



**FARKLI KUMAŞLAR ÜZERİNDEKİ KAN
LEKELERİNDE SICAKLIĞA ve ZAMANA BAĞLI
İÇERİKSEL DEĞİŞİMLERİN FOURIER DÖNÜŞÜM
KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FT-IR)
VE KEMOMETRİK ANALİZLER İLE BELİRLENMESİ**

Şeyma Gözde BAKIŞ

**Yüksek Lisans Tezi
Kriminalistik Anabilim Dalı
Doç. Dr. Özkan AKSAKAL
2016
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KUMAŞLAR ÜZERİNDEKİ KAN LEKELERİNDE
SICAKLIĞA ve ZAMANA BAĞLI İÇERİKSEL DEĞİŞİMLERİN
FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FT-IR)
VE KEMOMETRİK ANALİZLER İLE BELİRLENMESİ

Şeyma Gözde BAKIŞ

KRİMİNALİSTİK ANABİLİM DALI

ERZURUM
2016

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

FARKLI KUMAŞLAR ÜZERİNDEKİ KAN LEKELERİNDE SICAKLIĞA ve ZAMANA BAĞLI İÇERİKSEL DEĞİŞİMLERİN FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FT-IR) VE KEMOMETRİK ANALİZLER İLE BELİRLENMESİ

Doç. Dr. Özkan AKSAKAL danışmanlığında, Şeyma Gözde BAKIŞ tarafından hazırlanan bu çalışma, 22/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kriminalistik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mustafa Talip ŞENER

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 29/12/2016 tarih ve 50/31 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KUMAŞLAR ÜZERİNDEKİ KAN LEKELERİNDE SICAKLIĞA ve ZAMANA BAĞLI İÇERİKSEL DEĞİŞİMLERİN FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ (FT-IR) ve KEMOMETRİK ANALİZLER İLE BELİRLENMESİ

Şeyma Gözde BAKIŞ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kriminalistik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

Olay yerinde en sık karşılaşılan vücut sıvılarından biri kan lekeleridir. Kan lekeleri, zanlı kimliğini belirlemede, olay dizisini anlamada ve olayın zamanını tespit etmede sıklıkla kullanılmaktadır. Azaltılmış total yansıma Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) ise, olay yerinde bulunan vücut sıvılarındaki değişimleri ve yaş tayinini belirlemek için son dönemlerde kullanılabileceği önerilen bir tekniktir. Bu çalışmada, ATR-FTIR spektroskopisi pamuk ve keten kumaş üzerine damlatılmış kan lekelerindeki proteinlerde sıcaklığa (10°C, 20°C, 30°C ve 40°C) ve zamana (24, 48, 72 saat, 5 ve 10 gün) bağlı olarak ortaya çıkan değişimleri belirlemede kullanılmıştır. Buna ilaveten, sıcaklık ve zamana bağlı olarak pamuk ve keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin yaş tayininde ATR-FTIR spektroskopisinin etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla, 4x4 cm² büyüklüğünde kesilmiş pamuk ve keten kumaşlar üzerine antikoagülan madde içermeyen tüpe alınan kandan 200 µl damlatılmış, kumaşlar 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklarda 24 saat, 48 saat, 72 saat, 5 ve 10 gün süre ile bekletilmiş, ATR-FTIR spektroskopisi ile spektrumları toplanmış, 1740-1475 cm⁻¹ dalga sayısı aralığındaki protein bölgesi kullanılarak kantitatif ve kemometrik analizler yapılmıştır. Kantitatif analizler sonucunda sıcaklığa ve zamana bağlı olarak protein konsantrasyonunda artış veya azalışın olduğu, proteinlerin ikincil yapı komponentlerinde değişimlerin meydana geldiği, özellikle α-sarmal miktarında azalış, agrega β plakalı tabaka ve düzensiz sarmal yapıda artışın olduğunu belirlenmiştir. Hiyerarşik kümeleme (HCA) analizleri ile sıcaklık ve zamana bağlı olarak grupların oldukça yüksek duyarlılık, özgüllük ve doğrulukla birbirinden ayrıldığı tespit edilmiştir. Temel bileşen analizi (PCA) sonuçları ile bu ayrımlar desteklemiştir. Sonuç olarak, ATR-FTIR spektroskopisinin olay yerinde farklı koşullara maruz kalmış kan lekelerinde yaş tayinini belirlemek için kullanılabileceği önerilmiştir. Ayrıca yapılan analizler sonucunda; keten kumaşa göre, pamuk kumaşta daha iyi ayırım gözlemlenmiştir.

2016, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kriminalistik, Kan lekesi, ATR-FTIR, Sıcaklık, Zaman, Kemometrik analiz

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF TEMPERATURE AND TIME DEPENDENT ALTERATIONS IN THE CONTENT OF BLOOD STAIN ON DIFFERENT FABRICS VIA FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (FT-IR) AND CHEMOMETRIC ANALYSIS

Şeyma Gözde BAKIŞ

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Criminalistics

Supervisor: Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

One of the most common body fluids at the scene is blood stains. Blood stains are often used to determine the identity of the suspect, the event sequence, and the timing of the event. Attenuated total reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) is recently proposed technique which can be used to determine the changes in body fluids and the ages of them at the scene. In this study, ATR-FTIR spectroscopy was used to determine temperature and (10°C, 20°C, 30°C ve 40°C) and time (24, 48, 72 hour, 5 ve 10 days) -dependent changes in proteins of blood stains dropped on cotton and linen fabric. In addition, the efficacy of ATR-FTIR spectroscopy in the determination of age of blood stains on these fabrics was investigated which was depend on temperature and time. For this purpose, samples 4x4 cm in size were cut from cotton and linen fabrics and 200 µl of blood sample taken from the tube without anticoagulant substance, was dropped on these fabrics. These fabric samples were kept at 10°C, 20°C, 30°C, 40°C temperature and for 24 hours, 48 hours, 72 hours, 5 days and 10 days and their spectra were collected via ATR-FTIR spectroscopy. The quantitative and chemometric analyzes were performed in the protein region located at the 1740-1475 cm⁻¹ spectral region. Quantitative spectral analysis revealed the increase or decrease in the protein concentration depending on the temperature and the time. In addition, the alterations in the secondary structural components of the proteins were obtained. Especially, the decrease in the amount of α -helix and the increase in the aggregated β - sheet and random coil content were acquired. Hierarchical cluster (HCA) analysis revealed that the groups were separated from each other with a very high sensitivity, specificity and accuracy which depends on temperature and time. These discriminations were also supported by principal component analysis (PCA) results. The findings of the current study suggested that ATR-FTIR spectroscopy can be used to determine the age of blood stains exposed to different conditions at the scene. In addition, as a result of analyzes; according to the linen fabric, better discrimination was achieved in the cotton fabric.

2016, 102 pages

Keywords: Criminalistic, Blood stain, ATR-FTIR, Temperature, Time, Chemometric analysis

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında yapılmıştır.

Araştırmanın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde her türlü desteği sağlayan danışmanım, Sayın Doç. Dr. Özkan AKSAKAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmanın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde her türlü desteği sağlayan ve her türlü yardımı gösteren Sayın Arş. Gör. Nihal ŞİMŞEK ÖZEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Ferhunde AYSİN'e ve Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi laboratuvarındaki arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın yürütülmesinde katkısı olan Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (DAYTAM) teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme, bu zorlu yolda hiçbir zaman yalnız bırakmayıp daima destekleyen hayat arkadaşım M. Batuhan PARLAR'a ve bütün arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Şeyma Gözde BAKIŞ

Aralık, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kan ve Kan Lekeleri.....	2
1.2. Spektroskopi.....	5
1.2.1. Kızılötesi (İnfrared) spektroskopisi.....	8
1.2.2. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi	13
1.2.1.a. ATR (Azaltılmış Toplam Yansıtma) FTIR	16
1.2.3. Kemometrik analiz metotları.....	18
1.2.3.a. Gözetimsiz örüntü tanımlama yöntemleri	18
1.1.3.b. Gözetimli örüntü tanımlama metotları	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	26
3.1. Örnek Hazırlanması.....	26
3.1.1. DNA izolasyonu	27
3.1.2. Agaroz jel elektroforezi.....	29
3.2. ATR-FTIR Spektroskopisi Deneyleri	29
3.2.1. Spektral verilerin toplanması.....	29
3.2.2. Spektral data analizleri	30
3.2.2.a. Kemometrik analizler	31
3.2.2.b. Gözetimsiz örüntü tanımlama metotları	31
3.2.2.c. Spektral farklılıklara dayanarak grupların ayırımında kullanılacak metotların duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değerlerinin hesaplanması.....	31
3.2.3 İstatistiksel veri analizi	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	33

4.1. Kantitatif Analiz Sonuçları.....	35
4.2. Kemometrik Analiz Sonuçları.....	71
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	92
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	103



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
AFM	Atomik Güç Mikroskopi
ATR	Azaltılmış Toplam Yansıtma
CCR	Mükemmel Doğru Sınıflandırma Oranı
Cm^2	Santimetre kare
Di	Elmas
Dk	Dakika
DL	Tespit Limiti
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EIS	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
ESR	Elektron Spin Rezonansı
FT	Fourier Dönüştürücü
FT-IR	Fourier Dönüştürücü Kızılötesi Spektroskopisi
Ge	Germanyum
HbO_2	Oksihemoglobin
HC	Hemikrom
HCA	Hiyerarşik Kümeleme Analizi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Hz	Hertz
LDA	Lineer Ayırma Analizi
Met-Hb	Methemoglobin
m	Metre
mm	Milimetre
mm^3	Milimetre küp
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
MSP	Mikro-spektrofotometre
NIR	Yakın Kızılötesi Spektroskopisi

nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonansı
PCA	Temel Bileşen Analizi
PLS-DA	Kısmi En Küçük Kareler Ayırma Analizi
pm	Pikometre
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	Standart Ortalama Hata
SIMCA	Sıvı Bağımsız Sınıf Analog Modellemesi
Si	Silikon
TBE	Tris Borat EDTA
TSD	Zamana göre Çökme
UV	Ultraviyole
Zn-Se	Çinko-Selenit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Spektroskopi	5
Şekil 1.2. Absorbsiyon, emsiyon ve iletim olayları	5
Şekil 1.3. Elektromanyetik spektrum bölgeleri.....	6
Şekil 1.4. İnfrared spektroskopi bölgesi	9
Şekil 1.5. FTIR Spektroskopisinin temel prensibi	13
Şekil 1.6. Tipik biyolojik spektrumda 3000-800 cm ⁻¹ dalga sayısı arasında biyomoleküler pikler	15
Şekil 1.7. Çok yansımali ATR sistemi.....	16
Şekil 3.1. Tez çalışmasında izlenilen deney ve analiz aşamalarının özeti.....	27
Şekil 3.2 Bruker Vertex 70 FTIR spektroskopisi	30
Şekil 4.1. Pamuk ve kan damlatılmış pamuk örneklerine ait 4000-400 cm ⁻¹ spektral bölgesinde yer alan kızılötesi spektrumları	34
Şekil 4.2. Kan damlatılmış pamuk ve keten kumaş örneklerine ait 1740-1475 cm ⁻¹ spektral bölgesinde ki amit 1 ve amit 2 bantlarının yer aldığı kızılötesi spektrumları	34
Şekil 4.3. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler	35
Şekil 4.4. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40 °C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler	36
Şekil 4.5. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatlerde sıcaklığa bağlı değişimler	37
Şekil 4.6. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 5 ve B) 10 günde 10 ve 40 C’ye bağlı değişimler	38
Şekil 4.7. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatlerde sıcaklığa bağlı değişimler	39
Şekil 4.8. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 5, ve B) 10 günde 10°C ve 40°C sıcaklığa bağlı değişimle	39

Şekil 4.9. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler.....	40
Şekil 4.10. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler.....	41
Şekil 4.11. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte sıcaklıklara bağlı değişimler.....	42
Şekil 4.12. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklıklara bağlı değişimler.....	42
Şekil 4.13. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte sıcaklıklara bağlı değişimler.....	43
Şekil 4.14. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklıklara bağlı değişimler.....	44
Şekil 4.15. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 alan oranlarında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler	45
Şekil 4.16. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 alan oranlarında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler	46
Şekil 4.17. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatlerde sıcaklığa bağlı değişimler.....	47
Şekil 4.18. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 alan oranında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler	47
Şekil 4.19. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatlerde sıcaklığa bağlı değişimler.....	48
Şekil 4.20. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 alan oranlarında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler	49
Şekil 4.21. 10°C 24 saatte kan damlatılmış pamuk kumaşın 1700-1600 cm ⁻¹ dalga sayısı aralığında yer alan amit 1 bandı	50
Şekil 4.22. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde antiparalel β plakalı tabaka yapıdan kaynaklanan 1690 bandında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C’de zamana bağlı değişimler	51

Şekil 4.23. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 10, B) 20, C) 30 ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler	52
Şekil 4.24. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks bandı olan 1653 cm^{-1} bandında A) 10, B) 20, C) 30 ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler	53
Şekil 4.25. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} bandında A) 10, B) 20, C) 30 ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler	54
Şekil 4.26. Pamuk kumaş üzerindeki kan örneklerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında A) 10, B) 20, C) 30 ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler	55
Şekil 4.27. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde 1649 cm^{-1} bandında 40°C 'de zamana bağlı değişimler	55
Şekil 4.28. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde antiparalel β plakalı tabakadan kaynaklanan 1690 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48, C) 72 saat ve D) 5 günde sıcaklığa bağlı değişimler	56
Şekil 4.29. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapısından kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler	57
Şekil 4.30. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapısından kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler	58
Şekil 4.31. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks yapısından kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler	59
Şekil 4.32. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks yapısından kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler	59
Şekil 4.33. Pamuk kumaş üzerindeki kan örneklerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler	60

Şekil 4.34. Pamuk kumaş üzerindeki kan örneklerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler	61
Şekil 4.35. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler	62
Şekil 4.36. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler	62
Şekil 4.37. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 10°C , B) 20°C , C) 30°C ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler	63
Şekil 4.38. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında A) 10°C , B) 20°C , C) 30°C ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler	64
Şekil 4.39. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında A) 10°C , B) 20°C , C) 30°C ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler	65
Şekil 4.40. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler	66
Şekil 4.41. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler	66
Şekil 4.42. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler	67
Şekil 4.43. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler	68
Şekil 4.44. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler	69

Şekil 4.45. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} bandında A) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler	69
Şekil 4.46. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler	70
Şekil 4.47. Keten kumaş üzerindeki kan örneklerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler	71
Şekil 4.48. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 10°C ve B) 20°C gruplarının $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi	73
Şekil 4.49. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 30°C , B) 40°C gruplarının $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi	74
Şekil 4.50. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 24 saat, B) 48 saat gruplarının $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi.....	75
Şekil 4.51. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 72 saat, B) 5 ve 10 günlük gruplarının $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi.....	76
Şekil 4.52. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 10°C B) 20°C gruplarının $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi	78
Şekil 4.53. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 30°C B) 40°C gruplarının $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi	79
Şekil 4.54. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 24 saat B) 48 saat gruplarının $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi.....	80

Şekil 4.55. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 72 saat B) 5 ve 10 gün gruplarının 1740-1475 cm ⁻¹ spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi.....	81
Şekil 4.56. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 10°C ve B) 20°C sıcaklıkta 24, 48, 72 saat, 5 ve 10 günlük grupların 1740-1475 cm ⁻¹ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri.....	83
Şekil 4.57. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 30 °C ve B) 40 °C sıcaklıkta 24, 48, 72 saat, 5 ve 10 günlük grupların 1740-1475 cm ⁻¹ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri.....	84
Şekil 4.58. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 24 ve B) 48 saatte 10, 20, 30 ve 40°C grupların 1740-1475 cm ⁻¹ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri.....	85
Şekil 4.59. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 72 saat ve B) 5- 10 günde 10, 20, 30 ve 40°C grupların 1740-1475 cm ⁻¹ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri	86
Şekil 4.60. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 10°C ve B) 20°C sıcaklıkta 24, 48, 72 saat, 5 ve 10 günlük grupların 1740-1475 cm ⁻¹ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri.....	87
Şekil 4.61. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 30°C ve B) 40°C sıcaklıkta 24, 48, 72 saat, 5 ve 10 günlük grupların 1740-1475 cm ⁻¹ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri.....	88
Şekil 4.62. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 24 ve B) 48 saatte 10, 20, 30 ve 40°C grupların 1740-1475 cm ⁻¹ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri.....	89
Şekil 4.63. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 72 saat ve B) 5- 10günde 10, 20, 30 ve 40 °C grupların 1740-1475 cm ⁻¹ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri	90
Şekil 4.64. Pamuk ve keten kumaşlarda ki kan lekelerinin, DNA izolasyonunda zamana ve sıcaklığa bağlı olarak meydana gelen değişimler.....	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Biyolojik FTIR bant spektrum frekansları.....	14
--	----



1. GİRİŞ

Türkiye istatistik kurumu verilerine göre 2014 yılında ceza infaz kurumlarına 170733 hükümlü girmiştir. Hükümlü statüsünde girenlerin en çok işlediği suçlar hırsızlık (%17,5), yaralama (%14,5) ve adam öldürme (%5,2) şeklinde sıralanmıştır. Bu suçların işlendiği olay yerlerinin çoğunda cam kırıkları, patlayıcılar ve boya izleri gibi fiziksel nesnelerin yanı sıra insan vücut sıvılarıyla karşılaşılması son derece sıradan bir durumdur. Olay yerinde en fazla karşılaşılan ve suç ile suçlunun aydınlatılmasında önemli rol oynayan vücut sıvıları arasında kan, idrar, tükürük, semen ve vajinal sıvılar yer almaktadır. Bilindiği gibi vücut sıvılarından elde edilebilen DNA profili suçluların belirlenmesindeki en önemli adli delillerden biridir. Diğer pek çok delilin aksine DNA profillemeye, olayı potansiyel şüphelinin elemine edilmesi ya da sorgulaması sayesinde kişi ile doğrudan bağlantı sağlamakta ve suç soruşturması üzerinde oldukça büyük katkıya sahip olması nedeniyle çok önemlidir. Bununla birlikte, olay yerindeki vücut sıvıları çeşitli materyaller tarafından absorbe edildiğinde DNA profilinden vücut sıvısı kaynağını belirlemek mümkün olmamaktadır. Yine çeşitli vücut sıvılarına ait lekelerden elde edilen DNA profilleri açık biçimde belirgin olmayabilmektedir. Buna ilaveten, olay yerinde bulunan tükürük, semen ve vajinal salgılar beyaz/krem rengi ya da renksiz görünümlerinden dolayı kolaylıkla ayırt edilemeye bilmekte ya da tanımlanamaya bilmektedir. Kan ise karakteristik kırmızı renginden dolayı diğer vücut sıvılarından kolaylıkla ayırt edilmektedir. Kan, vücuttan çıktıktan sonra çevresel koşullara bağlı olarak kendi kırmızı renginden koyu kahverengiye doğru değişmeye başlamaktadır. Bu durum kanın temel bileşenlerinden biri olan hemoglobinin hava ile temas etmesi sonucu zamanla türevlerine dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. Oksihemoglobin (HbO_2) vücut dışına çıktığında önce methemoglobine (met-Hb) ardından hemikroma (HC) dönüşür. Bu dönüşümün incelenmesi, kan lekesinin yaşı hakkında bilgi vermektedir (Sümerbas 2014).

1.1. Kan ve Kan Lekeleri

Kan: Kan; plazma, kırmızı ve beyaz kan hücreleri ile plateletlerden oluşmaktadır. Plazma; kanın hücreler arası maddesidir, sıvıdır ve kanın %55'ini oluşturmaktadır. Plazmanın yaklaşık %90'ı su, %7'si plazma proteinleri ve %3'ü elektrolitler, amino asitler, enzimler, hormonlar ve metabolizma atıklarıdır. Plazmada bulunan başlıca proteinler fibrinojen, albüminler ve transferrindir. Fibrinojen, kanın pıhtılaşmasında rol oynar. Bilindiği gibi fibrinajensiz plazmaya serum denir. Albuminler ve transferrin, taşıyıcı proteinler ailesine mensuptur. Albuminler, kan damarları içindeki kan basıncının düzenlenmesinde ve çeşitli moleküllerin kanda taşınmasında önemli role sahiptir. Transferrin ise yüksek demir bağlama kapasitesi nedeniyle daha özel taşıyıcı bir role sahiptir. İyonize demir kanda transferrine bağlanarak taşınır.

Kırmızı (eritrositler), beyaz (lökositler) kan hücreleri ve plateletler kanın %45'lik bölümünü oluşturur. Eritrositler vücutta oksijen taşıyıcısı olarak işlev görür. 1 mm³ kanda ortalama 5 milyon kadar eritrosit bulunur. Her bir eritrosit ortalama 300 milyon hemoglobin molekülüne sahiptir. Hemoglobin kana kırmızı rengini veren, demir içeren globuler bir proteindir. Lökositler ise hemoglobin ihtiva etmezler ve bu yüzden renksizdirler. Lökositler zaman zaman ekstrasellüler sıvıya geçebilirler. Lökositler vücudu yabancı maddelere karşı korumakla görevlidirler. Granüllü (nötrofil, eozinofil ve bazofil) ve granülsüz (monosit ve lenfosit) olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Plateletler kemik iliğinde bulunan ve megakaryosit olarak isimlendirilen oldukça büyük hücrelerin, membranla çevrili sitoplazmik parçalarıdır. Bilindiği gibi plateletlerin çekirdekleri yoktur ve kanın pıhtılaşmasında rol oynarlar.

Kan, kriminal olaylarda olay yerinde en sık rastlanan vücut sıvısıdır. Olay yerinde bulunan bir lekenin kan lekesi olup olmadığını belirlemek için bazı testler yapılmaktadır. Bu testlerin genel prensibi ise hemoglobinin yapısında bulunan demirin kimyasallar ile tepkime vermesine bağlıdır. Kan tanımlama testi olarak kullanılan yaygın indikatörler; benzidin, o-Tolidin, löko kristal viyole, fenolftalein veya kastel meyer, lökomalaşit yeşili ve luminol'dür. Bu indikatörler, leke ile tepkimeye girdiğinde,

eğer leke kan lekesi ise belirli renklere dönüşmektedir. Ancak söz konusu bu testler yalnızca tarama testleridir. Kesin sonuç alabilmek için doğrulayıcı testleri uygulamak gerekir. Kan doğrulama testleri ise, olay yerinde bulunan kan lekesinin, insan kanındaki proteinlere özel anti serumları kullanarak presipitasyon (çökelme) tepkimesi sonucunda kanın insana ait olup olmadığını tespit etmede kullanılmaktadır. Presipitasyon tepkimeleri immünoglobulin G sınıfı antikorlar ile serolojik örnekte bulunan proteinler arasındaki etkileşimlere dayanmaktadır. Kan doğrulama testleri, halka testi (tüp yöntemi) ve Ouchterlony çift difüzyon testi olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir. Öte yandan kanın insana ait olup olmadığını ispatlamaya yarayan diğer bir yöntem ise immünokromatografik olarak kullanılan Hema Trace testidir. Hema Trace testi 10 dakika gibi kısa bir sürede sonuç veren spesifik bir testtir ve eser miktardaki insan hemoglobini tespit etmede bile etkilidir (Karakus 2013).

Olay yerinde bulunan kan lekesi, zanlının kimliğini belirlemek, olay dizisini anlayabilmek ve olay zamanını tespit edebilmek için oldukça önemlidir (Lu 2015). Bilindiği gibi olay yerinden kan lekesi elde edildikten sonra, kimlik tespiti amacıyla DNA amplifikasyonu yapılarak (Edelman *et al.* 2012) kimlik tespiti yapılmaktadır. Yine alınan kan lekesinden, yaş tayini ve ölüm zamanı da belirlenebilmektedir. Bu nedenle geçmişten günümüze kadar kan yaşını tayin etmek için çok sayıda teknik ve yöntem geliştirilmiştir.

1907 yılında, Tomellini 1 yıllık süre ile kan rengindeki değişimleri kaydederek bir renk skalası geliştirmiştir. 1910 yılında ise Leers oksihemoglobinden (HbO_2) methemoglobine (met-Hb) değişimi, kan kuruduktan sonra bu iki ürünün kombinasyonu ve onların varlığının kan yaşı tahmininde kullanılabileceğini bulmuştur (Brooke *et al.* 2010). Schwarzacher (1930) kanın sudaki çözünürlüğü ile kan yaşı arasında bağlantı olduğunu belirlemiş ve hemoglobin ile peroksidaz ve katalaz aktivitesinin kan lekesi yaşı ile ters ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Lu 2015). Hanson ve Ballantyne kanın UV/görünür spektrumda (414 nm'de) hemoglobin Soret bandının bir mavi spektral değişim gösterdiğini ve bu değişimin kuru kan lekesi yaşı ile ilgili olduğunu iddia etmiştir (Baranowski Pearl *et al.* 2011). Li *et al.* (2011) 442-585 nm dalga boyunda

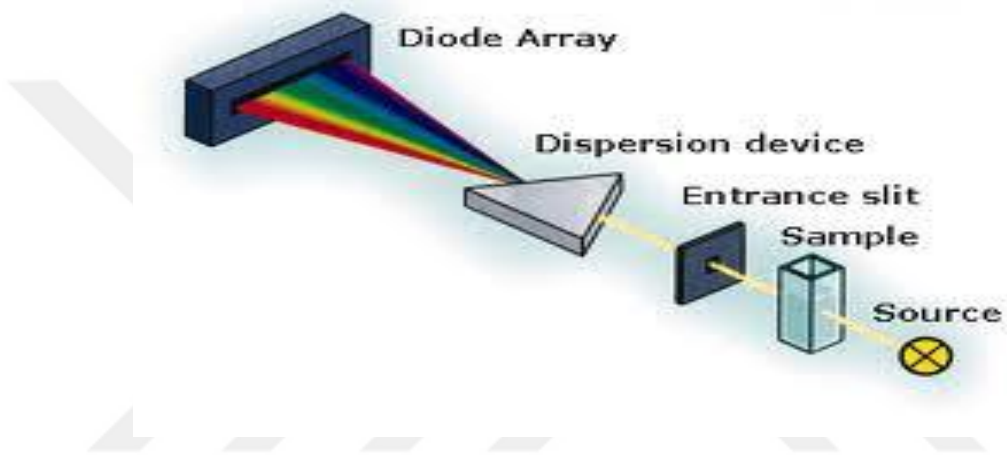
beyaz yüzeydeki kan lekelerini UV görünür spektrumda toplamak için mikro-spektrofotometre (MSP) kullanmışlar ve MSP'nin yaş tayininde kullanılabileceğini rapor etmiştir (Li *et al.* 2011). Cho *et al.* (2001) pamuktaki kuru kan lekesinin sıcaklık ve neme bağlı olarak yaş tayininde HPLC'nin kullanıldığını bildirmişlerdir (Cho *et al.* 2001). Aynı şekilde Lu *et al.* (2015), HPLC'nin kan yaşını belirlemek, hemoglobinin alfa (α) zincir ve hem proteini pik oranı tespit etmek ve kan lekesindeki bileşenleri tanımlamak için kullanılabileceğini rapor etmiştir. (Lu 2015).

Kan leke yaş tahmininde yansıma spektroskopisi de kullanılmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada Patterson kan lekesi renginin çevresel koşullarla ilişkili olduğunu belirlemiş ve kan lekelerinin yansıma spektrumunu kaydetmiştir (Koulis *et al.* 2001). Friedrich *et al.* tarafından yapılan çalışmada 1359 nm ve 1500 nm'de yakın kızılötesi piklerinin, 1 saat içinde kan yaşını tahmin etmede kullanılabileceği, 1459 nm ve 1900 nm'deki yakın kızılötesi piklerinin ise met-Hb'nin formasyonundan dolayı daha ileri tahminler için kullanılabileceği rapor edilmiştir (Friedrich and Weidler 2010).

Yukarıda bahsedilen teknikler dışında kan lekesi yaş tayininde; elektron paramagnetik rezonans, atomik güç mikroskopu, oksijen elektrotları, Raman spektroskopisi, X-ray floresansı, nükleer manyetik rezonansı, kütle spektroskopisi, SDS-PAGE ve RNA degradasyonu gibi teknikler de kullanılmaktadır. Ancak bu teknikler; cihazların taşınamaması, özel laboratuvar koşulları gerektirmesi ve ön hazırlık aşamasının olması nedeniyle günümüzde adli tıp alanında rutin olarak kullanılamamaktadır. Suç olaylarının aydınlatılması için, olayın işlendiği zaman hakkında doğru bilgi edinmek de olayın çözülmesi için çok önemlidir. Bu nedenle kan lekesi yaş tayinin doğru ve hızlı bir şekilde yapılması gerekmektedir. Yaş tayininde doğru sonuçlar elde edebilmek için ise kolay taşınabilir ve hızlı analiz yapan bir yöntemin uygulanmasına gereksinim duyulmaktadır. Yapılan literatür taramaları sonucunda spektroskopi tekniklerinden kızılötesi (infrared) spektroskopisinin kan yaşını tayin etmek için hızlı, güvenilir ve nispeten kolay bir yöntem olarak önerildiği belirlenmiştir.

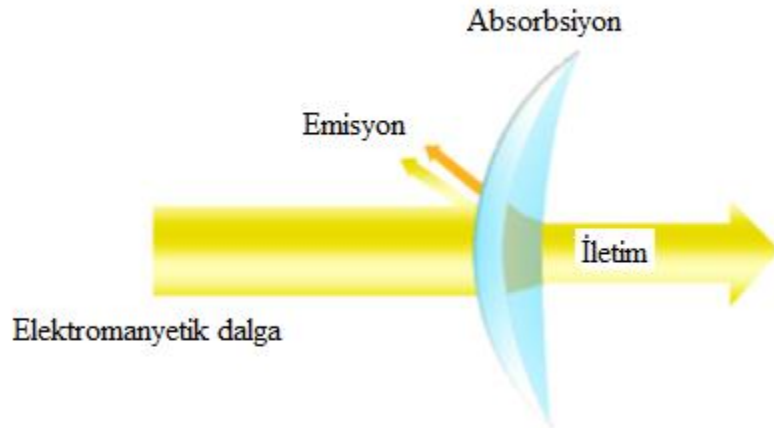
1.2. Spektroskopi

Spektroskopi, ışın ve madde etkileşimine bağlı olarak, maddede bulunan atom, molekül veya iyonların bir enerji düzeyinden başka bir enerji düzeyine geçişi sırasında soğurulma, saçılma, yayılma ve salınma hareketleri sonucu elektromanyetik dalganın ölçülmesi ve yorumlanmasıdır (Şekil 1.1).



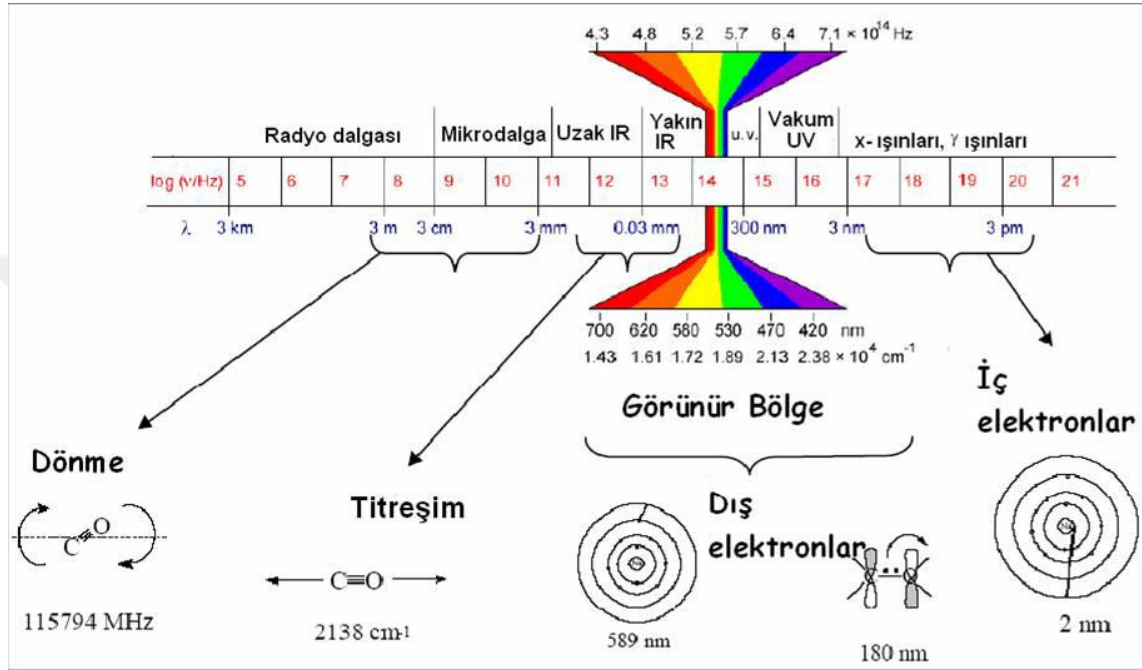
Şekil 1.1. Spektroskopi

Elektromanyetik dalga ile maddenin etkileşimi absorpsiyon, emisyon ve salınım olmak üzere üç şekilde gerçekleşmektedir. Oluşan etkileşimler elektromanyetik dalganın, dalga boyları tarafından belirlenmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Absorbsiyon, emisyon ve iletim olayları

Elektromanyetik ışıma, uzayda çok hızlı hareket halinde olan enerji çeşididir. Görünür ışık, infrared ışınları, X-ışınları ve radyo dalgaları elektromanyetik ışıma çeşitleridir (Şekil 1.3) (Altınışık 2004).



Şekil 1.3. Elektromanyetik spektrum bölgeleri

Elektromanyetik spektrum, dalga boylarına göre bölgelere ayrılmaktadır. Spektroskopide ise bu bölgeler kullanılmaktadır. Spektroskopide kullanılan çalışma bölgeleri ise şu şekildedir;

a. Radyo Dalga Bölgesi: $3 \times 10^6 - 3 \times 10^{10}$ Hz frekans aralığında denk gelen, 1 m'den daha uzun dalgalardan oluşmaktadır. Dalga boyu uzundur bu nedenle en düşük enerjiye ve sıcaklığa sahiptirler. Bu bölgede, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve Elektron Spin Rezonans (ESR) spektrumları bulunmaktadır.

b. Mikrodalga Bölgesi: $3 \times 10^{10} - 3 \times 10^{12}$ Hz frekans aralığında olup 1 mm-1 m arası dalga boyunu kapsamaktadır. Dönme spektroskopisinden oluşmaktadır. Mikrodalgalar,

atom ve moleküllerle etkileşimi sonucu oluşan sürtünme hareketiyle ortaya ısı enerjisinin çıkmasına neden olmaktadır.

c. İnfrared (kızılötesi) Bölgesi: $3 \times 10^{12} - 3 \times 10^{14}$ Hz frekans aralığında 710 nm–1 μ m arası dalga boylarında ki ışınları içermektedir. Bir molekülün titreşim ve dönme enerjisinden kaynaklanan spektrumu vermektedir. Elektromanyetik dalga madde tarafından soğurulduktan sonra atomlar arasında titreşim hareketleri meydana gelir. Titreşim hareketleri sonucunda, molekülde bir dipol değişimi oluşur ve spektrum elde edilir. Sonuç olarak molekülde meydana gelen titreşimler kızılötesi bölgede spektrum verir.

d. Görünür ve Ultraviyole (Morötesi) Bölgesi: $3 \times 10^{14} - 3 \times 10^{16}$ Hz frekans aralığında ve 1 μ m–10nm dalga boyunda yer alan ışınları içermektedir. Bu bölgede ışınlar, atom veya molekülün dış kabuğundaki elektronların farklı enerji düzeyleri arasındaki geçişine neden olur. Bu nedenle bu bölgedeki spektroskopi “elektron spektroskopisi” olarak adlandırılmaktadır. İnsan gözü 400 nm ile 700 nm aralığındaki elektromanyetik radyasyonu algılar. En kısa dalga boyları (en büyük foton enerjisi) menekşe rengi olarak algılanırken, en uzun dalga boyu (en küçük foton enerjisi) ise kırmızı olarak algılanır.

e. X-Işınları Bölgesi: $3 \times 10^{16} - 3 \times 10^{18}$ Hz frekans aralığında ve 10nm–100pm dalga boyu bölgesinde bulunmaktadır. X-ışınları, bir atom veya molekülün iç kabuğunda bulunan elektronlarının geçişlerine neden olur. Yani X-ışınları atom veya moleküllerin, iç orbitalinde ki elektronların enerji seviyelerinin değiştirir. Bu bölgedeki spektroskopiye “X-ışınları spektroskopisi” denilir. X-ışınlarının ışığı, bir dalga etkisinden daha çok parçacık etkisi gösterir.

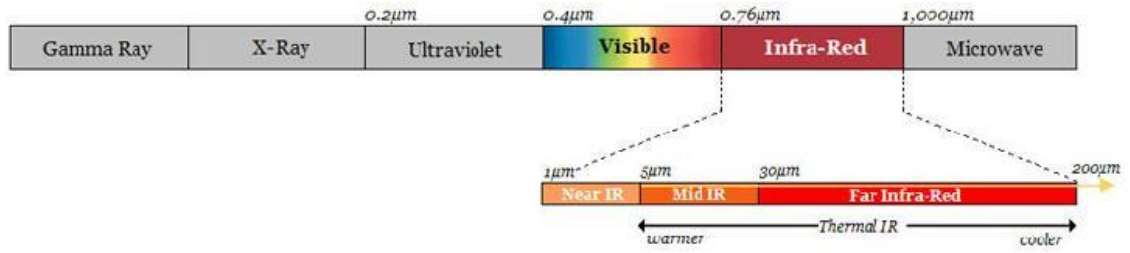
f. γ - Işınları Bölgesi: $3 \times 10^{18} - 3 \times 10^{20}$ Hz frekans aralığında ve 100pm–1pm dalga boyu bölgesinde yer almaktadır. Elektromanyetik spektrumda en fazla enerjiye ve en kısa dalga boyuna sahip kısımdır. Radyoaktif çekirdekler tarafından nükleer tepkimeler sonucunda yayılırlar. Yani, çekirdekteki parçacıkların yeniden düzenlenmesine neden olan enerji değişimleridir (Sakarya 2015).

Elektromanyetik spektrumların kullandığı ışın bölgesine göre birçok spektroskopî çeşidi mevcuttur. Bunlar;

1. Optik spektroskopî
2. Kızılötesi (infrared) Spektroskopî
3. Morötesi (görünür, ultraviyole) Işık Spektroskopî
4. Raman Spektroskopî
5. Elektron Spin Rezonans (veya Elektron Paramanyetik Rezonans) Spektroskopî
6. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopî (NMR Spektroskopî)
7. Kütle Spektroskopî
8. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopî (EIS)
9. Atomik Emisyon Spektroskopî
10. Mössbauer Spektroskopî (Anonymous 2016c)

1.2.1. Kızılötesi (İnfrared) spektroskopî

İnfrared spektroskopî, görünür ve mikrodalga bölgeleri arasında yer alan ışınların maddeler tarafından absorblanmasıyla, maddelerde bulunan kimyasal fonksiyonel grupların belirlenmesini ve analiz edilmesini sağlayan bir tekniktir (Hollas 2004; Sakarya 2015). Bir molekülde var olan farklı fonksiyonel gruplar kızılötesi ışınlarına maruz kaldığı zaman farklı absorblama fonksiyonları gösterir. Bu absorblama fonksiyonuna bağlı olarak molekülde farklı titreşim ve dönme hareketi meydana gelir. Bu dönme ve titreşme hareketi, molekülün dipol momentinde net bir değişime neden olur. Bu değişim, farklı moleküllerin yapısal özellikleri olan bağ uzunluğu, bağ açısı ve molekül simetrisi hakkında ayrıca molekülün kimyasal ve fiziksel özellikleri olan bağ kuvvetleri, molekül içi ve moleküller arası kuvvetler, molekülün elektronik dağılımı hakkında bilgi verir (Hollas 2004; Akyuz 2015). İnfrared spektroskopî bileşik yapılarını tanımlayıp açıkladığı gibi katı, sıvı ve gaz halindeki tüm örneklerde de ölçüm alabilmektedir. $0.7\ \mu\text{m}$ - $1000\ \mu\text{m}$ dalga boyuna ($10\ \text{cm}^{-1}$ - $10000\ \text{cm}^{-1}$ dalga sayısı) sahip fotonların oluşturmuş olduğu infrared spektral bölge, dalga boyu ve frekans bakımından üç bölgeye ayrılır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. İnfrared spektroskopi bölgesi

Yakın Kızılötesi (IR): 3.8×10^{14} - 1.2×10^{14} Hz frekans aralığında, 10.000 cm^{-1} ile 4.000 cm^{-1} dalga sayısına (0.7 - $2.5 \mu\text{m}$ dalga boyuna) sahip IR bölgesini oluşturur. Bu bölgede, molekülde meydana gelen titreşimlerin üst tonu ve harmonikleri incelenir.

