

T. C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

DANIŞMAN: PROF. DR. SALİH CENGİZ

**ÇEŞİTLİ KALEM MÜREKKEPLERİNİN FİZİKSEL, KİMYASAL VE BİYOLOJİK
KOŞULLARDA MOLEKÜLER DÖNÜŞÜMLERİNİN İNCELENMESİ**

FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

FATMA ÇAVUŞ YONAR

İSTANBUL, 2018

T. C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ

DANIŞMAN: PROF. DR. SALİH CENGİZ

ÇEŞİTLİ KALEM MÜREKKEPLERİNİN FİZİKSEL, KİMYASAL VE BİYOLOJİK
KOŞULLARDA MOLEKÜLER DÖNÜŞÜMLERİNİN İNCELENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

FATMA ÇAVUŞ YONAR

İSTANBUL, 2018

İstanbul, 06 Kasım 2018

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA**

Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin 50. maddesi uyarınca Enstitünüz Fen Bilimleri Anabilim Dalı'nın doktora öğrencisi Fatma ÇAVUŞ YONAR'ın,

"Çeşitli Kalem Mürekkeplerinin Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Koşullarda Moleküler Dönüşümlerinin İncelenmesi"

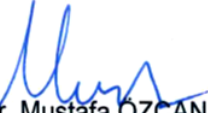
Adlı tezi jürimizce tetkik edilmiş ve kendisine tez savunması yaptırılmıştır.

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



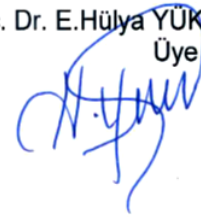
Prof. Dr. H.Bülent ÜNER
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Salih CENGİZ
Danışman



Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Üye

Doç. Dr. E.Hülya YÜKSELOĞLU
Üye



Dr. Öğ. Üyesi İtir ERKAN
Üye





Eşim Halil YONAR'a,

TEZ BİLDİRİMİ

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Çeşitli Kalem Mürekkeplerinin Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Koşullarda Moleküler Dönüşümlerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışmanın fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan tüm deneysel çalışma tarafımda yapılmış olup, bilimsel ahlak, etik değerlere ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan tüm cümleler ve yorumlar bana aittir, tarafıma ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapılmıştır.

Yukarıda yer alan hususların doğruluğunu beyan ederim.

Fatma ÇAVUŞ YONAR

Ekim 2018

ÖNSÖZ

Çalışmamı gerçekleştirmeme izin ve destek veren, bünyesinde çalışmaktan onur duyduğum, İstanbul Üniversitesi–Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitü Müdürüm Sayın Prof. Dr. Faruk AŞICIOĞLU’na,

Akademik hayatımın başından beri bana yol gösteren, çalışmamı hevesle ortaya çıkarabilme şansı veren ve deneysel basamakları İstanbul Üniversitesi–Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü Laboratuvarları’nda yapmama olanak sağlayan İ.Ü. Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı hocam Prof. Dr. Münevver Açikkol’a,

Öncelikle böyle bir çalışmanın ortaya çıkmasında en büyük pay sahibi olan, sabırla bana yol gösteren, engin bilgisi ve deneyimi ile karşılaştığım sorunlara her zaman hızlı ve pratik fikirler üretmiş olan, çeşitli zorluklarda getirdiğim çözümlere olumlu yaklaşımlarıyla destek olan, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Salih Cengiz’e,

İmkânları, anlayışı ve mânevi desteği ile beni ilgi ile takip eden, çalışmamın genetik analizlerini sorumlusu olduğu laboratuvarında yapmama olanak tanıyan, verdiği destekten dolayı beni yüreklendiren, kendisiyle çalışmaya doyamadığım kıymetli hocam Doç. Dr. Emel Hülya YÜKSELOĞLU’na,

Çalışma hayatımda ve bilimsel hayatta pek çok tecrübe edinmemi sağlayan, çalışmamın mikrobiyolojik kısmının yürütülmesi esnasında laboratuvarının olanaklarından faydalanmama imkan tanıyan değerli hocam Doç. Dr. Hüseyin ÇAKAN’a,

Çalışmamın başından beri değerli yorumlarını ve katkılarını benden esirgemeyerek desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Bülent Üner ve Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN’a,

Akademik hayatıma çalışma anlayışı ve bilgisiyle ışık tutan, her daim bilgisini cömertçe paylaşan ve tüm bilimsel faaliyetlerimde desteğini gördüğüm, özellikle çalışmamın MALDI-TOF-MS cihazı bulgularının değerlendirilmesi sırasında tecrübelerini ve yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Beril ANILANMERT’e,

Çalışmama yön verirken Acıbadem Sağlık Grubu bünyesindeki Acıbadem Üniversitesi Labmed Tıbbi Laboratuvarının kapılarını sonuna kadar açan dönemin müdürü Prof. Dr.

İbrahim ÜNSAL'a, ARGE Laboratuvarı Sorumlusu Doç. Dr. Ahmet Tarık Baykal' a ve MALDI-TOF-MS Sistem sorumlusu Arş. Gör. Emel AKGÜN'e,

Çalışmamın uzun ve yorucu genetik ve mikrobiyoloji laboratuvar aşamalarında sınırsız yardım ve desteğini gördüğüm, çalışmaya fikir ve önerileri ile katkıda bulunan, tüm enerji ve samimiyeti ile her zaman yanımda olan Gülten RAYİMOĞLU'na,

Çalışmada kullanmış olduğum mikroorganizmaların standart suşlarının temininde yardımcı olan İstanbul Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Doç. Dr. Dilek ŞATANA ve Mikrobiyoloji Tüberküloz Laboratuvarı'ndan Dr. Gonca Erköse Genç'e,

Çalışmamın MALDI-TOF-MS cihaz bulgularının değerlendirilmesinde bilgisayar yazılımından faydalanmam konusunda bana değerli zamanlarını ayırıp teknik anlamda Almanya'dan destek veren MALDI-TOF-MS sistemi aplikasyon uzmanı Dr. Volker Sauerland'a,

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve önerileriyle beni yönlendirerek, çalışmama sağladıkları özverili katkılardan ötürü kimyager Dr. Özge KURT ve Ferit MEMİŞ'e,

Çalışmam sırasında aktif olarak maddî ve manevî desteklerini gördüğüm değerli arkadaşlarım Öğr. Gör. Ömer Karataş'a ve Murat Öğüdür'e,

Samimi sözleriyle ve verdikleri manevi destekle beni her zaman cesaretlendiren çalışma arkadaşlarım Arş.Gör. Dr. Dilek SALKIM İŞLEK, Arş.Gör. Ayşegül ŞEN YILMAZ, Arş.Gör. Sharon Sibel Ramadanoğlu ve Arş.Gör. Afranur ATEŞ'e,

Güler yüzü, pozitif enerjisi ve her türlü yardımları için Anabilim Dalı Sekreteri Elvan Emral UĞUR'a,

Hoşgörülerini ve verdikleri desteklerden dolayı İ.Ü.C Adli Tıp Enstitüsü bünyesinde çalışan herkese,

Farkında olarak ya da olmayarak çalışmama önemli katkılarda bulunan ismini sayamadığım pek çok insana ve ACIBADEM LAB MED'in değerli çalışanlarına,

Hayatın her alanında sonsuz olanaklar sağlayıp, yardım ve desteklerini esirgemeyerek bugünlere ulaşmamı sağlayan, verdikleri güvenle her zaman yanımda olan Annem, Babam ve tüm aileme,

Kendisine ayırmam gereken zamandan çalarak tamamladığım akademik eğitimim süresince maddi ve manevi desteğiyle sürekli yanımda olan, doktora çalışmamı adım adım takip ederek “bittim” dediğim yerde “yettim” diyen en büyük destekçim Eşim Halil YONAR’a,

Kıymetli destekleri nedeniyle, saygı ve minnetlerimi arz ederim.

Fatma ÇAVUŞ YONAR

İstanbul, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİL DİZİNİ	xix
TABLO DİZİNİ	xxviii
KISALTMALAR	xxxii
ÖZET	xxxvi
SUMMARY	xxxix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Belgenin Tanımı ve Adli Belge İnceleme	4
2.2. Belgeyi Oluşturan Öğeler	5
2.2.1. Kağıt	5
2.2.1.1. Kağıdın Tarihçesi	5
2.2.1.2. Kağıdın Kimyasal ve Fiziksel Yapısı	6
2.2.2. Yazı Yazma Aracı Olarak Kalem	7
2.2.2.1. Tükenmez Kalemlerin Yapısı	8
2.2.3. Mürekkep	9
2.2.3.1. Tükenmez Kalem Mürekkebinin Yapısı ve Bileşenleri	10
2.2.3.1.1. Boyar Maddeler ve Pigmentler	10
2.2.3.1.2. Çözücüler	12
2.2.3.1.3. Reçineler	13
2.2.3.1.4. Diğer Katkı Maddeleri	13
2.3. Adli Belge İnceleme Açısından Mürekkep Analizi	14
2.3.1. Mürekkep Boyar Maddelerinin (Pigmentlerin) Solması	15
2.3.2. Çözücünün Buharlaşması	16
2.3.3. Reçinelerin Polimerleşmesi ve Sertleşmesi	17
2.3.4. Markerların (İşaretlerin) Analizi	17
2.4. Yazının Oluşturulduğu Zamanın Tespitinde Mürekkep Yapı Tayinin Kullanımı	18
2.5. Belge İncelemede Mürekkep Analizinde Kullanılan Analitik Yöntemler	20
2.5.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	21

2.5.2. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)	21
2.5.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)	23
2.5.4. Kapiler Elektrophorez Yöntemi (CE)	24
2.5.5. İnfrared Spektroskopisi Yöntemi	24
2.5.6. Raman Spektroskopisi	25
2.5.7. Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu-Kütle Spektrometresi LDI-MS	25
2.5.8. Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF-MS)	26
2.6. Adli Genetik ve DNA	29
2.7. Adli Bilimlerde Genetik Markırların Kullanımı	31
2.8. Adli Belge İncelemelerinde DNA' nın ve DNA Teknolojilerinin Kullanımı	33
2.8.1. Temas İzi ve DNA	34
2.8.2. Eser Miktarı (Degrede) DNA İçeren Biyolojik Örneklerle Yaklaşımlar	35
2.9. DNA Miktar Tayini Yöntemleri	37
2.10. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	37
2.10.1. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti	38
2.10.2. AmpFISTR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon Kiti	40
2.10.3. AmpFISTR® Globalfiler™ PCR Amplifikasyon Kiti	42
2.11. Elektrophorez	43
2.12. Belgelerin Saklandığı Ortamlarda Görülen Bozulmalar ve Nedenleri	46
2.12.1. Biyolojik Risk Faktörleri	46
2.12.1.1. Mikroorganizmalar	46
2.12.1.2. Böcekler ve Kemiriciler	48
2.12.2. Kimyasal Risk Faktörleri	48
2.12.3. Fiziksel Risk Faktörleri	49
2.13. Kağıttan Mikroorganizma Örneği Alınması ve Mikroorganizmaları Tanımlama Yöntemleri	50
2.14. Besiyerleri	50
2.15. Mikroorganizmaların Tanımlanması ve Mikrobiyal Üremenin Ölçülmesi	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM	52

