D-dimer yok veya hemoglobin/D-dimer tespit sınırının altında ise): Kontrol bölgesinde (C) 10 dakika sonra sadece bir kırmızı renkli çizgi belirir. P ve M çizgilerinin olmaması negatif bir test sonucunu gösterir (şekil 19).



Şekil 19: SERATEC PMB Testi için negatif sonuç⁴⁰

B. Pozitif sonuçlar

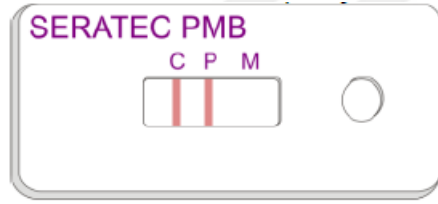
1.Olasılık (numunede bulunan insan hemoglobini ve D-dimer): Sonuç penceresinde üç kırmızı renkli çizgi belirir, biri kontrol bölgesinde (C), biri test bölgesinde (P) ve biri test bölgesinde (M). Üç çizginin renk yoğunlukları değişebilir. 10 dakika sonra zayıf bir test sonucu çizgisi bile pozitif bir test sonucunu gösterir (şekil 20).



Şekil 20: SERATEC PMB Testi için pozitif sonuç⁴⁰

Yorumlama: Hemoglobin ve D-dimer konsantrasyonu tespit sınırının üzerindedir. Bu, menstruasyon kanı veya menstrüel ve periferik kan karışımı için güçlü bir gösterge olarak kabul edilir.

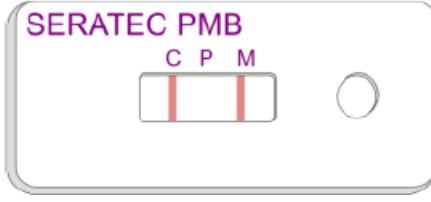
2.Olasılık (numunede bulunan insan hemoglobini): Sonuç penceresinde iki kırmızı renkli çizgi belirir, biri kontrol bölgesinde (C) ve biri test bölgesinde (P). Test bölgesinde (M) hiçbir çizgi görünmez. İki çizginin renk yoğunlukları değişebilir (şekil 21).



Şekil 21: SERATEC PMB Testi için pozitif sonuç⁴⁰

Yorumlama: Hemoglobin konsantrasyonu tespit sınırının üzerindedir. Bu, insan periferik kanının güçlü bir göstergesidir.

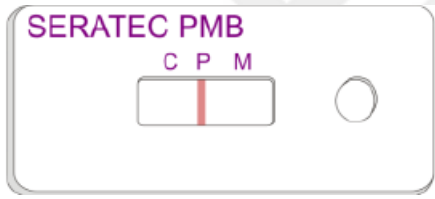
3.Olasılık (numunede bulunan insan D-dimeri): Sonuç penceresinde iki kırmızı renkli çizgi belirir, biri kontrol bölgesinde (C) ve biri test bölgesinde (M). Test bölgesinde (P) hiçbir çizgi görünmez. İki çizginin renk yoğunlukları değişebilir (şekil 22).



Şekil 22: SERATEC PMB Testi için pozitif sonuç⁴⁰

Yorumlama: D-dimer konsantrasyonu tespit sınırının üzerindedir. Aynı örnekte D-dimer'in pozitif ve hemoglobin'in negatif olması olası değildir. Ancak örnek yüksek konsantrasyondaysa bu durum meydana gelebilir. Bu durumda, Kanca Etkisi nedeniyle hemoglobin değeri negatif olabilir ve örnek seyreltilip tekrar test edilmelidir.

C. Geçersiz sonuçlar: Kontrol çizgisi (C) görünmüyor ise test güvenilirliğini kaybeder ve geçersizdir (şekil 23).



Şekil 23: SERATEC PMB Testi için geçersiz sonuç⁴⁰

Yorumlama: Bu durumda yeni bir kaset kullanılarak tekrarlanmalıdır.

4.3 DIMERTEST Lateks Test

DIMERTEST Lateks Testi, insan plazmasındaki çapraz bağlı fibrin yıkım ürünlerinin (XL-FDP) türevleri için hızlı bir niteliksel veya yarı niceliksel bir testtir. Yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC) ve pulmoner emboli ve derin ven trombozu gibi vasküler hastalıklara sahip

insan plazmasında yüksek XL-FDP seviyelerini tespit etmek amacıyla geliştirilmiş bir klinik testtir. Normal periferik kan/plazma, bu test tarafından tespit edilebilecek XL-FDP seviyelerine sahip değildir. Menstrüel kanda da fibrinolitik aktivite bulunduğundan, bu testin menstrüel kanı tespit etmek ve bunu periferik kandan ayırt etmek için kullanılabilmesi mümkündür⁴¹.