Orta Kızılötesi (IR): 1.2×10^{14} - 1.2×10^{12} Hz frekans aralığında, 4.000 - 400 cm^{-1} dalga sayısına, ($2.5 \mu\text{m}$ - $25 \mu\text{m}$ dalga boyuna) sahip IR bölgesini oluşturur. Moleküllerde meydana gelen neredeyse bütün titreşimlerin incelenebildiği bölgedir. Bu bölgede molekülün temel titreşimleri incelenir. Birçok molekülün titreşimleri orta kızılötesi bölgede gözlenebildiği için bu bölge temel kırmızı-altı (infrared) bölge olarak adlandırılır.

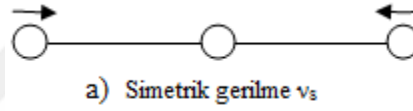
Uzak Kızılötesi (IR): 6×10^{12} - 3×10^{11} Hz frekans aralığında, 400 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} dalga sayısına, ($25 \mu\text{m}$ - $500 \mu\text{m}$ dalga boyuna) sahip IR bölgesini oluşturur. Bu bölgede moleküllerin dönmesi ve düzlem dışı açılı bükülmesi durumuna ait temel bantlar, moleküllerin serbest dönü geçişleri, kristallerdeki örgü titreşimleri ve ağır atomların titreşimleri gözlenir. Aynı zamanda bu bölge mikrodalga bölgesine yakın bölgede bulunduğu için moleküllerin dönme hareketleri de incelenebilir (Kendal 1966; George and McIntyre 1990).

Kızılötesi ışınları, molekül tarafından soğurulduğu zaman molekülde titreşim enerji düzeyleri arasında farklar oluşturmaktadır. Bundan dolayı enerji düzeyleri arasında bir geçiş meydana gelir. Enerji düzeyleri arasında oluşan bu geçişler titreşim hareketlerini meydana getirmektedir. Titreşim hareketleri, moleküldeki atomların birbirlerine

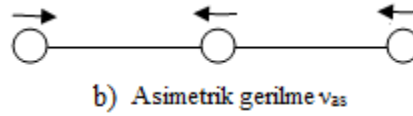
yakınlaşıp uzaklaşması veya bağ açılarındaki değişimiyle oluşmaktadır (Yıldız and Genc 1993).

Bir molekül, aşağıda belirtilen temel titreşim hareketlerini yapabilmektedir;

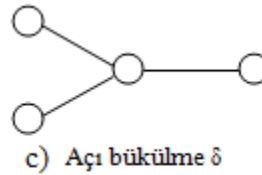
1)Gerilme Titreşimleri (Stretching): Atomlar arasındaki bağın eksen doğrultusunda uzaması ya da kısalmasıdır. Bir molekülde tüm bağlar periyodik olarak uzayıp kısalıyorsa bu titreşime “simetrik gerilme titreşimi” denir.



Moleküldeki bağların biri kısalırken diğeri uzuyorsa bu titreşime “asimetrik gerilme titreşim” denir. Asimetrik gerilme titreşim enerjisi, genel olarak simetrik gerilme titreşim enerjisinden büyüktür.

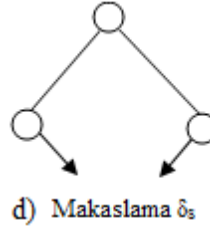


2)Açı bükülme titreşimleri (Bending): İki bağ arasındaki açının periyodik olarak değişmesi sonucunda oluşan titreşimlerdir. Bu titreşimlerde oluşan hareket bağ doğrultusuna diktir. Açı bükülme hareketi ile bir düzlem (bir simetri düzlemi) yok edilebiliyor olduğu için bu titreşime düzlem yok etme hareketi de denilmektedir.

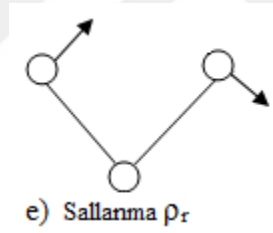


Açı bükülme hareketleri;

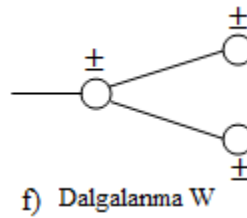
- Makaslama (Scissoring): İki bağ arasında oluşan açının bağlar tarafından periyodik şekilde kesilmesi sonucu oluşan değişimdir. Değişim bağa dik doğrultuda ve zıt yöndedir.



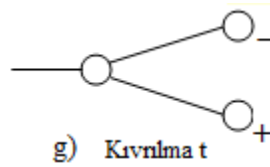
- Sallanma (Rocking): Hareket iki atomun birbirini takip etmesi şeklindedir. Bu hareket iki bağ arasında ya da bir bağ ile bir grup atom arasında gerçekleşir. Bağ uzunluğu ve açısı değişmez.



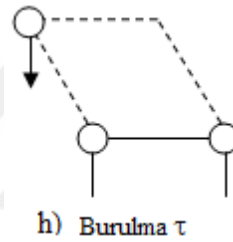
- Dalgalanma (Wagging): Bir bağ ile iki bağ tarafından oluşturulmuş bir düzlem arasındaki açının değişimidir. Molekülün tüm atomları dengede, bir düzlem içinde bulunurken, bir atomun bu düzleme dik hareketidir.



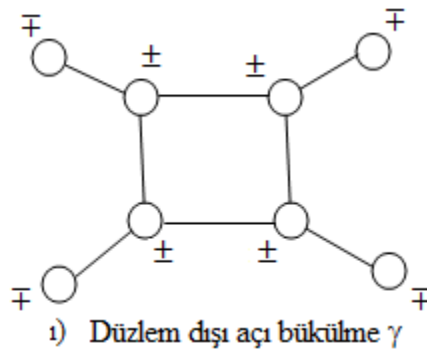
- Kırılma (Twisting): Lineer ve düzlemsel olmayan moleküllerde ki bağların atomlar tarafından bükülme hareketidir. Hareketler, bağ doğrultusuna dik bir şekilde oluşur. Bu harekette bağ deformasyona uğramaz.



- Burulma (Torsion): İki düzlem arasındaki, bir bağ veya açının deformasyonu sonucu oluşan periyodik hareketlerdir.

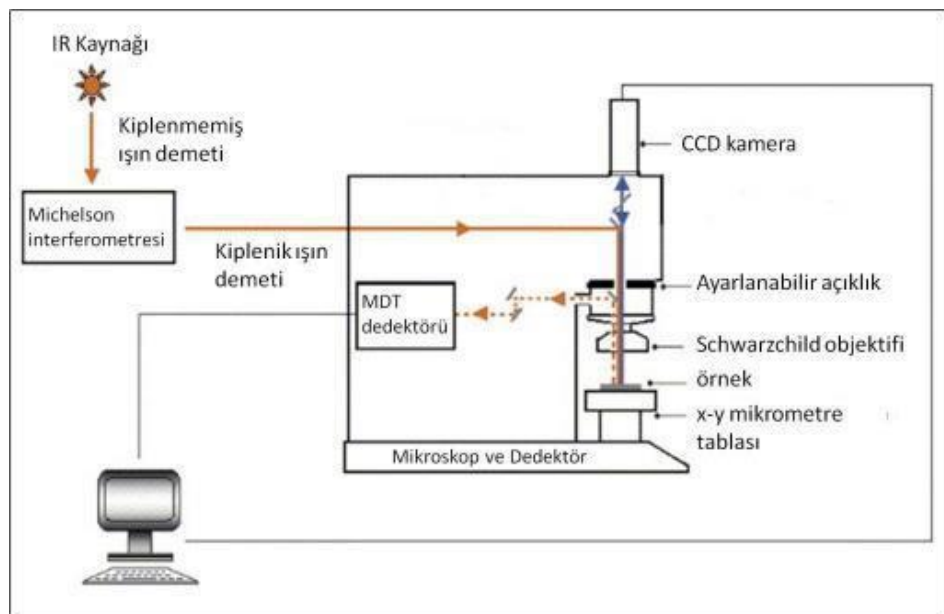


- Düzlem dışı aç bükülmesi (Out of Plane Bending): Atomların hareketi sonucunda bir düzlemin yok edilmesi ile oluşan harekettir. Genelde kapalı halka oluşturan moleküllerde görülmektedir. Hareketin şeklinden dolayı, “şemsiye titreşimi” denilmektedir (Akyuz 2015).



1.2.2. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi

Bir interferometre (girişimölçer) olan FTIR spektroskopisi, kızılötesi bölgesinde var olan elektromanyetik ışımaların gönderilmesi sonucu moleküllerde meydana gelen titreşimleri ölçen, oluşan farklı titreşim gruplarının görüntülenmesini sağlayan ve moleküllerin yapıları hakkında bilgi veren bir tekniktir (Şekil 1.5). Elde edilen spektrum sayesinde parmak izi niteliğinde bilgiler, sistemde mevcut olan moleküller, bu moleküllerin konsantrasyonları ve işlevleri hakkında bilgiler ve böylelikle farklı yapıların ayırt edilmesi sağlanır (Garip *et al.* 2009; Ozek *et al.* 2009). Bu bilgilere, ilk olarak doğru bant tanımlaması yapılarak, daha sonra ise ilgilenilen bantların yeri, bant şiddetleri veya bantların altında kalan alan ve bant genişliği değerlerinin hesaplanması ile ulaşılabilir. Bant şiddeti ve alanı; maddenin konsantrasyonu hakkında, bant konumu; düzen/düzensizlik hakkında, bant genişliği ise dinamik hakkında bilgi sağlamaktadır. Bir bileşiğin titreşim spektrumu, bir ürünün barkodu gibi sadece o bileşiğe spesifiktir. Yalnızca optik izomerler birbirleriyle aynı titreşim spektrumunu verebilirler. Bir fonksiyonel grubun teşhisi için gerekli olan titreşim frekansları önceden literatürlerde yer almış bilgilerden veya atlaslardan bulunabilir. Daha önceden bulunmuş olan biyolojik FTIR bant spektrumları Çizelge 1.1’de sınıflandırılmıştır.



Şekil 1.5. FTIR Spektroskopisinin temel prensibi (Gazi *et al.* 2006)

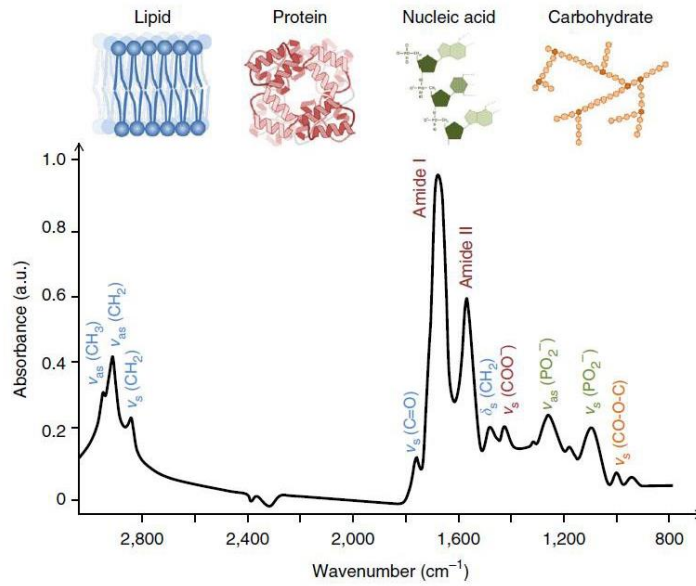
Çizelge 1.1. Biyolojik FTIR bant spektrum frekansları (Beekes *et al.* 2007; Gozen *et al.* 2009)

Frekans (cm ⁻¹)	Karşılık geldiği molekül yapıları
~3500	Hidroksil gruplarında O-H gerilimi
~3200	Proteinlerin N-H gerilimi
~3307	Polisakkarit ve proteinlerde N-H ve O-H titreşimi
2959	Yağ asitlerindeki metil gruplarında asimetrik CH ₃ titreşimi
2934	CH ₂ gruplarında C-H titreşimi
2927	Yağ asitlerinde metilen gruplarında asimetrik CH ₂ titreşimi
2876	Yağ asitlerindeki metil gruplarında simetrik CH ₃ titreşimi
2857	Yağ asitlerinde metilen gruplarında simetrik CH ₂ titreşimi
1741-1715	Esterlerde, karbonik ve nükleik asitlerde C=O titreşimi
~1655	α -Heliks yapısına ait Amid 1
~1637	Amid 1
1548	Amid 2
1515	Tirozin bandı
1468	CH ₂ 'de C-H deformasyonu
~1400	COO ⁻ 'da simetrik C=O titreşimi
1310-1240	Proteinlerde Amid 3 band bileşenleri
1250-1220	Fosfodiesterlerde P=O titreşimi
1200-900	C-O-P, P-O-P karbonhidratlarında C-O-C, C-O
1085	PO ₂ ⁻ 'de P=O titreşimi
900-600	Parmak izi bölgesi

Bu teknik ile biyolojik örnekler zarar verilmeden çalışılabileceği gibi hem *in vitro* hem *in vivo* koşullarda da çalışılabilmektedir. Ayrıca çok düşük konsantrasyonlarda bile analiz yapılabilmektedir. Hücre yapıtaşlarını oluşturan protein, lipid, karbonhidrat, DNA, kolesterol gibi moleküllerin fonksiyonel grubundaki değişimler de incelenebilir (Severcan *et al.* 2000; Severcan *et al.* 2003; Boyar *et al.* 2004; Severcan *et al.* 2005a; Cakmak *et al.* 2006; Toyran *et al.* 2006; Bozkurt *et al.* 2007; Dogan *et al.* 2007; Sara *et al.* 2009; Bozkurt *et al.* 2010; Ozek *et al.* 2010; Cakmak *et al.* 2011).

Bir örnekteki moleküllerin içeriği sinyal şiddeti ya da ilgili bantların alanlarının oranlarının hesaplanması ile (doymamış lipidlerin doymuş lipidlere ya da lipidlerin proteinlere oranı gibi) hızlı bir şekilde analiz edilebilmektedir. Lipitlerden kaynaklanan -CH₂ simetrik ve anti simetrik titreşimlerinin bant genişlikleri sistemin dinamiğini görüntülemek için kullanılabilmektedir. Bant pozisyonlarındaki kaymalar ise yapısal olarak meydana gelen değişimleri işaret etmektedir. Mesela, 3000-2800 cm⁻¹ bölgesindeki C-H gerilme bant pozisyonundaki kaymalar lipidlerin düzen/düzensizliklerinde olan değişimler hakkında, 1730 cm⁻¹ civarında görülen C=O

gerilme bandının bant pozisyonundaki değişimler ise bu fonksiyonel grup etrafındaki hidrojen bağlanması hakkında bilgi verir (Şekil 1.6). Ayrıca, kontrole karşı olarak yapılan ölçümlerde ana protein bantlarının (Amit 1) frekans değerlerindeki kaymalar ise proteinlerin yapılarında oluşabilecek değişimleri ifade eder (Anonymous 2016a). FTIR spektroskopisi, yüksek sinyal-gürültü oranı ile özellikle proteinlerin ikincil yapı ve miktarı hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Haris and Severcan 1999; Nilsson 2004; Severcan *et al.* 2004). Proteinlerin ikincil yapısından kaynaklanan değişimler ise 1650 cm^{-1} ve 1550 cm^{-1} civarında gözlenen sırasıyla Amit 1 ve Amit 2 ana protein bantlarıdır. Bu bantlara bakılarak proteinlerin ikincil yapıları detaylı bir şekilde incelenebilmektedir (Anonymous 2016a).



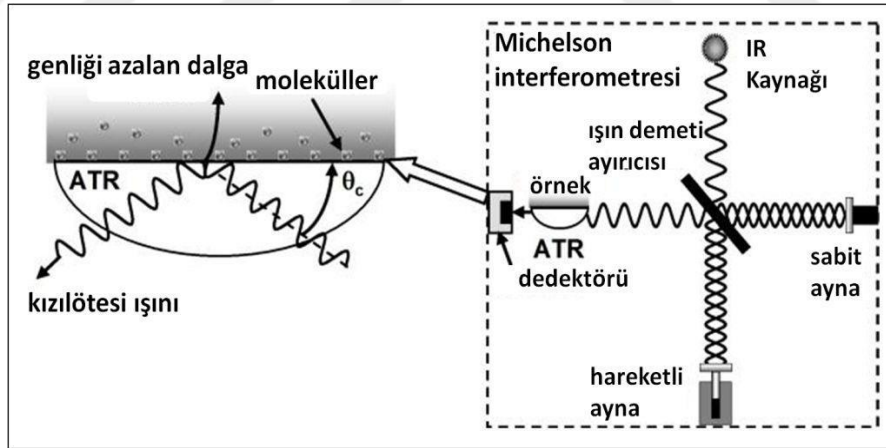
Şekil 1.6. Tipik biyolojik spektrumda $3000\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı arasında biyomoleküler pikler

Modern FTIR cihazları, kolay şekilde kullanılabilmekte, hızlı analiz yapabilmekte, çok hassas ve yüksek bir verimlilikle çalışabilmektedir (Albayrak 2010). Spektrum, tüm frekansların eş zamanlı ölçümlerinden dolayı dakikalar yerine saniyeler içinde toplanabilmektedir. Bu nedenle FTIR spektroskopisi ile hızlı bir şekilde analiz yapabilmektedir (Diem *et al.* 1999). FTIR analiz sonuçları, yüksek gürültü seviyelerindeki yüksek optik verileri ve yüksek hassasiyete sahip dedektörlerinden

dolayı hassasiyeti gelişmiş bir cihazdır. Yüksek hassasiyet mikrogram kadar düşük örnek miktarında dahi yüksek kalitede infrared spektrumu sağlamaktadır (Stuart 1997). Diğer taraftan, örnekler, katı, sıvı ve gaz halinde incelenebilmektedir. Bu teknik örnek hakkında yapısal ve işlevsel bilgi sağlayan karışık olmayan bir tekniktir (Dogan *et al.* 2007). Cihazda tek hareketli parça ayna olduğu için mekanik arıza olması çok düşük ihtimaldir. FTIR, kendi kendini kalibre edebilme yeteneğine sahiptir.

1.2.1.a. ATR (Azaltılmış Toplam Yansıtma) FTIR

FTIR spektroskopisine ATR ünitesinin takılması, birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Örnek hazırlığına gerek duyulmadan direkt örnek ile çalışılabilmesi sonucu daha hızlı şekilde analizler yapılırken, kalın bir katı örnek veya absorbsiyon özelliği yüksek olan bir sıvı örnek ile çalışma olanağı sağlaması ile son zamanlarda gündemde olan spektroskopik bir tekniktir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Çok yansımali ATR sistemi (Wang *et al.* 2007)

Kızıl ötesi kaynağından çıkan ışın, yüksek kırınımına sahip olan kristale belirli bir açı ile gönderilir. Örnek ve kristal arasındaki geliş açısı, iki yüzey arasındaki kırınım indeksinin fonksiyonu olarak tanımlanan kritik açıdan yüksek olduğunda, toplam iç yansımalar oluşur. ATR ünitesi kullanılarak, örnek ile gönderilen ışının çok yakın olması sonucu, kızılötesi ışınlardan kaynaklanan sinyaller elde edilir. Örnek ile kristal

arasındaki mesafenin yakın olması, belirli bir basınç ile sağlanır. Örnek kızıl ötesi spektrumunun bir kısmında enerjiyi absorbe ettiğinde, geriye kalan radyasyon zayıflatılmış hale gelecektir. Zayıflatılmış radyasyon ise spektrometre ile belirlenir, böylece örneğin kızıl ötesi spektrumu elde edilir.

Birçok kristal ATR ünitesinde kullanılabilmektedir. Kristallerin ana bileşenleri; germanyum (Ge), silikon (Si), elmas (Di) ve çinko-selenit (ZnSe)'ten oluşmaktadır. Kristal tercihi, örnek türüne ve kullanılmak istenen kızıl ötesi bölgesine göre belirlenmektedir (Severcan *et al.* 2011). Yansıtma özelliği en çok olan elmas (Di) kristalidir. ATR modu tıp, arkeoloji ve mineraloji, sanat eseri kaçakçılık suçlarında, ilaç ve uyuşturucu kullanımının tespitinde, boya ve kimyasallarda, aynı zamanda adli tıp gibi birçok alanda kullanılabilmektedir (Chalmers *et al.* 2012). Adli tıp alanında ise, olay yerinde bulunan biyolojik delillerin ayrımında, bu ayrım yapıldıktan sonra olay veya ölüm zamanını belirlemek amacıyla ATR-FTIR tekniği kullanılmaktadır. Örneğin Orphanou (2015) olay yerinde bulunan bazı vücut sıvılarının tanımlanması ve yaş tayininin yapılmasında ATR-FTIR tekniğini kullanmış ve bu teknikte doğru ayrımın ve yaş tahminin yapıldığını göstermiştir. Yine DeJong *et al.* (2015) farklı kumaş türlerinde farklı miktarlarda seyreltilmiş kan lekelerinin orta kızılötesi bölgesinde tespitini incelemiştir. Lu (2015) ise farklı nem ortamlarına bırakılan kan lekelerinde yaş tayininin ATR-FTIR tekniği yapılabileceğini rapor etmiştir.

ATR-FTIR spektroskopisi biyolojik sistemlerde moleküllerin farklı yapısal gruplarının hızlı, hassas ve eş zamanlı olarak görüntülenmesini sağlar. Küçük numune boyutu ve numune hazırlığının kolay olması gibi avantajlar biyolojik çalışmalar için bu tekniği iyi bir seçenek yapmaktadır. ATR kristalleri yerleştirilerek örnek hazırlığına gerek kalmadan direkt olarak inceleme yapılabilir. ATR-FTIR spektroskopisinde, numune inceliği çalışmayı etkilememektedir (Ozek 2015).

Bilindiği gibi ATR-FTIR ile ölçümler yapıldıktan sonra kemometrik analiz metotları ile sonuçlar yorumlanmaktadır.

1.2.3. Kemometrik analiz metotları

Spektroskopi temeline dayanan yöntemlerin oluşturduğu çoklu veriler bazen bilinen spektral analiz yöntemleri ile verimli analiz yapmayı güç kıldığından, çoğunlukla gruplar arası ayırma ve spesifik spektral biyo-belirteçlerin belirlenmesinde çok değişkenli kemometrik analizlere gereksinim duyulmaktadır. Tanılama ve sınıflandırma çalışmalarında genellikle kullanılan istatistiksel yöntemler gözetimsiz ve gözetimli örüntü tanımlama yöntemi olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadırlar.

1.2.3.a. Gözetimsiz örüntü tanımlama yöntemleri

Gözetimsiz örüntü tanımlama yöntemleri, eğitici veri örnekleriyle ilgili önceki bilgilere gerek duymaz. Bu nedenle daha önce bulunamamış, beklenilmeyen bir gruplandırma ortaya çıkmasına olanak tanır. Temel bileşen analizi (PCA), kümeleme analizi gibi yöntemler gözetimsiz örüntü tanımlama metotlarındandır. PCA farklı değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde ve bu sayede örnekler arasındaki ilişkinin açıklanmasında, kısaca örnekler arası benzerlik ya da farklılıkların yorumlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. PCA çok sayıda birbiri ile ilişkili değişkenler içeren, eldeki veriyi daha az sayıda değişkenle ifade edebilecek en iyi dönüşümü belirlemeyi amaçlar. Tek bir örnek üzerinde birden fazla ölçüm yapılabilmesine çok değişkenli ölçüm adı verilmektedir. Gürültüye karşı düşük hassasiyet, bellek ve kapasite ihtiyaçlarının azalması, az boyutlu uzaylarda daha etkin çalışması PCA'nın temel avantajları arasında sıralanabilir. Söz konusu analiz metodunda skor ve yükleme grafiği olmak üzere 2 tür grafik elde edilir. Skor grafiği örnekler arasındaki ilişkilerin/varyasyonların araştırılmasına olanak sağlarken, yükleme grafiği ise bu varyasyonlara hangi değişkenlerin ne kadar ölçüde katkı sağladığının analiz edilmesini sağlar. Kümeleme analizi ise bir tür çok değişkenli teknikler grubu olup, temel amacı grupları sahip oldukları karakteristik özellikleri temel alarak gruplamaktır. Kümeleme analizi, grupları küme içerisinde çok benzer biçimde, kümeler arasında farklı olacak biçimde kümeler (Wang and Mizaikoff 2008).

1.1.3.b. Gözetimli örüntü tanımlama metotları

Gözetimli örüntü tanımlama yöntemleri, eğitici veri örneklerinin sınıflandırılmasıyla ilgili bir ön bilgiye ihtiyaç duymaktadır. Verileri daha önceden tanımlanmış olan gruplara göre ayırır ve grup sınırları içinde daha keskin bir sınıflandırma yapar. Lineer ayırma analizi (LDA), kısmi en küçük kareler ayırma analizi (PLS-DA) , sıvı bağımsız sınıf analog modellemesi (SIMCA) ve yapay sinir ağları (Artificial Neural Networks, ANN) metotları gözetimli örüntü tanımlama yöntemleridir (Ozdemir 2009).

Amaç: Bu tezde pamuk ve keten kumaşlar üzerine damlatılan kan örneklerinde farklı sıcaklık ve farklı zaman aralıklarında meydana gelen değişimlerin, son dönemlerde kriminalistik araştırmalarda kullanılmaya başlanan ve özellikle vücut sıvılarının ayırımında kullanılan ATR-FTIR tekniği kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Yine herhangi bir ön hazırlık gerektirmeyen, kolay ve hızlı bir teknik olarak kullanılan ATR-FTIR spektroskopisinin farklı çevresel şartlar altında olayın zamanını tahmin etmede kullanılma potansiyeli değerlendirilmiştir. Yansıtma özelliği en fazla olduğundan dolayı ATR ünitesi olarak elmas (Di) kristali kullanılmıştır. Sonuçların elde edilmesinde ise kemometrik analiz yöntemlerinden kümeleme ve temel bileşen analiz (PCA) yöntemleri kullanılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Adli bilimlerde, biyolojik izler adli incelemeler için çok büyük öneme sahiptir. Biyolojik izler, olayın nasıl işlendiği ve olay yerinde ne olduğu gibi suç hakkında ya da şüpheli hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Olay yerinde bulunan vücut sıvılarının yaşlarını tahmin etmek bir diğer önemli bilgidir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda birçok teknik ve yöntemin bu bilgileri elde etmede kullanılabileceği gösterilmiştir.

Strasser *et al.* (2007) yapmış oldukları çalışmada adli olay sırasında muhtemel olarak kullanılabilecek kan lekesi yaş tahmini için yeni bir alet sunmuşlardır. Bunun için, bir nanometre skalada esnek değişimleri belirleme ve kan örneklerinde eritrositlerin yüksek çözünürlük görüntülenmesi amacıyla atomik güç mikroskopunu (AFM) kullanmışlardır. Analitik prosedür için bir cam kenarına taze kan damlatmışlar ve kan damlası kuruduktan sonra AFM ile kan yaşını belirlemeye çalışmışlardır. İlk adımda genel bir görüntüleme ile kırmızı kan hücrelerinin tipik şekillerinden dolayı kolay bir şekilde tespit ederek birkaç kırmızı kan hücresinin varlığının gösterimini sağlamışlardır. 4 hafta boyunca art arda yapılan morfolojik araştırmalarda kan hücrelerinde hiçbir değişim gözlenmemiştir. İkinci olarak AFM, kuvvet-uzaklık eğrilerini kaydederek esnekliğini test etmek için kullanmışlardır. Ölçümleri, kan kuruduktan 1.5, 30 saat ve 31 gün sonrasında hemen yapmışlardır. Koşullar, sabit oda sıcaklığı (20°C) ve sabit nemde (%30) tutulmuştur. Elde edilen esneklik parametrelerinin, zamana ve birkaç tekrara bağlı olarak grafiğini çizmişlerdir. Esnek şekilleri, kuruma ve çökme süreci sırasında kan lekelerinin değişimi ile muhtemelen etkileyen zamana göre bir azalma olduğunu bulmuşlardır. Ön veriler, adli incelemeler sırasında kan lekesi yaş tahmini için kullanılan kalibrasyon eğrilerinin geliştirilerek bulunan bu metot ile yapılabileceğini göstermiştir.

De Wael *et al.* (2008) kanlı cinayet olaylarında zanlı üzerinde kan kalıntılarının hızlı bir şekilde belirlenmesi için bir protokol tanımlamışlardır. Bu amaçla kanın mikro partiküllerinin, bant kaldırma (tape lifting) metodu ile elyaf ve saç örneklerini hazırlamışlardır. Bantlar, kana benzer morfolojiye sahip kırmızı partikülleri için düşük

güçte bir mikroskop ile incelendikten sonra, kan izleri olduğu düşünülen bantların bir parçası kesilerek mikrospektrofotometre ile incelenmiştir. Hemoglobinin tipik görünür spektrumunun kan için karakteristik olduğu bilindiğinden, Raman spektroskopisi ile hemoglobinin spektrumunu ölçmüştür. Diğer bir aşamada, banttı kesit alınarak genetik profillemeye amacıyla kan ekstrakte edilmiştir. Sonuç olarak, mikrospektrofotometre ile kan leke tayini yapılabileceğı gösterilmiştir.

Olay yerinde bulunan kan lekesinin zamanının belirlenmesi araştırmacılara paha biçilemez bir kanıt sağlamaktadır. Kan lekesi yaşını belirlenmesinde başarılı olan çeşitli metotlar olmasına rağmen, kan lekelerinden zaman ve yaş tayinin oldukça zor olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmamaktadır. Hanson and Ballantyne (2010) çalışmalarında, karakteristik oksidasyon kimyasına bağı olan hemoglobinin UV-VIS spektrofotometrik analizini kullanarak kuru kan lekesinin zamana göre çökme (TSD) tahmini için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Yaşlanmış kan lekesinde Hb Soret bandının (λ_{max} :412), detaylı çalışması ile lekenin yaşı ilerledikçe, mavi bir değişim (daha kısa dalga boylarına değişim) olduğunu açıklamışlardır. İlk zamandan beri gerçekleşen bu değişimin boyutu, analizler ve geri kazanımdan önce dakikalar, saatler, günler ve haftalarca çökmüş olan kan lekeleri arasında ayırım yapmaya olanak tanımıştır. Mavi değişimin boyutunun nem ve sıcaklıkla ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Yöntem oldukça hassas olup aynı zamanda analiz için kuru kan lekesinden 1 µl kadar düşük hacimli örnek gerektirmektedir. Hanson and Ballantyne (2010) olay yerinde düşük- örnek-hacmi gerektiren taşınabilir spektrofotometre kullanarak TSD ölçümlerinin yapılabileceğini göstermişlerdir.

Li *et al.* (2011) kan lekelerinden yaş tayini için mikrospektrometre (MSP) olarak adlandırılan yeni bir yöntem çalışmışlardır. Bu yöntemde, spektral ön işleme ve denetimli istatistiksel sınıflandırma teknikleri kullanmış ve hemoglobin bileşenlerinin görünür yansıma spektrumu ile ölçümü yapılmıştır. Pürüzsüz beyaz bir fayans üzerine at kanını damlatılarak, 1 ve 37 gün arasında kontrol edilen koşullar altında 442-585 nm dalga boylarında MSP aracılığıyla yapmışlardır. Yaş tayinini, kan lekesinin zaman ile spektrumdaki ilerleyici değişimine dayandırmışlardır. Örnek spektrumlarına spektral ön

işlemler uygulayarak, Fisher ağırlık ve spektrumun Fourier dönüşüm (FT) hesaplanmasına dayanarak, linear ayırım analizlerine (LDA) dayanan istatistiksel model kullanmışlardır. Bu yöntem kan lekesi yaşını tahmin etmek için kullanılmış ve leave-one-out doğrulama testi kullanılarak test etmişlerdir. Aynı kan lekesinde yapılan analizler sonucunda yüksek doğrulukta sınıflandırma elde etmişleridir. Böylelikle MSP yönteminin kan lekesi yaş tayininde kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Kan lekelerinin tanımlanması ve daha sonrasında yaş tayinin yapılması adli olaylarda en önemli adımlardan biridir. İkinci önemi ise suçun zamana ait yönleri hakkında önemli bilgiler sağlamasıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda beyaz arka planda kan lekelerinin görünür spektroskopisi ile kan lekeleri tanımlanmış ve bu yöntemin yaş tahmininde başarılı bir şekilde kullanıldığı rapor edilmiştir. Ancak bu teknik koyu bir arka planda kullanılamayacağından dolayı Edelman *et al.* (2012) yapmış oldukları çalışmada koyu arka planda yakın kızılötesi spektroskopisinin (NIR) kan lekesi tanımlanması ve yaş tahmini için kullanılma imkanını değerlendirmişlerdir. NIR yansıma spektroskopisini kullanarak, kan lekelerinin %100 hassaslık ve spesifiklik ile diğer maddelerden ayırmışlardır. Çalışmada kısmi en küçük karelerde regresyon analizlerinin de renkli arka planda kan lekelerinin yaş tahmininde kullanıldığı belirtilmiştir. Çalışmada 1 aya kadar kan lekesi yaşı, ortalama %8.9 tahmin hatası ile başarılı bir şekilde tahmin edilmiştir. Bu bulgular, çeşitli renklerdeki arka planla karşı karşıya kalındığında, adli vakalarda kan lekesi tanımlanması ve yaş tahmininin pratikte uygulanması için önemli bir adım olmuştur.

Li *et al.* (2013) kan lekelerinden yaş tayini için hiperspektral görüntü olarakta bilinen görünür dalga boyunu kullanmışlardır. Bu çalışmada beyaz fotokopi kağıdı üzerine kan damlatılmış ve sabit nem ile 30°C sıcaklıkta ve sabit nemde 30 güne kadar belli aralıklarda ölçümler alınmıştır. Portatif bir aletten elde edilen hiperspektral görüntü içinde seçilmiş yerlerden yansıyan spektrum, spektral ön işleme maruz bırakılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda ilk 7 günden 30 güne kadar çok az hata ile lineer sınıflandırma yapılabileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda 1 günden daha az sürede taze kan lekesinin de yaş tayininde kullanılabileceği rapor edilmiştir. Kontrollü koşullar

altında yapılan çalışmada, 0 ile 30 gün arasında yapılan ölçüm sonuçlarından çoğunun yaş tahminlerinin doğru olarak tespit edildiği ve HbO_2 'nin zamana bağlı olarak gerçekleşen oksidasyonu sonucunda güvenilir şekilde açığa çıkan spektroskopik değişimleri tanımlayabilen ön işlem aşamalarının, önerilen iyi kurulmuş kinetik süreçler ile tutarlı olduğunu gösterilmiştir. Bu yöntem, sabit çevresel koşullarda gelişmiş sınıflandırma yapabilmesi ve gerçekten portatif bir alet olması nedeniyle, olay yerinde uygulanabilecek bir metot olarak önerilmektedir.

Lu (2015) 3 tane akrilik ve 3 tane pamuk kumaş örneklerinden $4 \times 11 \text{ cm}^2$ büyüklüğünde kumaşlar hazırlamıştır. Fareden alınan kanı EDTA'lı tüpe koyduktan sonra, kanı distile su ile 10X ve 100X olarak seyreltmıştır. Toplam hacim $200 \mu\text{l}$ olacak şekilde kumaşlara seyreltilmemiş ve seyreltilmiş kanları uygulamıştır. Tanklar içine %65, %75 ve %85'lik yapaysal nem ortamlarını hazırlamıştır. Sıcaklık ve nemi sürekli kontrol altında tutmuştur ve kaydetmiştir. 83 günlük bir süre içerisinde her gün ATR-FTIR ile tüm örneklerin ölçümlerini almıştır. Çalışmada SmartDuraSamplIR'ye sahip Thermo Nicolet Nexus 670 Fourier dönüştürücü spektrometresi olan ATR ile çalışmıştır. $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında 4 cm^{-1} çözünürlüğünde veriler toplanmıştır. Sonuç olarak uzun ve kısa zaman dilimlerinde pamuk kumaş üzerinde kan yaş tahmininin, akrilik kumaş üzerindeki kan yaş tahminine göre daha iyi sonuçlar verdiği bulunmuştur. Pamuk hidrofilik bir kumaş, akrilik hidrofobik bir kumaş olduğu için kanın pamuk kumaşa daha homojen şekilde dağılmasından dolayı pamuktaki kanın spektrum varyasyonlarının azalmasına neden olduğu bulunmuştur. Zaman geçtikçe substrat ve kan arasında farklı etkileşimlerin artmasından dolayı yaş tahminini değiştiği gözlemlenmiş ve böylelikle hidrofobik ve hidrofilik bir substrat olmasının bu mekanizmayı etkileyebileceği bulunmuştur. Kızılötesi bölgesinde piklerin pozisyonu ve yoğunluğu bakımından 83 günlük zaman diliminde yaş tahmini olarak akrilik kumaşa 5-10 gün, pamukta 4-9 gün hata ile yaş tahmini yapmayı sağlamıştır. Pamukta yaş tahmininin daha iyi çıkmasının homojen dağılımından dolayı olduğunu ileri sürmüştür.

Kan, tükürük, semen ve vajinal sıvı olay yerinde en çok karşılaşılan insan vücut sıvılarıdır. Bugünlerde varsayımsal testlerin genellikle yanlış pozitif sonuçlar vermesi

ve bazı vücut sıvıları ile sınırlı olmasına rağmen, testler genellikle vücut sıvılarının varlığını göstermek için rutin olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda proteomiks ve mRNA analizleri gibi daha hassas ve daha spesifik vücut sıvısı tanımlama metotları keşfedilmiştir, fakat bunlar rutin uygulamalar için uygun değildir. Orphanou *et al.* (2015) yaptığı bu çalışmada insan kan, tükürük, semen ve vajinal sıvılarının belirlenmesi ve ayrımının yapılması için ATR-FTIR uygulamasını keşfetmiştir. ATR-FTIR spektroskopisi ile biyolojik materyal içinde yaygın olarak bulunan makromoleküllerin spektrum şekilleri, pik kombinasyonları ve frekanslarına göre vücut sıvıları arasında ciddi bir tespit ve ayırım yapılabildiği belirtilmiştir. Her vücut sıvısı ile ilgili olduğu bilinen proteinler karşılaştırıldığında, oluşan piklerle ilgili molekülün ne olduğu çok daha kolay analiz edilmiştir. Böylelikle adli bilimlerde hızlı ve kuvvetli bir uygulama olmasından dolayı ATR-FTIR spektroskopisinin biyolojik kanıtlarda rutin olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

DeJong *et al.* (2015) 4 farklı kumaş tipinde kızılötesi (IR) dağılmış yansıma spektrumu kullanılarak kan için tespit limiti (DL) bulunmuştur. Dilüe edilmiş rat kanı, akrilik kaplanmış, pamuk, naylon ve polyester kumaşlara damlatılmıştır. Dilüsyon miktarına göre tesit limiti adli komite için önemlidir. Akrilik kumaşa damlatılmış kan lekesi için DL'nin protein amit 1/2 absorpsiyon bantları için orta kızılötesi spektrumun uygun olduğu bulunmuştur. Akrilik, pamuk ve polyester kumaş için farklı dilüsyon yüzdeleri olduğu gösterilmiştir. Naylon kumaş için ise dilüsyon yüzdesi belirlenememiştir. DeJong *et al.* (2015) luminol metodunu kullanarak kan belirleme için rapor edilen DL değerlerini karşılaştırmışlardır. En yaygın şekilde rapor edilen luminol DL, tahmin etmiş oldukları kızılötesi DL'den 2-7 kat daha düşük olan, 1000 kat dilüsyon dizisi olduğunu göstermişlerdir.