3.1.Çalışmanın Genetik İnceleme Aşaması	53
3.1.1. Genetik İnceleme Çalışmalarında Kullanılan Gereçler	53
3.1.2. Genetik İnceleme Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Madde ve Kitler	54
3.1.3. Çalışmanın Genetik İnceleme Basamağının Laboratuvar Aşaması	55
3.1.4. Dokunma Yolu İle Belge Yüzeyine Epitel Hücrelerin Transferi	57
3.1.5. Transfer Edilen Epitel Hücrelerin Toplanması	57
3.1.6. Epitel Hücrelerden DNA Elde Edebilmek İçin DNA İzolasyonu Yöntem Optimizasyonu	60
3.1.6.1. Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü [197]	60
3.1.6.2. Modifiye Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü	61
3.1.7. Ağız İçi Sürüntü Örneklerinden DNA İzolasyonu	63
3.1.8. Su Altı Agaroze Jel Elektrophorezi	64
3.1.9. DNA İzolatlarının PCR Öncesi Saflaştırılması	66
3.1.10. Elde edilen DNA'nın Miktarının Belirlenmesi	66
3.1.11. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	67
3.1.11.1. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kit Protokolü	68
3.1.11.2. AmpFISTR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon Kit Protokolü	69
3.1.11.3. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kit Protokolü	70
3.1.12. PCR Ürünlerinin Elektrophoreze Hazırlanması	71
3.1.12.1. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti ve AmpFISTR® Identifiler™ PCR Kiti Kullanılarak Çoğaltılan Ürünlerin Elektrophoreze Hazırlanması	71
3.1.12.2. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti Kullanılarak Çoğaltılan Ürünlerin Elektrophoreze Hazırlanması	72
3.1.13. PCR Ürünlerinin ABI 3130 İle Elektrophorezi	72
3.1.14. Verilerin Analizi Ve Sonuçların Değerlendirilmesi	73
3.1.15. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması	76
3.2. Çalışmanın Mikrobiyolojik İnceleme Aşaması	77
3.2.1. Mikrobiyolojik İnceleme Çalışmalarında Kullanılan Gereçler	77
3.2.2. Mikrobiyolojik İnceleme Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal ve	78

Sarf Malzemeler	
3.2.3. Mikrobiyolojik İnceleme Çalışmalarında Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması	78
3.2.3.1. Tryptic Soy Broth (TSB, Jelöz Agar, Adi Agar) Hazırlanışı	78
3.2.3.2. Malt Ekstrakt Agar (ME, Maya-küf Agar) Hazırlanışı	79
3.2.3.3. Kanlı Agar Hazırlanışı	79
3.2.4. Çalışılacak Mikroorganizmaların Belirlenmesi için Arşiv Ortamının ve Arşiv Ortamında Bulunan Belgelerin Kültür Ortamında Mikrobiyal İncelenmesi	79
3.2.5. Üreyen Kolonilerin İdentifikasyonu	80
3.2.6. Tükenmez Kalem Mürekkepleri ve Mikrobiyal Üreme	81
3.2.6.1. Mürekkep Örneklerinin Ekimi	82
3.2.6.2. Mikroorganizma Suşlarının Pasajlanması İle Kontamine Edilmiş Besiyerlerine İnkbiyogramların Ekimi	82
3.2.6.2.1. Mürekkep-Kağıt Disklerinin Oluşturulması	82
3.2.6.2.2. 0.5 McFarland Hazırlanışı	82
3.2.6.2.3. İnkbiyogram Disklerinin Oluşturulması	83
3.2.6.2.4. Mürekkep Boyar Maddelerinin Mikrobiyal Üremeye Etkisinin İncelenmesi	84
3.2.6.2.5. Farklı Hacimde Mürekkep İçeren Disklerin, İnhibasyon Zonlarına Etkisinin Araştırılması	85
3.2.6.2.6. Zamanın İnhibasyon Zonlarına Etkisinin Araştırılması	86
3.2.6.2.7. Kontamine Edilmiş Kağıt-Mürekkep Disklerinin İçerisindeki Mürekkep Boyar Maddelerinin Moleküler Dönüşümüne Zamanın Etkisi	87
3.3.Çalışmanın Mürekkep Boyar Maddelerinin Moleküler Değişimlerini İnceleme Aşaması	88
3.3.1. Mürekkep Boyar Maddelerinin Moleküler Değişimlerinin İncelenmesi Çalışmalarında Kullanılan Gereçler	88
3.3.2. Mürekkep Boyar Maddelerinin Moleküler Değişimlerinin İncelenmesi	89
3.3.3.Kalem Ve Kağıt Numuneleri	89

3.3.4. Standart Çözeltilerin ve Analiz Örneklerinin Hazırlanması	90
3.3.4.1. PR, MV, CV, VB Çözeltilerinin ve Analiz Örneklerinin Hazırlanması	90
3.3.4.2. Tükenmez Kalem Mürekkep Örneklerinin Analize Hazırlanması	91
3.3.5. MALDI-TOF-MS Cihazının Örnek Yükleme Plakasının (Target) Temizlik Prosedürü	92
3.3.6. Yöntemin MALDI-TOF-MS Cihazına Uyarlanması ve Optimizasyonu	92
3.3.6.1. İyon Kaynağı (Ion Source) Değerinin Belirlenmesi	92
3.3.6.2. Lazer Pulsu İyon Ekstraksiyonu (Pulsed Ion Extraction) Belirlenmesi	93
3.3.6.3. Örnekleme Hızı ve Sayısallaştırıcı Ayarının (Sample Rate And Digitizer Settings) Belirlenmesi	93
3.3.6.4. Reflektör Değerinin Belirlenmesi	93
3.3.6.5. Lazer Atım Hızının Belirlenmesi	94
3.3.6.6. Dedektör Voltajının Belirlenmesi	94
3.3.6.7. Atış (Shot) Frekansının Belirlenmesi	94
3.3.6.8. Lazer Enerjisinin Belirlenmesi	94
3.3.7. Optimizasyon Sonrası Işık Etkisi İle Yapay Solan Örneklerin Analizi	95
3.3.8. Doğal Solmanın Gerçekleştiği Arşiv Belgelerinden Alınan Örneklerin Analizi	95
4.BULGULAR	96
4.1. Genetik Çalışma Bulguları	96
4.1.1. DNA İzolasyonundan Elde Edilen İzolatlara Ait DNA Bulguları ve Miktarları	97
4.1.2. Üç Farklı STR Kiti Kullanımı ile Elde Edilen Bulgular ve STR Profilleri	102
4.1.3. Gerçek Örnek Bulguları	112
4.2. Mikrobiyolojik Çalışma Bulguları	121
4.2.1. Üreyen Kolonilerin İdentifikasyonu	121
4.2.2. Tükenmez Kalem Mürekkeplerinde Mikrobiyal Üremenin Etkisinin	123

İncelenmesi	
4.2.3. Mikroorganizma Suşları İle Kontamine Edilmiş Besiyerlerine Ekilen İnkbiyogramlarda Gözlenen Mikrobiyal Üreme	126
4.3. Mürekkep Boyar Maddelerinin Moleküler Değişimlerinin İncelenmesi	134
4.3.1. MALDI-TOF-MS Cihazında Yöntem Geliştirilmesi ve Optimizasyonu	135
4.3.1.1. İyon Kaynağı (Ion Source) Değeri	136
4.3.1.2. Lazer Pulsu İyon Ekstraksiyonu (Pulsed Ion Extraction)	137
4.3.1.3. Örnekleme Hızı ve Sayısallaştırıcı Ayarı (Sample rate and digitizer settings)	138
4.3.1.4. Reflektör Değeri	139
4.3.1.5. Lazer Atım Hızı	140
4.3.1.6. Dedektör Voltajı	141
4.3.1.7. Atış (Shot) Frekansı	142
4.3.1.8. Zamana Bağlı Solmada Ayrım Aralığının En İyi Görüldüğü Lazer Enerjisinin Belirlenmesi	142
4.3.2. Optimizasyon Sonrası Işık Etkisi İle Yapay Soldurulan Örneklerin Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	144
4.3.3. Farklı Kağıt Türleri Üzerinde Bulunan Farklı Mürekkep Türleri İçerisindeki Boyar Maddelerin Zamana Bağlı Değişimlerinin ANOVA Analizi İle Karşılaştırılması	167
4.3.4. Doğal Solmanın Gerçekleştiği Belgelerde CV, MV, PR ve VB Değerleri; Geliştirilen Yöntemin Uygulanabilirliği	173
5.TARTIŞMA	190
6. SONUÇ	212
7. KAYNAKLAR	214
8.EKLER	232
Ek-1. Bilgilendirmiş Onam Formu Örneği	232
Ek-2. İnce (K1) ve Kalın (K2) A4 Kağıdı üzerindeki bazı mürekkep ve mürekkep pigmentlerinin MALDI-TOF-MS Cihazındaki Lazer Vuruşu Esnasındaki Analiz Görüntüsü	233

Ek-3. <i>S. aureus</i> ile kontamine edilerek 0 ve 6 ay bekletilmiş mürekkep örnekleri içerisindeki boyar maddelerden olan antimikrobiyal koruyucu etkiye sahip MV' nin (a) ve antimikrobiyal etkili olmasa da yine bir boyar özelliğe sahip CV'nin (b) toplam piklere göre oranlarının, ölçülen inhibisyon zon çapları ile karşılaştırılması	234
Ek-4. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış pararosanilin (PR) standardının 0. zamandaki spektrumu	235
Ek-5. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış pararosanilin (PR) standardının 0. zamandaki spektrumu	235
Ek-6. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış metil viyole (MV) standardının 0. zamandaki spektrumu	236
Ek-7. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış metil viyole (MV) standardının 0. zamandaki spektrumu	236
Ek-8. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış kristal viyole (CV) standardının 0. zamandaki spektrumu	237
Ek-9. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış kristal viyole (CV) standardının 0. zamandaki spektrumu	237
Ek-10. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış viktorya mavisi (VB) standardının 0. zamandaki spektrumu	238
Ek-11. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış viktorya mavisi (VB) standardının 0. zamandaki spektrumu	238
Ek-12. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış <i>Faber Castell FDx10</i> marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M1) 0. zamandaki spektrumu	239
Ek-13. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış <i>Faber Castell FDx10</i> marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M1) 0. zamandaki spektrumu	239
Ek-14. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış <i>Schneider Slider Edge XB</i> marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M2) 0. zamandaki spektrumu	240
Ek-15. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış <i>Schneider Slider Edge XB</i> marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M2) 0. zamandaki spektrumu	240

Ek-16. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış <i>Pensan MV-Pen Vision</i> marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M3) 0. zamandaki spektrumu	241
Ek-17. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış <i>Pensan MV-Pen Vision</i> marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M3) 0. zamandaki spektrumu	241
Ek-18. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış <i>Noki wonder Ball</i> marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M4) 0. zamandaki spektrumu	242
Ek-19. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış <i>Noki wonder Ball</i> marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M4) 0. zamandaki spektrumu	242
Ek-20. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış <i>Bigpoint 932</i> marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M5) 0. zamandaki spektrumu	243
Ek-21. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış <i>Bigpoint 932</i> marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M5) 0. zamandaki spektrumu	243
Ek-22. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış <i>Pensan MV-Pen Vision</i> marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S1) 0. zamandaki spektrumu	244
Ek-23. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış <i>Pensan MV-Pen Vision</i> marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S1) 0. zamandaki spektrumu	244
Ek-24. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış <i>Faber Castell Speedx10</i> marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S2) 0. zamandaki spektrumu	245
Ek-25. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış <i>Faber Castell Speedx10</i> marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S2) 0. zamandaki spektrumu	245
Ek-26. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış <i>Art Ballpoint Pen</i> marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S3) 0. zamandaki spektrumu	246

Ek-27. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış <i>Art Ballpoint Pen</i> marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S3) 0. zamandaki spektrumu	246
Ek-28. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış <i>Schneider Slider Edge XB</i> marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S4) 0. zamandaki spektrumu	247
Ek-29. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış <i>Schneider Slider Edge XB</i> marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S4) 0. zamandaki spektrumu	247
Ek-30. 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış <i>Bigpoint 930</i> marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S5) 0. zamandaki spektrumu	248
Ek-31. 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış <i>Bigpoint 930</i> marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S5) 0. zamandaki spektrumu	248
9. ÖZGEÇMİŞ	249