Vücutta kan pıhtısı çözüldüğünde üretilen bir protein parçası D-dimer olarak tanımlanır. Bir fibrin parçalanma ürünüdür, yani vücudun artık ihtiyaç duymadığı pıhtıları parçaladığı fibrinoliz süreci sırasında oluşur. Fibrinoliz sırasında plazmin fibrin ve fibrinojeni parçalar. Çözünmeyen fibrin parçalandığında, çeşitli çapraz bağlı fibrin parçalanma ürünleri (XL-FDP) üretilir. DIMERTEST Lateks, oldukça spesifik bir D-dimer monoklonal antikor Mab DD-3B6/22 ile kaplanmış lateks boncuklar kullanan hızlı bir aglütinasyon testidir. Numunedeki XL-FDP, kaplanmış lateks boncuklara bağlanarak çıplak gözle görülebilen bir aglütinasyon reaksiyonu oluşturur, D-dimer konsantrasyonu tespit eşiğinin üzerinde olduğunda görülür (şekil 25). Üreticinin kullanıcı talimatlarına göre, bu test 200 ng/mL'ye kadar D-dimer seviyelerini tespit eder ve bildirilmiş yanlış pozitif yoktur⁴². Söz konusu D-dimer tespiti olduğunda farklı üreticilerden farklı kitler ve cihazlar bulmak mümkündür, özellikle test aşamasında kullanılan koagülasyon cihazları farklı görünseler de sistem olarak benzerdir ve aynı amaca hizmet ederler (şekil 24).



Şekil 24: Farklı D-Dimer kit ve test cihazları^{43,44}



Şekil 25: DIMERTEST Lateks Testi için Sonuçlar, sol: Aglütinasyon yok, sağ: Aglütinasyon var¹¹

5. BULGULAR

Bu çalışmada menstrüel kanın adli olarak tanımlanması için farklı metotlar ve bu metotlara dayanan 3 ticari kit farklı açılardan karşılaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, RNA tabanlı RT-qPCR yöntemi yüksek düzeyde hassasiyet ve özgüllük sunarken, genellikle özel ekipman ve eğitilmiş personel gerektirmektedir. Buna karşılık, mikroskopik boyama prosedürleri ve ticari kitler, saha ortamlarında veya kaynakların sınırlı olduğu laboratuvarlarda uygulanabilecek hızlı ve uygun maliyetli alternatifler sunmaktadır. Karşılaştırma sonuçları 1 en düşük 5 en yüksek puan olmak üzere alttaki tabloda aktarılmıştır.



Kriter	ParaDNA Body Fluid ID Test	SERATEC PMB Test	DIMERTEST Latex Test	Mikroskopik Yaklaşımlar	mrna miRNA RT-qPCR
Hız	75-90 dakikada hızlı sonuçlar (4)	Hızlı, 5-10 dakikada sonuçlar (5)	Yaklaşık 3 dakikada sonuçlar sağlar ama örnek hazırlığı uzun (3)	15- 30 dakika veya daha uzun (4)	Farklı aşamalar farklı miktarda zaman gerektirir (2)
Hassasiyet	Yüksek hassasiyet (0,05 ng total RNA veya 62,5pg DNA) (5)	Yüksek hassasiyet (20 ng/ml'ye kadar insan hemoglobini ve 400 ng/ml'ye kadar D-dimer) (4)	Farklı ticari kitlere göre değişen hassasiyet (200 ng/mL'ye kadar D-dimer) (3)	Düşük hassasiyet (mikroskopik yöntem olduğundan büyük miktarda örnek gerekir,(mL)) (2)	Yüksek hassasiyet (genellikle mikrolitre numune başına pikogram veya femtogram) (5)
Güvenlik	Kullanıcılar için güvenli (5)	Kullanıcılar için güvenli (5)	Kullanıcılar için güvenli (4)	Biyolojik tehlikelere maruz kalma olasılığı (2)	Biyolojik tehlikelere maruz kalma olasılığı (2)
İş gücü	Orta derecede karmaşık işgücü (4)	Kolay uygulama, işgücü az (5)	Kolay uygulama, işgücü az (5)	Orta derecede karmaşık işgücü (3)	Karmaşık işgücü (1)
Maliyet	Yüksek maliyet (2)	Ucuz (4)	Farklı kitlere göre değişen maliyet (2)	Nispeten ucuz maliyet (3)	Yüksek maliyet (1)