DNA çalışmaları bireylerin tanımlanmasına olanak verdiği için vücut sıvıları adli bilimlerde büyük ilgiye sebebiyet veren bir kanıttır. Vücut sıvılarının belirlenmesi için adli uygulayıcılar tarafından kullanılan testler ve metotlar gözden geçirildikten ve temel sınırlar ve sakıncalar gösterildikten sonra, Zapata *et al.* (2015) bu çalışmada vücut sıvılarının adli analizleri için uygulanan ortaya çıkmış spektrometrik tekniklerin gözden

geçirilmesine odaklanmışlardır. Kan, idrar, semen, tükürük, vajinal sıvı ve terin araştırılması için; görünür ultraviyole (UV), kızılötesi (IR), Raman, X-Ray floresans ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ve kütle spektrometresi kullanmışlardır. Tüm bu spektrometrik tekniklerin DNA ekstraksiyonu öncesi vücut sıvılarını ayırt etmeye olası gibi görünse de, IR ve Raman spektroskopisinin vücut sıvılarının ayırımında daha umut verici sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir.

Zapata *et al.* (2016) çalışmasında kemometrikler ile kombine edilmiş FTIR iç yansıması ile farklı renklerde pamuk kumaş üzerine konulmuş semen, vajinal sıvı ve idrar lekelerinin ayrımı ile çalışmışlardır. Çalışmalarında bu amaçla semen-vajinal sıvı karışımları yanı sıra sabun, süt, losyon ve meyve suyu gibi günlük yaşamda yaygın bir şekilde kullanılan olası yanlış pozitif sonuçlar verebilen maddelerle de çalışmışlardır. Buldukları sonuçlar IR spektral sinyalleri ile her vücut sıvısının tanımlanmasının yanında sıvı bağımsız sınıf analog modellemesi (SIMCA) ve temel bileşen analizi (PCA) ile de bilinmeyen lekelerin doğru sınıflandırılmasını sağlamışlardır. Yapılan çalışmada kumaş renginden ve günlük hayatta varlığı analiz edilebilen yanlış pozitifliğe neden olan maddelerin hiçbirinin spektrumunda bantlar görülmemiştir.

Szykuła (2016) kan, tükürük, semen ve parmak izi olmak üzere 4 tane vücut sıvısının yaş sürecini incelemiştir. Belirtilmiş olan vücut sıvıları protein içerikli sıvılardır. Bu bileşenlerin tipini kütle spektrometresi kullanarak ölçmüş ve vücut sıvılarını farklı zamanlarda analiz etmiştir. Çalışmada birkaç protein tanımlanarak onların miktarları vücut sıvıları ile karşılaştırılmıştır. Kan, semen ve tükürük için proteinlerin sayısının zaman ile değiştiği belirtilmiştir. Aynı zamanda, bazı proteinlerde zaman geçtikçe, miktarının değiştiği gözlemlenmiştir. Böylelikle çalışma sonucunda, protein seviyelerinin biyolojik izlerde zamanla değiştiği ve biyomoleküllerin olay yerinde bulunan spesifik vücut sıvılarının yaş tahmini için biyomarker olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Tez çalışması, Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları ve Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütülmüştür. Çalışmada %100 pamuk ve keten beyaz kumaş, biyolojik sıvı olarak ise insan kanı kullanılmıştır. Analizler için Azaltılmış Toplam Reflektans Fourier Dönüşüm Kızıl Ötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR), QIAamp® DNA Mini Kit ve elektroforez cihazları kullanılmıştır.

Deneyin Yapılışı

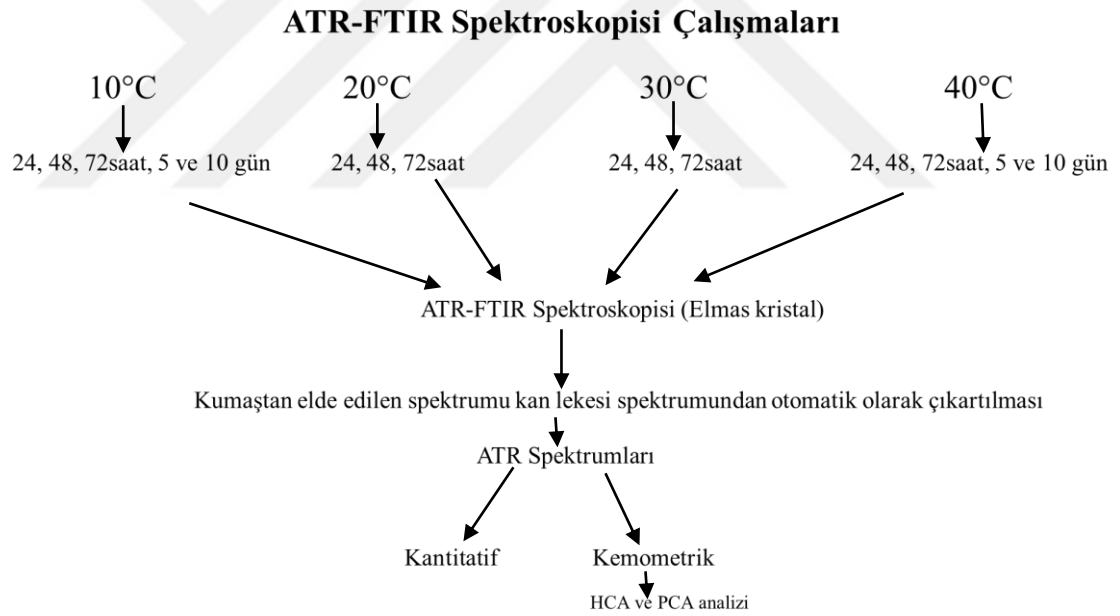
3.1. Örnek Hazırlanması

Pamuk ve keten beyaz kumaşlar deneyden 24 saat önce saf sudan geçirilmiş, kuruduktan sonra $4 \times 4 \text{ cm}^2$ büyüklüğünde karelere bölünmüş ve her kumaş numaralandırılmıştır. Numaralandırılan kumaşların ağırlıkları tartılmış ve kaydedilmiştir. Kumaşlar cam petri kaplarına konularak steril edilmiş ve gruplara ayrılmıştır.

Uygulama grupları:

- I) 24 saat 10°C , 20°C , 30°C ve 40°C sıcaklığa maruz bırakılan pamuk (3 paralel) ve keten kumaşlar (3 paralel)
- II) 48 saat 10°C , 20°C , 30°C ve 40°C sıcaklığa maruz bırakılan pamuk (3 paralel) ve keten kumaşlar (3 paralel)
- III) 72 saat 10°C , 20°C , 30°C ve 40°C sıcaklığa maruz bırakılan pamuk (3 paralel) ve keten kumaşlar (3 paralel)
- IV) 5 gün ve 10 gün 10°C ve 40°C sıcaklığa maruz bırakılan pamuk (3 paralel) ve keten kumaşlar (3 paralel)

Daha sonra sağlıklı gönüllü bir bireyden intravenöz yol ile damardan alınan kan antikoagulan içermeyen tüplere aktarılmış ve pıhtılaşmadan petri kapları içerisindeki steril kumaş parçaları üzerine 200 µl hacminde damlatılmıştır. Kan damlatılmış kumaşlar önceden 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklığa ayarlanmış etüvler içerisine konularak, sabit nem ve ışısız ortamda 24, 48, 72 saat 5 gün ve 10 gün bekletilmiştir. Sıcaklık uygulamalarının ardından etüvden çıkarılan kumaşların ağırlıkları tartılarak kaydedilmiş ve kumaşlar DNA izolasyonu ve FTIR analizleri için 2 ye bölünmüştür. İki parçaya ayrılan 4x4 cm²'lik kumaşlardan FTIR analizlerinde kullanılacak olanlar tekrar 3 parçaya bölünmüştür. Böylece FTIR analizleri için her örnekten 2x3=6 ölçüm yapılmıştır. Ölçümler Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DAYTAM) yapılmıştır.



Şekil 3.1. Tez çalışmasında izlenilen deney ve analiz aşamalarının özeti

3.1.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için QIAamp® DNA Mini Kit'in kuru kan lekeleri için oluşturulan protokolü kullanılmıştır. İzolasyon protokolünün basamakları aşağıda özetlenmiştir:

1. Üzerinde kan lekeleri bulunan kumaşlardan steril bir makasla 3 mm çapında kumaş parçaları kesilmiş (her örnek için 5 daire), kesilen kumaşlar steril ependorf tüplerine konulmuştur.
2. Her bir tüp içerisindeki kumaş üzerine 180 µl ATL solüsyonu konularak tüpler hafif bir şekilde çalkalanmış ve tüpler 85°C'ye ayarlanan su banyosuna konularak 10 dakika bu sıcaklıkta tutulmuştur.
3. Kısa bir süre santrifüj edildikten sonra tüplere 20 µl Proteinaz K eklenmiş ve kuvvetlice vortekslenmiştir. Daha sonra tüpler 65°C'ye ayarlanan su banyosunda 1 saat bekletilmiş, ardından kısa bir süre santrifüj edilmiştir.
4. Tüpler üzerine 200 µl AL solüsyonu eklenmiş ve 70 °C su banyosunda 10 dakika bekletilmiş ve yine kısa bir santrifüj yapılmıştır.
5. Tüplere 200 µl %96-100 etanol eklenmiş ve kuvvetlice vorteks yapıp, kısa bir santrifüj yapılmıştır.
6. Karışım, ependorf tüpten dikkatli bir şekilde kenarlar ıslatılmaksızın QIAamp Spin kolon'a (2 ml toplama tüpüne) aktarılmış ve 6000x g (8000 rpm)' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Toplama tüpü atılmış ve yeni 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne QIAamp Spin kolon yerleştirilmiştir.
8. Kolon üzerine 500 µl AW1 solüsyonu eklenmiş ve 6000x g (8000 rpm) 'de 1 dakika santrifüj edilmiş, toplama tüpü atılarak 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne QIAamp Spin kolon yeniden yerleştirilmiştir.
9. Kolon üzerine 500 µl AW2 solüsyonu eklenmiş ve 3 dakika 20 000x g'de santrifüj edilmiş, toplama tüpü atılarak 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne QIAamp Spin kolon yerleştirilmiştir.
10. 1 dakika 20 000x g'de santrifüj yapıp, toplama tüpü atılarak kolon 1.5 ml'lik ependorf tüpleri üzerine alınmıştır.
11. Kolon üzerine 30 µl Buffer AE eklenmiş, 1 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra 6000x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Yeniden kolona 20 µl Buffer AE eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika beklenmiş ve 6000x g'de santrifüj edilerek DNA izole edilmiştir.
12. Elde edilen DNA agaroz jel elektroforezinde koşturulmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Agaroz jel elektroforezi

Zamana ve sıcaklığa bağılı olarak DNA miktarında değişim olup olmadığını belirlemek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. İşlem aşağıda özetlenmiştir.

- a. Jel içerisinde agarın konsantrasyonu %1,5 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 0,5X Tris-Borat EDTA (TBE) tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır.
- b. Mikrodalga fırından çıkarılan 0,5X TBE + agaroz çözeltisi içerisine 0,5µg/ml olacak miktarda Ethidium bromid eklenmiştir.
- c. Hazırlanan jel katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur.
- d. Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (3µl bromfenol mavisi + 7µl DNA ürünü) yüklenmiştir.
- e. Elektrik akımı verilerek 70V–150 dk süre ile DNA'lar elektroforez işlemine tabi tutulmuş, iki saat sonunda elektrik akımı kesilmiştir.
- f. Elektroforez tankından çıkarılan jel UV ışık altında incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2. ATR-FTIR Spektroskopisi Deneyleri

3.2.1. Spektral verilerin toplanması

24 saat, 48 saat, 72 saat, 5 gün ve 10 gün süre ile 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan kan damlatılmış pamuk ve keten kumaşlar ölçüm almak için ATR ünitesine sahip Bruker Vertex 70 FTIR spektrometresinin Elmas/ZnSe kristalinin üzerine yerleştirilmiştir. Örnek spektrumları, sabit basınç altında, 4000-400 cm⁻¹ spektral bölgede 4 cm⁻¹ çözünürlükte 50 tarama sayısı ile OPUS 5.5 yazılımı (Bruker Optics, GmbH) kullanılarak elde edilmiştir. Her sıcaklık ve süre için 6 ayrı örnekten, her bir örneğin spektrumdan emin olmak için ise aynı örneğin 3 ayrı noktasından spektrumlar toplanmıştır. Elde edilen 3 spektrumun ortalaması alınmış ve bu

spektrumlar hem kantitatif spektral hem de kemometrik analizler için kullanılmıştır. Ölçümler üzerine kumaşın etkisini ortadan kaldırmak amacıyla kan örneği olmayan boş kumaş örneklerinin ATR-FTIR spektrumları arka plan (background) olarak çekilmiş ve söz konusu spektrumlar kanlı örnek spektrumundan otomatik olarak çıkarılmıştır.



Şekil 3.2 Bruker Vertex 70 FTIR spektroskopisi (Anonymous 2016b)

3.2.2. Spektral data analizleri

FTIR spektroskopisi ile kan yaş tayini, örneklerle ait spektrumlardaki bantların şiddeti veya bantın altında kalan alan ile konumlarındaki kayma gibi parametrelerdeki değişimlerin analiz edilmesi sonucunda elde edilmektedir. Bu nedenle 24, 48, 72 saat, 5 ve 10 gün süre ve 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklardan elde edilen, normalize edilmemiş ham ortalama spektrumlardan bant frekans ve bant alan analizleri yapılmıştır. Kumaşlardaki kan lekelerinde, sıcaklık ve zamana bağlı meydana gelen değişimleri belirlemek amacıyla, amit 1 ve amit 2 bantlarının; bant konumları, bant alanları ve bant alan oranları hesaplanmıştır. Bant frekanslarını elde etmek amacıyla bant yüksekliğinin %80 ile bu noktanın ortasına karşılık gelen frekans değeri ölçülmüştür.

Analizler için Perkin Elmer Spectrum One programı (Perkin Elmer Inc., Norwalk, CT, USA) kullanılmıştır. Bilindiği gibi bantların, bant konumlarındaki ve bant alan

oranındaki değişimler proteinlerin yapısında meydana gelen değişimler hakkında bilgiler vermektedir. Bu yüzden protein ikincil yapılarında meydana gelen değişimleri belirlemek amacıyla bantların altında kalan alt bantların sinyal şiddetleri ölçülmüştür. Analiz için öncelikle bantların ikincil türevi alınmış, daha sonra vektör normalizasyonu uygulanmıştır. İkincil yapı analizleri OPUS 5.5 yazılımı (Bruker Optics, GmbH) ile yapılmıştır.

3.2.2.a. Kemometrik analizler

Çalışılan grupların sınıflandırılması amacıyla, kemometrik analiz metotlarından olan gözetimsiz (unsupervised) örüntü tanıma yöntemlerinden, hiyerarşik kümeleme (HCA) ve temel bileşen analizi (PCA) metotları kullanılmıştır.

3.2.2.b. Gözetimsiz örüntü tanımlama metotları

Hiyerarşik kümeleme analizi için OPUS 5.5 (OPUS, Bruker Optics, Ettlingen, Germany), temel bileşen analizi için ise Unscrambler X 10.3 (Camo Software, Inc.) programı kullanılmıştır. PCA ve HCA analizleri için örnek spektrumlarının ikincil türevleri alınmış, daha sonra vektör normalizasyonu yapılmıştır. PCA sonuçları skor grafikleri, HCA sonuçları ise dendrogram grafikleri şeklinde verilmiştir.

3.2.2.c. Spektral farklılıklara dayanarak grupların ayrımında kullanılacak metotların duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değerlerinin hesaplanması

Kan yaş tayini hesaplamasında geliştirilen metotların tayindeki başarısı, özgüllük ve duyarlılıklarına bağlıdır. Duyarlılık kontrol grubu dışındaki grupların, özgüllük ise kontrol grubunun ne kadarının doğru olarak ayrıldığını gösteren parametrelerdir. Bu çalışmada gözetimsiz örüntü tanımlama metodu ile elde edilen ayırım yöntemi, duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değerleri aşağıda verilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Duyarlılık} = (A \times 100) / (A + B)$$

$$\text{Özgüllük} = (D \times 100) / (C + D)$$

$$\text{Doğruluk} = [(A + D) \times 100] / (A + D + B + C)$$

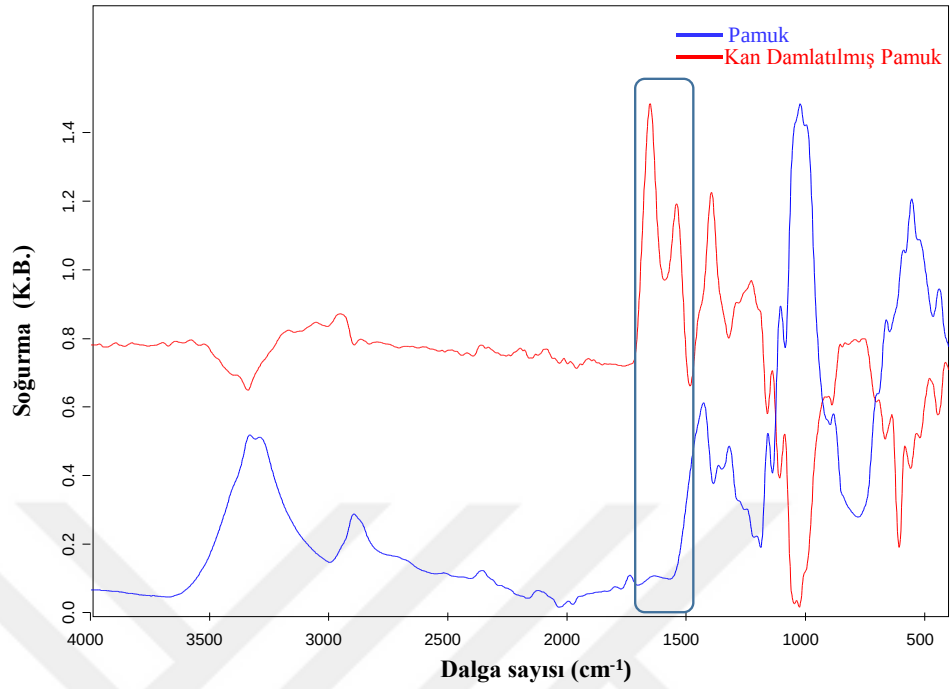
Kümeleme Analizleri		
	Pozitif	Negatif
48s/72s/5g/10g	A	B
24s	C	D

3.2.3 İstatistiksel veri analizi

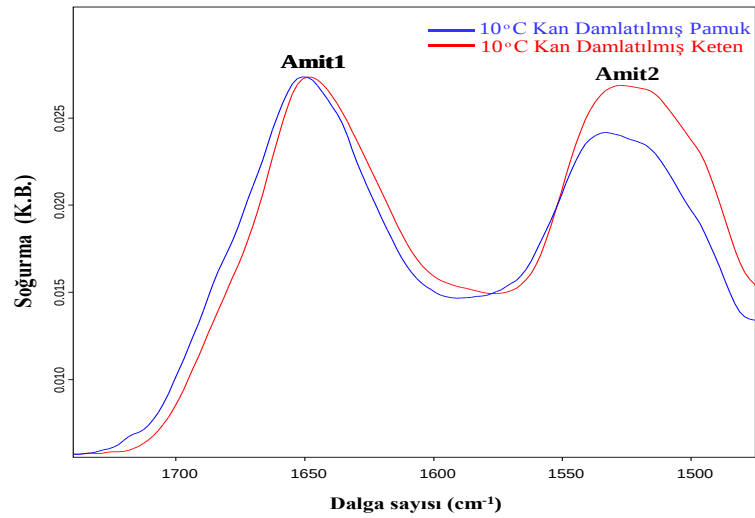
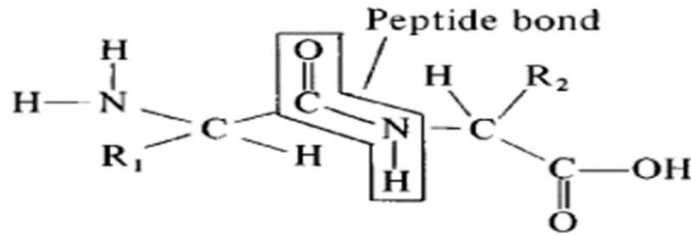
Farklı süre ve sıcaklıklara maruz bırakılan keten ve pamuk kumaşlardaki kan lekesi spektrumlarına ait spektral analizlerden elde edilen verilerin istatistiksel açıdan anlamlılığını tespit etmek amacıyla, öncelikle verilerin normal dağılım gösterip göstermediği incelenmiştir. Normal dağılım gösteren örneklerden, grup sayısı 2 olanlar için t test, örnek sayısı 2'den fazla olanlar için ise tek yönlü ANOVA istatistiksel analiz metodu kullanılmıştır. Grup karşılaştırmaları için kontrol grubu olarak 24 saatlik örnekler alınmış, Dunnet testi kullanılarak GraphPad Prism 6.01 istatistiksel analiz programı ile analiz yapılmıştır. Tüm örnekler, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırılmış, elde edilen tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel önem a, b, c, d 1: $p < 0,05$, a, b, c, d 2: $p < 0,01$, a, b, c, d 3: $p < 0,001$ ve a, b, c, d 4: $p < 0,0001$ şeklinde sunulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Öncelikle deney koşullarını optimize etmek amacıyla kan damlatılmış ve damlatılmamış pamuk ve keten kumaşların kızılötesi spektrumları toplanarak karşılaştırılmış, kumaştan kaynaklanan kızılötesi spektral bantlar belirlenmiştir. Kan damlatılmış örneklerden elde edilen spektral bantlarda, kumaştan kaynaklanan bantların katkısını elimine etmek amacıyla bu bantların spektrumları arka plan olarak toplanmıştır. Arka planda toplanan bu spektrumlar cihazın kendi yazılımı kullanılarak kan damlatılmış örneklerin spektrumundan çıkarılmıştır. Şekil 4.1’de kan damlatılmış ve damlatılmamış pamuk kumaşa ait $4000-400\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde yer alan spektrumlar verilmiştir. Literatürde yapılan benzer çalışmalar da dikkate alınarak gerek $3800-2800\text{ cm}^{-1}$ gerekse $1480-400\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde kan damlatılmamış pamuk (Şekil 4.1) ve keten kaynaklı spektral bantların bulunduğu alanlar çalışma kapsamında incelenmemiştir. Öte yandan kan damlatılmış pamuk ve keten kumaşlarda $1740-1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgede yer alan ve sadece proteinlerden kaynaklanan amit 1 ve amit 2 bantları analiz edilmiştir. Amit 1 bandı $1652-1650\text{ cm}^{-1}$ frekansta bulunan ve %80 oranında C=O gerilme, %10 oranında C-N gerilme ve %10 oranında N-H bükülme titreşimlerinden kaynaklanan banttır. Amit 2 bandı ise $1528-1523\text{ cm}^{-1}$ frekansta yer alıp, %60 oranında N-H bükülme ve %40 oranında C-N gerilme titreşimlerinden oluşmaktadır (Haris and Severcan 1999) (Cakmak *et al.* 2006; Ozek *et al.* 2010). $1740-1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde proteinlerden kaynaklanan amit 1 ve amit 2 bantları Şekil 4.2’de verilmiştir. Bu bantlar çalışılan örnekte yer alan total proteinlerde meydana gelen yapısal ve konsantrasyona bağlı değişimleri belirtmek için kullanılır. Yapısal değişimler ise amit 1 ve amit 2 bantlarına ait dalga sayısı kaymalarından veya bantlara ait alan ya da sinyal şiddeti oranındaki değişimlerden belirlenir. Çalışmamızda kan lekelerinde sıcaklığa ve zamana bağlı olarak proteinlerde meydana gelen yapısal değişimleri belirlemek amacıyla amit 1 ve amit 2 bantlarının dalga sayıları analiz edilmiştir.



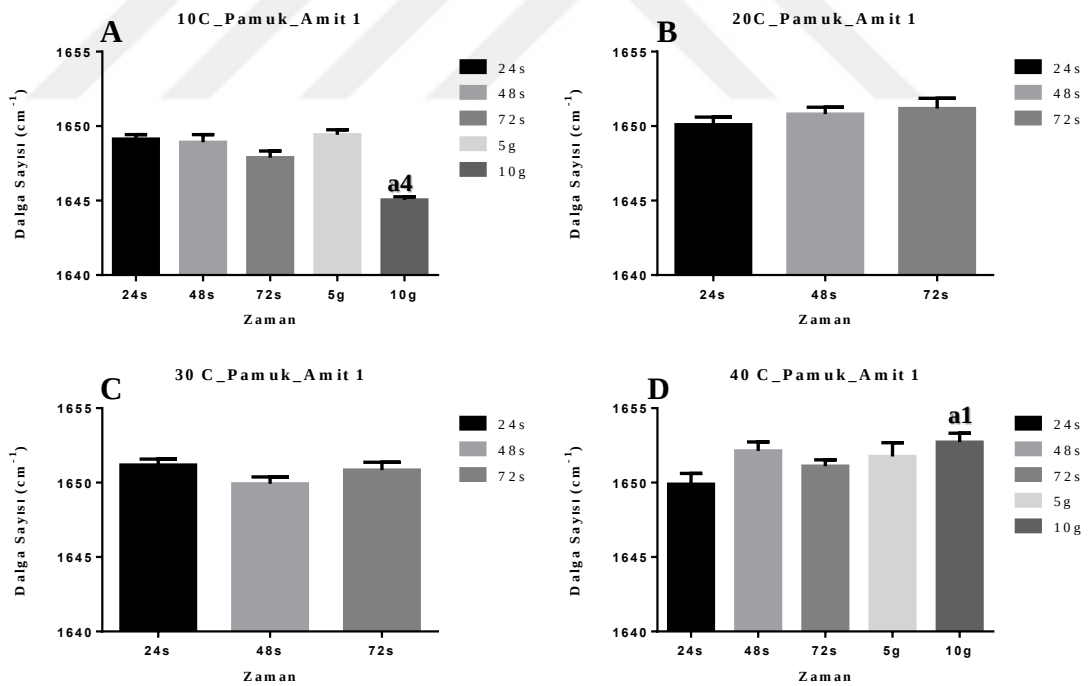
Şekil 4.1. Pamuk ve kan damlatılmış pamuk örneklerine ait 4000-400 cm^{-1} spektral bölgesinde yer alan kızılötesi spektrumları



Şekil 4.2. Kan damlatılmış pamuk ve keten kumaş örneklerine ait 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde ki amit 1 ve amit 2 bantlarının yer aldığı kızılötesi spektrumları

4.1. Kantitatif Analiz Sonuçları

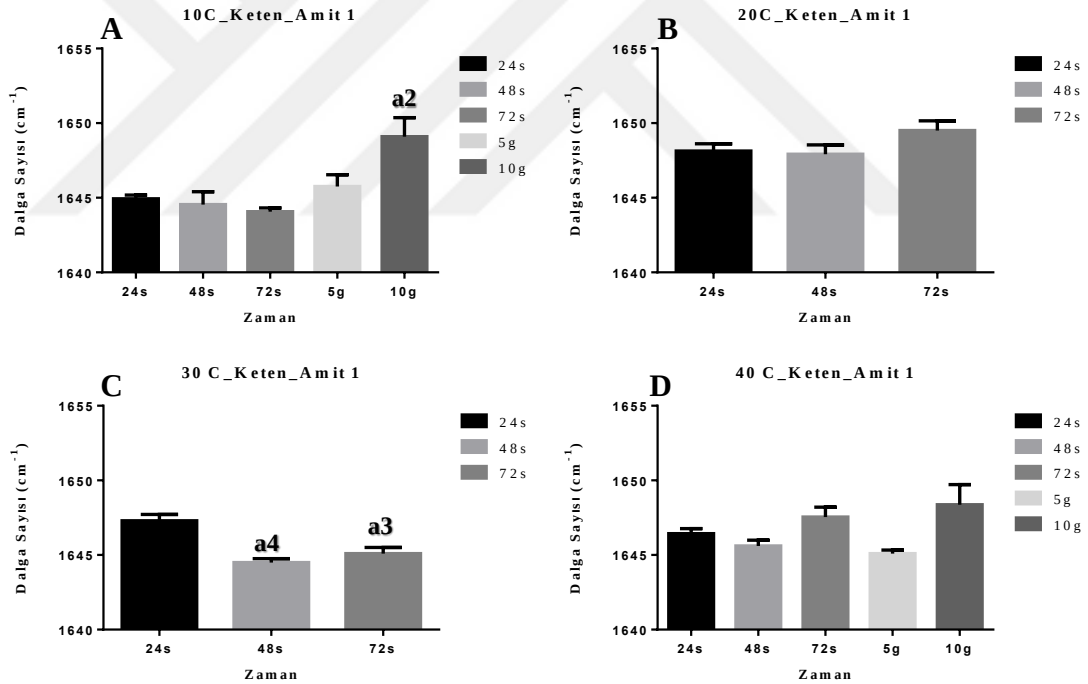
Şekil 4.3 A, B, C ve D zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayılarındaki değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10°C ve 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı olarak (48 saat, 72 saat, 5 gün ve 10 gün) amit 1 bandı dalga sayısında anlamlı değişim gözlenmiştir. Örneğin kontrol ile kıyaslandığında 10 gün 10°C uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olurken ($p<0,0001$), 10 gün 40°C ($p<0,05$) uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir. Öte yandan, kontrol ile kıyaslandığında 20°C ve 30°C’de zaman bağılı olarak istatistiksel anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.3. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler

*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır a1: $p<0,05$ a2: $p<0,01$ a3: $p<0,001$ a4: $p<0,0001$

Şekil 4.4 A, B, C ve D zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayılarındaki değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10°C ve 30°C sıcaklıklarda zamana bağlı olarak (48 saat, 72 saat, 5 gün ve 10 gün) amit 1 bandı dalga sayısında anlamlı bir değişim gözlenmiştir. Örneğin kontrol ile kıyaslandığında 10 gün 10°C uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış olurken ($p<0,01$), 48 saat ($p<0,0001$) ve 72 saat ($p<0,001$) 30°C uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış kaydedilmiştir. Öte yandan, kontrol ile kıyaslandığında 20°C ve 40°C’de zaman bağlı olarak istatistiksel anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

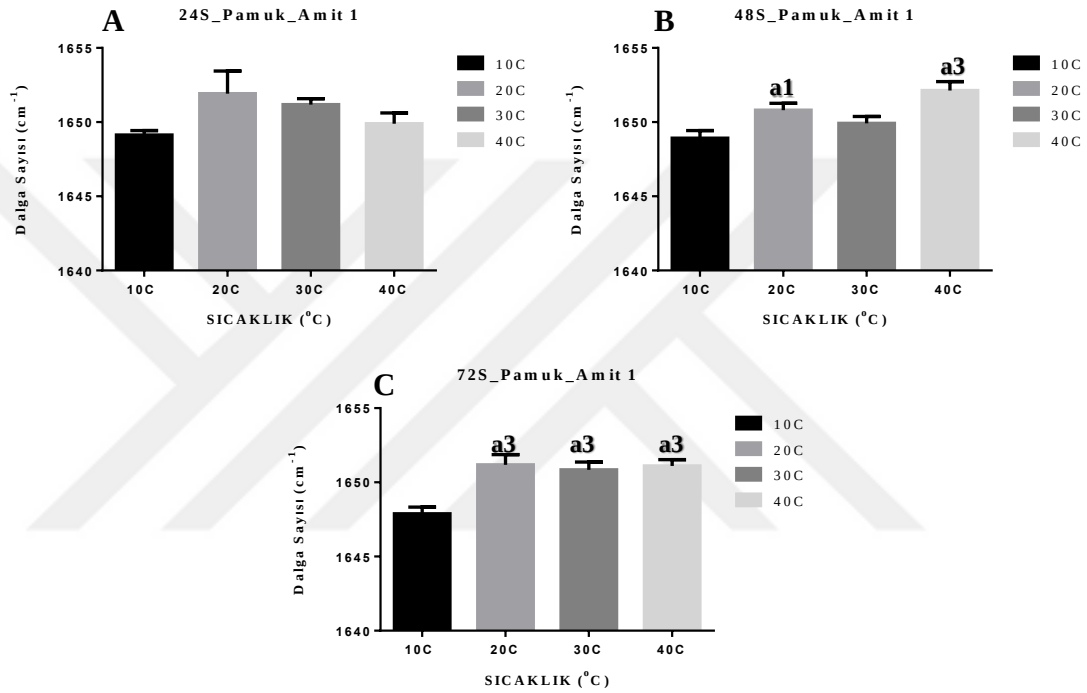


Şekil 4.4. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40 °C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler

*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır a1: $p<0,05$ a2: $p<0,01$ a3: $p<0,001$ a4: $p<0,0001$

Şekil 4.5 A, B ve C zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında oluşan değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol

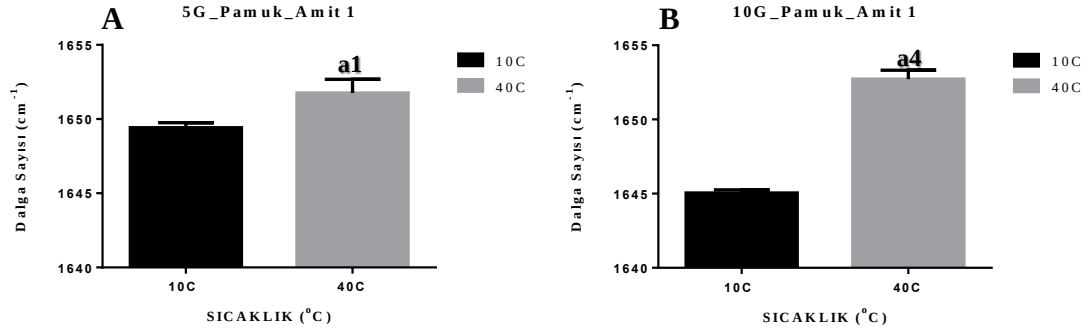
grubu ile kıyaslandığında 48 saat ve 72 saat 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1 dalga sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0,001$). Yine 48 saat ($p<0,05$) ve 72 saat ($p<0,001$) 20°C sıcaklığa maruz bırakılan örneklerde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir.



Şekil 4.5. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatlerde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır a1: $p<0,05$ a2: $p<0,01$ a3: $p<0,001$ a4: $p<0,0001$

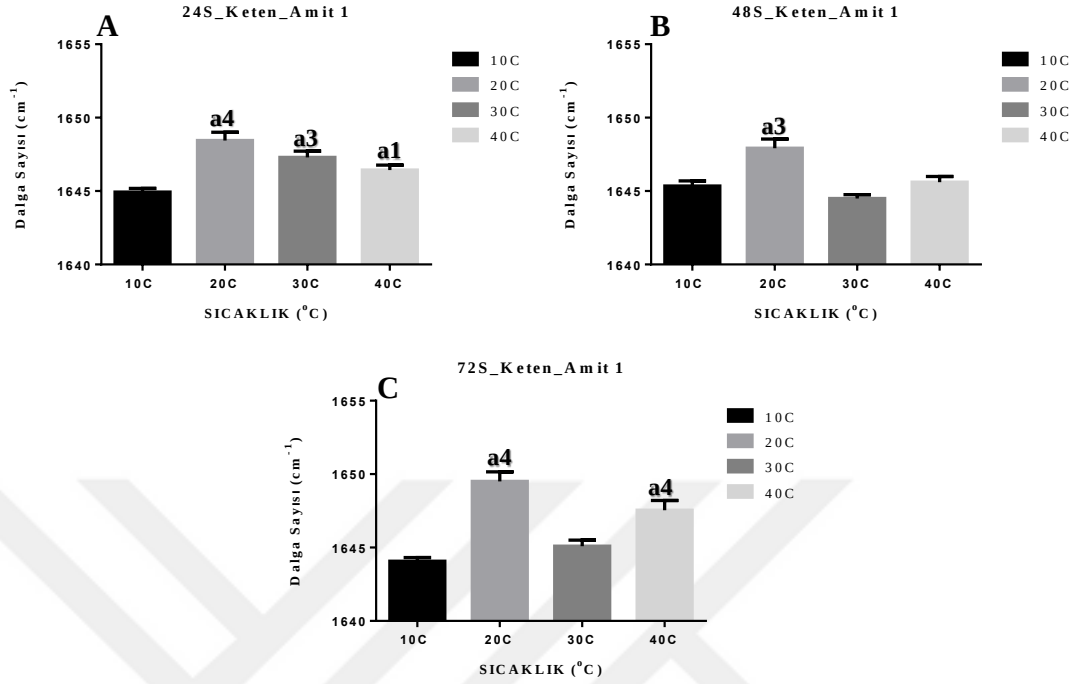
Şekil 4.6 A ve B 5 ve 10 gün 10°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında oluşan değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında 5 ($p<0,05$) ve 10 ($p<0,0001$) gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1 bandı dalga sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 5 ve B) 10 günde 10 ve 40 C'ye bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır a1: $p<0,05$ a2: $p<0,01$ a3: $p<0,001$ a4: $p<0,0001$

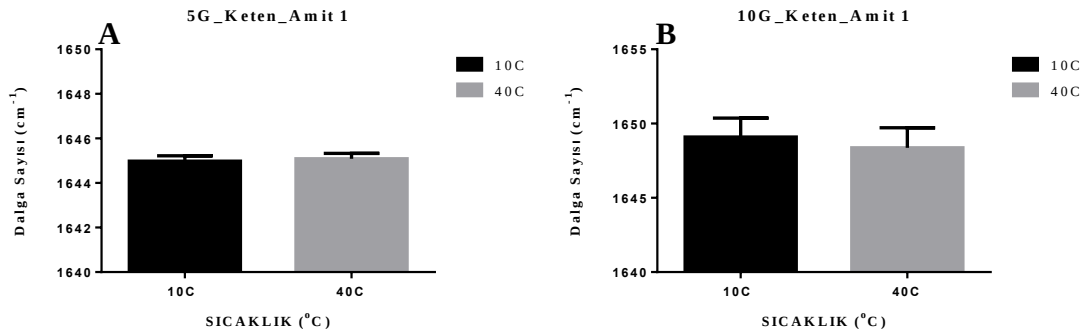
Şekil 4.7 A, B ve C zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında oluşan değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında özellikle 24 saat ($p<0,0001$), 48 saat ($p<0,001$), ve 72 saat ($p<0,0001$) 20°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1 dalga sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir. Yine 24 saat 30°C ($p<0,001$) ve 72 saat 40°C ($p<0,0001$) sıcaklığa maruz bırakılan örneklerde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir.