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Tükenmez kalem bilye ucu ve mürekkebin bilyedeki görünümü	8
Şekil 2.2. Standart bir tükenmez kalemin kısımları	9
Şekil 2.3. Tükenmez kalem mürekkebi bileşenlerinin toplam hacim içindeki yüzdeleri	10
Şekil 2.4. Tükenmez kalem mürekkeplerinde kullanılan bazı çözücüler	13
Şekil 2.5. Metil viyole ailesinden tükenmez kalem mürekkep boyar maddelerinin N-demetilasyon sonucu solması	16
Şekil 2.6. Kağıt üzerine tatbik edilen mürekkebin kuruma süreci	16
Şekil 2.7. Mürekkep analizinde kullanılan yöntemler	20
Şekil 2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Sistemi	21
Şekil 2.9. HPTLC’de Mobil faz olarak n-butanol - izo-propil alkol-su-asetik asit (20:10:10: 1 v / v / v / v) kullanıldığı silika jel üzerinde mürekkep örneklerinin analizi	22
Şekil 2.10. GC-MS sistemi bileşenleri	23
Şekil 2.11. Elektromanyetik spektrum	24
Şekil 2.12. MALDI-TOF-MS cihazı iş akışı	28
Şekil 2.13. MALDI-TOF-MS tekniğinin temel prensibi	28
Şekil 2.14. TOF analizörlü kütle spektrometresi	29
Şekil 2.15. DNA sarmalındaki ekzon ve intron bölgeleri	31
Şekil 2.16. Karışım Örneklerinin Yorumlanmasında İzlenecek Yöntemler	37
Şekil 2.17. AmpFISTR® MiniFiler® PCR Amplifikasyon kitinde kullanılan floresan boyalara ait ışıma spektrumu	39
Şekil 2.18. AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kitinde kullanılan floresan boyalara ait ışıma spektrumu	40
Şekil 2.19. AmpFISTR® Globalfiler® PCR Amplifikasyon kitinde kullanılan floresan boyalara ait ışıma spektrumu	43
Şekil 2.20: Kâğıt yüzeyde % 100 nemde gelişmiş C. globosum sporları	47
Şekil 3.1. Genetik analiz basamaklarının iş akış şeması	56
Şekil 3.2. DNA analizi için el sürüntü örneklerinin oluşturulması	57
Şekil 3.3. Normal swap örneği	58
Şekil 3.4. Normal swap ile hücre toplama	58
Şekil 3.5. Yeni nesil swap örneği	58
Şekil 3.6. Yeni nesil swap ile hücre toplama	58

Şekil 3.7. Bası uygulanan bölgeden 3 mm' lik panç yardımıyla kesit alınması	59
Şekil 3.8. Biometra Jel Görüntüleme Sistemi	65
Şekil 3.9. GeneAmp® 9700 PCR cihazı	67
Şekil 3.10. Çalışmanın yapıldığı ABI PRISM®3130 genetik analizör cihazı	72
Şekil 3.11. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kiti alelik ladder cetveli	74
Şekil 3.12. AmpFISTR® Identifiler™ PCR amplifikasyon kiti alelik ladder cetveli	74
Şekil 3.13. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kiti alelik ladder cetveli	75
Şekil 3.14. Hazırlanan besiyerleri görüntüleri a) Malt agar b) Jelöz agar c) Kanlı agar d)Yatık tüpte malt agar	79
Şekil 3.15. Öncül çalışmanın yapıldığı malt agar ve kanlı agar besiyerleri görüntüsü	80
Şekil 3.16. Mürekkep-kağıt disklerinin hazırlanışı	83
Şekil 3.17. 0.5 McFarland yöntemiyle 1.5×10^8 cfu/mL göre hazırlanmış süspansiyonlar	83
Şekil 3.18. (a) Ekim yapılmak üzere steril öze yardımıyla süspanse <i>Penicillium</i> sp.'nin alınıp, (b) inkbiyogram araştırması için ekiminin yapılması	84
Şekil 3.19. Mürekkep-kağıt disklerinin petrilere yerleştirilmesi	84
Şekil 3.20. İnkbiyogramlarda 0.aya ait inhibisyon zonlarına örnekler	85
Şekil 3.21. 0-6 ay arasında bekletilen mürekkep-kağıt diskleri	86
Şekil 3.22. İnkbiyogramlarda 6. aya ait inhibisyon zonlarına örnekler	87
Şekil 3.23. 300 Watt 1760 Lüks ksenon lamba kullanılarak 30 cm mesafede ışık kaynağına maruz bırakılan mürekkep örnekleri	91
Şekil 3.24. MALDI-TOF-MS örnek yükleme plakasına Pritt Stick yapıştırıcı yardımı ile sabitlenen kağıt numuneleri	91
Şekil 3.25. Çalışmada kullanılan MALDI-TOF-MS cihazı	93
Şekil 4.1. Serum fizyolojik ile ıslatılmış normal svap aracılığıyla alınan sürüntü örneklerinin izolasyonu sonrasında elde edilen izolatların %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	97
Şekil 4.2. Serum fizyolojik ile ıslatılmış yeni nesil svap aracılığıyla alınan sürüntü örneklerinin izolasyonu sonrasında elde edilen izolatların %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	97
Şekil 4.3. Kağıdın yüzeyinden mikroskop altında toplanan hücrelerin izolasyonu sonrasında elde edilen DNA izolatlarının %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	98
Şekil 4.4. Kağıttan alınan kesitten izolasyon sonrasında elde edilen DNA izolatlarının %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü	98

Şekil 4.5. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kitinin negatif kontrolüne ait elektroforegram	106
Şekil 4.6. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kitinin pozitif kontrolüne ait elektroforegram	106
Şekil 4.7. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kiti ile magazin kağıdından alınan sürüntü örneğine ait elektroforegram	106
Şekil 4.8. AmpFISTR® Identifiler™ PCR amplifikasyon kitinin negatif kontrolüne ait elektroforegram	107
Şekil 4.9. AmpFISTR® Identifiler™ PCR amplifikasyon kitinin pozitif kontrolüne ait elektroforegram	108
Şekil 4.10. AmpFISTR® Identifiler™ PCR amplifikasyon kiti ile magazin kağıdından alınan sürüntü örneğine ait elektroforegram	108
Şekil 4.11. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kitinin negatif kontrolüne ait elektroforegram	109
Şekil 4.12. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kitinin pozitif kontrolüne ait elektroforegram	109
Şekil 4.13. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kiti ile magazin kağıdından alınan sürüntü örneğine ait elektroforegram	110
Şekil 4.14. Magazin kağıdından, Çek Tipi Senet kağıdından, 80g/m ² A4 fotokopi kağıdından ve 100g/m ² A4 fotokopi kağıdından elde edilen DNA örnekleri için kit sistemlerinin başarı oranları	112
Şekil 4.15. Günlükten 1. günde alınan örneğe ait elektroforegram	120
Şekil 4.16. Birden fazla kişinin imzası bulunan 1 günlük belgeden alınan örneğe ait elektroforegram	120
Şekil 4.17. Küf ve mantar üreme olan bazı besiyerlerindeki kolonilerin makroskopik görüntüsü	121
Şekil 4.18. Besi yerlerinde üreyen bazı küf ve mantarların mikroskopik görüntüsü	122
Şekil 4.19. Bakteriyel üreme olan besiyerlerindeki kolonilerin makroskopik görüntüsü	122
Şekil 4.20. Besi yerlerinde üreyen bakterilerin mikroskopik görüntüsü	123
Şekil 4.21. Çalışmada kullanılan Pensan MV-Pen Vision (S1-Siyah) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini	126
Şekil 4.22. Çalışmada kullanılan Faber Castell Speedx10(S2-Siyah) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini	127

Şekil 4.23. Çalışmada kullanılan Art Ballpoint Pen (S3-Siyah) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini	127
Şekil 4.24. Çalışmada kullanılan Schneider Slider Edge XB (S4-Siyah) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini	127
Şekil 4.25. Çalışmada kullanılan Faber Castell FDx10 (M1-Mavi) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini	128
Şekil 4.26. Çalışmada kullanılan Schneider Slider Edge XB (M2-Mavi) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini	128
Şekil 4.27. Çalışmada kullanılan Pensan MV-Pen Vision (M3-Mavi) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini	128
Şekil 4.28. Çalışmada kullanılan Art Ballpoint Pen (M4-Mavi) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini	129
Şekil 4.29. İnhibisyon zonlarının farklı mikrobiyal etkene karşı zamana bağlı halka değişim eğrisi	133
Şekil 4.30. Kontamine edilmiş kağıt-mürekkep disklerinin içerisindeki mürekkep boyar maddelerinin moleküler dönüşümüne zamanın etkisi	134
Şekil 4.31. İyon kaynağı değerine karşılık elde edilen maksimum resolüsyon	136
Şekil 4.32. Lazer pulslu iyon ekstraksiyonu için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon	137
Şekil 4.33. Örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon	138
Şekil 4.34. Reflektör değeri için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon	139
Şekil 4.35. Farklı lazer atım hızlarına karşılık elde edilen maksimum resolüsyon	140
Şekil 4.36. Farklı dedektör voltajı değerlerine karşılık elde edilen maksimum resolüsyon	141
Şekil 4.37. Farklı shot frekansı değerlerine karşılık elde edilen resolüsyon	142
Şekil 4.38. Farklı lazer enerjisi değerlerine karşılık elde edilen solma değerleri aralığı	143
Şekil 4.39. Kristal viyole (CV) standardının 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerinde zamana bağlı solma eğrisi	145
Şekil 4.40. Kristal viyole (CV) standardının 100 g/m ² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerinde zamana bağlı solma eğrisi	145
Şekil 4.41. Metil viyole (MV) standardının 80 g/m ² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerinde	146

zamana bağılı solma eğrisi

Şekil 4.42. Metil viyole (MV) standardının 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerinde 146
zamana bağılı solma eğrisi

Şekil 4.43. Pararosanilin (PR) standardı içerisinde bulunan az miktardaki monometil 147
pararosanilinden pararosanilin ve diğer küçük moleküllerin oluşumuna ilişkin 80 g/m²
A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerinde zamana bağılı solma eğrisi

Şekil 4.44. Pararosanilin (PR) standardı içerisinde bulunan az miktardaki monometil 147
pararosanilinden pararosanilin ve diğer küçük moleküllerin oluşumuna ilişkin 100 g/m²
A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerinde zamana bağılı solma eğrisi

Şekil 4.45. Viktorya mavisi (VB) standardının 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı 148
(K1) üzerinde zamana bağılı solma eğrisi

Şekil 4.46. Viktorya mavisi (VB) standardının 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) 148
üzerinde zamana bağılı solma eğrisi

Şekil 4.47. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm 149
(M1) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı
solma eğrisi

Şekil 4.48. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine Mavi Faber Castell FDx10 1.0 149
mm (M1) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana
bağılı solma eğrisi

Şekil 4.49. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Mavi Schneider Slider 150
Edge XB (M2) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen
zamana karşı solma eğrisi

Şekil 4.50. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Mavi Schneider Slider 150
Edge XB (M2) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen
zamana karşı solma eğrisi

Şekil 4.51. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Mavi Pensan MV-Pen 151
Vision (M3) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana
karşı solma eğrisi

Şekil 4.52. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Mavi Pensan MV-Pen 151
Vision (M3) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana
karşı solma eğrisi

Şekil 4.53. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Mavi Noki wonder Ball 1.0 152
mm (M4) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana

karşı solma eğrisi

Şekil 4.54. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm (M4) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 152

Şekil 4.55. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Mavi Bigpoint 932 (M5) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 153

Şekil 4.56. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Mavi Bigpoint 932 (M5) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 153

Şekil 4.57. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm (S1), tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 154

Şekil 4.58. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm (S1), tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 154

Şekil 4.59. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm (S2) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 155

Şekil 4.60. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm (S2) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 155

Şekil 4.61. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm (S3) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 156

Şekil 4.62. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm (S3) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 156

Şekil 4.63. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Siyah Schneider slider Edge XB (S4) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 157

Şekil 4.64. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Siyah Schneider slider Edge XB (S4) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen 157

zamana karşı solma eğrisi

Şekil 4.65. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Siyah Bigpoint 930 (S5) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 158

Şekil 4.66. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Siyah Bigpoint 930 (S5) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi 158

Şekil 4.67. Mavi Tükenmez Kalem ile çizilen kağıtlarda yapay soldurma sonrası, iki farklı kağıt üzerinde her bir tükenmez kalem türü için elde edilen zamana karşı solma eğrisi 159

Şekil 4.68. Siyah Tükenmez Kalem ile çizilen kağıtlarda yapay soldurma sonrası, iki farklı kağıt üzerinde her bir tükenmez kalem türü için elde edilen zamana karşı solma eğrisi 160