Kriter	ParaDNA Body Fluid ID Test	SERATEC PMB Test	DIMERTEST Latex Test	Mikroskopik Yaklaşımlar	mrna miRNA RT-qPCR
Taşınabilirlik	Saha kullanımına uygun (3)	Saha kullanımına uygun (5)	Saha kullanımına uygun (4)	Saha kullanımına uygun değil (1)	Saha kullanımına uygun değil (1)
Laboratuvara adaptasyon	Orta düzeyde zor eğitim süreci, orta derecede hızlı adaptasyon (3)	Eğitim süreci kolay ve hızlı, hızlı adaptasyon (5)	Eğitim süreci kolay ve hızlı, hızlı adaptasyon (5)	Eğitim süreci kolay ve hızlı, hızlı adaptasyon (4)	Zor eğitim süreci, uzun adaptasyon (1)

Tablo 3: Değerlendirilen metotların belirli kriterlere göre karşılaştırılması

6. TARTIŞMA

6.1 Hız

Hızlı tanımlama yöntemleri kısa sürede sonuç vererek adli araştırmacıların olay yerindeki bir lekenin biyolojik kaynağını hızlı bir şekilde belirlemelerine olanak tanır. Karşılaştırılan metotlardan DIMERTEST yaklaşık 3 dakika gibi kısa bir süre ile öne çıkarken, onu sırasıyla 5-10 dakika ile SERATEC PMB Testi, 15-30 dakika ile mikroskopik testler, 75-90 dakika ile de ParaDNA BF ID Test izlemektedir. RT-qPCR ise spesifik tekniklere ve farklı aşamalara bağlı olarak zaman alıcı olduğundan son sırada yer almıştır^{32,39,40,42,44,45}.

6.2 Güvenlik

Menstrüel kanın tanımlanması sırasında laboratuvar çalışanları için kullanıcı dostu ve invazif olmayan test tekniklerinin uygulanması, kontaminasyon ve tehlikeli maddelere maruz kalma riskini en aza indirerek daha güvenli bir çalışma ortamı sağlanması önemlidir. Bu kriter açısından karşılaştırılan metotların ise şu şekilde sıralanabilir; SERATEC PMB Test, DIMERTEST Latex Test, ParaDNA BF ID Test ve gerektirdiği kimyasalların laboratuvar içerisinde insan hayatını tehlikeye sokabilme olasılığı bulunan mikroskopik metotlar RNA tabanlı RT-qPCR^{22,32,39,40,42,44-46}.

6.3 Hassasiyet

Adli çalışma ve soruşturmalarda, minimum örnek hacminden kesin tanımlama elde etme yeteneği çok önemlidir. Daha az biyolojik materyal gerektiren yöntemler yalnızca zorlu durumlarda testlerin uygulanabilirliğini artırır. Bu kriter açısından ise metotlar; ParaDNA BF ID Test, RNA tabanlı RT-qPCR, DIMERTEST Latex Test, mikroskopik metotlar ve SERATEC PMB Test olarak sıralanabilir^{32,34,39,40,42,45,47,48}.

6.4 İşgücü

İşgücü planlama, laboratuvar içerisindeki çalışanların farklı metotlar ile çalışırken ne kadar zaman, malzeme ve enerji gerekli olduğunu planlama konusunda önem taşır. Bu kriter söz konusu olduğunda DIMERTEST Latex Test öne çıkarken diğer metotlar şu şekilde sıralanabilir; SERATEC PMB Test, ParaDNA BF ID Test, mikroskopik metotlar ve yüksek işgücü ve eğitim gerektirmesi sebebiyle RNA tabanlı RT-qPCR.

ParaDNA sistemi kullanım kolaylığı için tasarlanmıştır ve uzman olmayan kişilerin minimum eğitimden sonra sistemi kullanmasına izin verirken, SERATEC PMB Testi ve DIMERTEST sonuçların yorumlanmasında belirli bir düzeyde uzmanlık gerektirir. Mikroskopik yaklaşımlar tipik olarak doğru analiz için daha vasıflı personel gerektirir ve moleküler yöntemler genellikle özel eğitim ve ekipman gerektirir^{16,32,39,40,42,45,49}.