Şekil 4.7. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatlerde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır a1: p<0,05 a2: p<0,01 a3: p<0,001 a4: p<0,0001

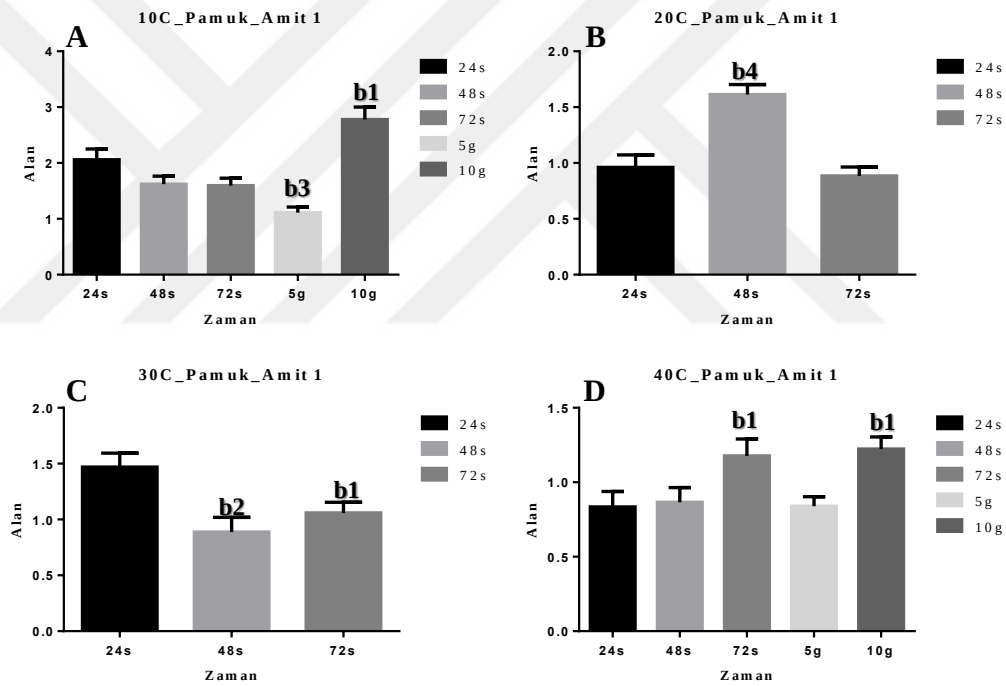
Şekil 4.8 A ve B 5 ve 10 gün 10°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında oluşan değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında 5 ve 10 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1 bandı dalga sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmemiştir



Şekil 4.8. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bandı dalga sayısında A) 5, ve B) 10 günde 10°C ve 40°C sıcaklığa bağlı değişimle

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır a1: p<0,05 a2: p<0,01 a3: p<0,001 a4: p<0,0001

Şekil 4.9 A, B, C ve D zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanındaki değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 5 gün 10°C ($p<0,001$), 48 saat ($p<0,01$) ve 72 saat ($p<0,05$) 30°C uygulama gruplarında amit 1 bant alanında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. 10 gün ($p<0,05$) 10°C, 48 saat ($p<0,0001$) 20°C, 72 saat ($p<0,05$) ve 10 gün ($p<0,05$) 40°C uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir.

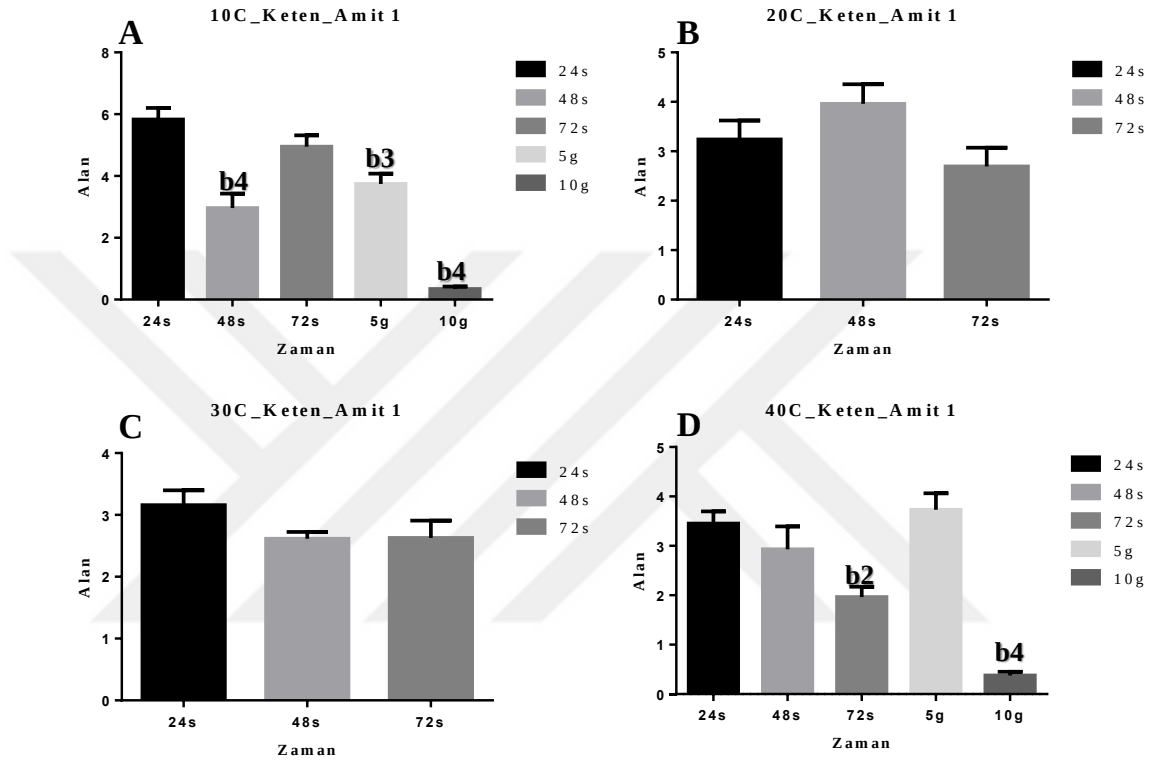


Şekil 4.9. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler

*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır b1: $p<0,05$ b2: $p<0,01$ b3: $p<0,001$ b4: $p<0,0001$

Şekil 4.10 A, B, C ve D zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanındaki değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10°C ve 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı olarak (48 saat, 72 saat, 5 gün ve 10 gün) amit 1 bant alanında anlamlı değişim gözlenmiştir.

Örneğin kontrol ile kıyaslandığında 48 saat ($p<0,0001$), 5 gün ($p<0,001$) ve 10 gün ($p<0,0001$) 10°C uygulanan gruplarda ve 72 saat ($p<0,01$) ve 10 gün ($p<0,0001$) 40°C uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olmuştur.



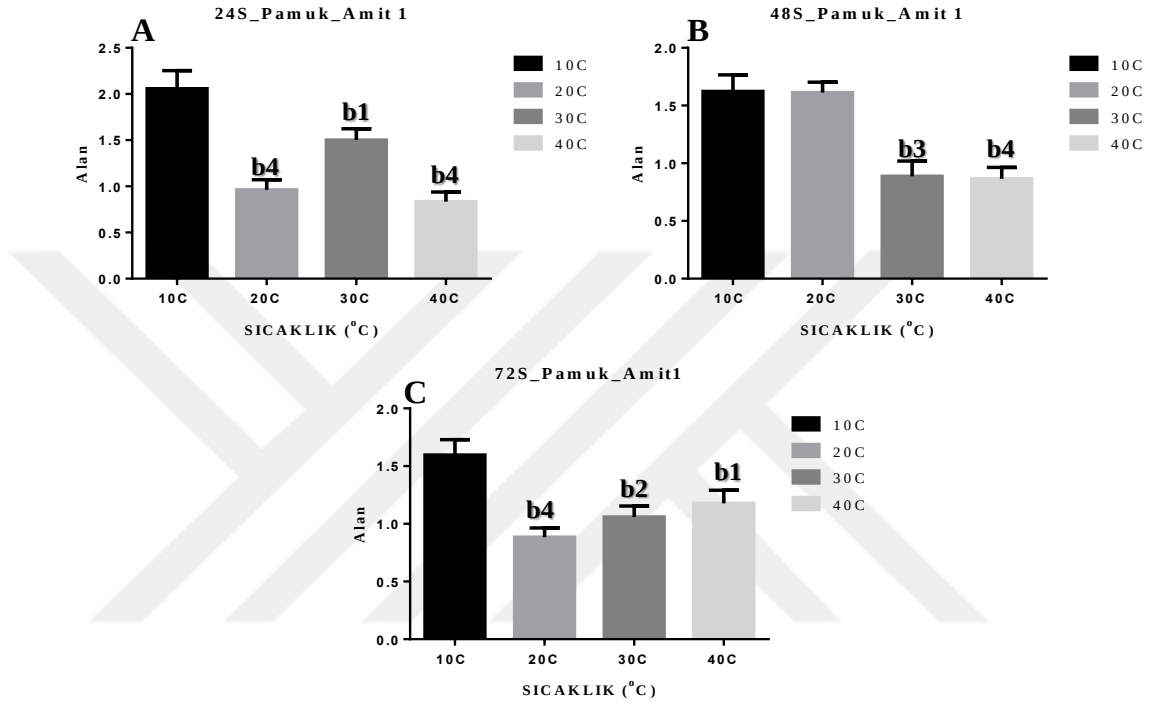
Şekil 4.10. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 10°C , B) 20°C , C) 30°C ve D) 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler

*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır b1: $p<0,05$ b2: $p<0,01$ b3: $p<0,001$ b4: $p<0,0001$

Şekil 4.11 A, B ve C 24 saat, 48 saat ve 72 saat 10°C , 20°C , 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında oluşan değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saat, 48 saat ve 72 saat 20°C , 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1 bant alanında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış kaydedilmiştir.

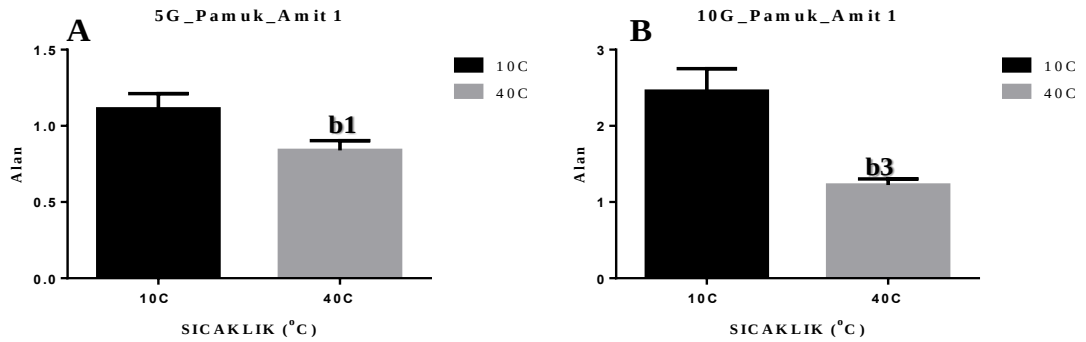
Şekil 4.12 A ve B 5 ve 10 gün 10°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında oluşan değişimleri

göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında 5 ($p<0,5$) ve 10 ($p<0,001$) gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1 bant alanında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış belirlenmiştir.



Şekil 4.11. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte sıcaklıklara bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır b1: $p<0,05$ b2: $p<0,01$ b3: $p<0,001$ b4: $p<0,0001$

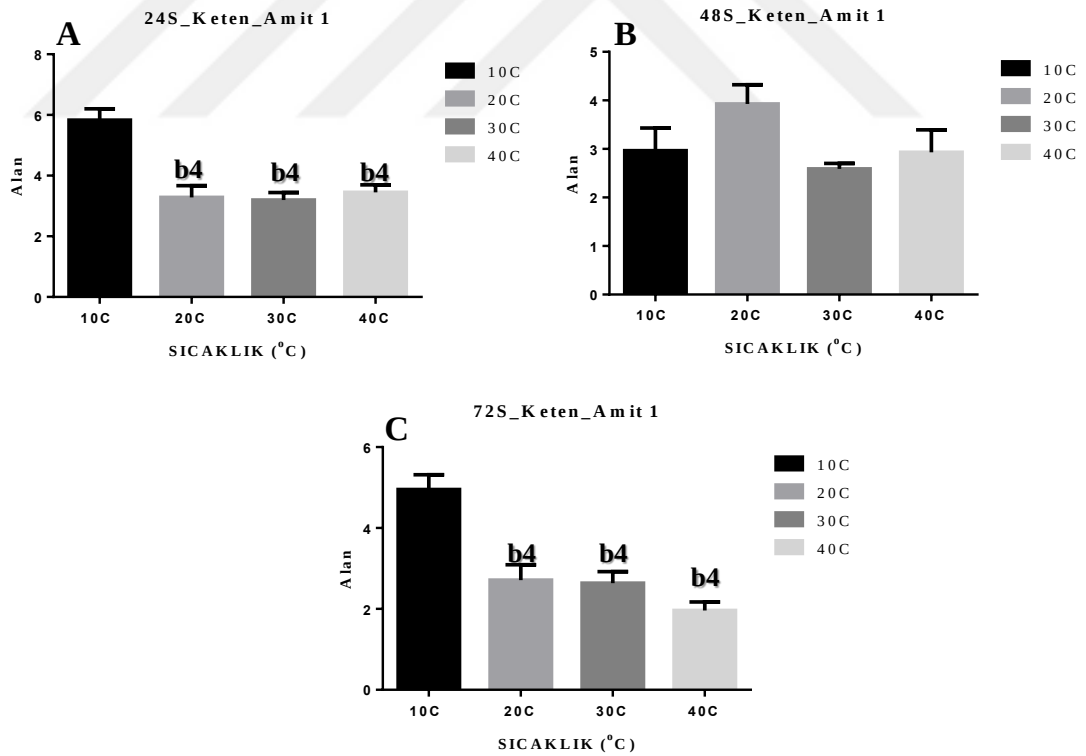


Şekil 4.12. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklıklara bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır b1: $p<0,05$ b2: $p<0,01$ b3: $p<0,001$ b4: $p<0,0001$

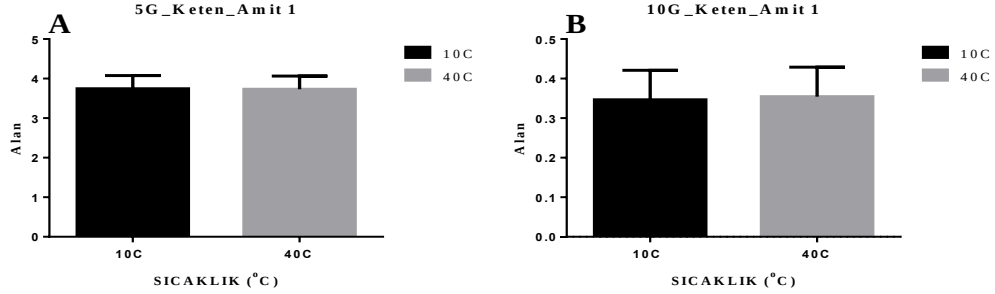
Şekil 4.13 A, B ve C 24 saat, 48 saat ve 72 saat 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında oluşan değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saat ve 72 saat 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1 bant alanında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış kaydedilmiştir ($p<0,0001$).

Şekil 4.14 A ve B 5 ve 10 gün 10°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında oluşan değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında 5 ve 10 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1 bant alanında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmamıştır.



Şekil 4.13. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte sıcaklıklara bağlı değişimler

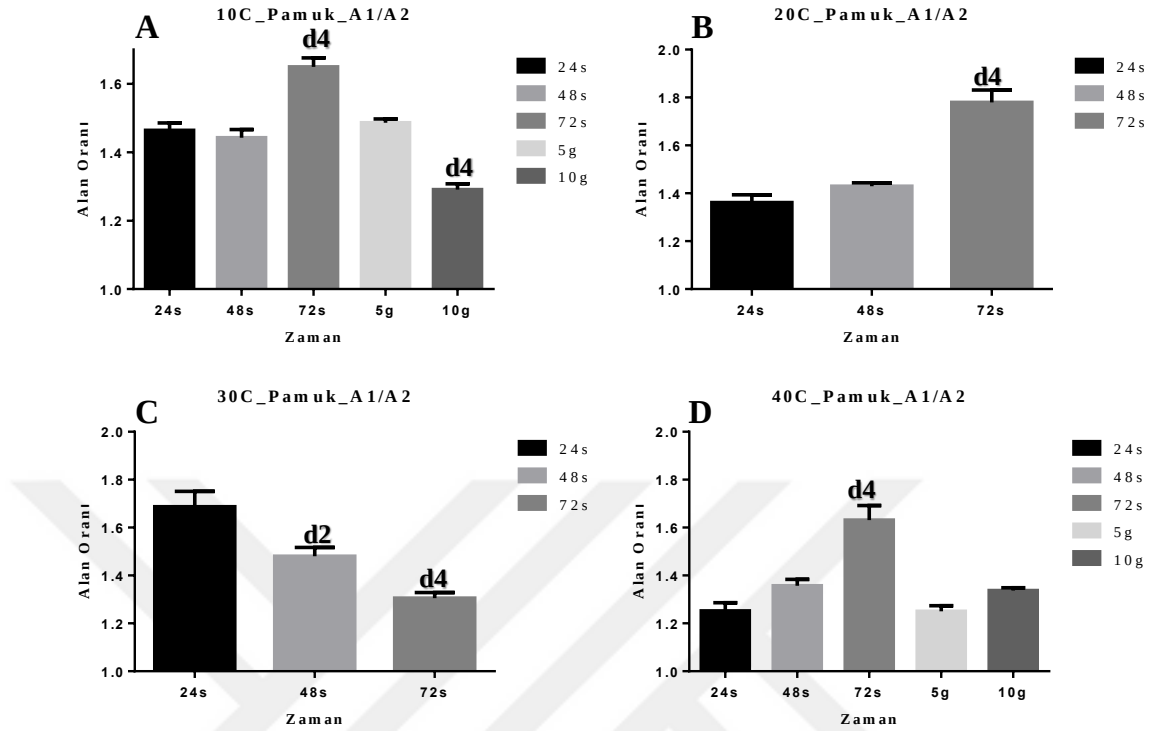
*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır b1: $p<0,05$ b2: $p<0,01$ b3: $p<0,001$ b4: $p<0,0001$



Şekil 4.14. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1 bant alanında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklıklara bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır b1: $p<0,05$ b2: $p<0,01$ b3: $p<0,001$ b4: $p<0,0001$

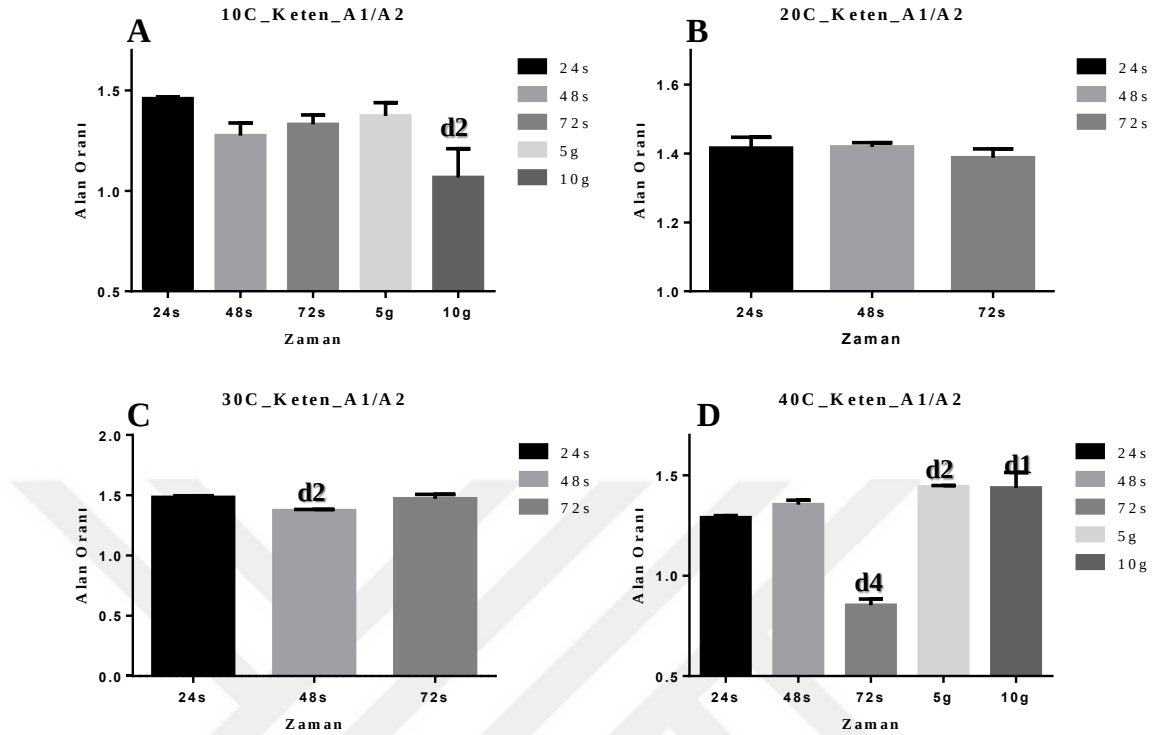
Şekil 4.15 A, B, C ve D zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında meydana gelen değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 72 saat 10°C ($p<0,0001$), 72 saat 20°C ($p<0,0001$) ve 72 saat 40°C ($p<0,0001$) uygulanan gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir. Öte yandan 10 gün 10°C ($p<0,0001$), 48 saat ($p<0,0001$) ve 72 saat ($p<0,01$) 30°C uygulanan gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir azalış kaydedilmiştir.



Şekil 4.15. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 alan oranlarında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler

*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır d1: $p<0,05$ d2: $p<0,01$ d3: $p<0,001$ d4: $p<0,0001$

Şekil 4.16 A, B, C ve D zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında meydana gelen değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 gün 10°C ($p<0,01$), 48 saat 30°C ($p<0,01$) ve 72 saat 40°C ($p<0,0001$) uygulanan gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Yine 5 gün ve 10 gün 40°C uygulanan gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış kaydedilmiştir. Kontrol ile mukayese edildiğinde 24 saat, 48 saat ve 72 saat 20°C uygulanan gruplarda önemli bir değişim olmamıştır.



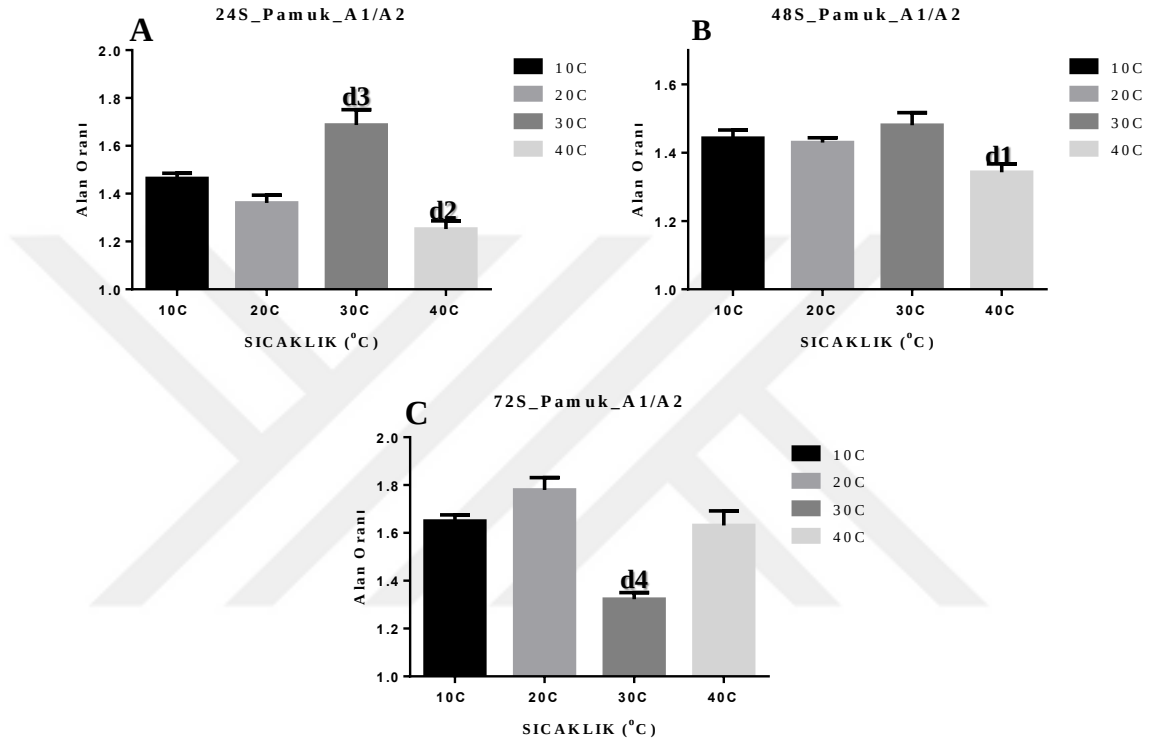
Şekil 4.16. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 alan oranlarında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C sıcaklıklarda zamana bağlı değişimler

*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır d1: $p < 0,05$ d2: $p < 0,01$ d3: $p < 0,001$ d4: $p < 0,0001$

Şekil 4.17 A, B ve C 24 saat, 48 saat ve 72 saat 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında meydana gelen değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saat 30°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p < 0,001$), 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış kaydedilmiştir. Yine 48 saat 40°C ve 72 saat 30°C sıcaklıklara maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış belirlenmiştir.

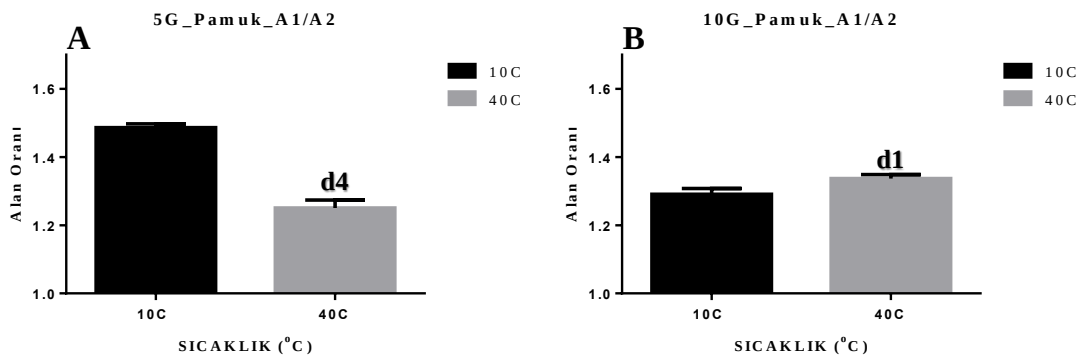
Şekil 4.18 A ve B 5 ve 10 gün 10°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında meydana gelen değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında 5 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde ($p < 0,0001$)

amit 1/amit 2 bant alan oranda istatistiksel olarak bir artış olduğu, 10 gün 40°C (p<0,05) sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında ise istatistiksel olarak bir azalmanın olduğu kaydedilmiştir.



Şekil 4.17. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatlerde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır d1: p<0,05 d2: p<0,01 d3: p<0,001 d4: p<0,0001

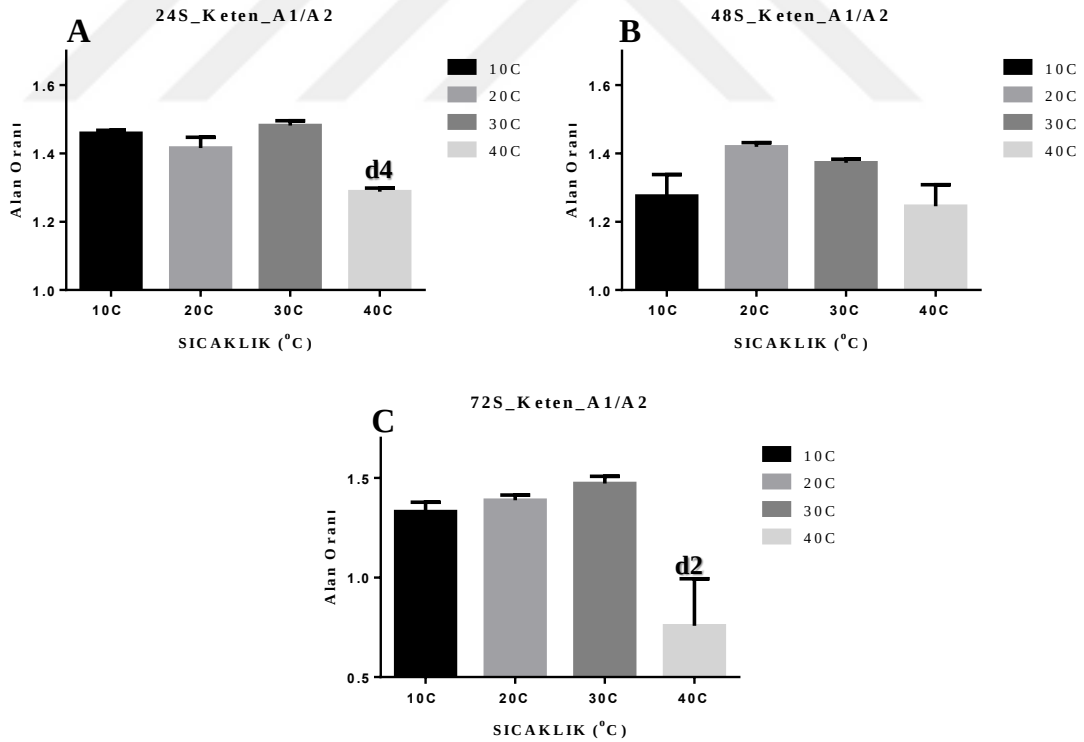


Şekil 4.18. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 alan oranında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır d1: p<0,05 d2: p<0,01 d3: p<0,001 d4: p<0,0001

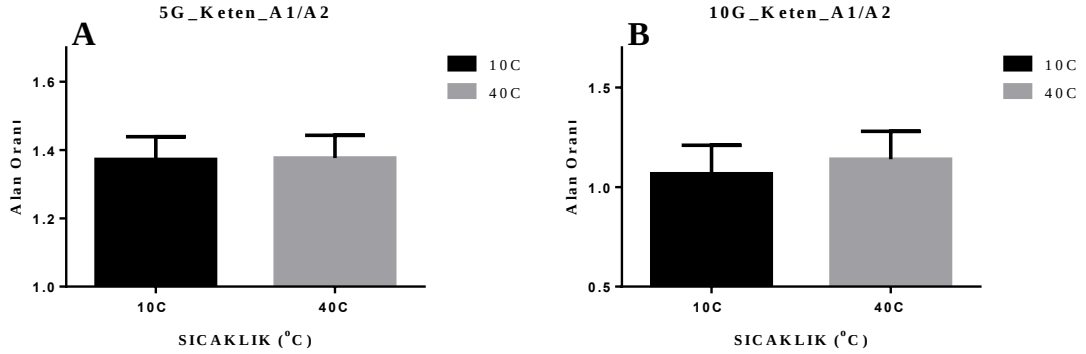
Şekil 4.19 A, B ve C 24 saat, 48 saat ve 72 saat 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında meydana gelen değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saat ($p<0,0001$) ve 72 saat ($p<0,01$) 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış kaydedilmiştir.

Şekil 4.20 A ve B 5 ve 10 gün 10°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılmış keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında meydana gelen değişimleri göstermektedir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında 5 ve 10 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan örneklerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.19. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 bant alan oranında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatlerde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır d1: $p<0,05$ d2: $p<0,01$ d3: $p<0,001$ d4: $p<0,0001$

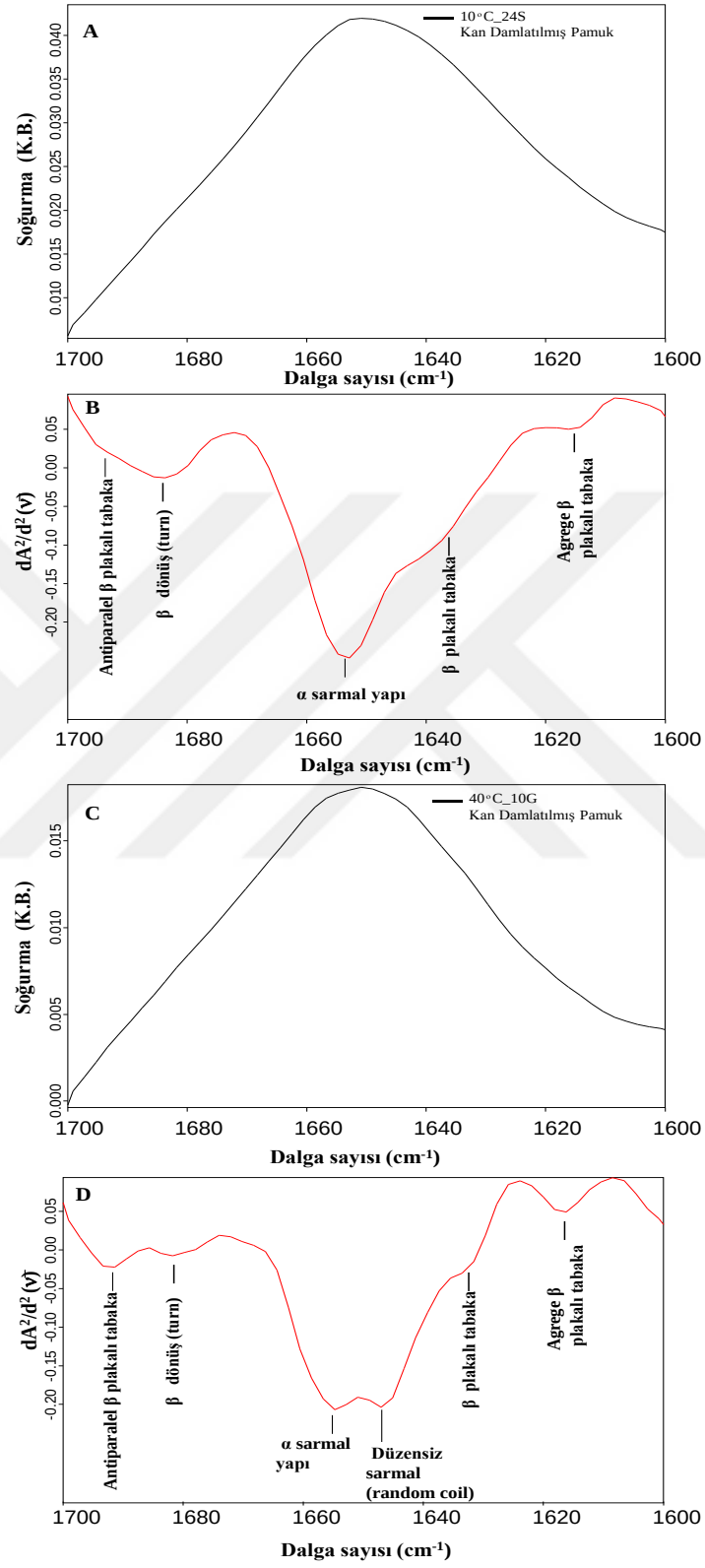


Şekil 4.20. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde amit 1/amit 2 alan oranlarında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır d1: $p < 0,05$ d2: $p < 0,01$ d3: $p < 0,001$ d4: $p < 0,0001$

Şekil 4.18'de A ve B'de keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin 5 ve 10 günde 10 ve 40°C sıcaklıklarına göre amit1/amit2 bant alan oranlarında meydana gelen değişimleri göstermektedir. Kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. 10°C'ye göre karşılaştırıldığında 5 ve 10 günde istatistiksel olarak sıcaklıklar arasında anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.

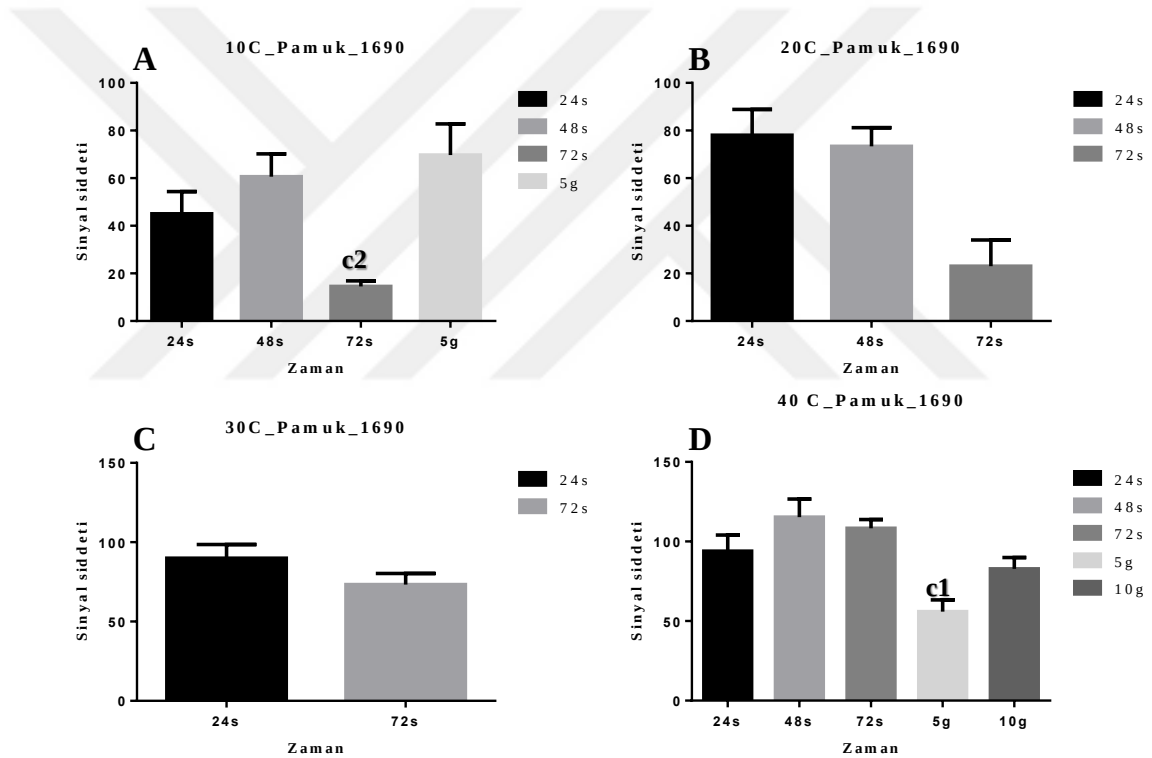
Protein bantlarında alan, alan oranları ve dalga sayılarındaki değişimler sıcaklığa ve zamana bağlı olarak protein yapılarında meydana gelen değişimleri göstermektedir. Proteinlerin ikincil yapılarında meydana gelen değişimleri belirlemek üzere amit 1 bandının ikincil türevi alınarak bant altında kalan ikincil yapılar tespit edilmiştir. Şekil 4.21 24 saat 10°C ve 10 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde amit 1 bandına ait soğurma spektrumu ve ikincil türev spektrumlarını göstermektedir. İkincil türev grafiklerinden de görüldüğü gibi 1690, 1682, 1653, 1630 ve 1617 cm^{-1} yer alan spektral bantlardan protein ikincil yapıları hakkında bilgiler elde edilmektedir. Bu bantlardan 1690 cm^{-1} antiparalel β plakalı tabaka, 1682 cm^{-1} β dönüş, 1653 cm^{-1} α - heliks, 1630 cm^{-1} β plakalı tabaka ve 1617 cm^{-1} agrega β plaka yapılarını temsil etmektedir.