Şekil 4.69. Her bir standardın iki farklı kalitedeki kağıt üzerinde zamana bağlı solma eğrileri 161

Şekil 4.70. Viktorya mavisi standardının iki farklı kalitedeki kağıt üzerinde zamana bağlı solma eğrileri 162

Şekil 4.71. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış Faber Castell FDx10 marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebi (M1) içerisindeki pigmentlerin 0,1,2,3,4 ve 5 saat ışık altında bekletilme sonucunda alınan spektrumları ve boş kağıdın spektrumunu (K1-Blank) 163

Şekil 4.72. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış Pensan MV-Pen Vision marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebi (M3) içerisindeki pigmentlerin 0,1,2,3,4 ve 5 saat ışık altında bekletilme sonucunda alınan spektrumları ve boş kağıdın spektrumunu (K2-Blank) 164

Şekil 4.73. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış Schneider Slider Edge XB marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebi (S4) içerisindeki pigmentlerin 0,1,2,3,4 ve 5 saat ışık altında bekletilme sonucunda alınan spektrumları ve boş kağıdın spektrumunu (K1-Blank) 165

Şekil 4.74. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış Bigpoint 930 marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebi (S5) içerisindeki pigmentlerin 0,1,2,3,4 ve 5. saat ışık altında bekletilme sonucunda alınan spektrumları ve boş kağıdın spektrumunu (K2-lank) 166

Şekil 4.75. 2018 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin soldurma 174

yapılmayan 0. saatteki mavi tükenmez kalem örnekleri ile kıyaslanması

Şekil 4.76. 2018 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin soldurma 175
yapılmayan 0. saatteki siyah tükenmez kalem örnekleri ile kıyaslanması

Şekil 4.77. 2017 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 1 saat 176
yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması

Şekil 4.78. 2017 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 1 saat 177
yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması

Şekil 4.79. 2016 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 2 saat 178
yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması

Şekil 4.80. 2016 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış 2 saat yapay soldurulan 179
örneklerin kıyaslanması

Şekil 4.81. 2015 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 3 saat 180
yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması

Şekil 4.82. 2015 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 3 saat 181
yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması

Şekil 4.83. 2014 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 4 saat 182
yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması

Şekil 4.84. 2014 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 4 saat 183
yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması

Şekil 4.85. 2013 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 5 saat 184
yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması

Şekil 4.86. 2013 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 5 saat 185
yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması

Şekil 4.87. Arşiv 1'den alınan 0. yıldaki mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin 186
(2018 ARSIV 1-M) 80 g/m² (K1) ve 100 g/m² (K2) A4 fotokopi kağıdına uygulanmış
Noki wonder Ball (M4), Bigpoint 932 (M5), Schneider Slider Edge XB (M2) marka
mavi renk tükenmez kalem mürekkeplerinin 0. saatteki spektrumu ile karşılaştırılması

Şekil 4.88. Arşiv 2'den alınan 0. yıldaki mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin 187
(2018 ARSIV 2-M) 80 g/m² (K1) ve 100 g/m² (K2) A4 fotokopi kağıdına uygulanmış
Schneider Slider Edge XB (M2), Bigpoint 932 (M5) marka mavi renk tükenmez kalem
mürekkeplerinin 0. saatteki spektrumu ile karşılaştırılması

Şekil 4.89. Arşiv 1'den alınan 0. yıldaki siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin 188
(2018 ARSIV 1-S) 80 g/m² (K1) ve 100 g/m² (K2) A4 fotokopi kağıdına uygulanmış

Faber Castell Speedx10 1.0 mm (S2), Schneider Slider Edge XB (S4) marka siyah renk tükenmez kalem mürekkeplerinin 0. saatteki spektrumu ile karşılaştırılması

Şekil 4.90. Arşiv 1’den alınan 0. yıldaki siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin 189 (2018 ARSIV 2-S) 80 g/m² (K1) ve 100 g/m² (K2) A4 fotokopi kağıdına uygulanmış Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm (S1), Faber Castell Speedx10 1.0 mm (S2), Art Ballpoint Pen 1.0 mm (S3) marka siyah renk tükenmez kalem mürekkeplerinin 0. saatteki spektrumu ile karşılaştırılması



TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1. Tarihte kağıdın keşfi ve kağıt üretimi	5
Tablo 2.2. Kağıt üretiminde kullanılan yardımcı kimyasal maddeler ve kullanım amacı	6
Tablo 2.3. Tükenmez kalem mürekkeplerinde kullanılan boyar maddeler	11
Tablo 2.4. Mürekkep yapı ve yaş analizi ile ilgili ilk çalışmalar	19
Tablo 2.5. AmpFISTR® Minifiler® PCR Amplifikasyon Kiti lokus ve alelleri	39
Tablo 2.6. AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon Kiti lokus ve alelleri	41
Tablo 2.7. AmpFISTR® Globalfiler® PCR Amplifikasyon Kiti lokus ve alelleri	44
Tablo 3.1. Genetik analizlerde kullanılan gereçlerin adları, marka ve modelleri	53
Tablo 3.2. Genetik analizlerde kullanılan kimyasal madde ve kitlerin listesi	54
Tablo 3.3. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için GeneAmp® 9700 PCR cihazı programı	68
Tablo 3.4. AmpFISTR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için GeneAmp® 9700 PCR cihazı programı	69
Tablo 3.5. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için GeneAmp® 9700 PCR cihazı programı	70
Tablo 3.6. ABI PRISM®3130 Genetik Analizör cihazı için kullanılan yürütme koşulları	73
Tablo 3.7. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan gereçlerin adları, marka-modelleri	77
Tablo 3.8. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan kimyasal madde ve besi yerlerinin listesi	78
Tablo 3.9. Tek bir mikroorganizma için farklı hacimde mürekkep içeren disklerin hazırlanışı	86
Tablo 3.10. Çalışmanın mürekkep boyar maddelerinin moleküler değişimlerini inceleme aşamasında kullanılan gereçlerin adları, marka-modelleri	89
Tablo 3.11. Çalışmanın mürekkep boyar maddelerinin moleküler değişimlerini inceleme aşamasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemelerin listesi	90
Tablo 4.1. Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü ile el sürüntüsü örneklerinden elde edilen DNA miktarları	99
Tablo 4.2. Modifiye Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü ile el sürüntüsü örneklerinden elde edilen DNA miktarları	100
Tablo 4.3. El sürüntüsü örneklerine ait DNA izolatlarından saflaştırma öncesi ve sonrasında elde edilen DNA miktarları	101
Tablo 4.4. Ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen DNA miktarları	102

Tablo 4.5. Araştırmacıya ait farklı kağıt yüzeylerden farklı PCR kitleri ile elde edilen	103
edilen DNA profillerinin beklenen ve gözlenen lokus sayılarına göre mukayese edilebilirliği	
Tablo 4.6. AmpFlSTR® Minifiler® PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak lokus bazında	104
elde edilen DNA sonuçları	
Tablo 4.7. AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak lokus	104
bazında elde edilen DNA sonuçları	
Tablo 4.8. AmpFlSTR® GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak lokus	105
bazında elde edilen DNA sonuçları	
Tablo 4.9. Farklı kağıt yüzeylerden elde edilen DNA profillerinin güvenilirliği	111
Tablo 4.10. Farklı kişilerin oluşturduğu belgelerin kağıt yüzeylerinden alınan	113
örneklerden elde edilen DNA Miktarları	
Tablo 4.11. Farklı kişilerin oluşturduğu belgelerin kağıt yüzeylerinden alınan	114
örneklerden elde edilen DNA profillerinin mukayese edilebilirliği	
Tablo 4.12. Farklı kişilerin oluşturduğu belgelerin kağıt yüzeylerinden alınan	115
örneklerin AmpFlSTR® GlobalFiler® PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak amplifiye edilmesi ile lokus bazında elde edilen DNA sonuçları	
Tablo 4.13. Tek kişiye ait günlüğün kağıt yüzeylerinden alınan sürüntülerden elde	116
edilen DNA miktarları ve DNA profillerinin mukayese edilebilirliği	
Tablo 4.14. Aynı kişiye ait günlükten elde edilen lokus bazında elde edilen DNA	117
sonuçları	
Tablo 4.15. Birden fazla kişinin imzası bulunan belgelerden alınan örneklerden elde edilen	118
DNA miktarları ve DNA profillerinin mukayese edilebilirliği	
Tablo 4.16. Birden fazla kişinin imzası bulunan belgelerden lokus bazında elde edilen	119
DNA sonuçları	
Tablo 4.17. İzole edilen küf mantarlarının ve non toksik bakterilerin farklı ortamlara	124
göre dağılımları	
Tablo 4.18. Farklı şekillerde ekilen örneklerin farklı besi yerlerinde üreme olup	125
olmaması	
Tablo 4.19. Çalışmada kullanılan tükenmez kalem mürekkebi boyar maddelerinin	130
toplam miktar içindeki yüzdelik miktarı	
Tablo 4.20. Aynı mürekkeplerin farklı hacimde mürekkep içeren kağıt diskleri ile	131
yapılan inkbiyogram sonuçları	

Tablo 4.21. İnkbiyogramların Zon Çaplarının Zamana Bağlı Değişimi	132
Tablo 4.22. İyon kaynağı değerine karşılık elde edilen resolüsyon değeri	136
Tablo 4.23. Lazer pulslu iyon ekstraksiyonu için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri	137
Tablo 4.24. Örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri	138
Tablo 4.25. Reflektör değeri içindenenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri	139
Tablo 4.26. Farklı lazer atım hızlarına karşılık gelen resolüsyon değeri	140
Tablo 4.27. Farklı dedektör voltajı değerlerine karşılık gelen resolüsyon ve sinyal/gürültü değerleri	141
Tablo 4.28. Farklı atış frekansı değerlerine karşılık gelen resolüsyon ve sinyal/gürültü değerleri	142
Tablo 4.29. Farklı lazerenerjisi değerlerine karşılık gelen solma değerleri	143
Tablo 4.30. ANOVA analizi ile kağıt türü gözetmeksizin, saate göre kağıt üzerinde soldurulan MAVİ mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar	167
Tablo 4.31. ANOVA analizi ile kağıt türü gözetmeksizin, saate göre kağıt üzerinde soldurulan SİYAH mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar	168
Tablo 4.32. ANOVA analizi ile saate göre İNCE A4 kağıt (K1) üzerinde soldurulan mavi mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar	169
Tablo 4.33. ANOVA analizi ile saate göre KALIN A4 kağıt (K2) üzerinde soldurulan mavi mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar	170
Tablo 4.34. ANOVA analizi ile saate göre İNCE A4 kağıt (K1) üzerinde soldurulan siyah mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar	171
Tablo 4.35. ANOVA analizi ile saate göre KALIN A4 kağıt (K2) üzerinde soldurulan siyah mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar	172
Tablo 4.36. 2018 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile soldurma yapılmayan 0. saatteki mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri	174
Tablo 4.37. 2018 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile soldurma yapılmayan 0. saatteki siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri	175
Tablo 4.38. 2017 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 1 saat	176

yapay soldurulan mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri

Tablo 4.39. 2017 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 1 saat 177

yapay soldurulan siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri

Tablo 4.40. 2016 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 2 saat 178

yapay soldurulan mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri

Tablo 4.41. 2016 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 2 saat 179

yapay soldurulan siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri

Tablo 4.42. 2015 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 3 saat 180

yapay soldurulan mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri

Tablo 4.43. 2015 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 3 saat 181

yapay soldurulan siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri

Tablo 4.44. 2014 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 4 saat 182

yapay soldurulan mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri

Tablo 4.45. 2014 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 4 saat 183

yapay soldurulan siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri

Tablo 4.46. 2013 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 5 saat 184

yapay soldurulan mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri

Tablo 4.47. 2013 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 5 saat 185

yapay soldurulan siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri

KISALTMALAR

A. flavus	Aspergillus flavus
A. fumigatus	Aspergillus fumigatus
ABI	Applied Biosystems, Inc.
AE	Elüsyon Tamponu
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ATL	Doku Lizis Tamponu
AW1	Yıkama Tamponu 1
AW2	Yıkama Tamponu 2
B. subtilis	Bacillus subtilis
bç	Baz Çifti
CE	Kapiler Elektroforez
CFU	Koloni Oluşturabilen Birim (Colony Forming Units)
cm	Santimetre
CODIS	Birleşik DNA İndeks Sistemi
CV	Kristal Viyole
dH₂O	Deiyonize Su
dk	Dakika
ddH₂O	Bidistile Su
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTT	Diklorodifeniltrikloroetan
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Etilendiamin Tetra-Asetik Asit
FBI	Federal Soruşturma Bürosu
FE	Fenoksietanol
G	Gürültü
GC-MS	Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometrisi
gr	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı sıvı Kromatografisi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
K1	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı
K2	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı

KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilo Dalton
KH₂PO₄	Potasyum Fosfat
L	Litre
LDI	Lazer Desorpsiyon İyonizasyon
m	Kütle
M	Molar
m²	Metrekare
M. lentiflavum	Mycobacterium lentiflavum
M1	Faber Castell FDx10 Marka Mavi Renkli Tükenmez Kalem Mürekkebi
M2	Schneider Slider Edge XB Marka Mavi Renkli Tükenmez Kalem Mürekkebi
M3	Pensan MV-Pen Vision Marka Mavi Renkli Tükenmez Kalem Mürekkebi
M4	Noki wonder Ball Marka Mavi Renkli Tükenmez Kalem Mürekkebi
M5	Bigpoint 932 Marka Mavi Renkli Tükenmez Kalem Mürekkebi
MALDI-MS	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Kütle Spektrometrisi
MALDI-TOF-MS	Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometrisi
MgCl₂	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Mili Molar
MS	Kütle Spektrometrisi
MV	Metil Viyole
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
Na₂PO₄	Sodyum Fosfat
NaAc	Sodyum Asetat

NaCl	Sodyum Klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
Ort	Ortalama
PBS	Fosfat Tamponu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	Hidrojen Gücü
POP-4	Performance Optimized Polymer 4
PR	Pararosanilin
RF	Alıkonma Faktörü
RFU	Bağıl Floresan Ünite
Rpm	Dakikada Devir Sayısı
RSD	Bağıl Standart Sapma
S	Sinyal
S. aureus	Staphylococcus aureus
S1	Pensan MV-Pen Vision Marka Siyah Renkli Tükenmez Kalem Mürekkebi
S2	Faber Castell Speedx10 Marka Siyah Renkli Tükenmez Kalem Mürekkebi
S3	Art Ballpoint Pen Marka Siyah Renkli Tükenmez Kalem Mürekkebi
S4	Schneider slider Edge XB Marka Siyah Renkli Tükenmez Kalem Mürekkebi
S5	Bigpoint 930 Marka Siyah Renkli Tükenmez Kalem Mürekkebi
SD	Standart Sapma
sn	Saniye
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
STR	Kısa Ardışık Tekrar
TBE	Tris+Borik asit+ EDTA Tamponu
TFA	Trifloroasetik Asit
TOF	Uçuş Zamanı

TPR	Tetrametil Pararosanilin
UV	Ultraviyole
VB	Viktorya Mavisi
W	Watt



ÖZET

Suç dünyası her zaman adalet ile yarışarak öne geçmeye çalışmaktadır. Adalet sisteminin önemli bir ögesi olan adli bilimler suçu önleme mücadelesinde öne geçmek için; yeni yöntemler üretmek, yeni teknolojileri bir deneyler bütünü içinde kullanarak ve sonuçlarını değerlendirerek adalete hizmet etmelidir. Bu bağlamda Adli Belge İnceleme analizlerinde ilgili birimlerin bir araya gelerek güçlerini birleştirmesi ve ortak bir platformda buluşarak farklı perspektifler sunması büyük önem arz etmektedir. Bu konuda farkındalık yaratılma amacı güdülmesi bu çalışmanın şekillenmesine öncülük etmiştir. Hakim veya savcıların bilirkişiliğe başvurduğu konuların başında, belgeyi düzenleyen kim olduğu ya da belgedeki imzanın kime ait olduğu, aynı veya farklı belge üzerindeki mürekkeplerin tespiti ve ayrıştırılması, belge üzerine mürekkebin ne zaman aktarıldığı ve bu mürekkebin bulunduğu ortamdan nasıl ve ne derece etkilendiği soruları gelmektedir. İncelenmek üzere gönderilen bir belgenin saklandığı fiziksel koşullar ile mürekkebin bu fiziksel koşullardan nasıl etkilendiği, incelemeleri etkileyen önemli unsurlardandır. Tüm bu unsurlar ve soruların cevaplanmasında, mürekkeplerin belirli bir üretim standardının olmaması, formülasyonlarının üretici tarafından gizli tutulması belge inceleme uzmanlarının karşılaştıkları sorunları arttırmaktadır.

Günümüzde gelişen DNA teknolojisi sayesinde, dokunma yolu ile belge yüzeyine transfer edilen epitel hücrelerden DNA elde etmek ve elde edilen DNA'nın kalitesini ve miktarını belirleyerek adli belge üzerinde identifikasyon gerçekleştirmek olasıdır. Bu olasılık doğrultusunda çalışmanın genetik inceleme kısmında, araştırmacının kendisinin bası uygulayarak 4 farklı kağıt yüzey üzerine oluşturduğu el sürüntüsü örneklerinden 4 farklı yöntemle epitel hücreler toplanarak silika temelli DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyon işlemi sonrasında izolasyonun başarısını gözlemlemek için DNA izolatları %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Beklenen kalite ve miktarda DNA elde edilemediğinden izolasyon prosedürü modifiye edildi ve izolasyon sonrası çekitlenen DNA'lar saflaştırıldı. PCR işleminde kullanılacak amplifikasyon kitine özgü konsantrasyonda DNA miktarını ayarlayabilmek için Qubit Florimetre Cihazı ile florimetrik olarak DNA miktar tayini yapıldı. Daha sonra aynı örneklerde insan genomik DNA'sına özgü primerler kullanılarak PCR işlemi 3 farklı STR kiti (AmpFISTR® MiniFiler™ PCR, AmpFISTR® IdentiFiler™ PCR ve AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kiti) ile gerçekleştirildi. PCR işlemi sonrasında ABI 3130 kapiller elektroforez cihazında elektroforezi yapılan örnekler Genemapper IDx yazılım programı kullanılarak analizlendi ve genotiplendirildi.

Çalışmamızda kağıt yüzey üzerine bırakılan el sürüntüsü örnekleri ile birlikte kontrol amaçlı mukayese yapabilmek ve çalışmanın başarı oranını belirleyebilmek için aynı kişiye ait ağız içi sürüntü örnekleri de kullanıldı. Belgeye temas süresinin, farklı yüzey tipindeki belgelerin ve belgenin saklandığı koşulun; teması gerçekleştiren kişinin cinsiyeti, yaşı, kullandığı kozmetik ürünler, epitelyum vericiliği ve çevresel şartlar elde edilen DNA miktarını ve kalitesini etkilediği bilindiğinden analizler yapılırken bu parametreler de dikkate alındı. Elde edilen bulgular neticesinde geliştirilen yöntem çalışmaya gönüllü katılmayı kabul eden 3 kişiden alınan kağıt yüzeyler üzerine bırakılan el sürüntü örneklerine, 1 gün ila 10 yıl zaman aralığında farklı tükenmez kalemle aynı kişi tarafından yazılmış bir günlükten ve bir hukuk bürosu arşivinde birden fazla kişinin imzası bulunan belgelerden alınan örneklerle uygulandı. Epitel hücreden DNA elde etme teknikleri, rutinde kullanılan tekniklerden daha farklı ve hassastır. Çünkü belge üzerinden elde edilen DNA miktarı diğer rutin çalışmalara göre eser miktarda ve degrade olabilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre geliştirdiğimiz yöntem ile belge sahteciliği suçlarının tespitinde analitik yöntemlerin yetersiz kaldığı veya başka ikincil deliller tarafından desteklenmesi gerektiği durumlarda DNA profili elde etmek ve belgeye kişinin dokunup dokunmadığını tespit etmek yüksek derecede olasıdır.

Çalışmanın mikrobiyoloji kısmında belgenin saklama koşullarında ortamda bulunabilecek olan mikroorganizmaların tükenmez kalem mürekkebinin bileşiğindeki boyar maddelerin zamanla değişimine etkisini incelemek için, arşiv ortamında ve belge üzerinde olabilecek küf, mantar ve bakteri türleri kültür araştırması ile belirlendi. Saf suşları temin edilen *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium lentiflavum* mikrobiyolojik etkenleri ile kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş ve kurutularak oda ısısında 6 aya kadar bekletilmiş örnekler İnkbiyogram yapılarak aşama aşama incelendi.

Mürekkep içerisinde mikrobiyal üremeye karşı eklenen diğer katkı maddelerinin yapısı ve miktarı üreticiden üreticiye değiştiğinden, inceleme sonucunda inkbiyogramların aynı mikroorganizmaya karşı inhibisyon çapları arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Boyanmış zon çaplarındaki farklılıklar, mürekkep formülasyonlarındaki farklılıklardan kaynaklanan sebeplerle agarın içine farklı miktarlarda ve çaplarda diffüze olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu da kağıt üzerindeki yazının mikroorganizmalarla etkileşiminde; antimikrobiyal etkiye sahip MV molekülünün yanısıra, bu molekülün kağıt yüzeyine ve derinine daha fazla ya da daha az diffüze olmasını sağlayan bir formülasyonun da etkisi olduğunu düşündürmektedir. Bu artıştan hareketle kontamine edilmiş kağıt-mürekkep disklerinin

içerisindeki mürekkep boyar maddelerinin zamanla moleküler dönüşümüne mikrobiyal etkiyi incelemek amacıyla aynı şartlarda bekletilen kontamine edilmiş ve kontamine edilmemiş kağıt-mürekkep disklerinin 0., 3. ve 6. aydaki zamana karşı solma eğrileri Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF-MS) analiz dataları kullanılarak çizildi. Eğri çiziminde; herbir mürekkebin zamanla kağıt üzerinde solmasına ilişkin oluşan ve zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen küçük pikler ile metil viyole (MV) iyon şiddeti toplamının kristal viyole (CV) iyon şiddetine oranı temel alındı. Kontamine edilmiş ve kontamine edilmemiş örneklerin zamana karşı solma oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.

Yapılan çalışmalarda mürekkep boyar maddelerinin bir metil grubu ($-CH_3$) kaybederek kristal viyolenin zamanla metil viyoleye, metil viyolenin zamanla tetrametil pararozaniline ve tetra metil pararosanilinin diğer fotodegradasyon ürünlerine dönüşmesi nedeniyle, mürekkep renginde solma meydana geldiği ortaya çıkarılmıştır. Bu moleküler dönüşümden/solmadan hareketle belge üzerine yazılan yazının oluşturulma zamanı hakkında yorum yapılabilmektedir. Çalışmanın tükenmez kalem mürekkebi içerisindeki boyar maddelerin moleküler dönüşümlerinin incelendiği bu aşamasında öncelikle MALDI-TOF-MS cihazında herhangi bir ön ekstraksiyon işlemi yapmaksızın 1.2 mm çaplı kağıt örneğinden doğrudan mürekkep yapı analizine ilişkin yöntem geliştirildi. İyi bir yüzey analizi yapabilmek için geliştirilen yöntem optimize edildi. Yöntem optimizasyonu sonrasında pararosanilin (PR), metil viyole (MV), kristal viyole (CV) ve viktorya mavisi (VB) mürekkep boyar maddelerinin ayrı ayrı hazırlanan standard çözeltileri ile piyasadan rastgale seçilmiş 5'er adet mavi ve siyah tükenmez kalem mürekkepleri piyasadan kolaylıkla temin edilebilen iki farklı kalitedeki ($80g/m^2$ ve $100g/m^2$) A4 fotokopi kağıdına tatbik edildi. Yapay soldurma tekniği uygulanan örneklerde zamanla kağıt üzerindeki mürekkep boyar maddelerinin solma oranları MALDI-TOF-MS ile analizlendi ve zamana karşı solma eğrileri çizildi. Bu solma eğrisinin gerçeğe uygunluğunun irdelenmesi için, iki farklı arşivden gerçek örnekler alınarak geliştirilen yöntemle analizlendi ve sonuçlar ışık fotonlarıyla yapay soldurulmuş ve solma zamanları bilinen örneklerle karşılaştırıldı.