6.5 Maliyet

Adli bilimlerde menstrüel kanın tanımlanması, soruşturmaların genel verimliliğini ve etkinliğini önemli ölçüde etkileyebilecek çeşitli maliyetler içerir. Doğru tanımlama ihtiyacı genellikle özel reaktifler ve test kitleri gerektirir; bunların fiyatı hassasiyet ve özgüllüklerine bağlı olarak değişebilir. Ayrıca, ekipmanın bakımı ve kalite kontrolünün sağlanmasıyla ilgili maliyetler de mali yükü artırabilir. Bu açıdan ise metotlar; SERATEC PMB Test, mikroskopik

metotlar, DIMERTEST Latex Test, ParaDNA BF ID Test ve gerektirdiği cihaz, sarf malzeme, eğitimli personel gibi sebeplerden ötürü RNA tabanlı RT-qPCR olarak sıralanabilir^{16,32,39,40,42,44,45,49}.

6.6 Taşınabilirlik

Taşınabilir test çözümleri, adli bilimler uzmanlarının analizleri yerinde yapmasına olanak tanıyarak, numunelerin laboratuvara taşınması ve sonuçların beklenmesi için gereken süreyi azaltarak soruşturmaların verimliliğini önemli ölçüde artırabilir. Ayrıca, taşınabilir yöntemler, açık hava olay yerleri veya laboratuvar tesislerine sınırlı erişimi olan alanlar gibi zorlu ortamlarda kanıtların incelenmesini kolaylaştırabilir.

ParaDNA sistemi taşınabilir ve saha uygulamaları da dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda kullanılabilirken, SERATEC PMB Testi ve DIMERTEST de taşıma kolaylığı için tasarlanmıştır. Mikroskopik yöntemler ve diğer RNA tabanlı RT-qPCR, laboratuvar ortamlarına duyulan ihtiyaç nedeniyle tipik olarak daha az taşınabilirdir ve genellikle kolayca taşınamayan sofistike ekipmanlar gerektirir^{16,31,32,39,40,42,44,45}.

6.7 Laboratuvara Adaptasyon

Menstrüel kan için tanımlama tekniklerinin rutin laboratuvar uygulamalarına uyarlanması, adli soruşturmaların verimliliğini ve güvenilirliğini artırmak için gereklidir. Yöntem aynı zamanda laboratuvarın kalite kontrol protokolleri ve yasal gereklilikleriyle uyumlu olmalı ve standart çalışma prosedürlerine sorunsuz bir şekilde dahil edilebilmelidir.

SERATEC PMB Test öne çıkarken bu metodu DIMERTEST Latex Test, mikroskopik metotlar, ParaDNA BF ID Test ve RNA tabanlı RT-qPCR izlemektedir. Mikroskopik ve RNA tabanlı RT-qPCR standart uygulamalara dahil edilebilir ancak genellikle daha kapsamlı doğrulama ve eğitim gerektirir^{16,31,32,35,39,40,42,44,45}.

7. SONUÇLAR

1. ParaDNA BF ID testi, yüksek hassasiyeti ve minimum örnek gereksinimi ile dikkat çekerken, maliyetli olması ve orta derecede karmaşık iş gücü gerektirmesi dezavantajlar arasında yer alır.
2. SERATEC PMB ve DIMERTEST Latex Testleri ise daha uygun maliyetli ve kolay uygulanabilir olmalarına rağmen hassasiyet açısından sınırlamalar ve yanlış pozitif durumları gösterebilir.
3. RNA tabanlı RT-qPCR, yüksek hassasiyet sunmasına rağmen daha karmaşık iş gücü, laboratuvara adaptasyon, güvenlik ve taşınabilirlik açısından dezavantajlıdır.
4. Mikroskopik metotlar ise hız, hassasiyet ve güvelik konusunda diğerlerine göre dezavantajlı olup maliyet ve laboratuvara adaptasyon konusunda daha avantajlıdır.