Şekil 4.21. 10°C 24 saatte kan damlatılmış pamuk kumaşın 1700-1600 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yer alan amit 1 bandı

*A) soğurma grafiği, B) ikincil türev grafiği, 40°C 10 günde amit 1 bandı C) soğurma grafiği, D) ikincil türev grafiği

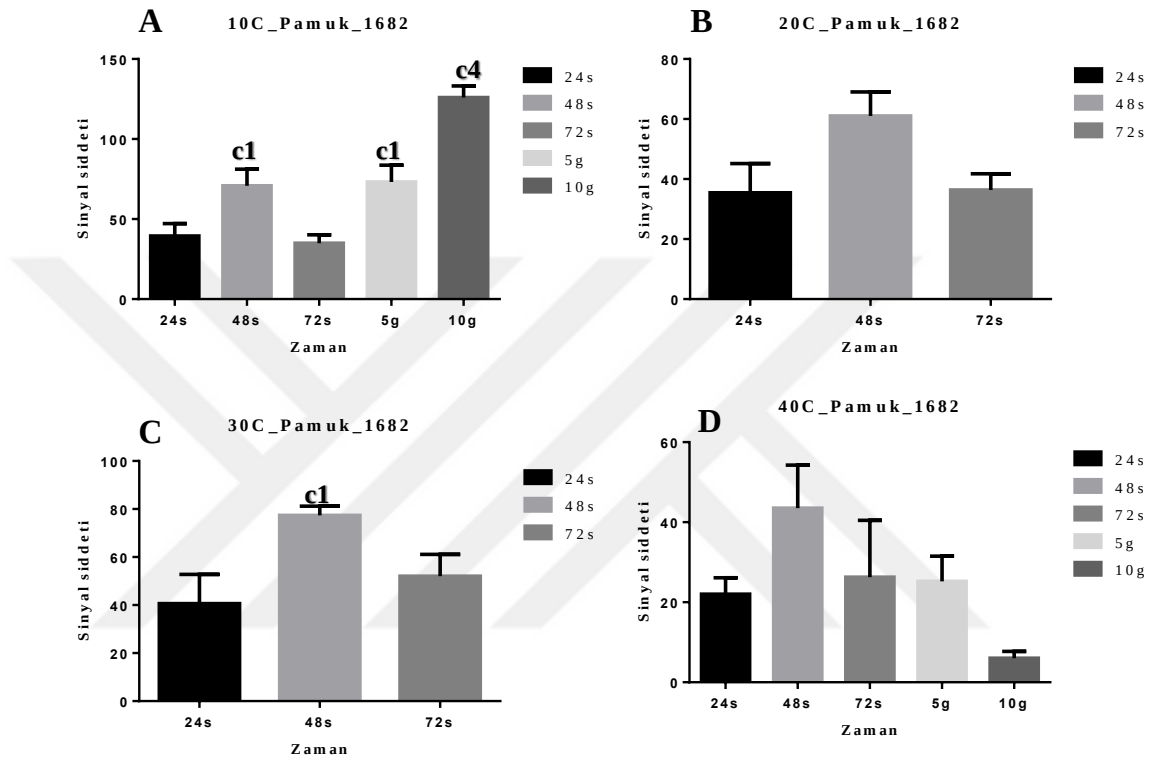
Zamana bağılı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde antiparalel β plakalı tabaka yapıdan kaynaklanan 1690 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.22'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 72 saat 10°C ($p<0,01$) ve 5 gün 40°C ($p<0,05$) sıcaklık uygulanan kan örneklerinde 1690 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış kaydedilmiştir. 10 gün 10°C 48 saat 30°C uygulanan kan örneklerinde 1690 cm^{-1} bandında herhangi bir sinyal alınamamıştır.



Şekil 4.22. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde antiparalel β plakalı tabaka yapıdan kaynaklanan 1690 bandında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C'de zamana bağlı değişimler
*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

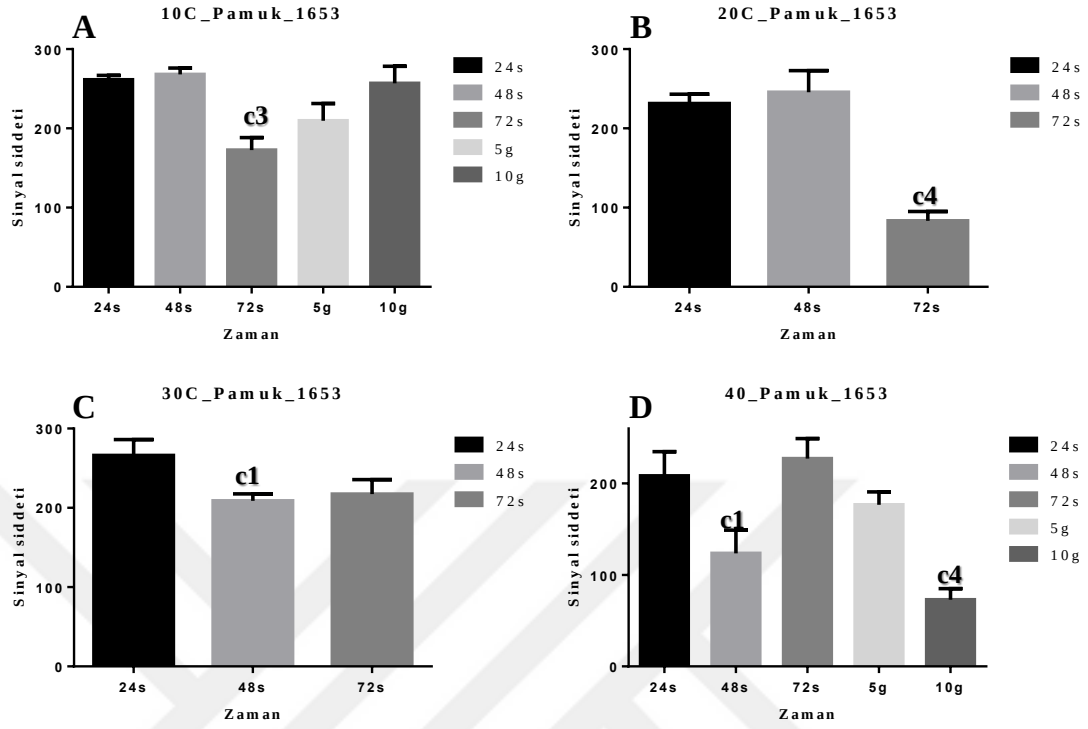
Zamana bağılı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.23'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 48 saat ($p<0,05$), 5 gün ($p<0,05$) ve 10 gün ($p<0,0001$) 10°C ve 48 saat 30°C ($p<0,05$) sıcaklık uygulanan kan örneklerinde

1682 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir. Öte yandan zamana bağlı olarak 20°C ve 40°C sıcaklık uygulanan kan örneklerinde 1682 cm^{-1} bandın sinyal şiddetinde herhangi anlamlı bir değişim belirlenmemiştir.



Şekil 4.23. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 10, B) 20, C) 30 ve D) 40°C’de zamana bağlı değişimler
*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

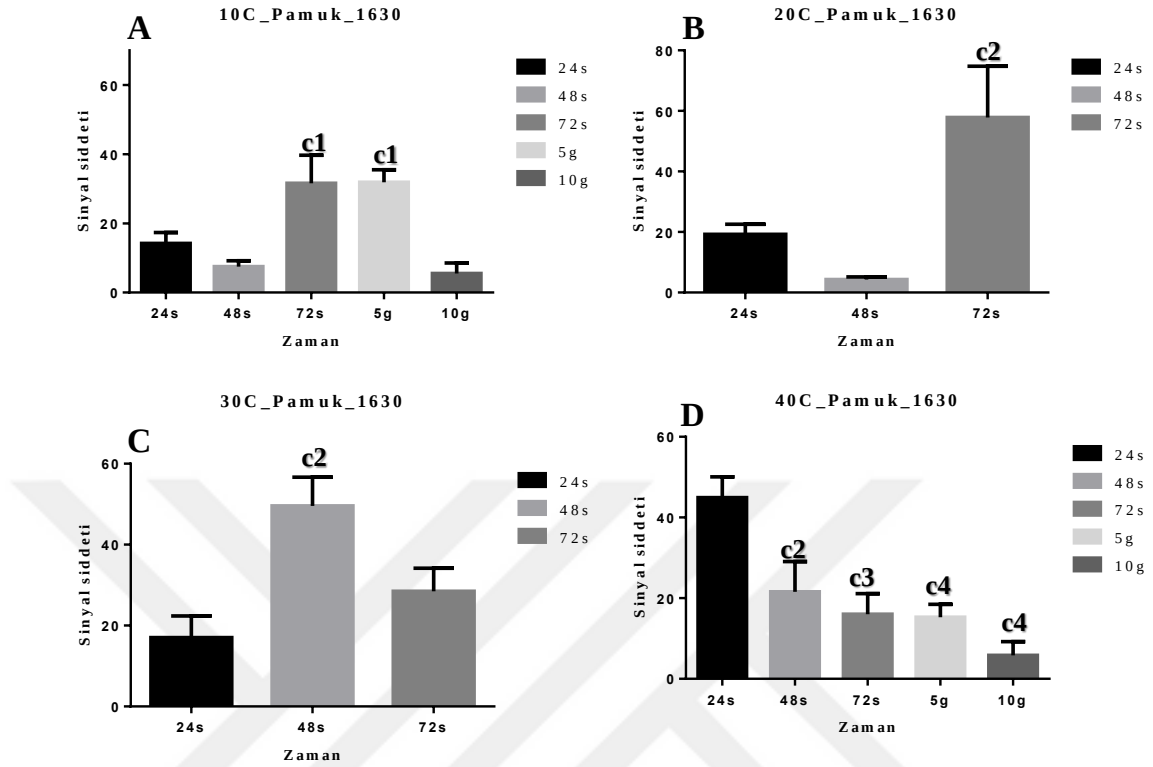
Zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.24’de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 72 saat ($p<0,001$) 10°C, 72 saat 20°C ($p<0,0001$), 48 saat 30°C, 48 saat ve 10 gün 40°C sıcaklık uygulanan kan örneklerinde 1653 cm^{-1} ’deki bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış kaydedilmiştir.



Şekil 4.24. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks bandı olan 1653 cm⁻¹ bandında A) 10, B) 20, C) 30 ve D) 40°C’de zamana bağlı değişimler

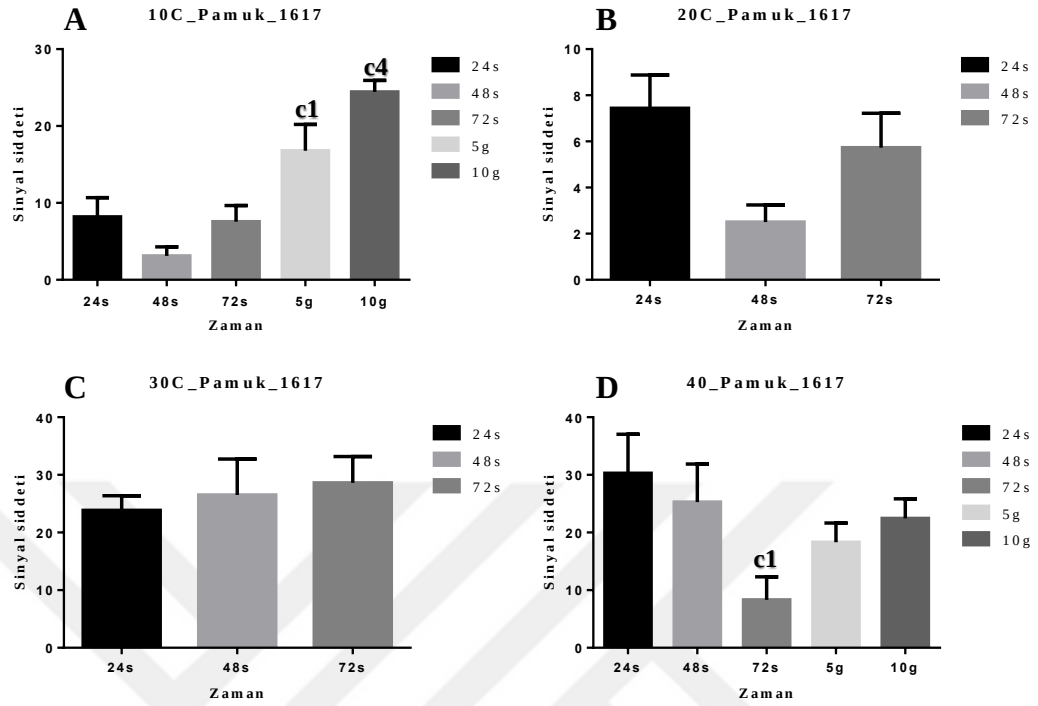
*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır c1: p<0,05 c2: p<0,01 c3: p<0,001 c4: p<0,0001

Zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm⁻¹ bandında bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.25’de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 72 saat (p<0,001) ve 5 gün (p<0,05) 10°C, 72 saat 20°C (p<0,05), 72 saat 30°C (p<0,01) sıcaklık uygulanan kan örneklerinde 1630 cm⁻¹’deki bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir. Öte yandan zamana bağlı olarak 40°C sıcaklık uygulanan kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm⁻¹ bandında bant sinyal şiddetinde farklı önem seviyelerinde istatistiksel olarak önemli azalış belirlenmiştir.



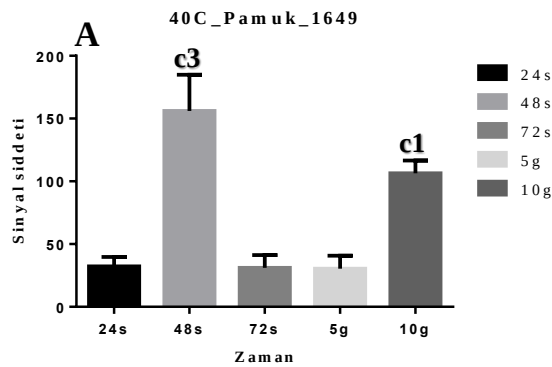
Şekil 4.25. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} bandında A) 10, B) 20, C) 30 ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler
 *Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

Zamana bağlı olarak 10°C , 20°C , 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.26'da verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 5 gün ($p<0,05$) ve 10 gün ($p<0,0001$) 10°C sıcaklık uygulanan kan lekelerinde 1617 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir. Öte yandan 72 saat 40°C sıcaklık uygulanan kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak önemli azalış belirlenmiştir ($p<0,05$).



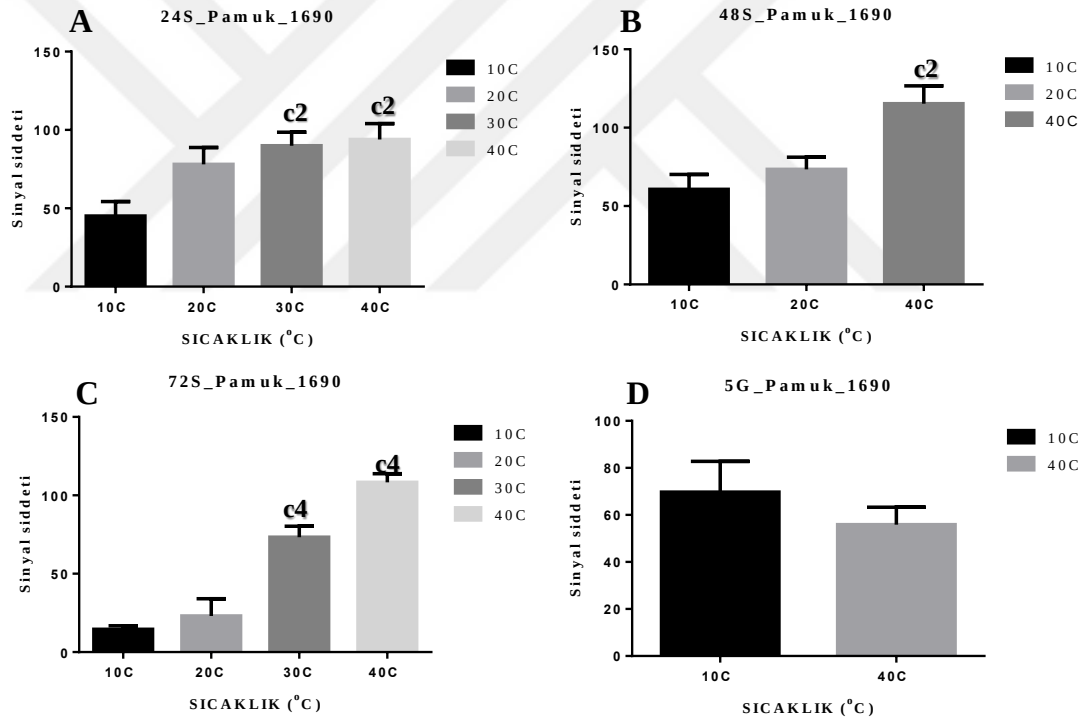
Şekil 4.26. Pamuk kumaş üzerindeki kan örneklerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında A) 10, B) 20, C) 30 ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler
*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

40°C sıcaklık uygulanmış pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde 1649 cm^{-1} 'de bant sinyal şiddetinde diğer uygulama gruplarında gözlenmeyen bir değişim belirlenmiştir. Bu bant için kontrol grubu olarak 24 saat alındığı zaman kontrol ile kıyaslandığında 48 saat ($p<0,001$) ve 10 gün ($p<0,05$) 40°C sıcaklık uygulanan kan lekelerinde 1649 cm^{-1} bandında istatistiksel olarak önemli bir artış kaydedilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde 1649 cm^{-1} bandında 40°C 'de zamana bağlı değişimler
*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

Sıcaklığa bağlı olarak 24 saat, 48 saat, 72 saat ve 5 gün süreyle maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde antiparalel β plakalı tabakadan kaynaklanan 1690 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.28'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 30°C ve 40°C 'ye 24 saat ($p<0,01$) ve 72 saat ($p<0,0001$), 40°C 'ye 48 saat ($p<0,01$) maruz bırakılan kan lekelerinde antiparalel β plakalı tabakadan kaynaklanan 1690 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak önemli artış olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan 10 gün farklı sıcaklıklara bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1690 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinde veri elde edilememiştir.



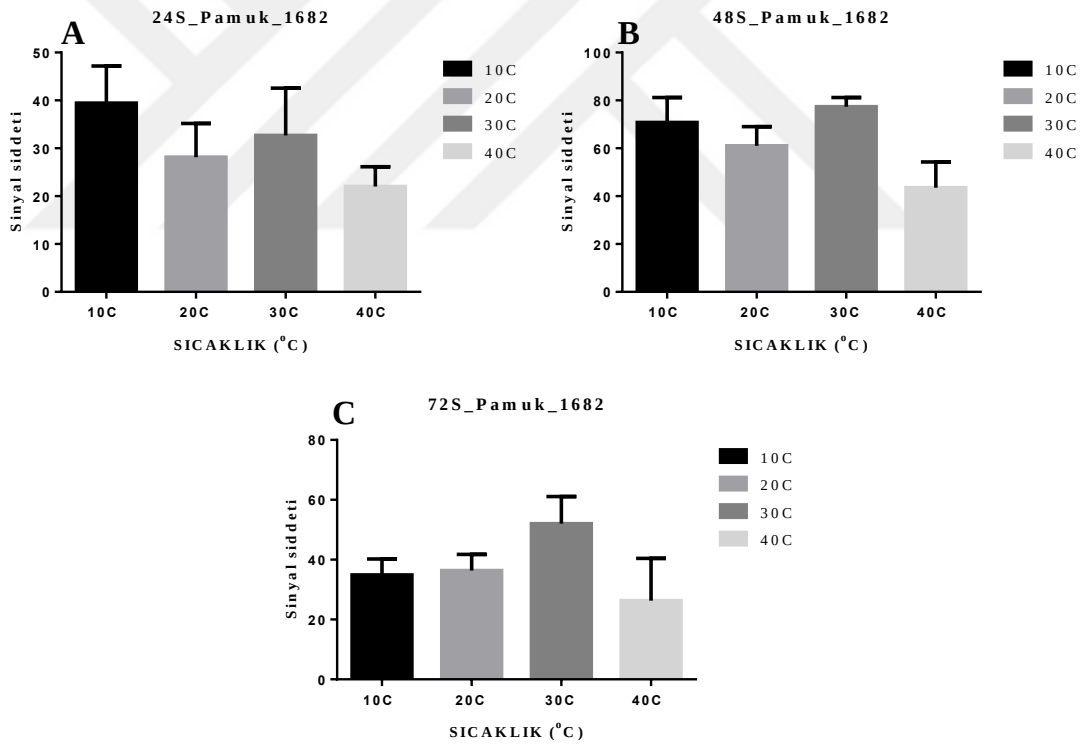
Şekil 4.28. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde antiparalel β plakalı tabakadan kaynaklanan 1690 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48, C) 72 saat ve D) 5 günde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10 C'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

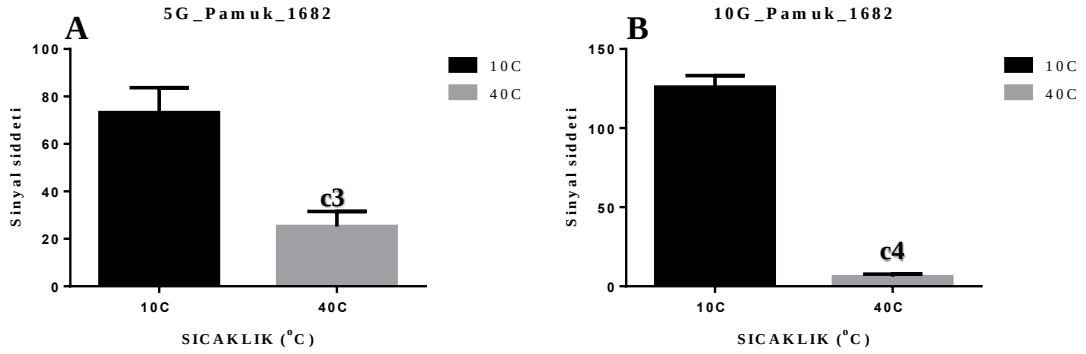
Sıcaklığa bağlı olarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde β dönüş yapısından kaynaklanan 1682 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.29'da verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak

10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24, 48 ve 72 saat farklı sıcaklıklara maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1682 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir.

10°C ve 40°C sıcaklığa bağlı olarak 5 gün ve 10 gün süreye maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde β dönüş yapısından kaynaklanan 1682 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.30'da verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1682 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak ($p<0,0001$) önemli bir azalış kaydedilmiştir.



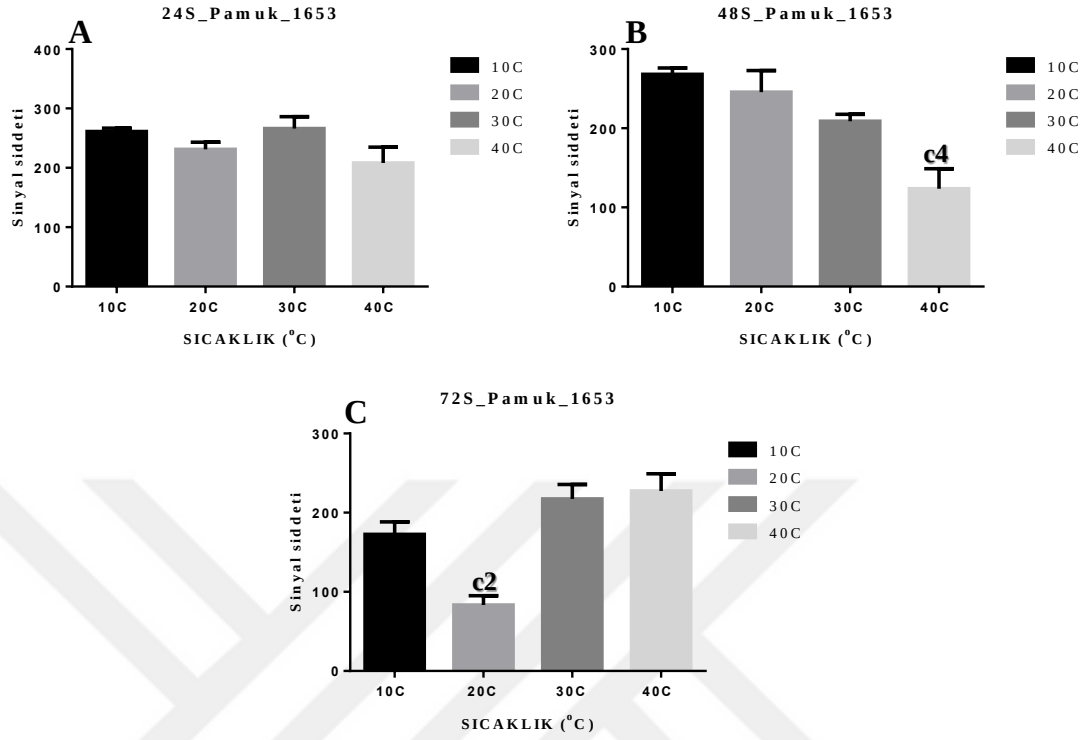
Şekil 4.29. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapısından kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler
*Gruplar 10 C'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$



Şekil 4.30. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapısından kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler

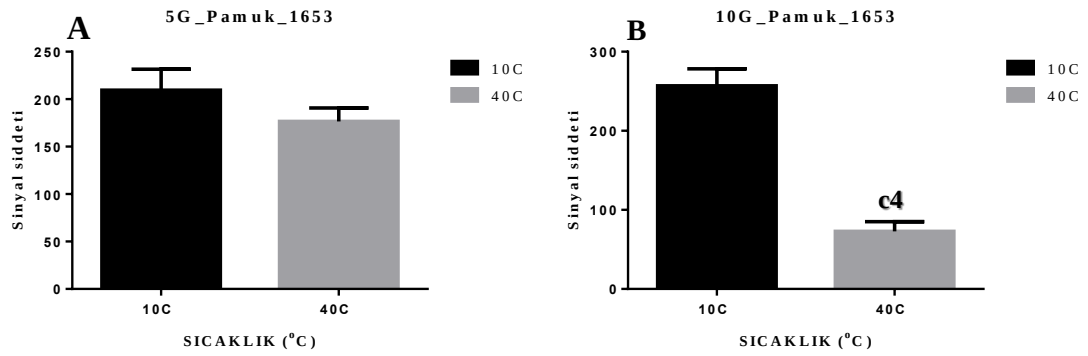
*Gruplar 10°C 'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

Sıcaklığa bağlı olarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreye maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde α -heliks yapısından kaynaklanan 1653 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.31'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 48 saat 40°C ($p<0,0001$) ve 72 saat 20°C ($p<0,01$) sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1682 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görülmüştür. Öte yandan 10°C ve 40°C sıcaklığa bağlı olarak 5 gün ve 10 gün süreye maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde α -heliks yapısından kaynaklanan 1653 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.32'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1653 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak ($p<0,0001$) önemli bir azalış kaydedilmiştir.



Şekil 4.31. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks yapısından kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C 'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

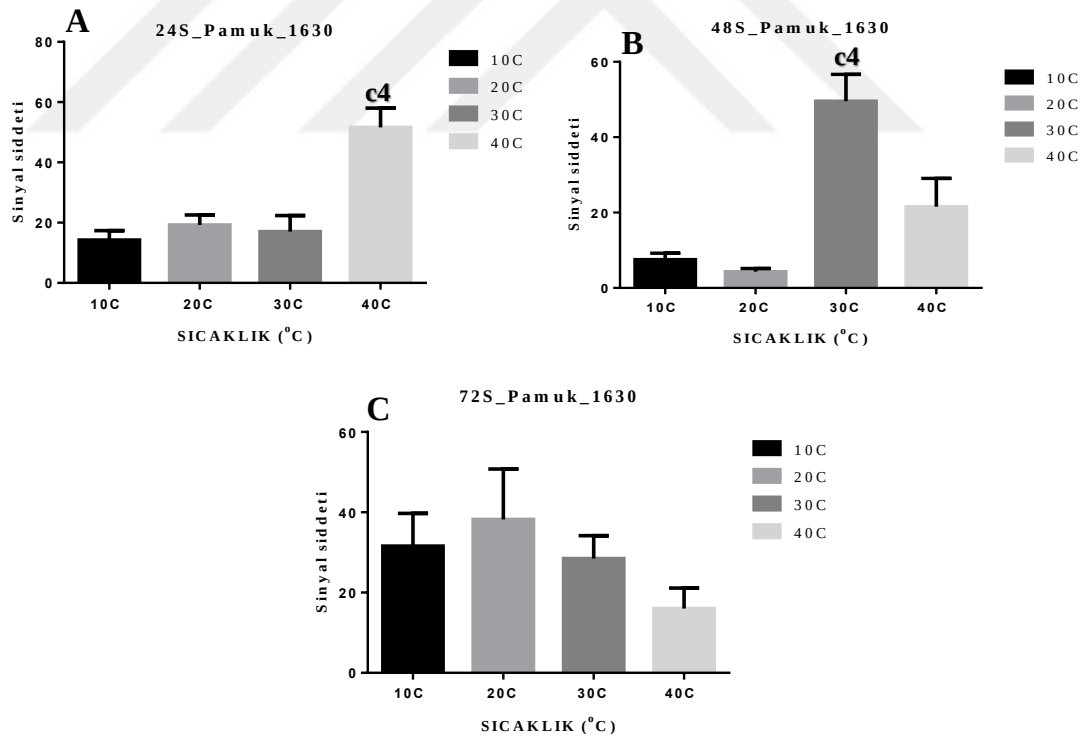


Şekil 4.32. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks yapısından kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C 'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

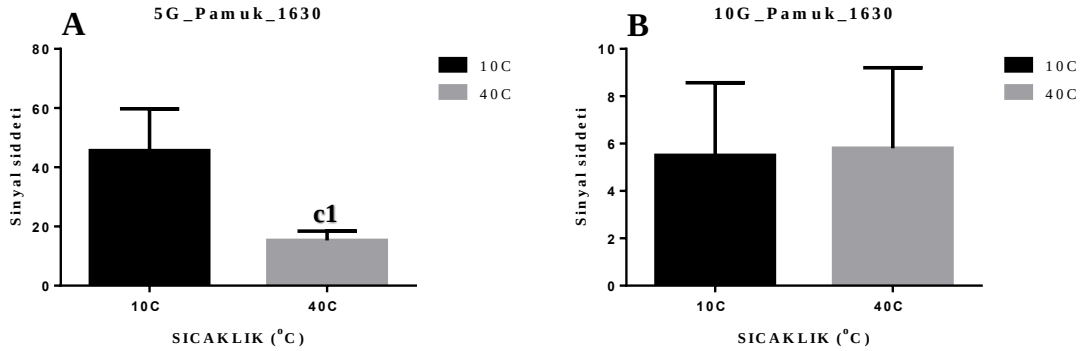
Sıcaklığa bağlı olarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreye maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.33'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak

10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saat 40°C ($p<0,0001$) ve 48 saat 30°C ($p<0,0001$) sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1630 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. 72 saat farklı sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Öte yandan 10°C ve 40°C sıcaklığa bağlı olarak 5 gün ve 10 gün süreye maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.34'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 5 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1630 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak ($p<0,05$) önemli bir azalış kaydedilmiştir.



Şekil 4.33. Pamuk kumaş üzerindeki kan örneklerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler

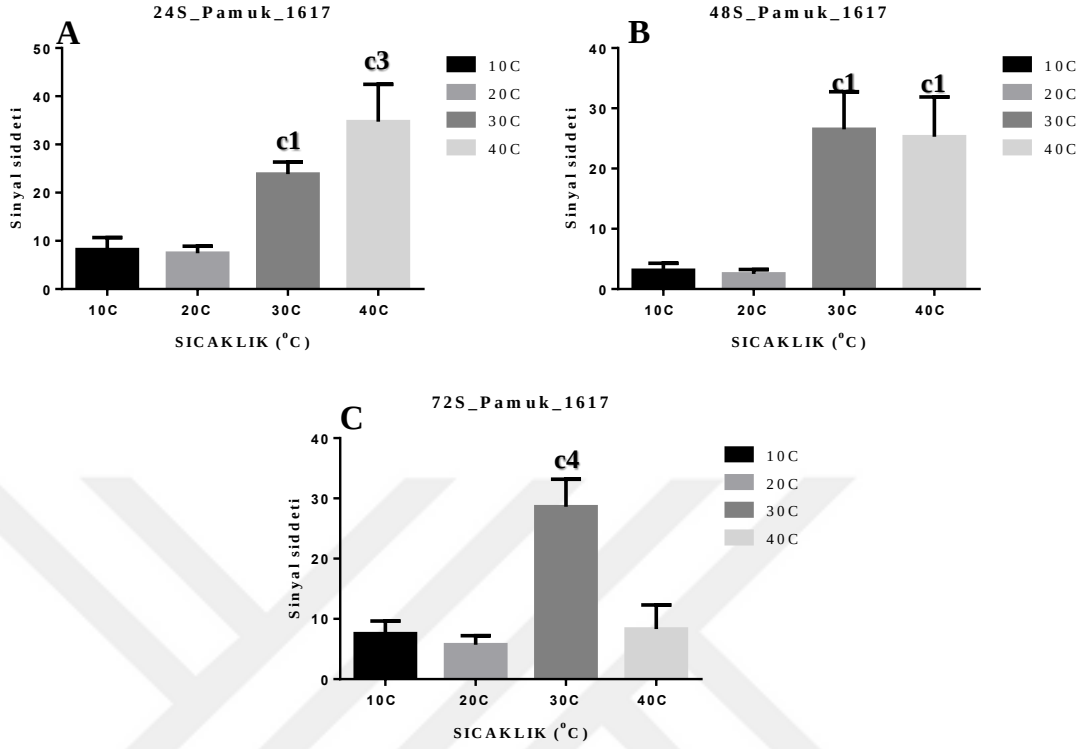
*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$



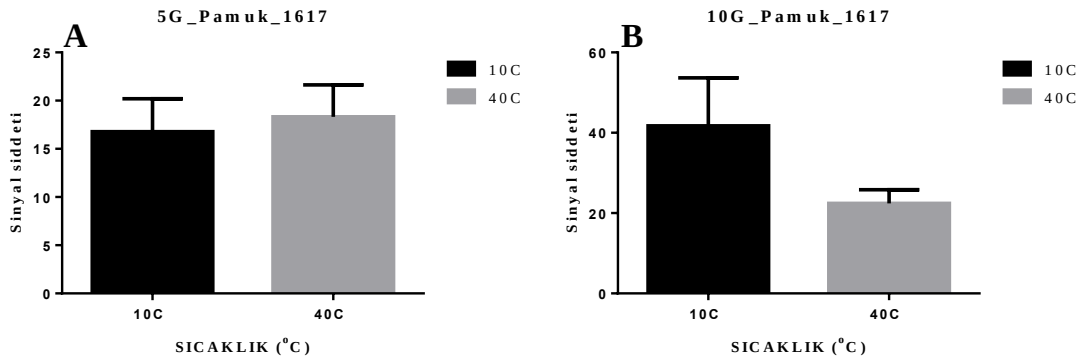
Şekil 4.34. Pamuk kumaş üzerindeki kan örneklerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C 'ye göre karşılaştırılmıştır. c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

Sıcaklığa bağlı olarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreye maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.35'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saat ve 48 saat 30°C ve 40°C sıcaklığa ve 72 saat 30°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1617 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir artış görülmüştür. Öte yandan 10°C ve 40°C sıcaklığa bağlı olarak 5 gün ve 10 gün süreye maruz bırakılan pamuk kumaştaki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.36'da verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 5 gün ve 10 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1617 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir değişim kaydedilmemiştir.