Anahtar Kelimeler: Belge İnceleme, DNA, Kimliklendirme, MALDI-TOF-MS, Metil Viyole Ailesi, Mikroorganizma

SUMMARY

The world of crime is always trying to get ahead, competing with justice. Forensic sciences, which is an important element of the justice system, should serve to justice through producing new methods, using new technologies in a whole set of experiments and evaluating the results of justice, in order to take the lead in the fight against crime. In this context, it is of great importance that the relevant units come together and join forces in the Questioned Document Investigations and present different perspectives in a common platform. The aim of creating awareness about this issue has led to the design of the study. The subjects which judges or prosecutors apply for expertise mostly are; the questions about by whom the document was drafted or who the signature belongs to, the identification and differentiation of the inks on the same or different document, when the ink is transferred onto the document and how and to what extent the ink is influenced. The physical storage conditions of the document, sent for investigation and how the ink on the paper is affected by these physical conditions are important factors influencing the investigations. In answering all these elements and questions, the fact that the inks do not have a specific production standard and the formulations are kept secret by the manufacturer, increases the problems that the document examiners face.

Thanks to the developing DNA technology, it is possible to obtain DNA from the epithelial cells transferred to the surface of the document through touching and to identify the quality and amount of DNA obtained and to be able to perform identification on the forensic document. In line with this possibility, in the genetic examination part of the study, silica based DNA isolation was performed by collecting epithelial cells with 4 different methods, from 4 hand swabs formed on 4 different paper surface by the hand pressure of the researcher himself. DNA isolates were run on 2% agarose gel electrophoresis to observe the success of isolation following DNA isolation. Since the expected quality and quantity of DNA could not be obtained, the isolation procedure was modified and the DNA extracted after isolation was purified. In order to adjust the amount of DNA at the concentration specific to the amplification kit to be used in the PCR process, fluorimetric DNA quantification was carried out with the Qubit Fluorimeter Device. Then, PCR was performed using 3 different STR kits in the same samples (AmpFISTR® MiniFiler™ PCR, AmpFISTR® Identifiler™ PCR and AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR amplification kit) using primers specific for human genomic DNA. After PCR, electrophoresis samples were analyzed using ABI 3130 capillary electrophoresis instrument and genotyped using Genemapper IDx software program. In this

study, we also used mouth swab specimens of the same person in order to compare the hand swab samples left on the paper surface for control purposes and to determine the success rate of the study. Since it is known that document contact time, different surface types of documents, the condition where the document is stored, the gender, age, epithelium donation of the person who made the contact, the cosmetic products used by this person and environmental conditions influences the amount and quality of DNA, these parameters were kept in consideration during analyses. The method developed as a result of the findings, was applied to the hand swab specimens left on paper surfaces of taken from 3 volunteers who agreed to participate in the study and to the samples from a diary and some documents carrying signatures of more than one person in the archive of a law office, with different ballpoint pens, from a time period of 1 day to 10 years. Techniques for obtaining DNA from the epithelial cell are different and more sensitive than the techniques used in routine. Because the amount of DNA obtained from the document may be in trace amounts and degraded when compared to other routine studies. According to our results, it is highly possible to obtain DNA profile and to show if the person had touched the document or not, when the analytical methods are insufficient for the detection of document fraud offenses or if support by other secondary evidences are necessary.

In the microbiology section of the study, to investigate the effect of microorganisms (which may be present in the storage conditions of the document) on the change of the pigments in the composition of the ball pen ink with the time; the mold, fungus and bacterial species which may exist in the archives and on the documents were determined by microbiological culture investigation. The samples on which controlled contamination have been performed with pure strains of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium lentiflavum* and kept 6 months at ambient temperature after drying, were investigated step by step through making inkbiograms.

Since the structure and amount of other additives added to ink changed according to the manufacturer, differences were observed in the inkbiograms of the same microorganisms, from the point of inhibition diameters. Differences in stained zone diameters probably occur due to the diffusion of different amounts and diameters into the agar due to differences in ink formulations. So it suggests that; in addition to the MV molecule which has antimicrobial action, a formulation that allows this molecule to more or less diffuse to the surface and depth of the paper, may also effect the interaction of the ink on paper with microorganisms. From this increase, to examine the microbial effect on the molecular transformation of ink pigments

in contaminated paper-ink discs, the fading curves of contaminated and non-contaminated paper-ink discs held under the same conditions were constructed versus 0th, 3th and 6th months, using the analysis data obtained from Matrix assisted laser desorption ionization - Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) experiments. In the construction of the curve; the ratio of the sum of small peaks and methyl violet (MV) ion intensity (which are formed as a result of the fading of ink on paper and expected to increase over time) to crystal violet (CV) ion intensity, was taken as a measure. No significant difference was observed between the fading ratios of contaminated and non-contaminated samples versus-time.

In the studies carried out, it is found out that ink color fading occurs due to the loss of a methyl group ($-\text{CH}_3$) from the pigments in the ink, as in the conversion of the crystal violet to the methyl violet, the methyl violet to the tetramethyl pararosaniline and the tetramethyl pararosaniline into other photodegradation products over time. From this molecular transformation / fading, a comment can be made on the time of the script on the document. In this phase of the study, where the molecular transformations of the pigments in the ball-point pen ink were investigated, a method for ink structure analysis was developed on paper samples with 1-2 mm diameters, without any sample preparation, using MALDI-TOF-MS instrument. The method developed was optimized in order to perform a good surface analysis.

During the optimization of the method, the ink matrices of the 5 blue and black ball pen inks which are selected randomly from the market and the prepared-solutions of pararosaniline (PR), methyl violet (MV), crystal violet (CV) and victoria blue (VB) pigment standards were applied to two different quality ($80\text{g} / \text{m}^2$ and $100\text{g} / \text{m}^2$) A4 copy paper. Fading rates of ink pigments on paper samples on which an artificial fading technique is applied, were analyzed by MALDI-TOF-MS and fading curves were plotted against time. In order to examine the feasibility of this fading curve, real samples from two different archives were analyzed with the developed method and the results were compared with those of the artificially photo-faded samples with known fading times.

Keywords: Investigation of Questioned Documents, DNA, Identification, MALDI-TOF-MS, Methyl Violet and similar pigments, microorganism

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli bilimler; her çeşit adli olayın bilimsel kanıtlar ışığında ve multidisipliner bilim alanlarından yararlanarak çözümlenmesini amaçlayan bir bilim dalıdır. Bu bilim dalı kapsamı içinde yer alan belge sahteciliği suçları adalet sistemini en çok meşgul eden suç türlerindendir. Bu suçların tespitinde ve önlenmesinde, adli belge inceleme uzmanları gelişen teknolojiyi takip etmek ve mümkün olduğunca da bu gelişmeleri bilimsel çalışmalara uyarlayarak ve yeni teknolojileri kullanmak zorundadır [1]. Hakim veya savcıların bilirkişiliğe başvurduğu konuların başında, belgeyi düzenleyen kim olduğu ya da belgedeki imzanın kime ait olduğu, belge üzerindeki mürekkeplerin tespiti ve ayrıştırılması, belge üzerine mürekkebin ne zaman aktarıldığı ve belge üzerindeki mürekkebin bulunduğu ortamdan nasıl ve ne derece etkilendiği soruları gelmektedir.

Günümüzde uzmanlar tarafından bu konuda adalete önemli katkılarda bulunma güdüsü ile ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Belge üzerindeki imza veya el yazısı incelemelerinde optik yöntemlerle sonuca ulaşamadığı durumlarda, belgenin yazımında kullanılan mürekkebin ve belgeyi oluşturan kağıdın yapısının ileri analitik yöntemlerle incelenmesi gerekmektedir. Bu incelemeler, yazının temel unsurları olan mürekkep ve kağıdın fizikokimyasal süreçlerini kapsamaktadır ve literatürde bu konuda yapılan çalışmaların sayısının her geçen gün hızla arttığı görülmektedir [1,2]

Mürekkebin yapısındaki bileşenler zaman içerisinde değişmekle birlikte bu değişim süreci bileşenlerin miktarlarında meydana gelen azalma ve artmalar veya fotokimyasal ürünler yoluyla gözlenmektedir [2-4]. Analitik yöntemlerle tespit edilen fotodegradasyon ürünlerin yokluğu, belgenin uygun koşullarda saklandığını; varlığı ise belgenin çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere maruz kaldığını göstermektedir [5]. İlk yapılan adli belge inceleme çalışmalarında sıcaklık, nem, komşu materyaller gibi saklama koşullarının; gözenek büyüklüğü, pH, kaplama gibi kağıt özelliklerinin; çözücüler, boyalar, reçineler ve katkıları gibi mürekkep bileşimini oluşturan maddelerin; belgenin saklandığı ortamdaki çeşitli bakteri, mantar, termit, kemirgen vb. gibi mikroorganizmaların mürekkep muhteviyatında bulunan ve zamanla değişen bileşenlerin tayini üzerine etkisi olmadığı düşünülmüştür. Ancak saklandıkları koşullar sebebi ile adli belgelere kimyasal, fiziksel ve biyolojik olarak etki eden ve kağıdın yapısı ile bünyesindeki mürekkebin moleküler yapısını bozan pek çok çevresel risk etmeni bulunmaktadır. Özellikle kimyasal yapısı sebebi ile çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkilere maruz kalan mürekkep boyar maddeleri çok daha çabuk solma özelliğine sahiptir.

Tükenmez kalem mürekkebinin yapısında kristal viyole (CV), metil viyole (MV) ve viktorya mavisi (VB) olarak adlandırılan viyole ailesinden boyar maddeler bulunmaktadır. Bu boyar maddeler ışığa karşı direnç gösteremeyip, ışık etkisi altında bir metil (-CH₃) kaybederek bir alt gruptaki moleküllere dönüşmektedir [6,7]. Bu dönüşüm reaksiyonunu ve reaksiyon hızını etkileyen en temel unsur belgenin maruz kaldığı ışık ve bu ışığın dalga boyudur.

Son yıllarda mürekkep kimyasını temel alarak yapılan çalışmalar, mürekkep incelemelerinde birçok dış ve çevresel değişkenin incelemeler sırasında hesaba katılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Belgenin saklandığı ortam koşullarının kağıda ve mürekkebe olan etkisi, kağıdın yapısal özellikleri, inceleme yöntemi gibi hususların iyi bilinmesi mürekkep analizi konusunda yorum yapacak uzmanların daha net sonuçlara ulaşması açısından fayda sağlamaktadır [4]. Literatür kaynakları tarandığında, ülkemizde ve dünyada mürekkep bileşenlerinin (boyaların, reçinelerin, çözücülerin) fizikokimyasal dönüşümlerin incelendiği fakat bu dönüşüme neden olan etmenlerden özellikle biyolojik faktörlerin bu değişimi nasıl etkilediğinin ayrıntılı ele alınmadığı anlaşılmaktadır.

Bir bilimsel yaklaşım olarak çalışmanın birincil amacı, belgenin saklanması sırasında mürekkep yapısındaki bileşenlerin farklı fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı moleküler dönüşümlerinin ve dönüşüm hızlarının MALDI-TOF-MS (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) sistemi ile izlenmesidir. Bu izlemler doğrultusunda solma oranlarının yüksek doğrulukla tespit edilmesine yönelik güvenilirliği yüksek analitik bir yöntem geliştirilmesi, dünyada hızla yaygınlaşmaya başlayan MALDI-TOF-MS teknolojisinin adli alandaki yansımalarını değerlendirerek bu teknolojinin mürekkebin boyar maddelerinin solması konusunda uygulanabilirliğine dair bilgi, görgü ve tecrübe edinilmesidir.