Çalışma sonucunda metotlar hız, güvenlik, hassasiyet, iş gücü, maliyet, taşınabilirlik ve rutin laboratuvara adaptasyon gibi önceden belirlenmiş kriterlere göre tartışılmış ve metotlar sıralanan kriterlere göre yapılan değerlendirmede menstrüel kanın adli identifikasyonunda SERATEC PMB Testi ve DIMERTEST Lateks Test hızlı taramada öne çıkarken, ParaDNA BF ID Testi ile diğer RNA dayalı RT-qPCR'ın yüksek başlangıç maliyetine sahip olsa da yanlış pozitif olasılığının düşük olması ve minimum numune kaybı ile uzun vadede maliyet etkinliği bulunduğu anlaşılmaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. Sijen T, Harbison S. On the Identification of Body Fluids and Tissues: A Crucial Link in the Investigation and Solution of Crime. *Genes (Basel)* 2021;12(11) (In eng). DOI: 10.3390/genes12111728.
2. Wang Z, Luo H, Pan X, Liao M, Hou Y. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet* 2012;6(3):419-23. (In eng). DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.08.008.
3. Harbison S, Fleming R. Forensic body fluid identification: state of the art. *Research and Reports in Forensic Medical Science* 2016;11. DOI: 10.2147/RRFMS.S57994.
4. Mozayani AaCN. *The Forensic Laboratory Handbook: Procedures and Practice*: Humana Press, 2007.
5. McClintock JT. *Forensic Analysis of Biological Evidence: A Laboratory Guide for Serological and DNA Typing*: Taylor & Francis, 2017.
6. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(8):467-77. (In eng). DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.76.
7. Tilstone WJ, Savage KA, Clark LA. *Forensic Science: An Encyclopedia of History, Methods, and Techniques*: Bloomsbury Academic, 2006.
8. Li Z, Bai P, Peng D, et al. Screening and confirmation of microRNA markers for distinguishing between menstrual and peripheral blood. *Forensic Sci Int Genet* 2017;30:24-33. (In eng). DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.05.012.
9. Li R. *Forensic Biology: Identification and DNA Analysis of Biological Evidence*: Taylor & Francis, 2008.
10. Heather Waltke; Gerald LaPorte; Danielle Weiss; Dawn Schwarting; Minh Nguyen; Frances Scott. *Sexual Assault Cases: Exploring the Importance of Non-DNA Forensic Evidence*.
11. Bagwe K. Evaluation of recently developed methods for the forensic detection of menstrual blood. *Boston University School of Medicine*; 2018.
12. Furuya Y, Inoue T. On the detection of glycogen-containing vaginal epithelial cells from gynecological bloodstains. *Nihon Hoigaku Zasshi* 1966;20(1):11-3. (In eng).
13. Hausmann R, Pregler C, Schellmann B. The value of the Lugol's iodine staining technique for the identification of vaginal epithelial cells. *Int J Legal Med* 1994;106(6):298-301. (In eng). DOI: 10.1007/bf01224775.
14. Jones EL, Jr., Leon JA. Lugol's test reexamined again: buccal cells. *J Forensic Sci* 2004;49(1):64-7. (In eng).
15. Hausmann R, Schellmann B. Forensic value of the Lugol's staining method: further studies on glycogenated epithelium in the male urinary tract. *Int J Legal Med* 1994;107(3):147-51. (In eng). DOI: 10.1007/bf01225602.
16. French CE, Jensen CG, Vintiner SK, Elliot DA, McGlashan SR. A novel histological technique for distinguishing between epithelial cells in forensic casework. *Forensic Sci Int* 2008;178(1):1-6. (In eng). DOI: 10.1016/j.forsciint.2008.01.010.
17. Padubidri VG, Daftary SN. *Shaw's Textbook of Gynecology E-Book*: Elsevier Health Sciences, 2014.
18. Asano M, Oya M, Hayakawa M. Identification of menstrual blood stains by the electrophoretic pattern of lactate dehydrogenase isozymes. *Forensic Sci* 1972;1(3):327-32. (In eng). DOI: 10.1016/0300-9432(72)90030-1.