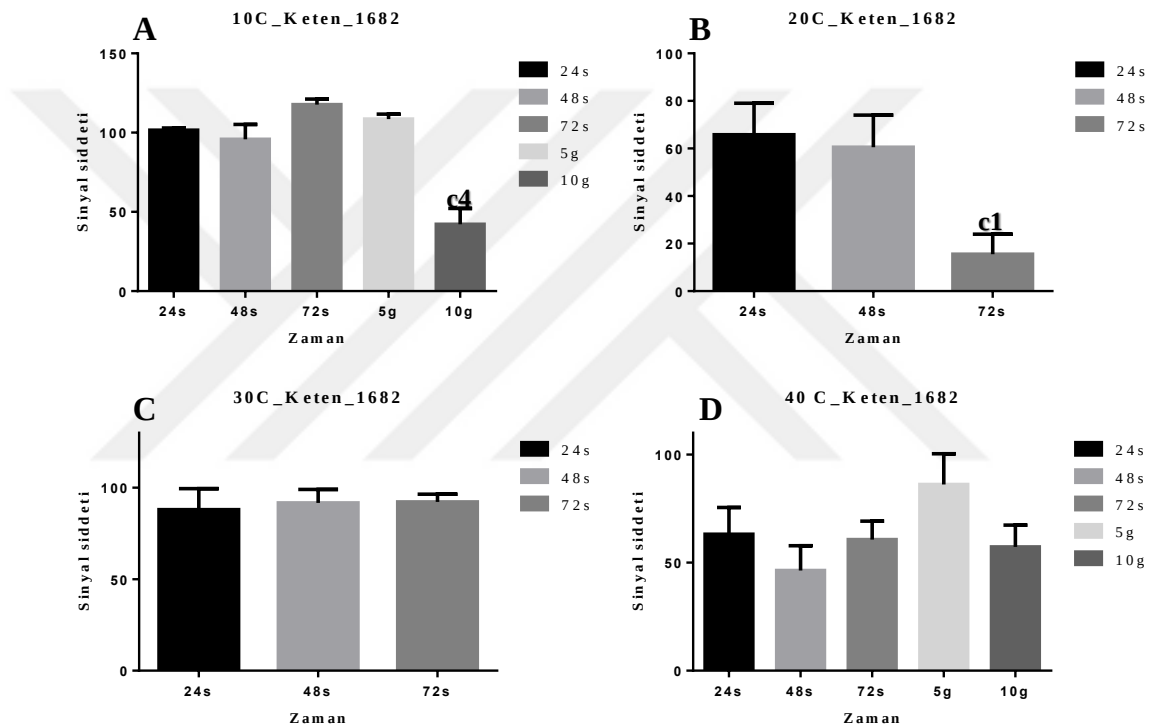
Şekil 4.35. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm⁻¹ bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler
*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır c1: p<0,05 c2: p<0,01 c3: p<0,001 c4: p<0,0001



Şekil 4.36. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm⁻¹ bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler
*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır c1: p<0,05 c2: p<0,01 c3: p<0,001 c4: p<0,0001

Zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm⁻¹ bandında bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.37'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 24

saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 gün ($p<0,0001$) 10°C ve 72 saat 20°C ($p<0,05$), sıcaklık uygulanan kan örneklerinde 1682 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış kaydedilmiştir. Zamana bağlı olarak 30°C ve 40°C sıcaklık uygulanan gruplarda β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında bant sinyal şiddetinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

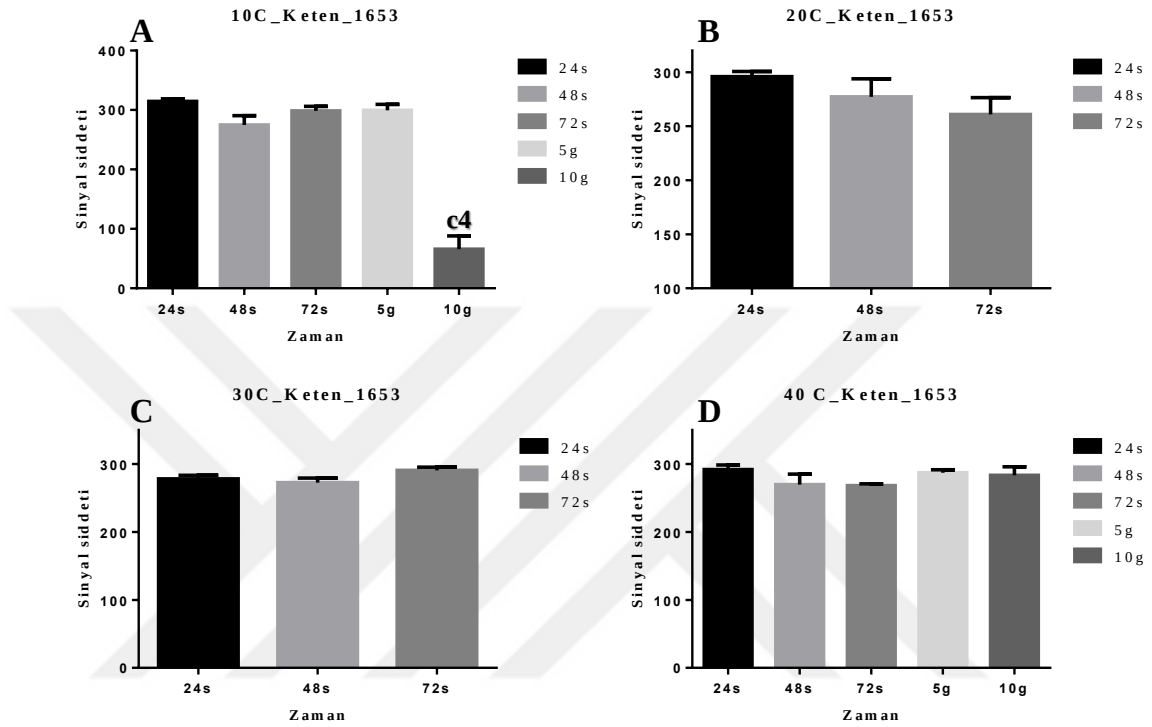


Şekil 4.37. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 10°C, B) 20°C, C) 30°C ve D) 40°C'de zamana bağlı değişimler

*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

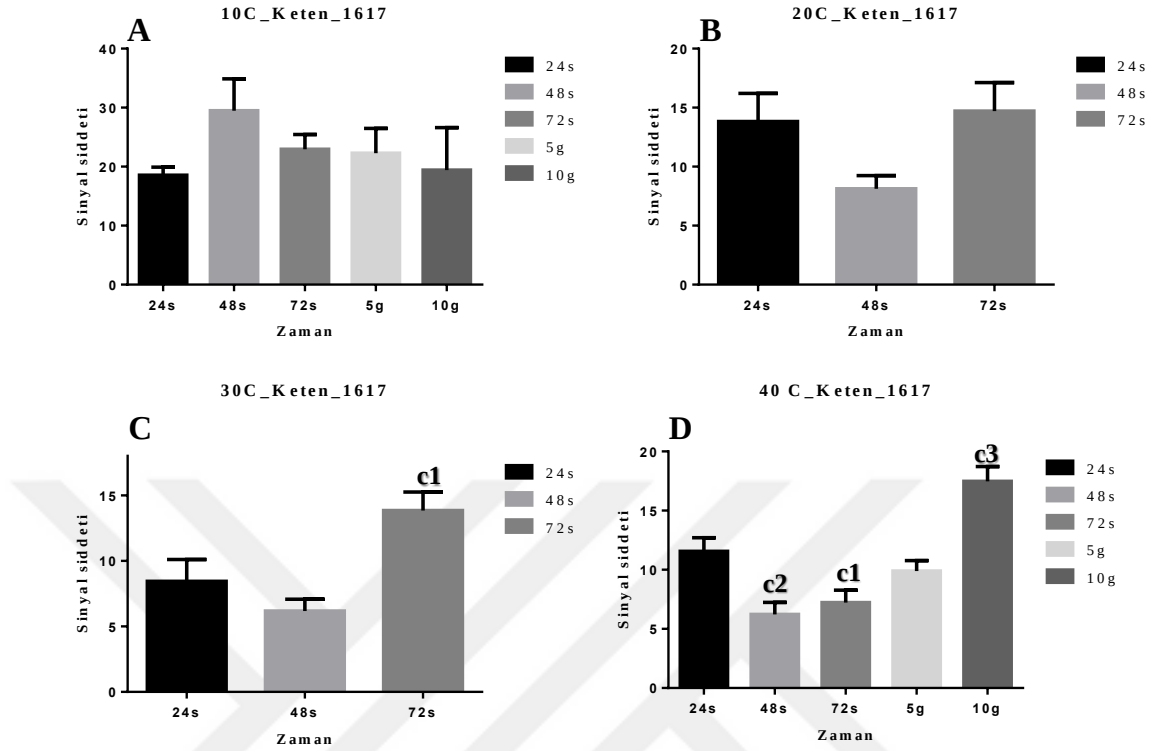
Zamana bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.38'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 gün 10°C sıcaklık uygulanan kan örneklerinde 1653 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış kaydedilmiştir ($p<0,0001$). Zamana bağlı olarak 20°C, 30°C ve 40°C

sıcaklık uygulanan gruplarda α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında bant sinyal şiddetinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.38. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında A) 10°C , B) 20°C , C) 30°C ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler
*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

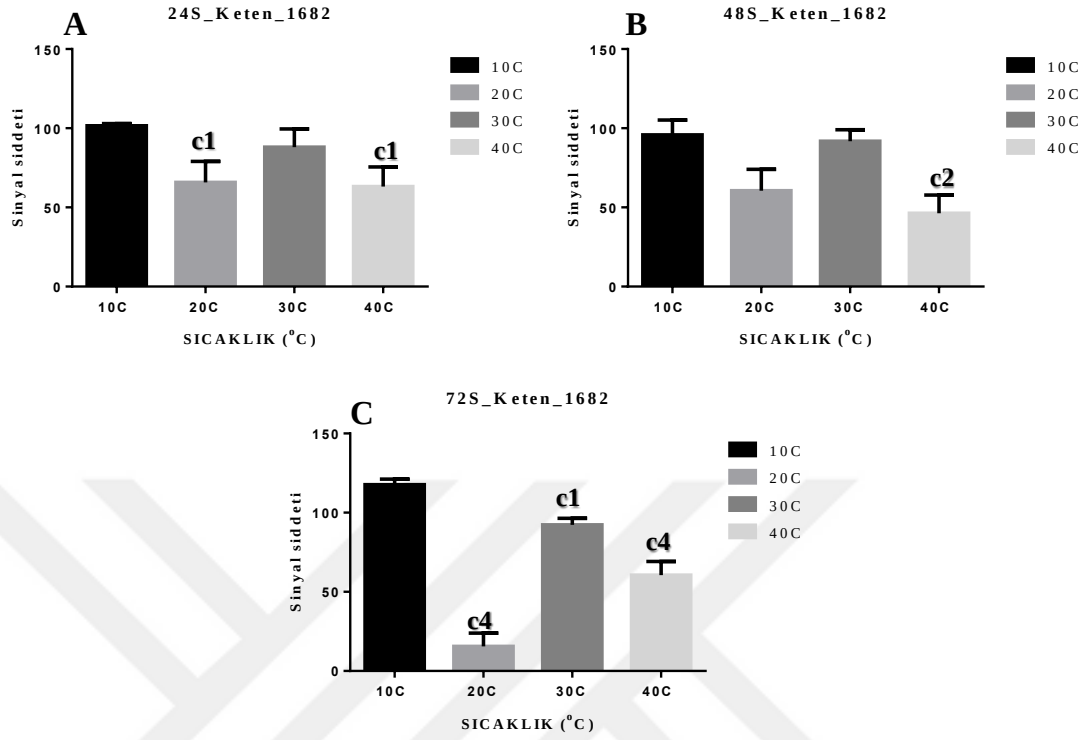
Zamana bağlı olarak 10°C , 20°C , 30°C ve 40°C sıcaklıklara maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.39'da verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 24 saat alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 72 saat 30°C ($p<0,05$) ve 10 gün 40°C ($p<0,001$) sıcaklık uygulanan kan örneklerinde 1617 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir. Yine 48 saat ($p<0,01$) ve 72 saat ($p<0,05$) 40°C sıcaklık uygulanan kan lekelerinde 1617 cm^{-1} bandında bant sinyal şiddetinde kontrole göre önemli bir azalış kaydedilmiştir. Zamana bağlı olarak 10°C ve 20°C sıcaklık uygulanan gruplarda agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında bant sinyal şiddetinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.39. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında A) 10°C , B) 20°C , C) 30°C ve D) 40°C 'de zamana bağlı değişimler

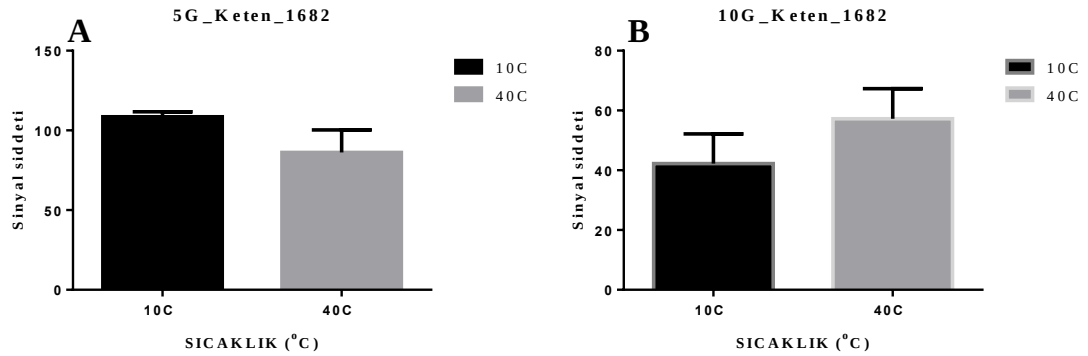
*Gruplar 24 saate göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

Sıcaklığa bağlı olarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreye maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.40'da verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saat 20°C ve 40°C , 48 saat 40°C ve 72 saat 20°C , 30°C ve 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1682 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir azalış görülmüştür. Öte yandan 10°C ve 40°C sıcaklığa bağlı olarak 5 gün ve 10 gün süreye maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.41'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 5 gün ve 10 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1682 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir değişim kaydedilmemiştir.



Şekil 4.40. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C 'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

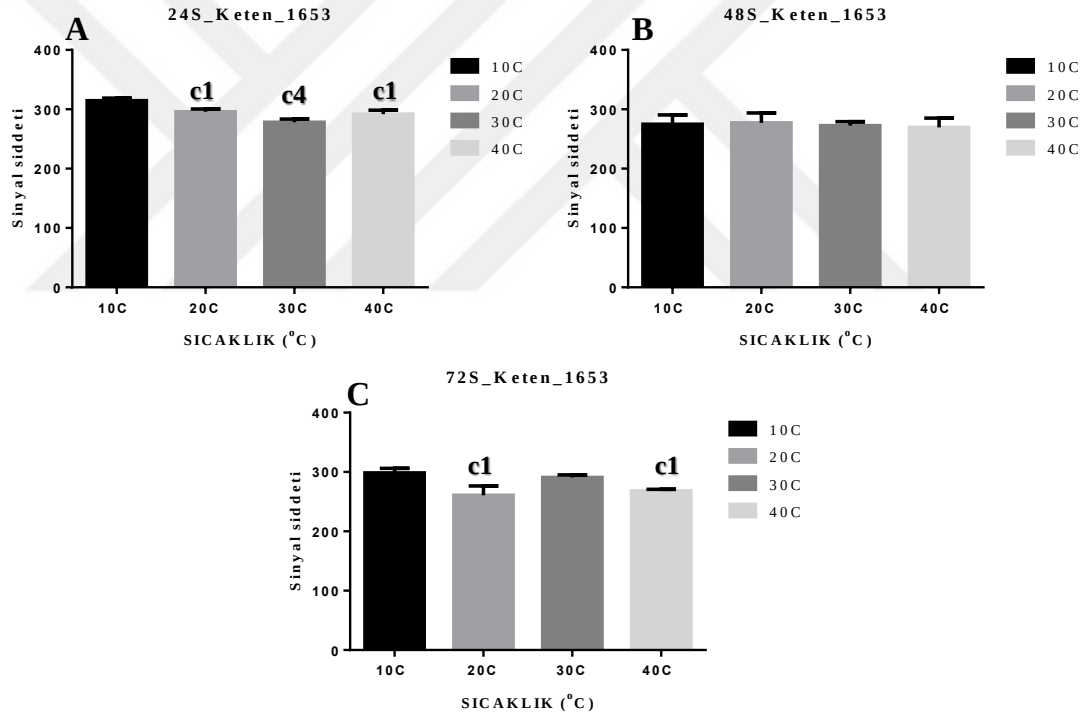


Şekil 4.41. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde β dönüş yapıdan kaynaklanan 1682 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C 'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

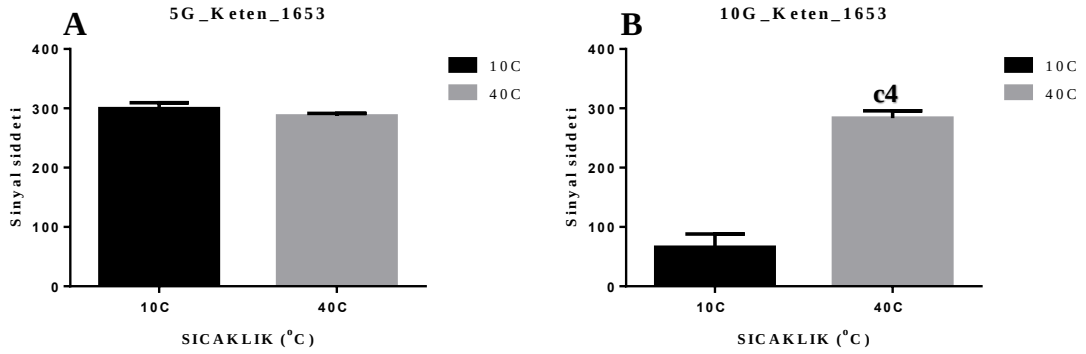
Sıcaklığa bağlı olarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreye maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.42'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak

10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saat 20°C, 30°C ve 40°C ve 72 saat 20°C ve 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1653 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir azalış görülmüştür. Öte yandan 10°C ve 40°C sıcaklığa bağlı olarak 5 gün ve 10 gün süreye maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.43'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1653 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir artış kaydedilmiştir ($p<0,0001$).



Şekil 4.42. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler

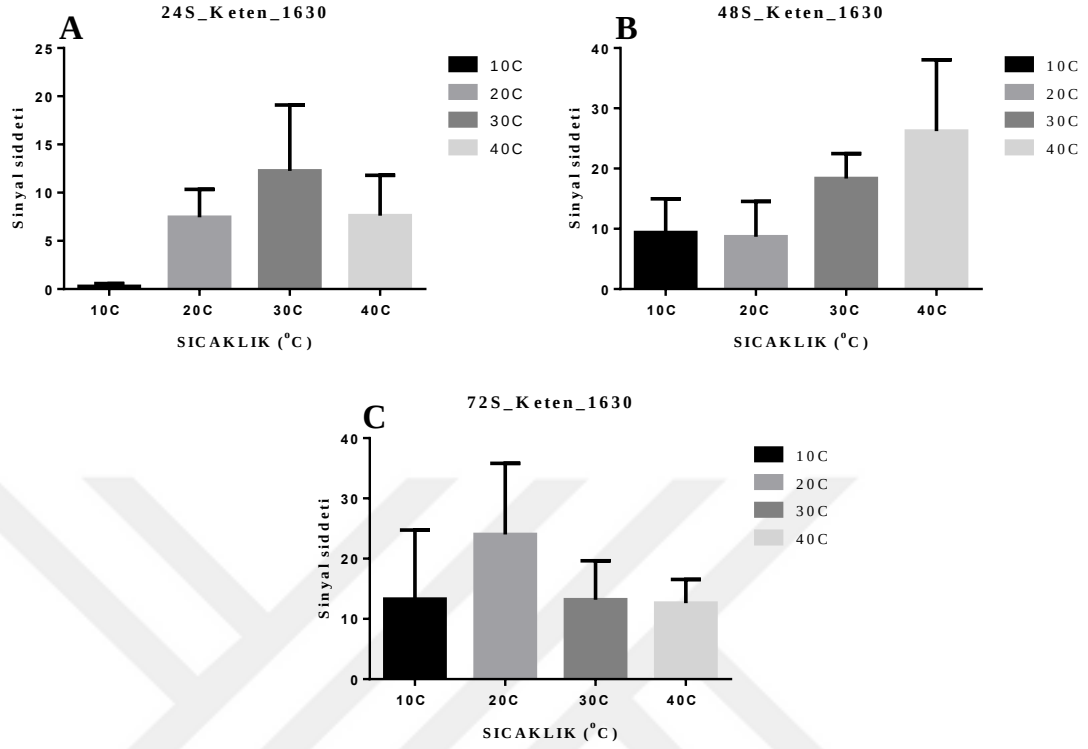
*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$



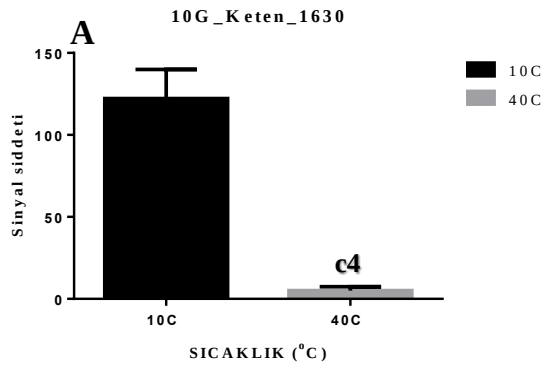
Şekil 4.43. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde α -heliks yapıdan kaynaklanan 1653 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p < 0,05$ c2: $p < 0,01$ c3: $p < 0,001$ c4: $p < 0,0001$

Sıcaklığa bağlı olarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreye maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.44'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında farklı süreler farklı sıcaklıklara maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1630 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir değişim görülmemiştir. Öte yandan 10°C ve 40°C sıcaklığa bağlı olarak 10 gün süreye maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} 'deki bant sinyal şiddetindeki değişim Şekil 4.45'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1630 cm^{-1} bant sinyal şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir azalış kaydedilmiştir ($p < 0,0001$).



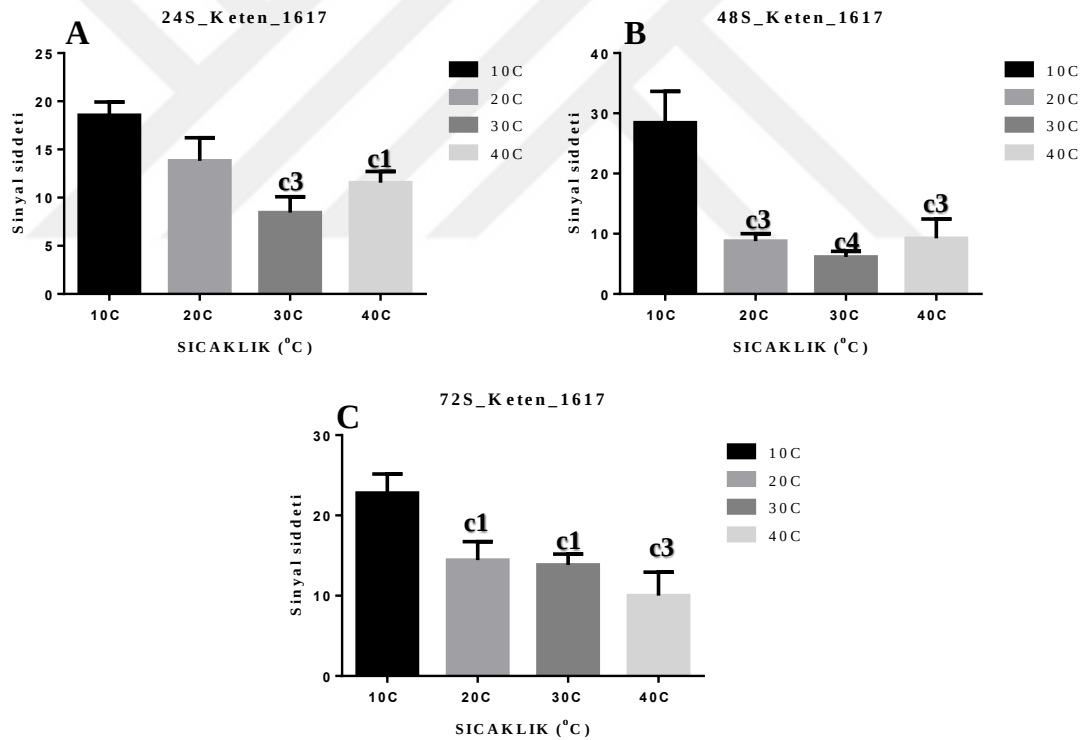
Şekil 4.44. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler
*Gruplar 10°C 'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$



Şekil 4.45. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde β plakalı tabakadan kaynaklanan 1630 cm^{-1} bandında A) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler
*Gruplar 10°C 'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

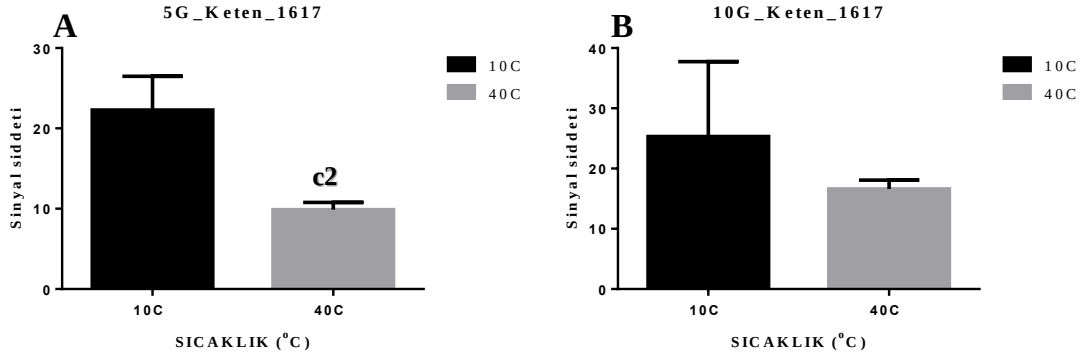
Sıcaklığa bağlı olarak 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreye maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} 'deki bant

sinyal şiddetindeki değişimler Şekil 4.46'da verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 24 saat 30°C ve 40°C, 48 saat 20°C, 30°C ve 40°C ve 72 saat 20°C, 30°C ve 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1617 cm^{-1} bant sinyali şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir azalış görülmüştür. Öte yandan 10°C ve 40°C sıcaklığa bağlı olarak 10 gün süreye maruz bırakılan keten kumaştaki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} 'deki bant sinyali şiddetindeki değişim Şekil 4.47'de verilmiştir. Analizler için kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 5 gün 40°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerinde sıcaklığa bağlı olarak 1617 cm^{-1} bant sinyali şiddetinde istatistiksel olarak önemli bir azalış kaydedilmiştir ($p<0,01$).



Şekil 4.46. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında A) 24, B) 48 ve C) 72 saatte günde sıcaklığa bağlı değişimler

*Gruplar 10°C'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$



Şekil 4.47. Keten kumaş üzerindeki kan örneklerinde agrega β plakalı tabakadan kaynaklanan 1617 cm^{-1} bandında A) 5 ve B) 10 günde sıcaklığa bağlı değişimler
 *Gruplar 10°C 'ye göre karşılaştırılmıştır c1: $p<0,05$ c2: $p<0,01$ c3: $p<0,001$ c4: $p<0,0001$

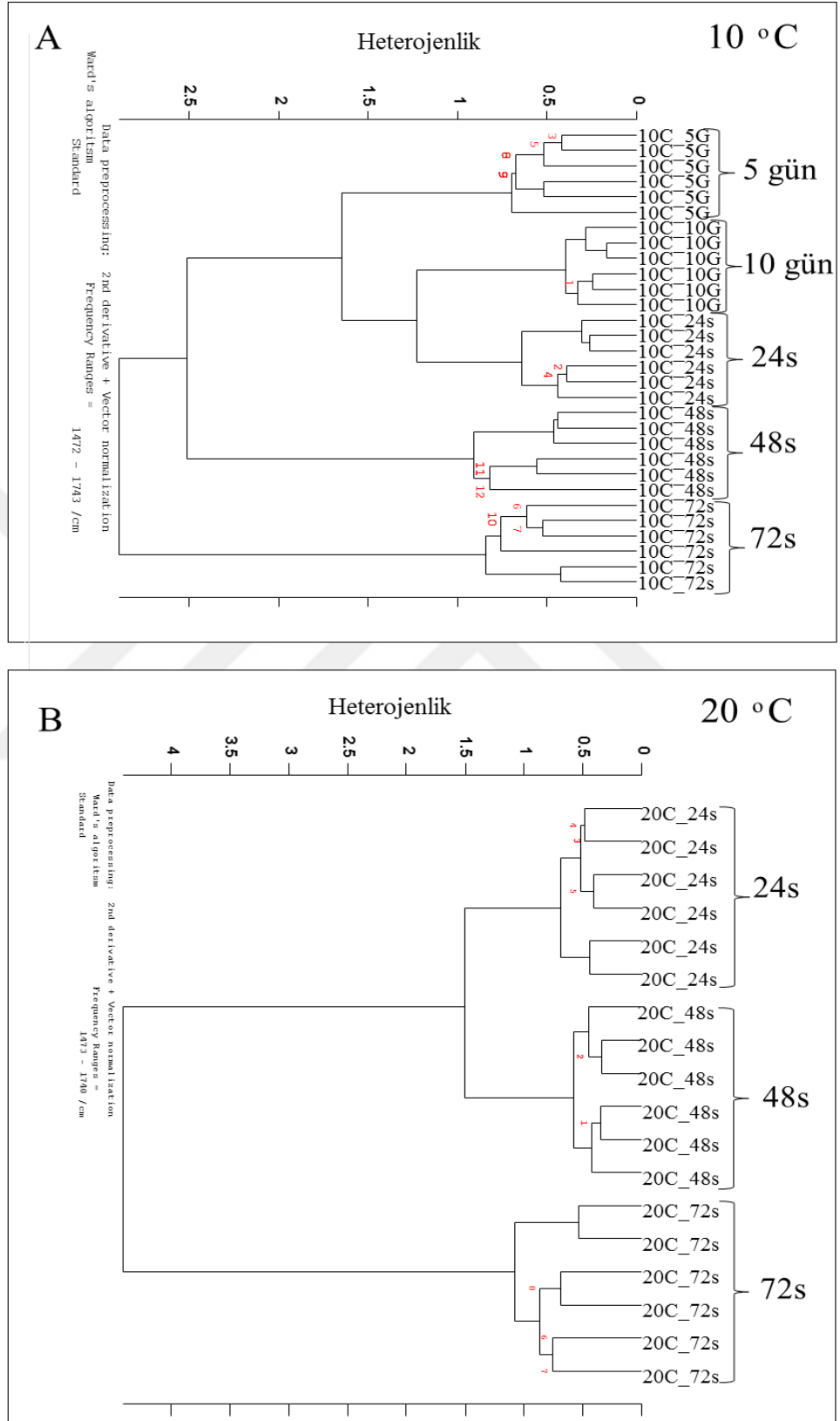
4.2. Kemometrik Analiz Sonuçları

Yaptığımız kantitatif spektral analizler sonucunda, keten ve pamuk kumaşlara damlatılmış kan lekelerinde zamana ve sıcaklığa bağlı olarak yapısal ve içeriksel değişimlerin olduğu gösterilmiştir. Örneklerin sabit sıcaklıkta zamana göre (24, 48 72 saat, 5 ve 10 gün) ve sabit zamanda sıcaklıklara göre (10°C , 20°C , 30°C ve 40°C) birbirlerinden ayrılıp ayrılmadığını test etmek amacıyla, örneklerle ait spektrumlara, gözetimsiz örüntü tanımlama metotlarından hiyerarşik kümeleme analizi (HCA) ile temel bileşen analizi (PCA) uygulanmıştır. Bu metotlar spektral değişimlere dayalı olarak çalışılan örneklem gruplarının sınıflandırılmasına ve dolayısıyla kan leke yaş tayininde kullanılacak metotların geliştirilmesine olanak sağlar. Her iki analiz içinde örneklerle ait spektrumların ikincil türevi alınıp, vektör normalizasyonu yapılmıştır. Analiz için spektral bölge olarak amit 1 ve amit 2 bantlarının yer aldığı $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölge kullanılmıştır. Sabit sıcaklıkta kontrol grubu olarak 24 saat, sabit zamanda ise kontrol grubu olarak 10°C alınmıştır. Bununla birlikte, grupların ayırımında kullanılacak metotların etkinliğini test etmek amacıyla HCA analizinde her bir ayırım için duyarlılık, özgülük ve doğruluk değerleri hesaplanmıştır.

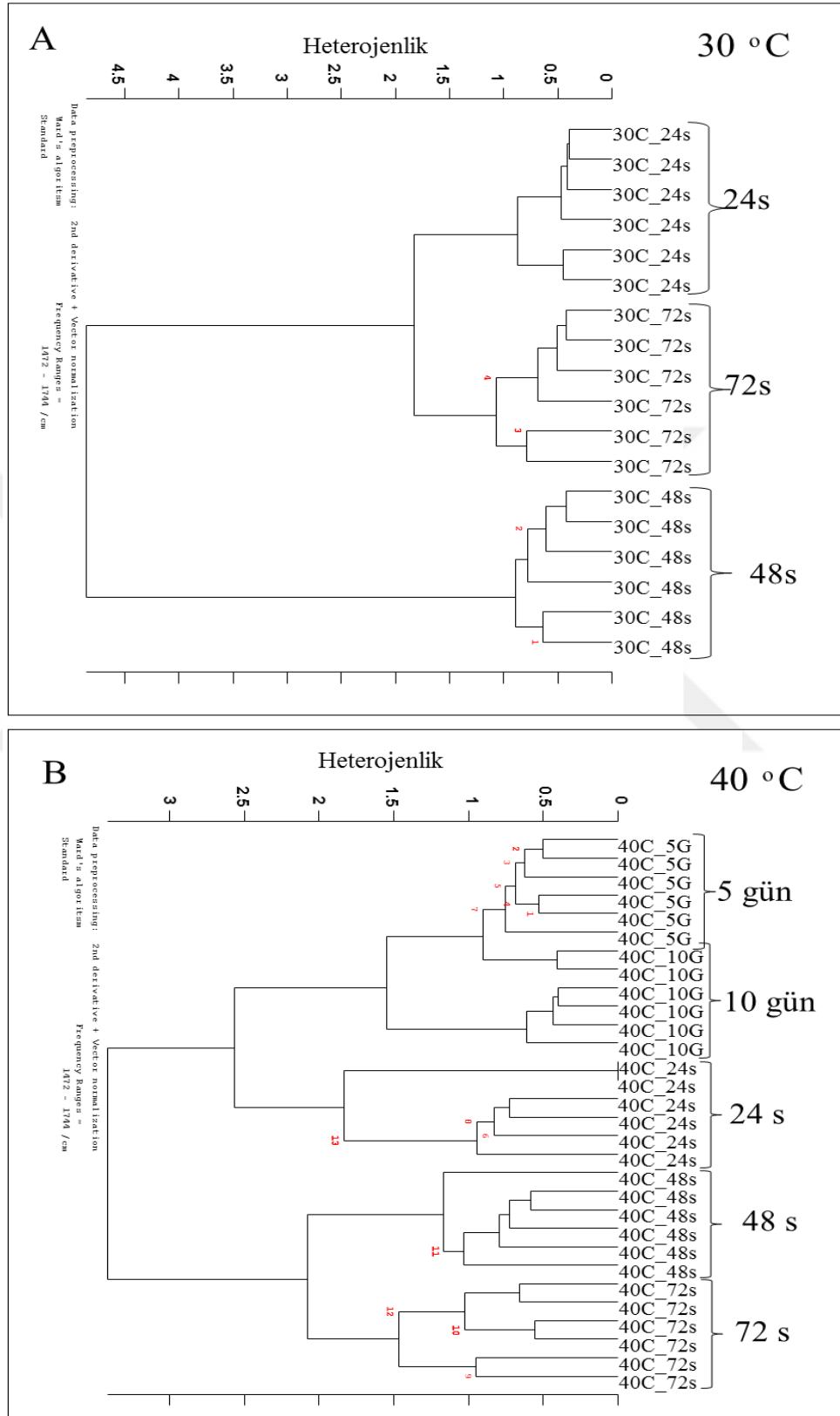
Sabit sıcaklıkta süreye bağlı olarak ve sabit sürede sıcaklığa bağlı olarak pamuk kumaşa damlatılmış kan lekelerinden elde edilen HCA analiz sonuçları Şekil 4.48-4.51'de verilmiştir. Bu analiz yöntemi ile pamuk kumaşa damlatılmış kan lekelerinde sabit

sıcaklıkta 24, 48, 72 saat, 5 ve 10 güne ait gruplar hem birbirinden hem de 24 saatlik kontrol grubundan %100 özgüllük, duyarlılık ve doğruluk ile ayrılmıştır. Yine bu analiz yöntemi ile sabit sürede 10°C, 30°C ve 40°C'ye ait gruplar hem birbirinden hem de 10°C'lik kontrol grubundan %100 özgüllük, duyarlılık ve doğruluk ile ayrılmış, 48 saat 20°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerine ait gruplar %83,33 duyarlılık ve %100 özgüllük, %91,66 doğruluk ile 10°C'lik gruptan ayrılmıştır.

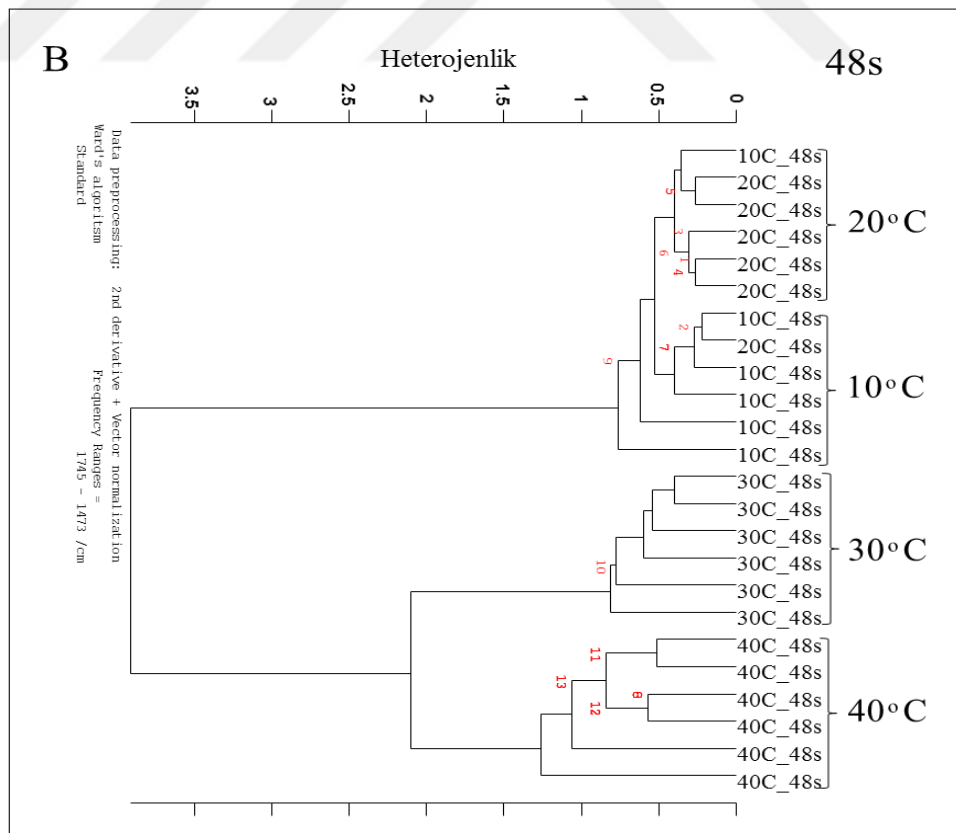
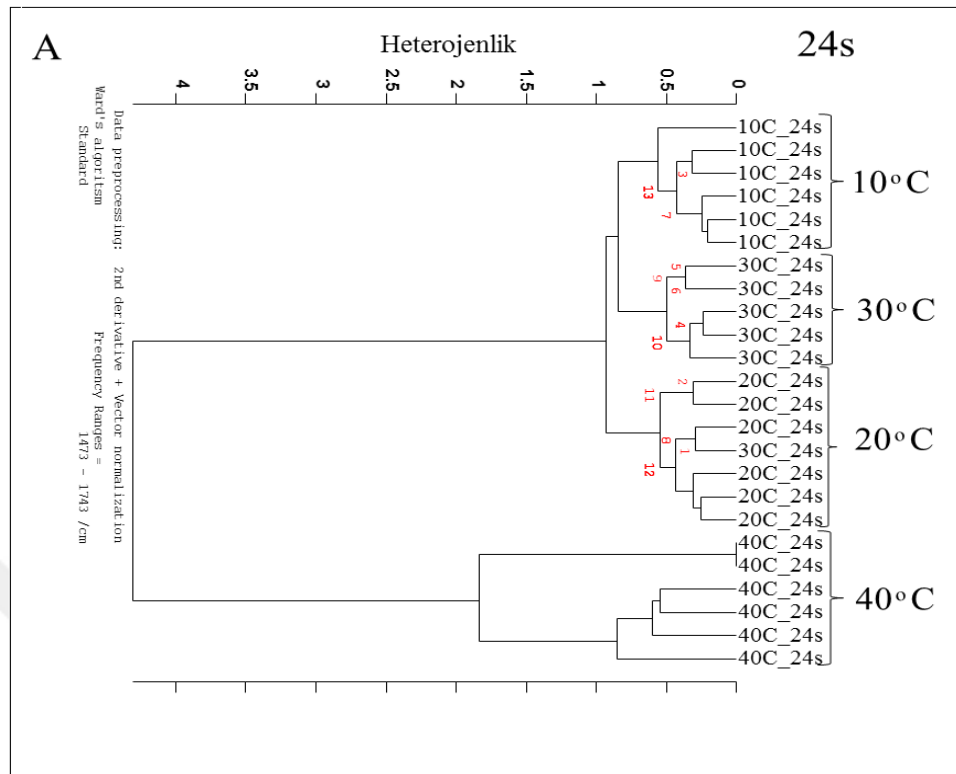




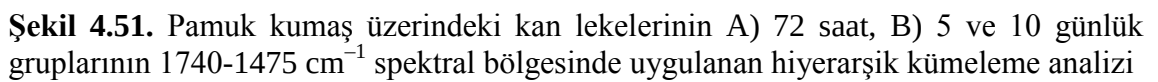
Şekil 4.48. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 10°C ve B) 20°C gruplarının 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi



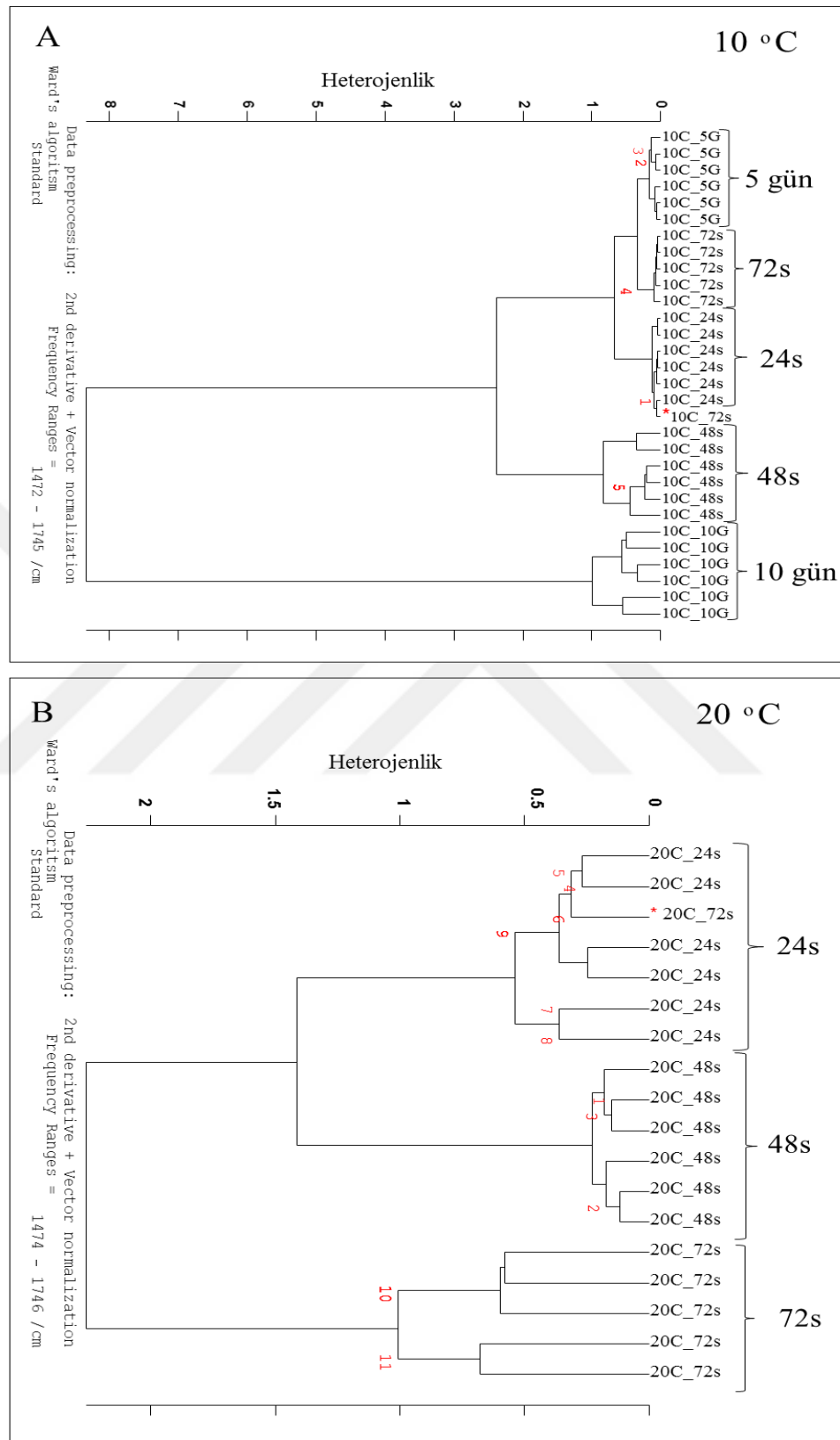
Şekil 4.49. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 30°C, B) 40°C gruplarının 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi



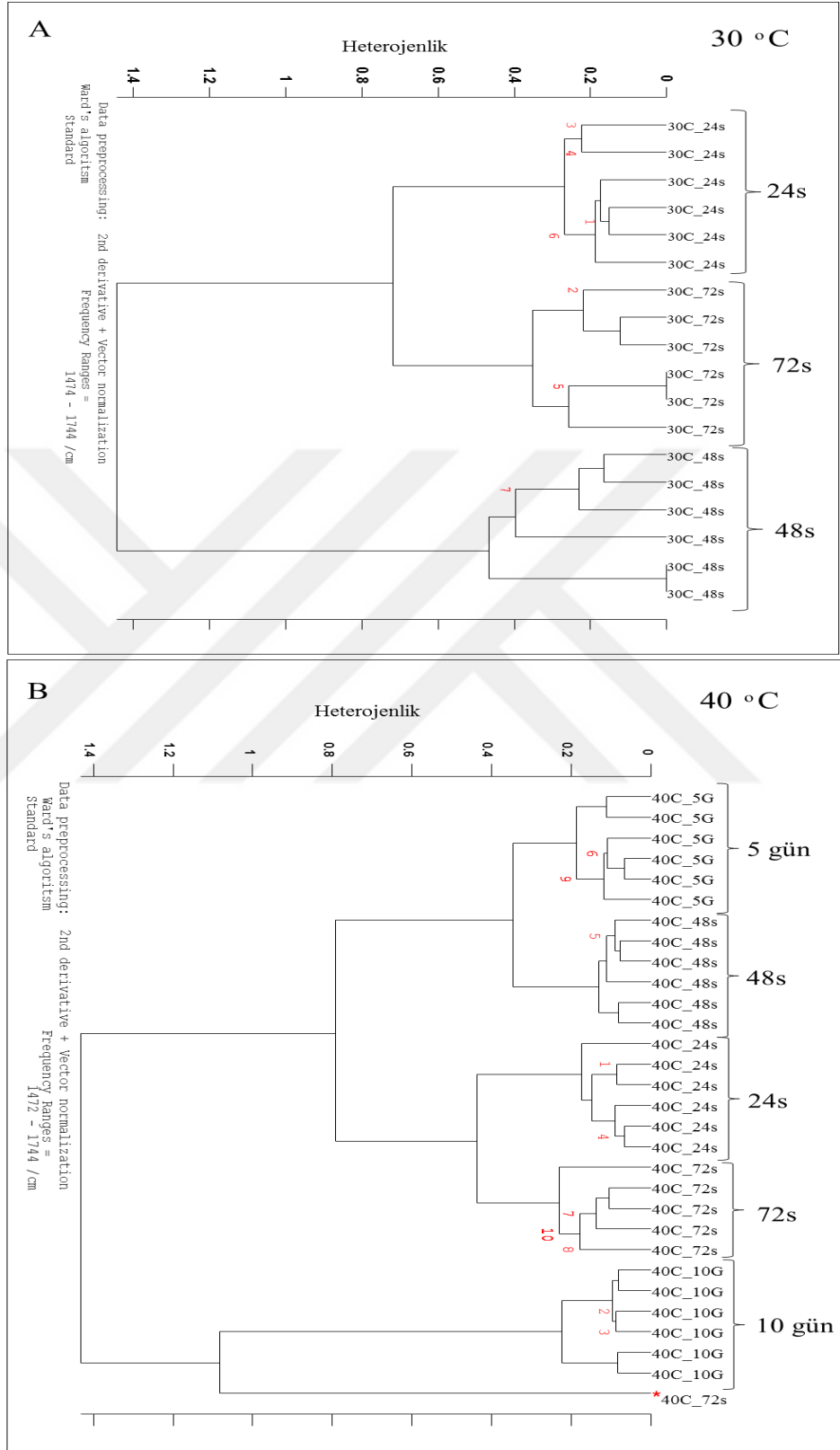
Şekil 4.50. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 24 saat, B) 48 saat gruplarının 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi



Keten kumaşa ait kan lekelerinin elde edilen HCA analiz sonuçları ise Şekil 4.52-4.55’de verilmiştir. Keten kumaşa damlatılmış kan lekelerinde sabit sıcaklıkta 24, 48 ve 72 saate ait gruplar 30°C sıcaklıkta hem birbirinden, hem de 24 saatlik kontrol gruplarından %100 özgüllük, duyarlılık ve doğruluk ile ayrılmıştır. Buna ilaveten, 10°C, 20°C ve 40°C sıcaklıklarda 48 saat, 5 ve 10 güne ait gruplar %100 özgüllük, duyarlılık ve doğruluk ile 24 saatlik gruptan ayrılmıştır. Yine 72 saatlik grup %83,33 duyarlılık ve özgüllük, %91,66 doğruluk ile 24 saatlik gruptan ayrılmıştır. Öte yandan sabit sürede 10°C, 30°C ve 40°C’ye ait gruplar hem birbirinden hem de 10°C’lik kontrol grubundan %100 özgüllük, duyarlılık ve doğruluk ile ayrılmıştır. 48 saat zaman diliminde ise 20°C sıcaklığa maruz bırakılan kan lekelerine ait örnekler %100 duyarlılık ve %66,66 özgüllük değeri ile 10°C’den ayrılmıştır.

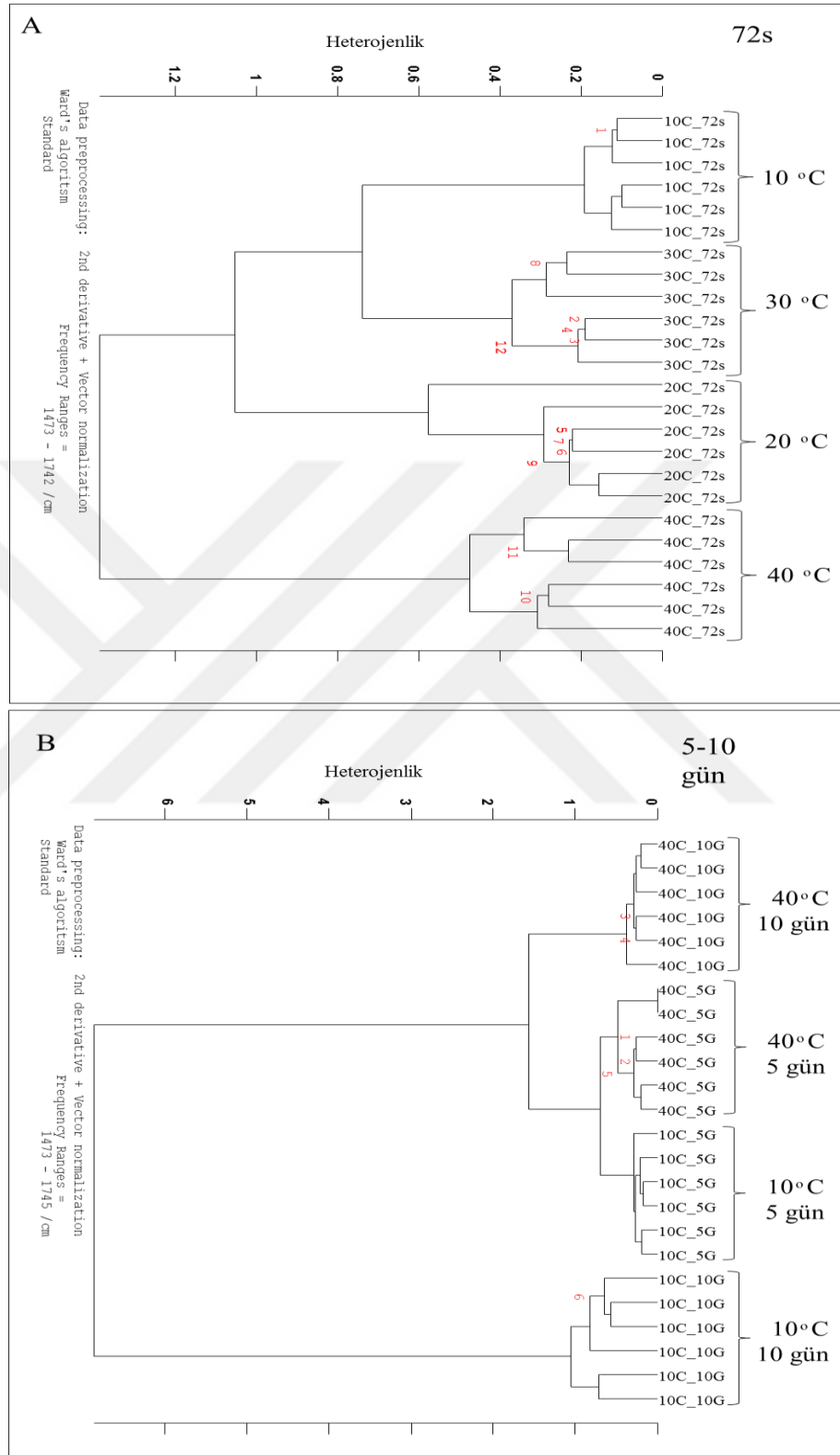


Şekil 4.52. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 10°C B) 20°C gruplarının 1740-1475 cm⁻¹ spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi



Şekil 4.53. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 30°C B) 40°C gruplarının 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi

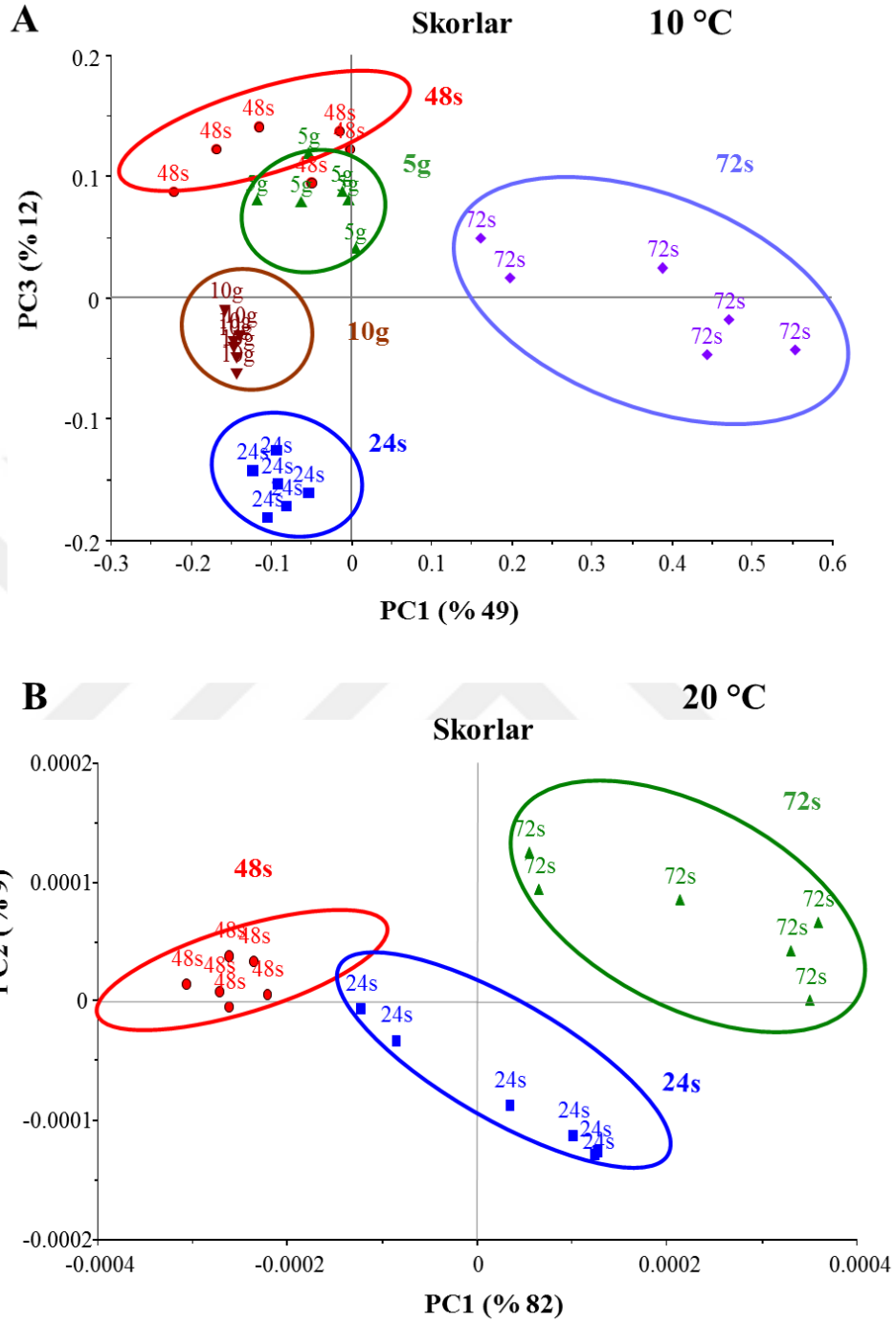
Şekil 4.54. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 24 saat B) 48 saat gruplarının 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi



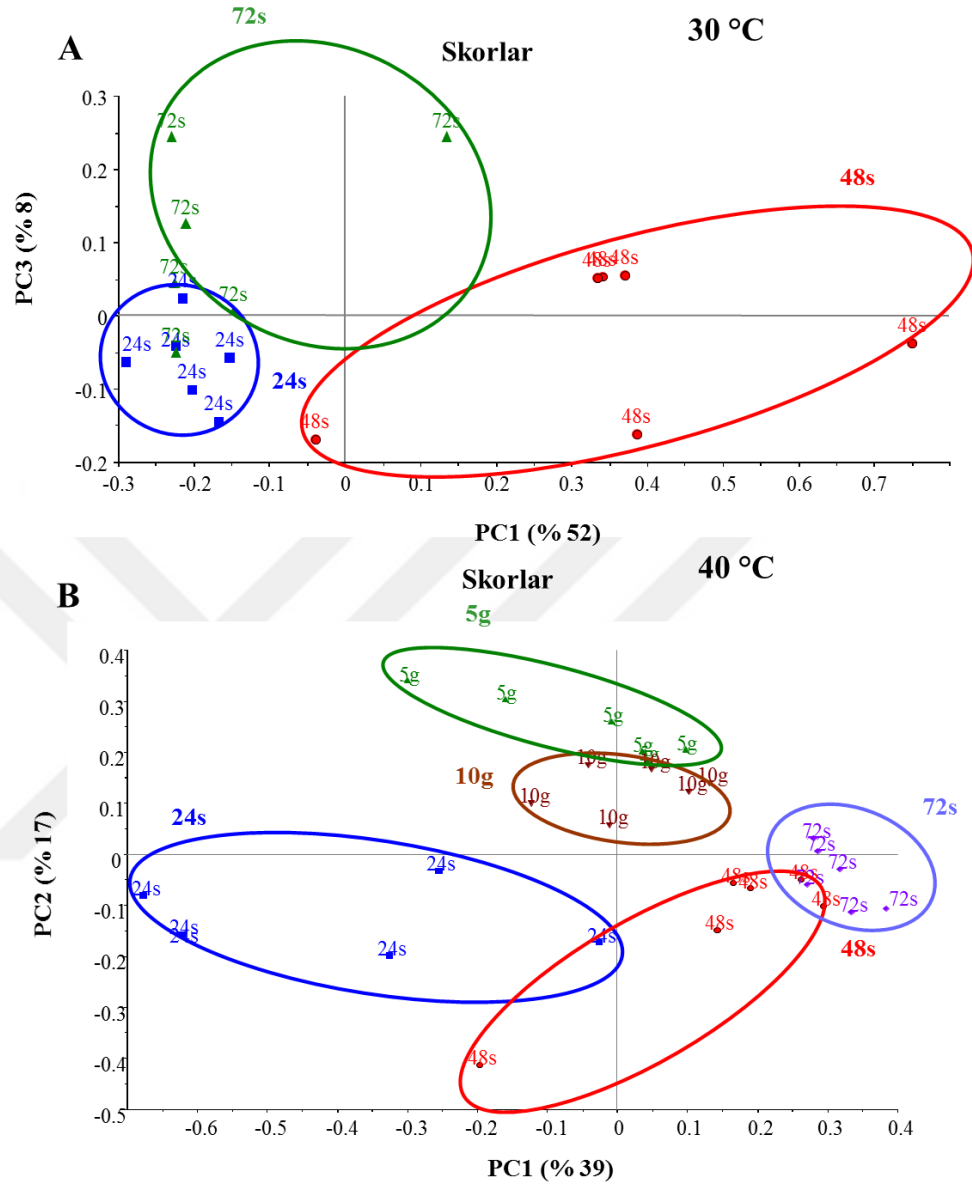
Şekil 4.55. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 72 saat B) 5 ve 10 gün gruplarının $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde uygulanan hiyerarşik kümeleme analizi

HCA analizlerini desteklemek ve grupların birbirinden ayrılıp ayrılmadığını tespit etmek amacıyla PCA analizi de yapılmıştır. Şekil 4.56-4.63’de pamuk ve keten kumaşa ait amit 1 ve 2 bölgesinde yapılan PCA skor grafikleri verilmiştir. Skor grafikleri, çalışılan örnekler arasındaki bağlantıların yorumlanmasını sağlayan, örnekler arasındaki benzerlik veya farklılıkların belirlenmesinde kullanılan analiz yöntemidir (Kansiz *et al.* 1999; Kirschner *et al.* 2001). Grafikler temel bileşenlere dayalı olarak çizilmektedir. Örnekler arasındaki varyasyonlar ise bu bileşenlerle gösterilmektedir. Birinci temel bileşen toplam değişkenliği en fazla açıklayan, ikinci temel bileşen ise kalan değişkenlikleri en fazla açıklayan değişkendir.

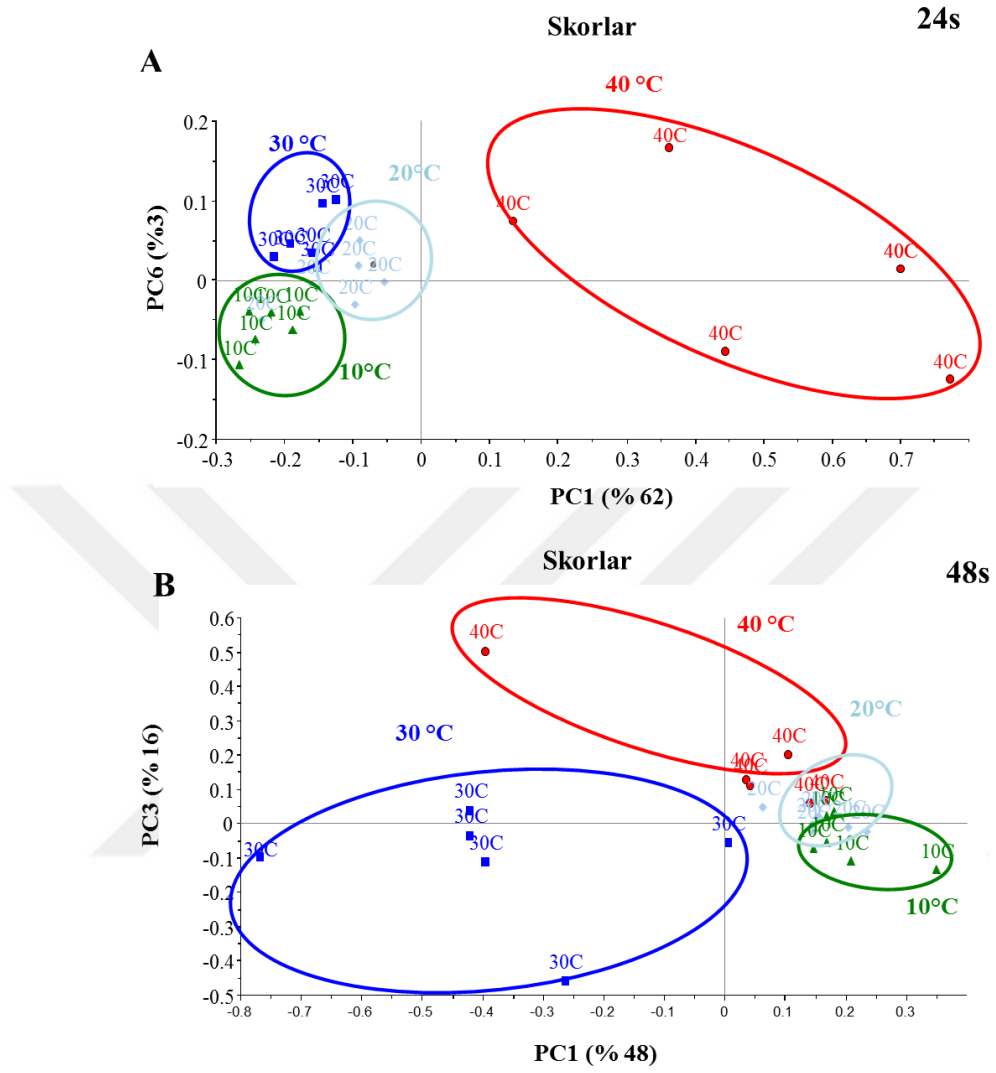
Şekil 4.56-4.63’de görüldüğü gibi amit 1 ve 2 bölgesine ait skor grafiklerinde, pamuk ve keten kumaşlara damlatılmış kan lekeleri zamana ve sıcaklığa bağlı olarak birbirlerinden ayrılmıştır. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinde yapılan PCA analizleri sonucunda 10°C sıcaklıkta, 24, 72 saat ve 10 gün grupları oldukça iyi bir biçimde ayrılmış, ancak 48 saat ve 5 gün grupları diğer gruplara göre daha yakın gruplanmıştır. Buna ilaveten, 20°C ve 30°C sıcaklıklarda 24, 48 ve 72 saat grupları da oldukça iyi bir şekilde birbirinden ayrılmıştır. Yine 40°C’de tüm gruplar birbirinden ayrılmış, 48 saat ile 72 saat, 5 gün ile 10 gün grupları birbirlerine daha yakın konumlanmıştır(Şekil 4.58). 24 saatlik grupta 40°C’de tam bir ayrım sağlanırken, 10°C, 20°C ve 30°C grupları birbirine daha yakın konumlanmıştır. 48 saate ise 30°C ile 40°C ve 10°C ile 20°C grupları birbirlerine daha yakın konumlanmıştır. 72 saatte ise gruplar arasındaki ayrım daha da belirginleşmiştir. 5 ve 10 günde ise tüm gruplar birbirinden ayrılmıştır. (Şekil 4.59).



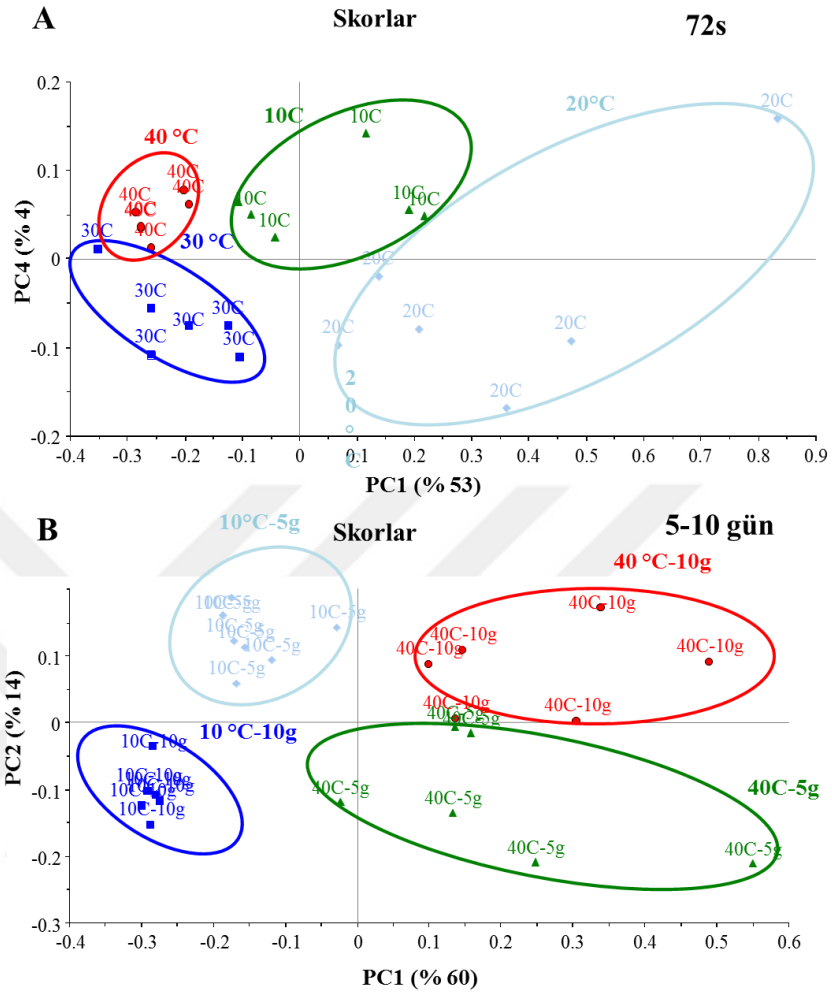
Şekil 4.56. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 10°C ve B) 20°C sıcaklıkta 24, 48, 72 saat, 5 ve 10 günlük grupların 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri



Şekil 4.57. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 30 °C ve B) 40 °C sıcaklıkta 24, 48, 72 saat, 5 ve 10 günlük grupların $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri



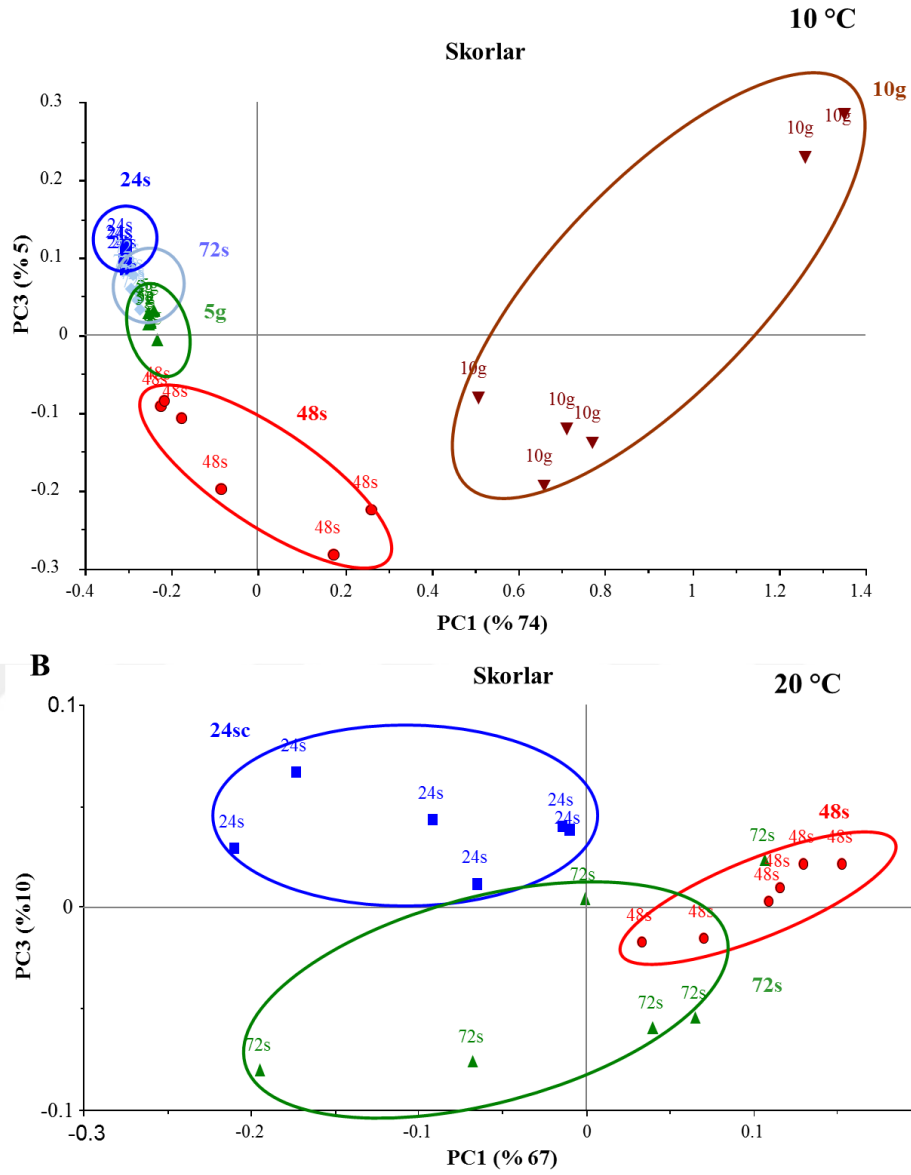
Şekil 4.58. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 24 ve B) 48 saatte 10, 20, 30 ve 40°C grupların $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri



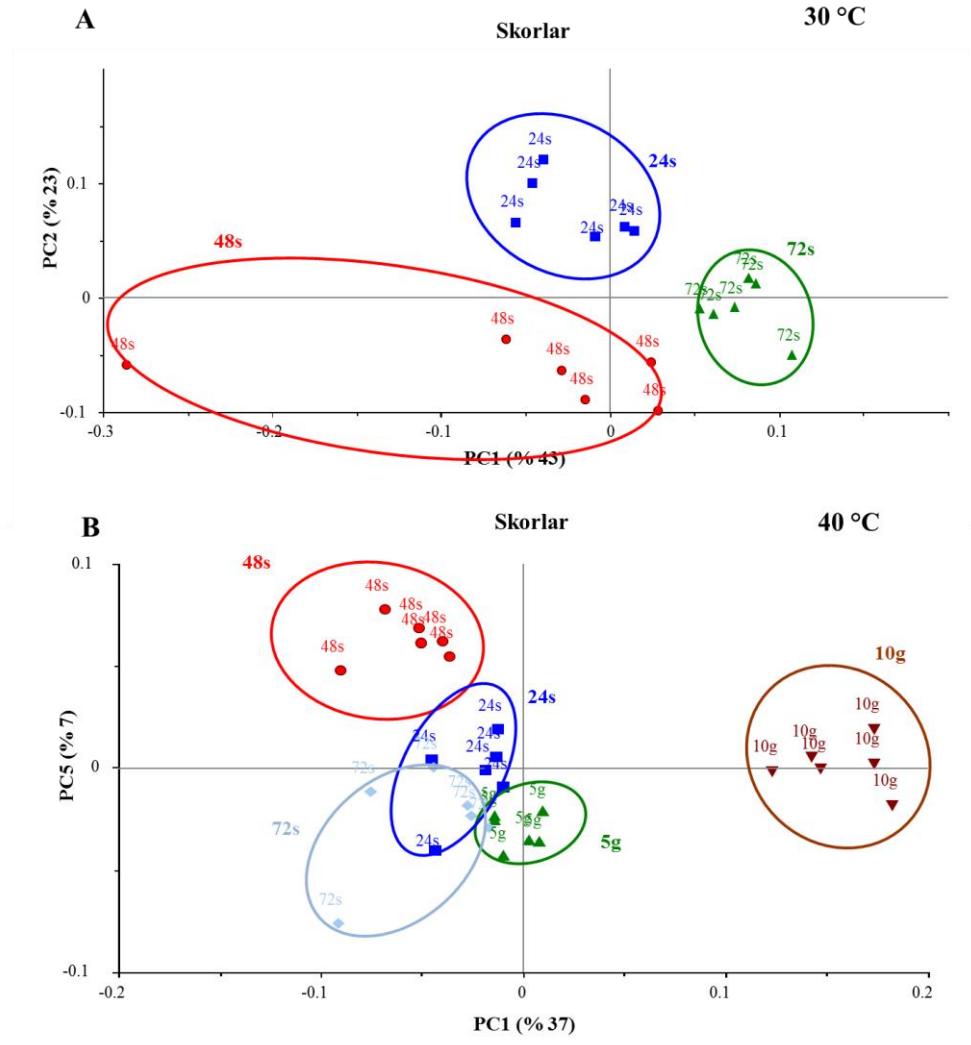
Şekil 4.59. Pamuk kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 72 saat ve B) 5- 10günde 10, 20, 30 ve 40°C grupların 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri

Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinde yapılan PCA analizleri sonucunda 10°C’de 10 günde tam bir ayırım sağlanmış, 24, 48, 72 saat ve 5 gün birbirine yakın konumlanmıştır. 20 °C’de, 24 saatte tam bir ayırım sağlanırken, 48 ve 72 saatlik gruplar birbirlerine daha yakın yerleşmişlerdir (Şekil 4.60). 30°C’de 24, 48 ve 72 saatlik gruplar arasındaki ayırım daha da belirginleşmiştir. 40°C sıcaklıkta 10 günde tam bir ayırım sağlanırken, 24, 48, 72 saat ve 5 gün gruplar birbirlerine daha yakın konumlanmışlardır (Şekil 4.61). 24 saatlik grupta 10°C ve 40°C’nin tam bir ayırım sağlanmış, 20°C ve 30°C gruplar birbirlerine daha yakın konumlanmışlardır. 48 saatlik grupta 10°C grupta tam bir ayırım sağlanmış, 20°C, 30°C ve 40°C gruplar birbirlerine daha yakın konumlanmışlardır (Şekil 4.62). 72 saatlik grupta 10°C ile 30°C ve 20°C ve 40°C gruplar birbirlerine daha

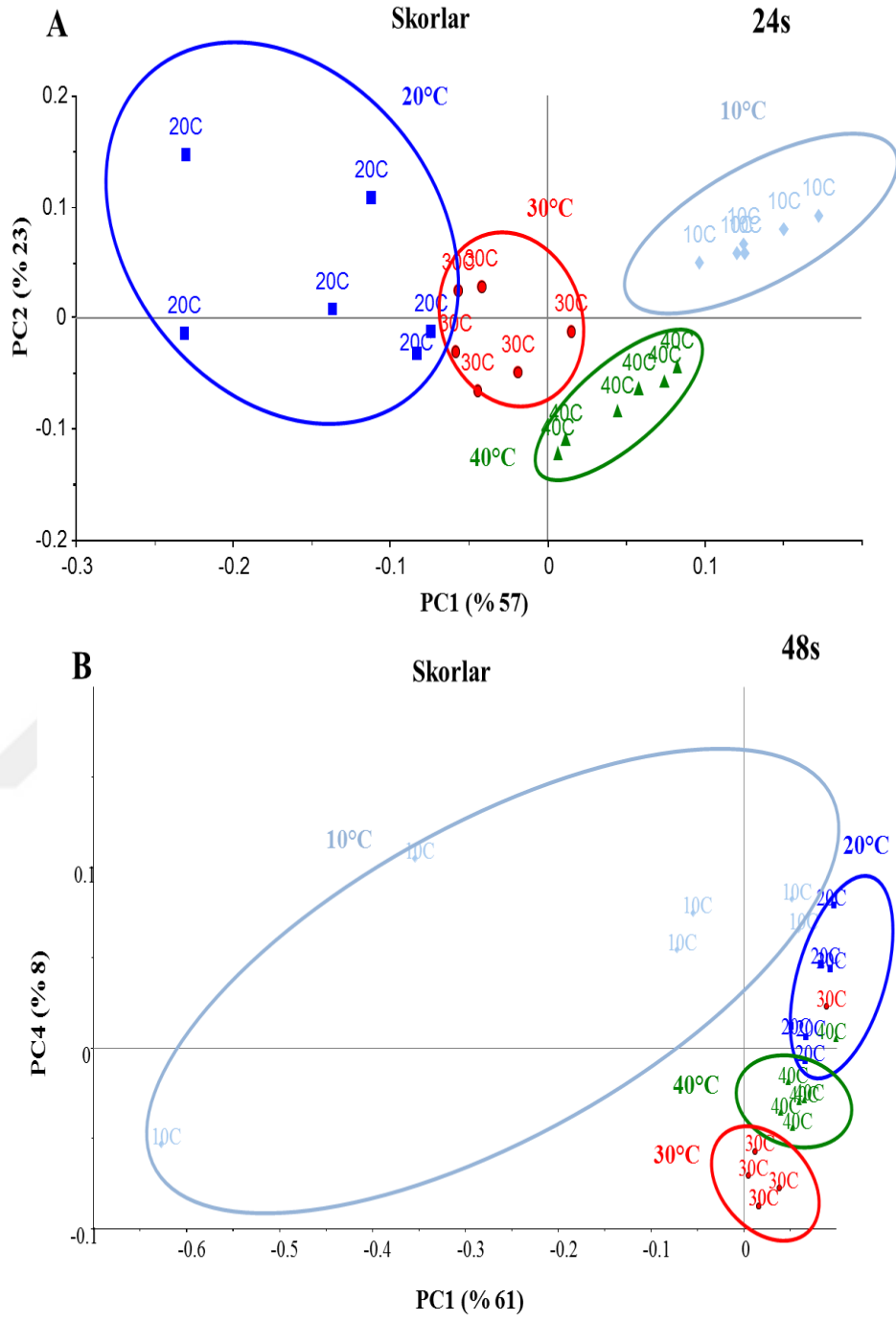
yakın konumlanmışlardır .5-10 günlük grupta, 10°C 10 günde tam bir ayrım sağlanmış, diğer gruplar birbirleri ile yakın konumlanmışlardır (Şekil 4.63).