Belgeyi düzenleyen kim olduğu ya da belgedeki yazının/îmzanın kime ait olduğu soruları belge sahteciliği suçlarında bilirkişiliğe başvurulmuş konuların başında gelmektedir. Bu soruları yanıtlamak üzere adli belge inceleme uzmanları grafoloji alanında optik incelemelerle ciddi çalışmalar yapmakta ve bu bağlamda adalete önemli katkılarda bulunmaktadır. Bunun yanı sıra “Her temas bir iz bırakır” ilkesinden yola çıkarak gelişen DNA teknolojisi ile değerli doküman, belge, tehdit veya fidye mektubu ya da intihar notu gibi dokunulan yüzeye bırakılan parmak izlerinden veya dokunma yolu ile belge yüzeyine transfer edilen (primer DNA transferi) epitel hücrelerden elde edilen DNA ile kimliklendirme yapılabilmesi ve olguların aydınlatılması olasıdır [8-10]. DNA incelemeleri çok az başlangıç materyali gerektirdiğinden, stabil olduğundan, zamanla ve dış etkenlerle solmadığından, teknik hata olmadığı sürece

yanlış kişileştirme yapılmasına imkan vermediğinden olay yerinde veya nesneler üzerinde bulunabilecek eser miktarda DNA içeren biyolojik örneklerden hareketle profillemeye yapılabilir. Kişinin imzasının taklidinde kişi belgeyi hiç görmediğini belirttiğinde, belgeden DNA analizi bu belgeye kişinin dokunup dokunmadığı sorusunun cevabını verebilir. Aynı kalem ile aynı anda yazılmış şüpheli yazıların analizinde zaman farkı ve kalem farkı bulunmayacağından kişinin DNA analizi diğer bulgularla değerlendirilip konu aydınlatılabilir. Bu konuya yönelik araştırmalarda dikkat edilmesi gereken en önemli husus, belge bütünlüğünü bozmadan ve belge yüzeyinde herhangi bir tahribat yapmaksızın delillerin çalışılarak kişi identifikasyonun yapılmasıdır. Epitel hücreden DNA elde etme teknikleri, rutinde kullanılan tekniklerden daha farklı ve hassastır. Çünkü belge üzerinden elde edilen DNA miktarı diğer rutin çalışmalara göre oldukça az ve degrade olabilmektedir. DNA miktarının sınırlı olduğu durumlarda tek bir hücreden identifikasyona olanak sağlayan yeni nesil DNA analiz teknikleri, adli olayların çözülmesinde büyük olanak sağlamaktadır [11]. DNA'nın bir zanlının suçluluğunu veya suçsuzluğunu ispatlamadaki önemi, olay yerinde veya bir nesne üzerine transfer edilen DNA'nın, laboratuvar şartlarında izolasyonu sonucu elde edilen miktarına ve kalitesine bağlıdır. Çalışmanın bu aşaması söz konusu durumlarda sorunları giderebilecek ve belge sahteciliği olayları ile bağlantılı birincil delillerin desteklenmesinde güçlü bir alternatif sistem olacaktır. Bu sebeple çalışmanın ikincil amacı ise; dokunma yolu ile belge yüzeyine transfer edilen epitel hücrelerden DNA elde edebilmek ve elde edilen DNA'nın kalitesini ve miktarını belirleyebilecek, sistem validasyonu yapılabilecek ve rutine kazandırılabilen bir yöntem geliştirilerek adli belge üzerinde kimliklendirme yapabilmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Belgenin Tanımı ve Adli Belge İnceleme

Bir olgu veya savın doğruluğunu gösteren, bir olayın kanıtlanmasını sağlayacak bir anlam veya bilgi içeren yazılı kanıtlar “belge” olarak tanımlanmakla birlikte insanlar arasındaki ilişkilerin hukuki açıdan geçerli kılınmasında belgelere ihtiyaç duyulmaktadır [12-14]. Yazı içeren bir nesnenin belge olarak tanımlanabilmesi için; hukuki sonuç doğurabilecek hukuki değer taşıyan anlaşılabilir bir içeriğe sahip olması, yazılı olması, imza içermesi, taşınabilir bir nesnenin üzerine yazılması, düzenleyenin belli olması, içeriğinin yazıldığı nesnenin zamana ve dış etkilere karşı dayanıklılığının ve sürekliliğinin olması gibi niteliklerinin bulunması gerekmektedir [15]. Bu nedenle “belgede sahtecilik” en sık karşılaşılan suç türlerinden birisidir. TCK 5237 sayılı kanunda belirtildiği şekilde işlenen herhangi bir suç nedeniyle verilecek ceza yönünden belgeler resmi belge, özel belge ve resmi belge hükmünde belgeler olmak üzere üç farklı alt sınıfa ayrılmaktadır.

Adli belge inceleme kavramı, yazı ve imzaların çeşitli inceleme yöntemleri ile kimliklendirilerek belgeler üzerinde yapılan sahteciliklerin tespit edilmesine yönelik yapılan tüm çalışma faaliyetlerini ve belgeyi oluşturan mürekkep, kağıt, kalem gibi yazı yazma araçlarının incelendiği araştırmaları ifade etmektedir [12,16]. Sahtecilikte asıl amaç bir şeyin gerçekmiş gibi gösterilmeye çalışılmasıdır. Bütünü ile yapılan sahtecilik, kısmen yapılan sahtecilik, ekleme, silme/kazıma, sürşarj (değiştirme), lekeleme, ısıtma (yakma)-eskitme şeklinde belgelerdeki yazılar üzerinde; üstten kopya yöntemi, bakarak kopya yöntemi, imza (yazı) transferi yöntemi ve inkar kastıyla imza atma yöntemi şeklinde imzada sahtecilik yöntemleri uygulanmaktadır [15].

Belge incelemede en sık sorulan sorulardan birisi mevcut yazının/imzanın kimin el ürünü, belgenin hangi tarihte yazıldığı, belgedeki bazı bölümlerin yazılma tarihlerinin aynı zamanda olup olmadığı ya da aynı kalemle yazılıp yazılmadığıdır. Grafoloji alanında deneyimli olan uzmanlar yazıyı ve metni detaylı incelediklerinde bu soruların ilkine cevap verebilirken diğer sorulara cevap verebilmek için analitik yöntemler kullanarak kağıt ve mürekkebin yapısının incelenmesi gerekmektedir. Mitchell ile 1904 yılında başlayan belge kimyası ve mürekkep inceleme çalışmaları günümüzde gelişen teknolojinin de etkisi ile hızla devam etmektedir [3,17]. Mürekkep analizleri, doküman inceleme alanında belgenin düzenlenme zamanı ile belgeye sonradan yapılan ilavelerin anlaşılmasını sağlayarak, adli süreçte mürekkebe bağlı pek çok hukuksal problemin çözülmesini sağlamaktadır.

2.2. Belgeyi Oluşturan Öğeler

Belgeler; kağıt, mürekkep ve kalem gibi modern yazı yazma araçları olmak üzere genel olarak bu üç temel unsurdan oluşmaktadır [12].

2.2.1. Kağıt

İnsanoğlunun M.Ö. 3500'den beri ilk yazma aracına adını veren kâğıt kelimesi papirüs bitkisinden ileri gelmekte olup; kumaş, ot veya odun gibi bitki liflerinin sulandırılması ile elde edilen selüloz hamurunun ince bir süzgeç üzerinde oluşturduğu keçe olarak tanımlanmaktadır [4,18]. Çoğunlukla yazının yazıldığı bir malzeme olarak kullanılan kağıt bunun dışında ambalaj, baskı yada çizim amacıyla da kullanılabilir.

2.2.1.1. Kağıdın Tarihçesi

Günümüzde kullanılan kağıt türü bitki liflerinden yararlanılarak üretilmektedir. Tarihte bildiğimiz anlamda üretilen ilk kağıt, M.S. 105 yılında Çin'de yaşayan Tsai Lun tarafından icat edilmiştir. Tablo 2.1'de kağıt üretimindeki tarihi süreç görülmektedir [19].

Tablo 2.1. Tarihte kağıdın keşfi ve kağıt üretimi [20,21]

Yıl	Kağıt Üretimi ve Kağıdın Tarihsel Gelişimi
M.Ö. 3500	Mısırlılar tarafından Nil nehri boyunca yetişen papirüs bitkisinden kağıt üretimi
M.Ö. 1000	Ortadoğu Asya da sığır derisinden yapılan parşömen
M.S. 105	Çin de bugünkü anlamda bitki liflerinden bildiğimiz kağıt üretimi
M.S. 751	Araplar tarafından kağıt üretilmeye başlanması
14. yy	Almanya da ilk kağıt fabrikalarının açılması
1151	İspanya da kağıt üretimi
1411	İsviçre de kağıt üretimi
1494	İngiltere de kağıt üretimi
1600	Amerika da kağıt üretimi
19. yy	Kağıt üretiminde odun reçinesinin fiber olarak kullanılması

2.2.1.2. Kağıdın Kimyasal ve Fiziksel Yapısı

Kağıdın hammaddesini kağıt hamuru, selüloz ya da bitkisel kökenli selüloz lifleri oluşturmaktadır. İlk dönemlerde selüloz olarak kullanılan pamuğun pahalı olması, odun, çavdar, buğday gibi selüloz bakımından zengin bitkilerin ve üretilen yapay selülozun kullanımını zorunlu hale getirmiştir [22]. Kağıt hamuru üretiminde kullanılan mekanik yöntem ile genellikle gazete veya saman kağıdı gibi düşük kalitede kağıt üretilmektedir [18]. İstenmeyen maddelerin uzaklaştırılmasında ve daha saf/temiz hamur elde edilmesinde kimyasal ajanların kullanıldığı kimyasal (pişirme) yöntem ile daha kaliteli kağıtlar elde edebilmek için kağıt hamurlarına dövme işlemi uygulanmaktadır. Dövme işlemi sırasında hamura katılan dolgu maddeleri kağıdın mürekkep emme kabiliyetini daha da arttırmak için eklenmektedir. Kağıt üretiminde temel olarak kullanılan su ve odun hamuru yanında, kağıda istenen özellikleri kazandırmak için çeşitli yardımcı maddeler kullanılmaktadır. Bu yardımcı maddeler kağıt üzerine tatbik edilen mürekkebin dağılmasını önlemede önemli rol oynamaktadırlar. Her kağıt üreticisinin kağıt üretim formülü farklı ve gizli olmakla birlikte genel olarak Tablo 2.2’de kullanılan yardımcı maddeler kağıt üretiminde kullanılmaktadır.

Tablo 2.2.Kağıt üretiminde kullanılan yardımcı kimyasal maddeler ve kullanım amacı [18]

Kullanım Amacı	Kimyasal Madde
Kaolin, titanyum dioksit, talk, sodyum bikarbonat, kalsiyum karbonat	Dolgu maddesi, kaplama maddesi
Kolofan, mumlar	Yapıştırma maddesi
Kalsit, kaolin	Kuşe kağıt yapımında
Asit boyalar, bazik boyalar	Boyar maddesi
Ozon, klor dioksit, hidrojen peroksit	Ağartma işlemi
Alum/reçine ölçüsü, alkil keten dimerler, alkenil susinik anhidrit	Boyut ajanları
Katyonik nişasta, tutkal, poliakrilamidler	Kuruluğa dayanım ajanları
Üre formaldehit, melamin formaldehit ve poliamin reçineleri	Neme dayanım ajanları

Kağıt üretiminde kullanılan hem fiziksel (fiber dağılım şekli) hem de kimyasal katkı maddelerinin çeşitliliği sebebi ile kağıt yüzeyi çok karmaşık bir yapıya sahiptir [4]. Kağıdın fiziksel özelliği; kağıt hamurunun lif kaynağına ve kağıt üretimi sırasında mekanik veya

kimyasal yöntemin kullanılıp kullanılmamasına bağlı olarak bir çok parametreden etkilenmektedir. Genel olarak kağıdın yapısal (fiziksel) özellikler grubuna dahil olanlar; kağıdın ağırlığı (gramajı), kalınlığı, yoğunluğu, Cobb değeri (birim zamanda 1 m² kağıt yüzeyi tarafından emilen su miktarının g/m² cinsinden ifadesi), nemi, yüzey düzgünlüğü, porozite değerleri (birim zamanda kağıt yüzeyinden geçen hava miktarının mL/dk cinsinden ifadesi), dayanırlılığı gibi faktörlerdir ve bu faktörler mürekkebin kağıda geçişini önemli ölçüde etkileyen parametrelerdir [4,18]. Kağıdı oluşturan selülozun beyazlık derecesi, kağıt hamuru içerisindeki dolgu maddesi gibi beyaz pigmentlerin veya boya maddelerinin varlığı, içeriğindeki reçine veya nişasta gibi maddelerin miktarı; kağıda gelen ışığın kağıt tarafından geçirilme, absorbe edilme ve yansıtılma gibi optik özelliklerini etkilemektedir. .