19. Miyaishi S, Kitao T, Yamamoto Y, et al. Identification of menstrual blood by the simultaneous determination of FDP-D dimer and myoglobin contents. *Nihon Hoigaku Zasshi* 1996;50(6):400-3. (In eng).
20. Serin A CH, Ulubay A, Alper B. Vücut Sıvılarının Tanımlanmasında Çeşitli Doku Spesifik mRNA Belirteçlerinin Etkinliğinin Araştırılması. *Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences* 2017. DOI: 10.5336/forensic.2017-57328.
21. Jakubowska J, Maciejewska A, Pawłowski R, Bielawski KP. mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification. *Forensic Science International: Genetics* 2013;7(2):272-278. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.11.005.
22. Bauer M, Patzelt D. Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. *J Forensic Sci* 2002;47(6):1278-82. (In eng).
23. Valadkhan S, Gunawardane LS. Role of small nuclear RNAs in eukaryotic gene expression. *Essays Biochem* 2013;54:79-90. (In eng). DOI: 10.1042/bse0540079.
24. Adli Genetik Uygulamaları: İÜC Üniversite Yayınevi, 2024.
25. Acar BA. Adli Tıpta Vücut Sıvılarının Tanımlanmasında Biyolojik Marker Olarak Mikrorna'nın Kullanımı. *Mersin Üniversitesi*; 2019.
26. Layne TR, Green RA, Lewis CA, et al. microRNA Detection in Blood, Urine, Semen, and Saliva Stains After Compromising Treatments. *J Forensic Sci* 2019;64(6):1831-1837. (In eng). DOI: 10.1111/1556-4029.14113.
27. Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, van Ijcken W, Kayser M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med* 2008;122(2):135-42. (In eng). DOI: 10.1007/s00414-007-0182-6.
28. He H, Ji A, Zhao Y, et al. A stepwise strategy to distinguish menstrual blood from peripheral blood by Fisher's discriminant function. *Int J Legal Med* 2020;134(3):845-851. DOI: 10.1007/s00414-019-02196-w.
29. Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR). *Methods Enzymol* 2013;530:67-74. (In eng). DOI: 10.1016/b978-0-12-420037-1.00002-6.
30. Yang Q, Liu B, Zhou Y, et al. Evaluation of one-step RT-PCR multiplex assay for body fluid identification. *Int J Legal Med* 2021;135(5):1727-1735. DOI: 10.1007/s00414-021-02535-w.
31. RT-PCR Protocol.
32. ParaDNA | LGC Forensics.
33. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem* 2009;387(2):303-14. (In eng). DOI: 10.1016/j.ab.2009.01.037.
34. LGC. Technical Note: HyBeacons™ Technology.
35. French DJ, Archard CL, Brown T, McDowell DG. HyBeacon probes: a new tool for DNA sequence detection and allele discrimination. *Mol Cell Probes* 2001;15(6):363-74. (In eng). DOI: 10.1006/mcpr.2001.0384.
36. French DJ, Archard CL, Brown T, McDowell DG. HyBeacon™ probes: a new tool for DNA sequence detection and allele discrimination. *Molecular and Cellular Probes* 2001;15(6):363-374. DOI: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0384>.
37. Konrad H, Hartung B, Poetsch M. (Un)Reliable detection of menstrual blood in forensic casework — evaluation of the Seratec® PMB test with mock samples. *International Journal of Legal Medicine* 2023;138(3):781-786. DOI: 10.1007/s00414-023-03138-3.
38. Barbaro A, Cormaci P, Votano S, La Marca A. Evaluation study about the SERATEC® rapid tests. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2015;5:e63-e64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2015.09.025>.
39. SERATEC PMB Test.
40. PMB Test.

41. Holtkötter H, Dias Filho CR, Schwender K, et al. Forensic differentiation between peripheral and menstrual blood in cases of alleged sexual assault-validating an immunochromatographic multiplex assay for simultaneous detection of human hemoglobin and D-dimer. *Int J Legal Med* 2018;132(3):683-690. (In eng). DOI: 10.1007/s00414-017-1719-y.
42. Sekisui Diagnostics, LLC. DIMERTEST® Latex Assay user instruction. In: Sekisui Diagnostics L, ed. 2012.
43. XL3200 Automatic Coagulation Analyzer.
44. Remel™ D-Dimer Test, Wellcotest Kit
45. SERATEC® PMB user Instruction.
46. 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;22:89-99. (In eng). DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.01.018.
47. Silva SS, Lopes C, Teixeira AL, Carneiro de Sousa MJ, Medeiros R. Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet* 2015;14:1-10. (In eng). DOI: 10.1016/j.fsigen.2014.09.002.
48. 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;7(1):116-23. (In eng). DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.07.006.
49. Fleming RI, Harbison S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Sci Int Genet* 2010;4(4):244-56. (In eng). DOI: 10.1016/j.fsigen.2009.10.006.