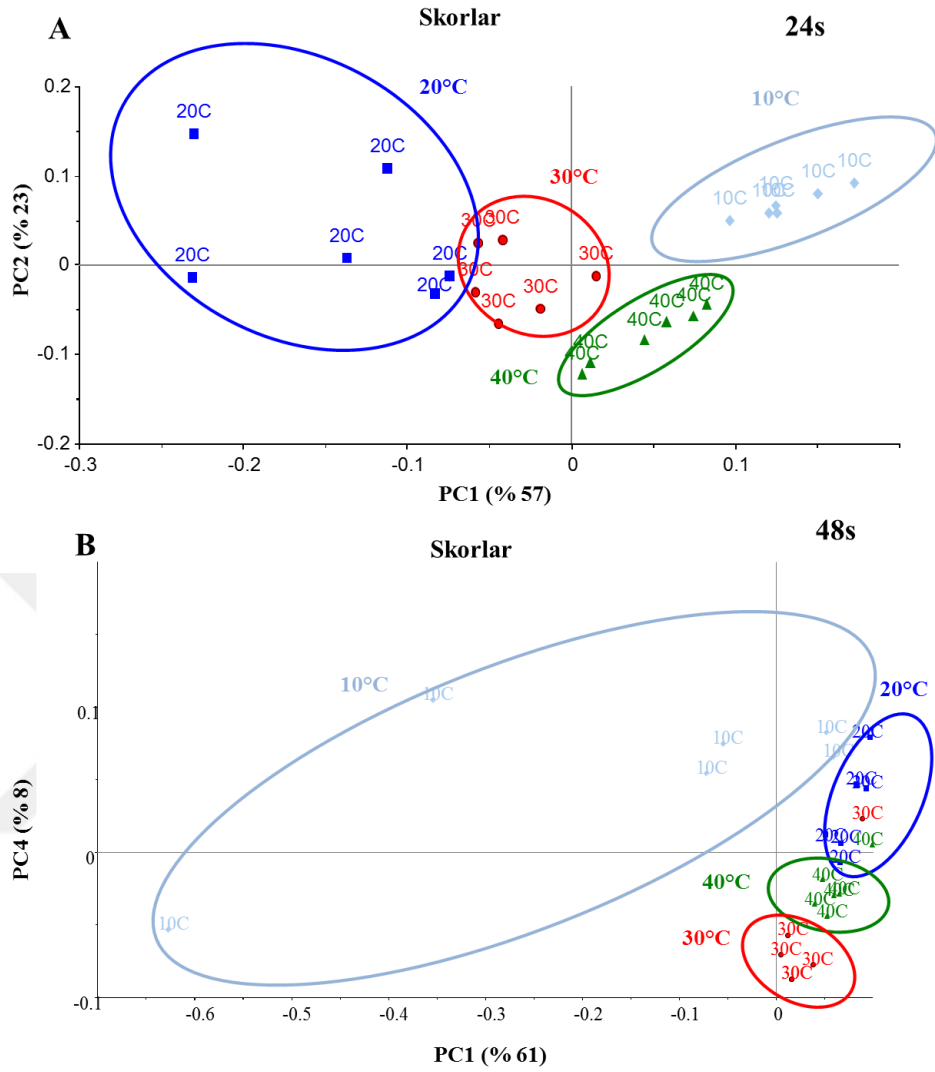
Şekil 4.60. Ketan kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 10°C ve B) 20°C sıcaklıkta 24, 48, 72 saat, 5 ve 10 günlük grupların 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri



Şekil 4.61. Ketten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 30°C ve B) 40°C sıcaklıkta 24, 48, 72 saat, 5 ve 10 günlük grupların 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri

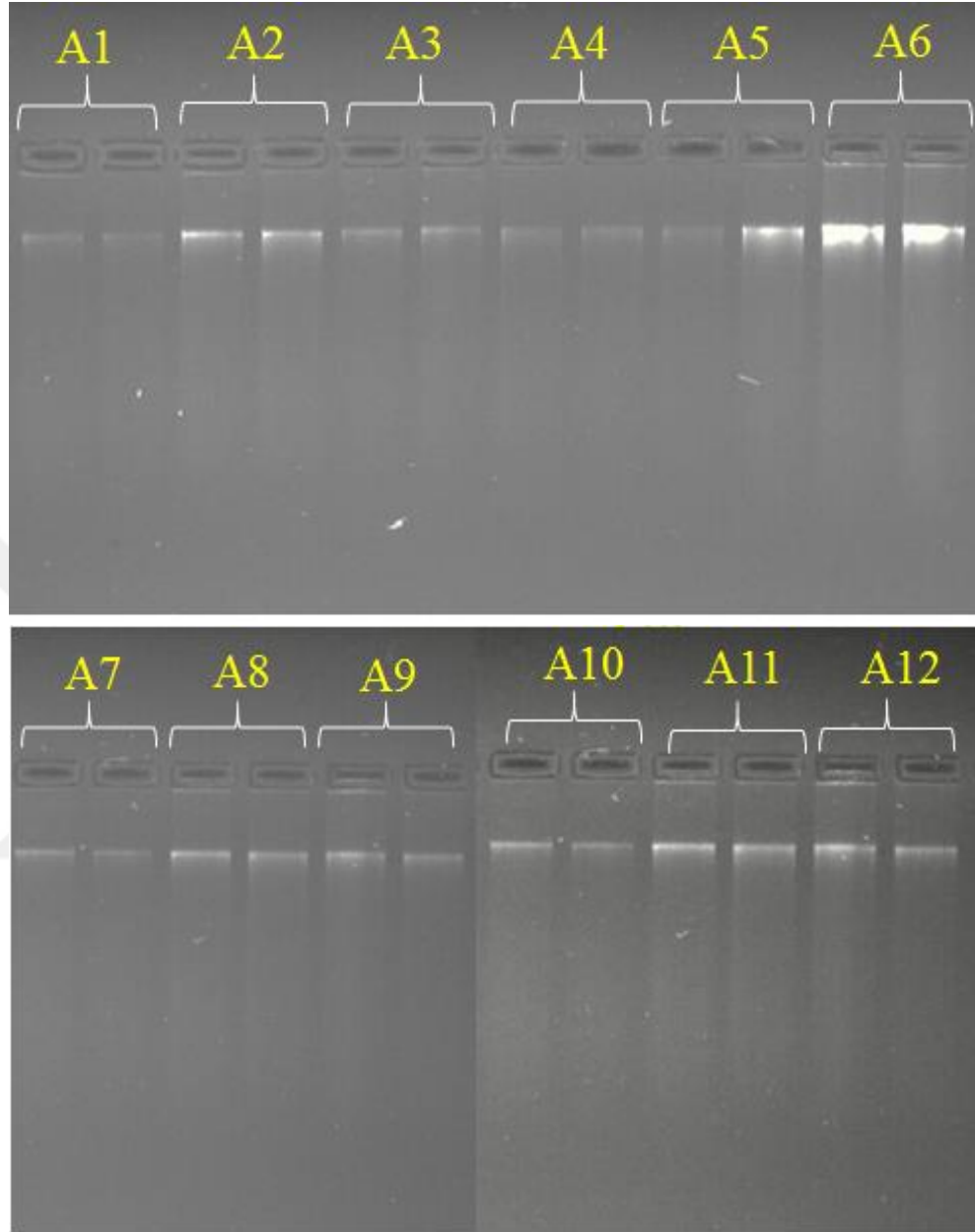


Şekil 4.62. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 24 ve B) 48 saatte 10, 20, 30 ve 40°C grupların $1740\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri



Şekil 4.63. Keten kumaş üzerindeki kan lekelerinin A) 72 saat ve B) 5- 10günde 10, 20, 30 ve 40 °C grupların 1740-1475 cm^{-1} spektral bölgesinde yapılan PCA analizine ait skor grafikleri

Farklı süre ve sıcaklığa bırakılan maruz bırakılan keten ve pamuk kumaştaki kan lekelerinden, DNA eldesinin mümkün olup olmadığını belirlemek amacıyla QIAamp® DNA Mini Kit kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Yapılan izolasyon sonucunda farklı sıcaklık ve sürelerde her iki kumaş üzerindeki kan lekelerinden elde edilen DNA'nın herhangi bir bozunmaya uğramadan izole edilebildiği ortaya konmuştur.



Şekil 4.64. Pamuk ve keten kumaşlarda ki kan lekelerinin, DNA izolasyonunda zamana ve sıcaklığa bağlı olarak meydana gelen değişimler

*A1: 10°C 24 saat pamuk ve keten kumaş. A2: 10°C 48 saat pamuk ve keten kumaş. A3: 10°C 72 saat pamuk ve keten kumaş. A4: 20°C 24 saat pamuk ve keten kumaş. A5: 20°C 48 saat pamuk ve keten kumaş. A6: 20°C 72 saat pamuk ve keten kumaş. A7: 30°C 24 saat pamuk ve keten kumaş. A8: 30°C 48 saat pamuk ve keten kumaş. A9: 30°C 72 saat pamuk ve keten kumaş. A10: 40°C 24 saat pamuk ve keten kumaş. A11: 40°C 48 saat pamuk ve keten kumaş. A12: 40°C 72 saat pamuk ve keten kumaş.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Olay yerinde en sık karşılaşılan biyolojik delillerden birisi kan lekesidir. Kan lekesi, zanlı kimliğini belirlemek, olay dizisini anlamak ve olay zamanını tespit etmekte önemli bir yere sahiptir. Kan lekesi yaş tayini için geçmişten günümüze kadar birçok teknik ve yöntem geliştirilmiştir. Kan lekesi yaş tayininde basit temele dayanan kan rengi değişimlerinin kaydedildiği renk skalası, hemoglobin değişimi gibi yöntemlerin yanı sıra daha komplike donanım ve tecrübe gerektiren UV/görünür spektroskopisi, mikrospektrofotometre, HPLC, yansıma spektroskopisi, elektron paramagnetik rezonans, atomik güç mikroskopu, oksijen elektrotları, Raman spektroskopisi, X-ray floresansı, nükleer manyetik rezonansı, kütle spektroskopisi, SDS-PAGE ve RNA degradasyonu gibi yöntem ve teknikler kullanılmaktadır. Ancak bu tekniklerin çoğu, özel laboratuvar koşulları ve ekipmanları gerektirmesi, ön hazırlık aşamalarının olması ve cihazların taşınamaması gibi nedenlerden dolayı günümüzde adli tıp alanında rutin olarak kullanılamamaktadır. Yukarıda sıralanan yöntem ve teknikler dışında kan lekesi gibi vücut sıvılarının yaş tayini için rutin olarak kullanılabilecek ve bir olayın hızlı şekilde çözülmesine yardımcı olabilecek yöntem ve tekniklere ihtiyaç duyulmuştur. Bu yüzden son zamanlarda kriminal alanda vücut sıvılarının yaş tayininde en çok kullanımı araştırılan spektroskopik yöntemlerin başında kızılötesi spektroskopisi gelmektedir.

Kızılötesi spektroskopisi, kızılötesi ışınlarının maddeler tarafından absorblanarak, maddelerdeki fonksiyonel grupların belirlenmesi ve analiz edilmesini sağlamaktadır. Bu teknik, biyolojik sistemlerde mevcut olan lipid, protein, karbohidrat, nükleik asit (RNA, DNA) gibi makromoleküllere ait soğurma bantlarını tek bir spektrumda verebilen, makromoleküllerin aynı anda ve hiçbir etiketleme yöntemi kullanmadan izlenmesini sağlayan eşsiz bir tekniktir. Bu teknik ile kantitatif ve kemometrik olmak üzere iki türlü analiz yapılabilir. Bu çalışmada pamuk ve keten kumaşlara damlatılmış kanda bulunan proteinlerde zamana ve sıcaklığa bağlı olarak meydana gelen değişimleri analiz etmek için kızılötesi spektroskopisi kullanılmıştır. Kantitatif ve kemometrik analizler için sadece protein bölgesi olan amit 1 ve amit 2 bant bölgesi ($1740-1470\text{ cm}^{-1}$) incelenmiştir. Bu bantlar total proteinlerde meydana gelen yapısal ve miktarsal

değişimleri belirlemek için kullanılmaktadır. Yapısal değişimler, amit 1 ve amit 2 bantlarına ait dalga sayısı kaymalarından veya bantlara ait alan ya da sinyal şiddeti oranındaki değişimlerden belirlenmektedir. Kantitatif analiz olarak hesaplanan bant alanı ve bant sinyal şiddeti bandın kaynaklandığı moleküllerin konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir. Elde edilen bant sinyal şiddetlerinde meydana gelen artış ya da azalış, bantla ilişkili molekülün miktarındaki artış ve azalışı ifade etmektedir. Bu çalışmada zamana ve sıcaklığa bağlı olarak amit 1 bant alanında meydana gelen değişim protein miktarındaki değişim olarak yorumlanmıştır. Pamuk kumaşa damlatılmış kan lekelerindeki protein miktarı zamana bağlı olarak 10°C, 20°C ve 40°C sıcaklıklarda artmış, 30°C sıcaklıkta azalmıştır. Keten kumaşa damlatılmış kan lekelerindeki protein miktarı ise zamana bağlı olarak 10°C ve 40°C sıcaklıklarda azalmıştır. Öte yandan, pamuk ve keten kumaşa damlatılmış kan lekelerindeki protein miktarı sıcaklık artışına bağlı olarak 24 saat, 48 saat, 72 saat, 5 gün ve 10 günde azalmıştır. Protein miktarında meydana gelen bu azalma kan lekesinde yer alan proteinlerin degradasyonu ile ilişkilidir. Kanda dominant olarak bulunan hemoglobin, albumin ve γ -globulin gibi proteinlerde yaşlanmaya bağlı olarak degradasyon olduğu Rajamannar (1977), Guo *et al.* (2012) ve Doty *et al.* (2016) tarafından da rapor edilmiştir. Öte yandan, zamana bağlı olarak çeşitli sıcaklıklarda protein miktarında artış kaydedilmiştir. Bu artış taze kanda bulunmayan ancak kan lekelerinde yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan bir proteinin miktarındaki artıştan kaynaklanabilir. Nitekim Inoue *et al.* (1992) ve Andrasko (1997) HPLC yöntemi ile kan yaşı tayinine yönelik yaptıkları çalışmalarında zamana bağlı olarak, taze kanda bulunmayan ve tanımlanamayan bir proteinin miktarında artış belirlemiş ve bu proteini protein X olarak adlandırmışlardır. Bununla birlikte, Joode (2010) tarafından spektrofotometrik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak hemoglobinin kinetiğine ilişkin yapılan bir çalışmada kan lekesi yaşında sıcaklığa bağlı olarak, hemoglobinin denatürasyonu sonucu oluşan hemikrom fraksiyonunda artış gözlenmiştir.

Kumaşlar üzerine damlatılan kan lekelerinde bulunan proteinlerin miktarında meydana gelen değişimlere ilaveten bu proteinlerde zamana ve sıcaklığa bağlı olarak ortaya çıkan yapısal değişimleri belirlemek amacıyla amit 1 bandı dalga sayılarındaki değişimlere

bakılmıştır. Amit 1 bandı dalga sayısındaki kaymalar proteinlerin konformasyonlarında ki yapısal değişimleri göstermektedir (Haris and Severcan 1999). Pamuk kumaşa damlatılmış kan lekelerinde 10°C’de çalışılan süre artışına bağlı olarak bir azalış, 40°C’de bir artış kaydedilmiştir. Yine keten kumaşa damlatılmış kan lekelerinde 10°C’de çalışılan süre artışına bağlı olarak bir artış, 30°C’de bir azalış tespit edilmiştir. Öte yandan, pamuk kumaşa damlatılmış kan lekelerinde sıcaklık artışına bağlı olarak 48 saat, 72 saat, 5 ve 10 günde dalga sayılarında bir artış belirlenmiştir. Keten kumaşa damlatılmış kan lekelerinde ise 24, 48 ve 72 saatte sıcaklık artışına bağlı olarak dalga sayılarında bir artış kaydedilmiştir. Dalga sayılarında oluşan bu kaymalar hem pamuk hem de keten kumaşa damlatılan kanlarda proteinlerde konformasyonel değişimlerin olduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgulara paralel olarak, Guo *et al.* (2012), tarafından floresan ömür ölçümüne dayalı kan lekesi yaş tayinine yönelik yapılan bir çalışmada, leke yaşlanmasına bağlı olarak, kan lekesine ait floresan ömrün lineer olmayan bir şekilde azaldığı ve bu azalmanın kanın ana proteinleri olan albumin ve γ -globulinlerin katlanma yapılarının açılmalarına bağlı olarak konformasyonel yapılarındaki değişimlerle ilgili olabileceği rapor edilmiştir. Buna ilaveten, reflektans spektroskopisi ile hemoglobinin türevlerinin belirlenmesi üzerinden kan lekesi yaş tayininde kan lekesinin yaşlanmasına bağlı olarak hemoglobinlerde konformasyonel değişimlerin olduğu belirtilmiştir (Bremmer *et al.* 2011). Kan leke yaşlanmasına bağlı olarak hemoglobinde oluşan yapısal değişimler UV görünür spektroskopisi kullanılarak da gösterilmiştir (Hanson and Ballantyne 2010).

Protein konformasyonlarında meydana gelen yapısal değişimleri daha detaylı incelemek amacıyla, protein konformasyonlarını oluşturan ikincil yapı komponentlerindeki değişimler analiz edilmiştir. Bu amaçla, proteinlerde ikincil yapı analizinde en çok kullanılan amit 1 bandının ikincil türevleri alınmış, ikincil türevde yer alan bantların dalga sayıları ve bu dalga sayılarına karşılık gelen ikincil yapı komponentleri belirlenmiştir. Komponentlerdeki miktarsal değişimleri belirlemek üzere sinyal şiddetleri ölçülmüştür. Pamuk kumaşa damlatılmış kan lekelerinde çalışılan süre artışına bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C’de antiparalel β plakalı tabaka ve α - heliks yapıda azalış kaydedilirken, agrega β plaka yapı ve düzensiz sarmal yapıda artış

kaydedilmiştir. Sabit sürede farklı sıcaklıklarda ise sıcaklık artışı ile birlikte β dönüş, α -heliks yapıda azalış, antiparalel β plakalı tabaka, β plakalı tabaka, agrega β plakalı tabaka ve düzensiz sarmal yapıda artış belirlenmiştir. Keten kumaşa damlatılmış kan lekelerinde ise çalışılan süre artışına bağlı olarak 10°C, 20°C, 30°C ve 40°C’de β dönüş, α -heliks yapıda azalış, agrega β plakalı tabakada artış kaydedilmiştir. Yine sabit sürede farklı sıcaklıklarda sıcaklık artışı ile birlikte β dönüş, α -heliks, β plakalı tabaka ve agrega β plakalı tabakada azalış belirlenmiştir. Hem pamuk hem de keten kumaştaki kanda gözlenen ikincil yapı komponentlerinde ki değişim, zaman ve sıcaklığa bağlı olarak kan lekelerindeki proteinlerde konformasyonel değişimlerin olduğunu ortaya koymaktadır. Proteinlerde özellikle α -heliks yapısındaki azalma ve agrega β plakalı tabaka ile düzensiz sarmal yapıdaki artış ise proteinlerde denatürasyonun olduğunu göstermektedir. Bu denatürasyon, kan lekelerinin havayla temas etmesinden dolayı kandaki temel proteinlerin katlanmış yapılarının açılması ve ikincil yapı elementlerinin α -heliksten, β -plakalı yapıya ve düzensiz sarmal yapıya dönüşmesi ile bağlantılıdır (McCutcheon *et al.* 2008). Kan lekelerinde yaşlanmaya paralel olarak hemoglobin denatürasyonunda artışa bağlı olarak beta plakalı tabaka miktarda azalma ve düzensiz sarmal yapıda artışın olduğunu raman spektroskopisi kullanılarak yaş tayinine yönelik yapılan bir çalışma ile de rapor edilmiştir (Doty *et al.* 2016). Yine reflektans spektroskopisi ile hemoglobin türevlerinin belirlenmesi üzerine kan lekesi yaş tayini ile ilgili bir çalışmada, kan lekesinin yaşlanmasına bağlı olarak oksihemoglobinin otooksidasyon sonucu methemoglobine ve methemoglobinde denatüre olarak hemikroma dönüştüğü gösterilmiştir (Bremmer *et al.* 2011). Kan lekesi yaşlanmasına bağlı olarak hemoglobinde görülen denatürasyon, pamuk ve keten kumaştaki sıcaklık ve zamana bağlı olarak kan lekeleri proteinlerinde görülen denatürasyon bulgularımızı desteklemektedir.

Kantitatif spektral analiz sonuçlarındaki değişimlere bağlı olarak, kan lekesi yaş tayininde kullanılacak metot/metotların geliştirilmesi için çoklu değişkenli analiz yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Kemometrik analiz olarak adlandırılan bu metotlar yüzlerce veri bulunan spektrumlardan, anlamlı bilgiler elde edilmesini sağlamaktadır. FTIR/reflektans spektroskopisi ile birlikte kemometrik analizlerin kan

lekesi yaş tayininde kullanılabileceği literatürde çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Li *et al.* 2011; Edelman *et al.* 2012). Bu nedenle çalışmamızda, elde edilen spektral değişimlere dayalı, farklı sıcaklıklarda ve zamanlarda kan yaş tayini yapabilmek amacıyla gözetimsiz örüntü tanımlama metotlarından hiyerarşik kümeleme (HCA) ve temel bileşen analizleri (PCA) kullanılmıştır. HCA analizleri ile elde edilen dendrogram grafikleri ile her iki kumaştaki kan lekelerinde, sabit zaman-farklı sıcaklıklarda ve sabit sıcaklık-farklı zamanlarda çalışılan grupların birbirlerinden tamamen ayrıldığı belirlenmiştir. Bu ayırımların etkinliğini test etmek amacıyla duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değerleri hesaplanmıştır. Pamuk kumaşa ait örneklerde süre artışına bağlı olarak çizilen dendrogramlarda %100 özgüllük, %83,33-100 duyarlılık ve %91,66-100 doğruluk değerleri elde edilmiştir. Sıcaklık artışına göre çizilen dendrogramlarda ise %100 özgüllük, duyarlılık ve doğruluk değerleri elde edilmiştir. Yine keten kumaşa ait örneklerde süre artışına bağlı olarak çizilen dendrogramlarda %100 özgüllük, %83,33-100 duyarlılık ve %91,66-100 doğruluk değerleri elde edilirken, sıcaklık artışına göre çizilen dendrogramlarda %66,66-100-özgüllük, %100 duyarlılık ve %66,66-100-doğruluk değerleri elde edilmiştir. Öte yandan, HCA analizlerini desteklemek amacıyla PCA analizleri uygulanmıştır. PCA analizinde elde edilen skor grafikleri, gruplar arasındaki ilişkilerin dolayısıyla gruplaşmaların olup olmadığını ortaya çıkaran grafiklerdir. Skor grafiklerine bakıldığında hem sabit sıcaklıkta-farklı sürelerde hem de sabit süre-farklı sıcaklıklarda çalışılan grupların birbirinden ayrıldığı görülmüştür. PCA analizlerinden elde edilen bu sonuçlar HCA analiz sonuçlarını desteklemektedir. Analiz sonuçlarına paralel olarak yakın kızılötesi spektroskopisi ve kısmi en küçük kareler regresyonu kullanılarak kan lekesi yaş tayinine yönelik bir çalışmada 1 aylık kan lekelerinin diğer maddelerden %100 duyarlılık ve özgüllükle ayrılabilirdiği belirtilmiştir (Edelman *et al.* 2012). Yine, hem eğitimli hem de test grubu örneklerin aynı kan leke örneği setinden alındığında 37 günlük kan leke örneklerinin %99,2 doğruluk değerinde tanımlanabildiği lineer diskriminant analizi ve görünür reflektans spektroskopisi kullanılarak gösterilmiştir (Li *et al.* 2011). Literatürde verilen özgüllük, duyarlılık ve doğruluk değerleri kemometrik analizlerden elde edilen yüksek özgüllük, duyarlılık ve doğruluk değerleri ile örtüşmektedir. Öte yandan, gruplar arasında süreye ve sıcaklığa bağlı olarak elde edilen ayırımlar, FTIR spektroskopisi ile kemometrik analiz yaklaşım metotlarının

kumaşlardaki kan lekelerinin yaş tayininde etkin olarak kullanılabilme potansiyelini göstermektedir. Bununla birlikte, elde edilen bu ayırımların kan leke yaş tayinindeki etkinliklerini doğrulamak için daha fazla sayıda kan lekesi spektrumlarına gözetimli örüntü tanımlama metotlarını uygulamak gerekir. Bu analizler, test/kör örneklerin doğru olarak hangi sınıflarda/gruplarda yer aldığının belirlenmesini sağlar.

Çalışmamızda kullanılan metotlarla diğer konvansiyonel tanı yöntemlerine göre daha yüksek duyarlılık, özgüllük ve doğruluk değeri elde edilmiştir. Literatürde belirtildiği gibi kan yaş tayininde kullanılan konvansiyonel yöntemlerin özgüllüğü, hassasiyeti ve doğruluğu oldukça değişkenlik göstermektedir. Aynı zamanda bu yöntemler invaziv, kullanıcıya bağımlı, yüksek maliyetli, örnek analizi uzun zaman gerektiren metotlardır. Konvansiyonel yöntemlere kıyasla, FTIR spektroskopisi invaziv olamayan, kullanıcıdan bağımsız ve örnek hazırlığı gerektirmeyen oldukça avantajlı bir yöntemdir. Bu avantajlarından dolayı FTIR spektroskopisinin taşınabilir tipte olanları olay yerinde kan lekesi yaş tayininde kullanılabilir.

Çalışmamızda FTIR spektroskopisine ilave olarak, sıcaklık ve zamana bağlı olarak kan leke örneklerinden elde edilen DNA'ların jel elektroforezi ile kalitesine de bakılmıştır. Çünkü olay yerinde karşılaşılan kan lekelerinden DNA elde edilmesi, zanlıların tanımlanması veya kimliklendirilmesi açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. Çalışma kapsamında farklı sıcaklıklar (10°C, 20°C, 30°C ve 40°C) ve sürelerle (24, 48 ve 72 saat) maruz bırakılan pamuk ve keten kumaşa damlatılmış kan lekelerinden DNA izole edilmiş ve elde edilen DNA'ların kalitesine agaroz jel elektroforezinde bakılmıştır. Sıcaklık ve zamana bağlı olarak tüm gruplara ait örneklerden DNA bozunuma uğramadan izole edilebilmiştir. Intorasoot *et al.* (2013) ise 1, 7, 14, 21, 28 ve 56 günlük kuru kan lekelerinde DNA izole etmiş ve 28 güne kadar kuru kan lekelerindeki DNA kalitesinde herhangi bir kayıp olmadığını, bu günden sonra elde edilen DNA miktarında kayıplar ve bozunmalar meydana geldiğini belirtmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Akyuz, S., 2015. "Yoğunluk Fonksiyon Teorisi Yardımı ile 5-[2-(TRİFLUOROMETHYL)PHENYL]Furfural Molekülünün FT-IR, FT-Raman, UV ve NMR Hesaplamalarının DeneySEL ve TeorİK Çalışmaları, Yüksek lisans tezi, fizik anabilim dalı." 2-65.
- Albayrak, G., 2010. "Arkea ve Bakteria İdentifikasyonunda FT-IR (Fourier Transforminfrared Spektroskopisi) Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı." 23-42.
- Altınışık, M., 2004. "Spektroskopi Analiz Yöntemleri, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/45-uzm-02.pdf>." 1-20.
- Andrasko, J., 1997. "The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis." Journal of Forensic Science **42**(4): 601-607.
- Anonymous, 2016a. http://www.acikders.org.tr/pluginfile.php/1108/mod_resource/content/0/konu11.pdf (2016).
- Anonymous, 2016b. <http://www.bio.w-hs.de/OFC/FTIR.aspx> (2007). "Fourier-dönüştürülmüş kızılötesi spektroskopi. Yüzey Kimya FB 12 Laboratuvar, <http://www.bio.w-hs.de/OFC/FTIR.aspx> (02.12.2016).".
- Anonymous, 2016c. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Spektroskopi> (2016).
- Baranowski Pearl, M. R., H. Brooke, J. N. McCutcheon, S. L. Morgan and M. Myrick L., 2011. "Coating effects on mid-infrared reflection spectra of fabrics." Appl Spectrosc **65**(8): 876-884.
- Beekes, M., P. Lasch and Naumann, D., 2007. "Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research." Vet Microbiol **123**(4): 305-319.
- Boyar, H., F. Zorlu, M. Mut and Severcan, F., 2004. "The effects of chronic hypoperfusion on rat cranial bone mineral and organic matrix. A Fourier transform infrared spectroscopy study." Anal Bioanal Chem **379**(3): 433-438.
- Bozkurt, O., M. D. Bilgin and Severcan, F., 2007. "The Effect of Diabetes Mellitus on Rat Skeletal Extensor Digitorum Longus Muscle Tissue: An FTIR Study, Spectroscopy An Int. J." **21**(3): 151-160.
- Bozkurt, O., M. Severcan and Severcan, F., 2010. "Diabetes induces compositional, structural and functional alterations on rat skeletal soleus muscle revealed by FTIR spectroscopy: a comparative study with EDL muscle." Analyst **135**(12): 3110-3119.
- Bremmer, R. H., A. Nadort, T. G. Van Leeuwen, M. J. Van Gemert and Aalders, M. C., 2011. "Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy." Forensic science international **206**(1): 166-171.
- Brooke, H., M. R. Baranowski, J. N. McCutcheon, S. L. Morgan and Myrick, M. L. 2010. "Multimode imaging in the thermal infrared for chemical contrast enhancement. Part 3: Visualizing blood on fabrics." Anal Chem **82**(20): 8427-8431.
- Cakmak, G., S. Bolukbasi, A. Simsek, O. Erdem, G. Yilmaz and Senkoylu, A., 2006. "Effect of synthetic cell-binding peptide on the healing of cortical segmental bone defects." Saudi Med J **27**(6): 777-780.

- Cakmak, G., I. Togan and Severcan, F., 2006. "17Beta-estradiol induced compositional, structural and functional changes in rainbow trout liver, revealed by FT-IR spectroscopy: a comparative study with nonylphenol." *Aquat Toxicol* **77**(1): 53-63.
- Cakmak, G., F. Zorlu, M. Severcan and Severcan, F., 2011. "Screening of protective effect of amifostine on radiation-induced structural and functional variations in rat liver microsomal membranes by FT-IR spectroscopy." *Anal Chem* **83**(7): 2438-2444.
- Chalmers, J. M., H. G. M. Edwards and Hargreaves, M. D., 2012. "Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science, A John & Sons, Ltd., Publication."
- Cho, L., J. A. Reffner, B. M. Gatewood and Wetzel, D. L., 2001. "Single fiber analysis by internal reflection infrared microspectroscopy." *J Forensic Sci* **46**(6): 1309-1314.
- De Wael, K., L. Lepot, F. Gason and Gilbert, B., 2008. "In search of blood--detection of minute particles using spectroscopic methods." *Forensic Sci Int* **180**(1): 37-42.
- DeJong, S. A., Z. Lu, B. M. Cassidy, W. L. O'Brien, S. L. Morgan and Myrick, M. L., 2015. "Detection limits for blood on four fabric types using infrared diffuse reflection spectroscopy in mid- and near-infrared spectral windows." *Anal Chem* **87**(17): 8740-8747.
- Diem, M., S. Boydston-White and Chiriboga, L., 1999. "Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject. *Applied Spectroscopy* " **53**: 148-161.
- Dogan, A., K. Ergen, F. Budak and Severcan, F., 2007. "Evaluation of disseminated candidiasis on an experimental animal model: a fourier transform infrared study." *Appl Spectrosc* **61**(2): 199-203.
- Dogan, A., G. Siyakus and Severcan, F., 2007. "FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Food Chemistry*." **100**: 1106-1114.
- Doty, K. C., G. McLaughlin and Lednev, I. K., 2016. "A Raman "spectroscopic clock" for bloodstain age determination: the first week after deposition." *Analytical and bioanalytical chemistry* **408**(15): 3993-4001.
- Edelman, G., V. Manti, S. M. van Ruth, T. van Leeuwen and Aalders, M., 2012. "Identification and age estimation of blood stains on colored backgrounds by near infrared spectroscopy." *Forensic Sci Int* **220**(1-3): 239-244.
- Friedrich, F. and Weidler, P. G., 2010. "Contact pressure effects on vibrational bands of kaolinite during infrared spectroscopic measurements in a diamond attenuated total reflection cell." *Appl Spectrosc* **64**(5): 500-506.
- Garip, S., A. C. Gozen and Severcan, F., 2009. "Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates, *Food Chemistry*." **113**(4): 1301-1307.
- Gazi, E., M. Baker, J. Dwyer, N. P. Lockyer, P. Gardner, J. H. Shanks, R. S. Reeve, C. A. Hart, N. W. Clarke and Brown, M. D., 2006. "A correlation of FTIR spectra derived from prostate cancer biopsies with gleason grade and tumour stage." *Eur Urol* **50**(4): 750-760; discussion 760-751.
- George, W. O. and McIntyre, P. S., 1990. "Infrared spectroscopy, John Willey and Sons, London-England, ISBN: 0471913820."
- Guo, K., S. Achilefu and Berezin, M. Y., 2012. "Dating bloodstains with fluorescence lifetime measurements." *Chemistry* **18**(5): 1303-1305.

- Hanson, E. K. and Ballantyne, J., 2010. "A blue spectral shift of the hemoglobin sores band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains." *PLoS One* 5(9): e12830.
- Haris, P. and Severcan, F., 1999. "FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media, J. Molecular Catalysis: B (Enzymatic), " 7: 207-221.
- Hollas, J. M., 2004. "Modern Spectroscopy, John Wiley & Sons Ltd, England, ." 252.
- Inoue, H., F. Takabe, M. Iwasa, Y. Maeno and Y. Seko (1992). "A new marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography." *Forensic Sci Int* 57(1): 17-27.
- Intorasoot, S., J. Techateerawat and Intorasoot, A., 2013. "Genomic DNA Isolation from Dried Blood Using Gelatin-Coated Magnetic Particles. Current Science, 105 (1), 81-84."
- Joode, M., 2010. "Aging Bloodstain Investigation: Biochemical and Spectrophotometric Analysis on Haemoglobin Kinetics. ."
- Kansiz, M., P. Heraud, B. Wood, F. Burden, J. Beardall and McNaughton, D., 1999. ""Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains", *Phytochemistry*." 52: 407-417.
- Karakus, O., 2013. "Kriminalistik, Adalet Yayinevi, Ankara." 234-243.
- Kendal, D. N., 1966). "*Applied Infrared Spectroscopy*, Reinhold Publishing Co., New York."
- Kirschner, C., K. Maquelin, P. Pina, N. A. Ngo Thi, L. P. Choo-Smith, G. D. Sockalingum, C. Sandt, D. Ami, F. Orsini, S. M. Doglia, P. Allouch, M. Mainfait, G. J. Puppels and Naumann, D., 2001. "Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study." *J Clin Microbiol* 39(5): 1763-1770.
- Koulis, C. V., J. A. Reffner and Bibby, A. M., 2001. "Comparison of transmission and internal reflection infrared spectra of cocaine." *J Forensic Sci* 46(4): 822-829.
- Li, B., P. Beveridge, W. T. O'Hare and Islam, M., 2011. "The estimation of the age of a blood stain using reflectance spectroscopy with a microspectrophotometer, spectral pre-processing and linear discriminant analysis." *Forensic Sci Int* 212(1-3): 198-204.
- Li, B., P. Beveridge, W. T. O'Hare and Islam, M., 2013. "The age estimation of blood stains up to 30 days old using visible wavelength hyperspectral image analysis and linear discriminant analysis." *Sci Justice* 53(3): 270-277.
- Lu, Z., 2015. "Applications of Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Forensic Analysis. College of Arts and Sciences University of South Carolina." 2-80.
- McCutcheon, J. N., A. R. Trimboli, S. L. Morgan and Myrick, M., 2008. "Estimation of Bloodstain Age on Polymer Substrates by Diffuse Reflectance Infrared Spectroscopy (DRIFTS). The 60th Southeastern Regional Meeting (SERMACS)."
- Nilsson, M. R., 2004. "Techniques to study amyloid fibril formation in vitro." *Methods* 34(1): 151-160.
- Orphanou, C. M., 2015. "A Bioanalytical Approach To Forensic Body Fluid Identification & Age Determination, Staffordshire University, Degree of Doctor of Philosophy in the subject of Forensic & Crime Science, Thesis." 2-277.

- Orphanou, C. M., L. Walton-Williams, H. Mountain and Cassella, J., 2015. "The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy." *Forensic Sci Int* **252**: e10-16.
- Ozdemir, D., 2009. "II. Kemometri Yaz Okulu Ders Notları."
- Ozek, N. S., 2015. "Characterization Of Molecular-Level Changes Due To Microrna-125b Expression In Breast Cancer Cells By Spectroscopic And Chemometric Analysis Techniques, A Thesis Submitted To The Graduate School Of Natural And Applied Sciences Of Middle East Technical University." 26-31.
- Ozek, N. S., Y. Sara, R. Onur and Severcan, F., 2009. "Low dose Simvastatin induces compositional structural and dynamical changes on rat skeletal extensor digitorum longus muscle tissue, *Bioscience Reports*." **6**; **30(1)**: 41-50.
- Ozek, N. S., S. Tuna, A. E. Erson-Bensan and Severcan, F., 2010. "Characterization of microRNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy." *Analyst* **135(12)**: 3094-3102.
- Rajamannar, K., 1977. "Determination of the age of bloodstains using immunoelectrophoresis. *J Forensic Sci*. 22(1)." 159-164.
- Sakarya, H., 2015. "Yoğunluk Fonksiyon Teorisi Yardımı İle 2,2'-Ethylenedianiline Molekülünün FT-IR, FT-Raman ve NMR Hesaplamalarının Deneysel ve Teorik Çalışmaları." 1-93.
- Severcan, F., G. Gorgulu, T. S. Gorgulu and Guray, T., 2005a. "Rapid monitoring of Diabetes-Induced Lipid peroxidation by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Analytical Biochemistry*." **339**: 36-40.
- Severcan, F., N. Kaptan and Turan, B., 2003. "FTIR spectroscopic investigation of diabetic rat heart crude membranes, *Spectroscopy, an Int J*." **17**: 569-577.
- Severcan, F., M. Severcan and Banerjee, S., 2011. "İnbred Obez Fare Modellerindeki Değişik Adipoz Dokuların Yapı, Fonksiyon ve İçeriğinin Karakterizasyonu, Proje No: SBAG BM0901-40 (110S235)."
- Severcan, F., N. Toyran, N. Kaptan and Turan, B., 2000. "Fourier transform infrared study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the CH region." *Talanta* **53(1)**: 55-59.
- Severcan, M., P. I. Haris and Severcan, F., 2004. "Using artificially generated spectral data to improve protein secondary structure prediction from Fourier transform infrared spectra of proteins." *Anal Biochem* **332(2)**: 238-244.
- Strasser, S., A. Zink, G. Kada, P. Hinterdorfer, O. Peschel, W. M. Heckl, A. G. Nerlich and Thalhammer, S., 2007. "Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy." *Forensic Sci Int* **170(1)**: 8-14.
- Stuart, B., 1997. "Biological applications of infrared spectroscopy,, Wiley, UK."
- Sümerbas, K., 2014. "Kan Lekesinin Yaş Tayininde Şeker Faktörünün Etkisinin Spektral Olarak Belirlenmesi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Fizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi." 1-68.
- Szykuła, K., 2016. "Age determination of body fluids by mass spectrometry. Master Thesis. Analytical Chemistry Group van' t Hoff Institute for Molecular Sciences." 4-34.
- Toyran, N., P. Lasch, D. Naumann, B. Turan and Severcan, F., 2006. "Early alterations in myocardia and vessels of the diabetic rat heart: an FTIR microspectroscopic study." *Biochem J* **397(3)**: 427-436.

- Wang, L. and Mizaikoff, B., 2008. "Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy." Anal Bioanal Chem **391**(5): 1641-1654.
- Wang, T. D., G. Triadafilopoulos, J. M. Crawford, L. R. Dixon, T. Bhandari, P. Sahbaie, S. Friedland, R. Soetikno and Contag, C. H., 2007. "Detection of endogenous biomolecules in Barrett's esophagus by Fourier transform infrared spectroscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15864-15869.
- Yıldız, A. and Genc, Ö., 1993. "Enstrümental Analiz, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara."
- Zapata, F., M. A. de la Ossa and Garcia-Ruiz, C., 2016. "Differentiation of Body Fluid Stains on Fabrics Using External Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Chemometrics." Appl Spectrosc **70**(4): 654-665.
- Zapata, F., F. A. M. Ossa and García-Ruiz, C., 2015. "Emerging spectrometric techniques for the forensic analysis of body fluids. Trends in Analytical Chemistry." **64**: 53-63.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında Çorum ilinde doğdu. İlkokul ve ortaokulu Çorum Albayrak İlköğretim okulu, lise öğrenimini Çorum Merkez Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2010 yılında girmiş olduğu Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü 2014 yılında bitirdi. 2014 yılı güz döneminde Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans öğrenimine başladı. 2015 yılı bahar döneminde Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Kriminalistik Anabilim Dalı tezli yüksek lisans öğrenimine başladı. Her iki anabilim dalında tezli yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.