2.2.2. Yazı Yazma Aracı Olarak Kalem

Parmak ve çividen sonra yazı yazma aracı olarak kamış fırçalar, şimşir veya metal levhalar, kuş tüyleri kullanılmış daha sonraları fildişi, mürekkepli dolma kalem, kurşun ve tükenmez kalem geliştirilerek bugün bildiğimiz anlamda modern kalem üretilmiştir [2]. Modern yazım gereçlerinin tarihsel açıdan piyasaya çıkışına bakacak olursak sırasıyla [2,4];

- Yağ bazlı mürekkep içeren tükenmez kalem 1945 yılında,
- Glikol çözeltili mürekkepler 1950 yılında,
- Bakır ftalosiyanın içeren yeni boyalı mürekkepler 1955 yılında,
- Su bazlı mürekkep içeren keçeli kalem ve silinebilir kalem 1963 yılında,
- Su bazlı mürekkep içeren roller kalem 1967 yılında,
- Basıncı tükenmez kalem mürekkepleri 1968 yılında (Bu kalemlerde yerçekimiyle akışın aksine mürekkep akışı basınçla sağlanmaktadır)
- Su bazlı mürekkep içeren forforlu marker kalem 1970 yılında,
- Su bazlı mürekkep içeren jel mürekkepli kalem 1984 yılında geliştirilerek piyasa da satışa sunulmuşlardır.

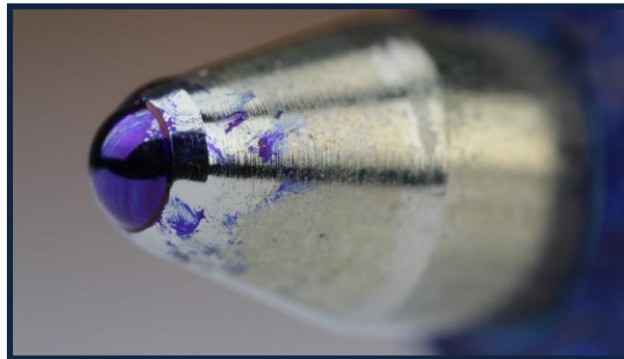
Şüpheli adli bir belge üzerinde bulunan yazının yazıldığı kalemin tespiti için yapılan kalem incelemelerinde, kalemleri mürekkep yapılarına göre tükenmez kalem ve tükenmez kalem olmayan kalem olarak ikiye ayırmak mümkündür [13,23]. Tükenmez kalem mürekkeplerinin içerdikleri boyar madde veya pigmentler yağ bazlı; dolma kalem, jel kalem,

marker kalem ve roller kalem vb. kalemlerin içerdikleri boyar madde ve pigmentler su veya jel bazlıdır.

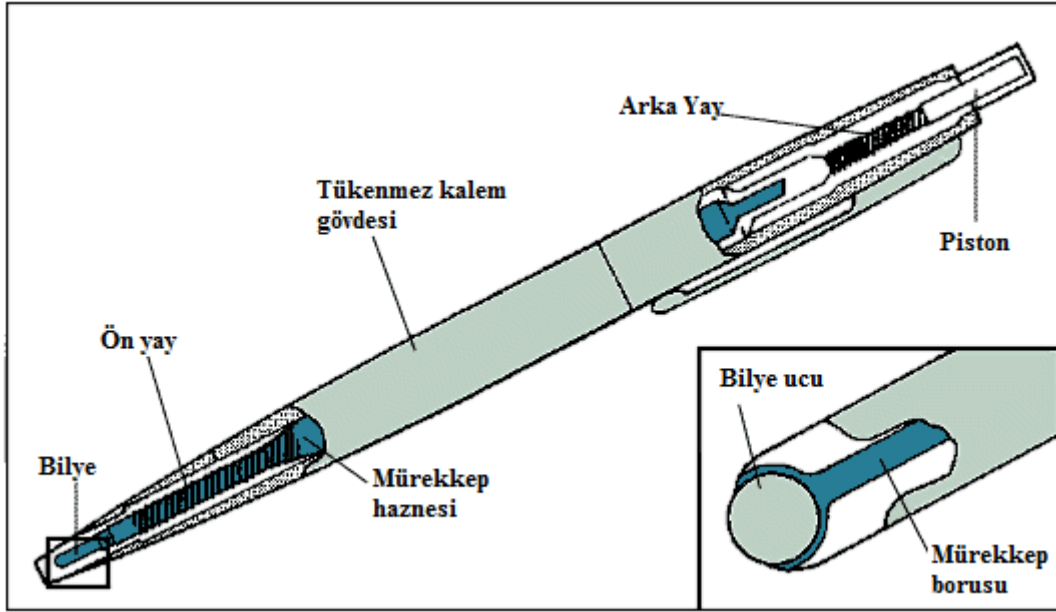
Günlük hayatta, kullanım kolaylığı ve ucuz olması sebebi ile özellikle siyah, mavi ve kırmızı renkli mürekkep içeren tükenmez kalem çeşitleri kullanılmaktadır. M. Calcerrada ve ark.'nın 2015 yılında yayınladıkları bir araştırmada dünya genelinde adli belge inceleme çalışmalarının özellikle tükenmez kalem mürekkebi üzerine yoğunlaştığı ifade edilmektedir [23]. Adli dosyalarda belge inceleme uzmanlarının karşılaştığı kalem tipleri arasında yaygın olarak tükenmez kalemlerin kullanıldığı çeşitli çalışmalarda ifade edilmiştir [24].

2.2.2.1. Tükenmez Kalemlerin Yapısı

Tek kullanımlık olanlar ve tekrar doldurulabilenler olmak üzere iki çeşidi bulunan tükenmez kalemler gövde, bilye uç (Şekil 2.1) ve mürekkep haznesi olmak üzere 3 ana parçadan oluşmaktadır (Şekil 2.2) [19,25]. 1950 yılı öncesinde piyasada bulunan tükenmez kalem mürekkeplerinde yağ bazlı çözücüler kullanılırken 1950 yılı itibari ile tükenmez kalem mürekkeplerinde glikol bazlı çözücüler, 1954 yılından sonra ise bakır ftalosiyanın gibi şellatlı boyalar kullanılmıştır [3]. Tükenmez kalemin çalışma mekanizmasına bakacak olursak; mürekkep dolu bir tüpün ucuna monte edilmiş bilye, yuvası içinde dönerken, kağıt ile temas eden kısmı mürekkebi kağıt üzerine aktarmakta diğer tarafı ise mürekkep haznesinden takviye yapmaktadır. Mürekkep bileşiminde bulunan yağlı asitler bilye ucunda adeta yağ görevi görmekte ve yazı ilk yazıldığında yuvarlak ucu özelliklerinin iyileştirilmesine olanak vermektedir.



Şekil 2.1. Tükenmez kalem bilye ucu ve mürekkebin bilyedeki görünümü [26]



Şekil 2.2. Standart bir tükenmez kalemın kısımları [27]

Mürekkep haznesi nitrojen veya diğer etkisiz gazların basıncı altında olan “basıncılı tükenmez kalemler” de mürekkep yapısı diğer tükenmez kalemlerin yapısına benzemekle birlikte mürekkep, soket içindeki yuvarlak uç dönerek temas etmedikçe sıvı halde değildir [28].

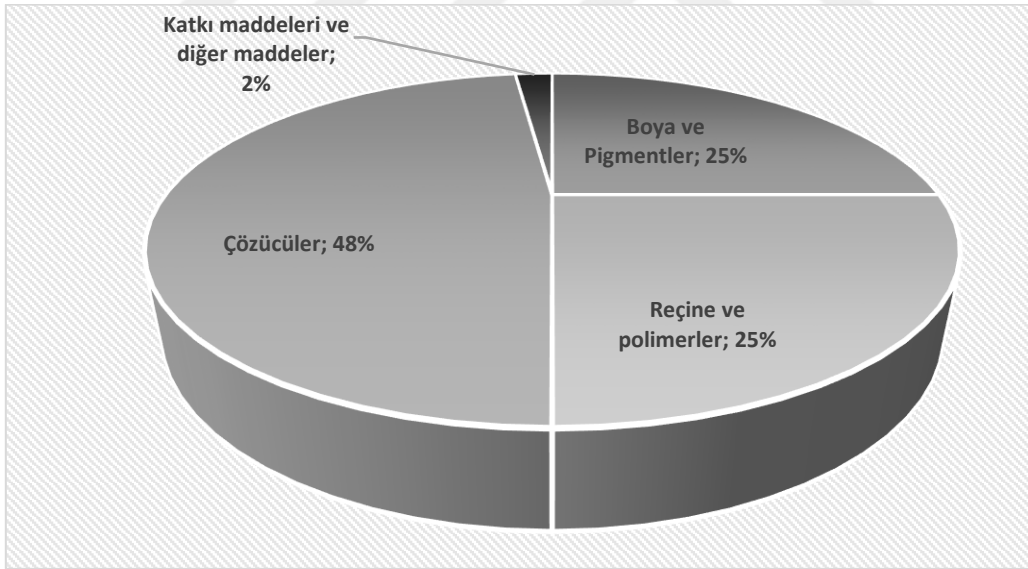
2.2.3. Mürekkep

Mürekkep, yazı ve baskı amacıyla kullanılan ve formülasyonu üreticiler tarafından gizli tutulan kimyasal bir bileşimdir [29]. Modern yazı araçlarında karbon hint mürekkepleri, dolmakalem mürekkepleri, tükenmez kalem mürekkepleri, döner yuvarlak uçlu marker mürekkepleri, keçeli veya delik uçlu kalem mürekkepleri ve jel kalem mürekkepleri gibi birçok farklı mürekkep kullanılmaktadır. Günümüz piyasasında çeşitli birçok markanın farklı mürekkep formülleri bulunmakla birlikte temelde her bir mürekkep, renk veren katı bir madde (boya veya pigment) ile bu boya veya pigmentin karıştırıldığı bağlayıcı veya eritici bir akışkandan (reçine) ve organik çözücüler ile mürekkep reçetelerinde diğer katkı maddeleri olarak adlandırılan yüzey aktif ajanlar, akışkanlık düzenleyiciler, mikrobiyolojik üremeyi önleyen katkılar, pH ayarlayıcılar ve tamponlardan oluşmaktadır. Tükenmez kalem mürekkepleri formülasyonları, üreticileri tarafından gizli tutulur ve bu mürekkepler suda az çözünürler ya da hiç çözünmezler. Mürekkeplerin fizikokimyasal ve analitik yöntemlerle incelenmesi sonucu iki farklı yazının aynı mürekkeple yazılıp yazılmadığı tespit

edilebilmektedir [30]. Mürekkep muhteviyatında bulunan maddelerin bilinmesi demek, bunların analizinde hangi yöntemin kullanılacağını belirlemeyi de sağlamaktadır.

2.2.3.1. Tükenmez Kalem Mürekkebinin Yapısı ve Bileşenleri

Tükenmez kalem mürekkepleri; benzil alkol içindeki çeşitli sentetik boyalar ve pigmentler, çözücüler, reçineler, polimerler ve diğer katkı maddeler (Şekil 2.3.) gibi farklı bileşenlerden oluşur [31]. Tamponlar, yağlı asitler (oleik asit en yaygındır), kalemin tıkanmasını önleyen katkılar, pH ayarlayıcılar, mikrobiyolojik üremeyi önleyen katkılar, korozyon önleyiciler ve kayganlaştırıcılar mürekkebin özelliklerini geliştirmek için mürekkebe eklenen katkı maddeleridir [2,4]. Tükenmez kalem mürekkepleri viskoz bir yapıya sahip olmakla birlikte, suda az çözünürler veya hiç çözünmezler. İçeriğindeki bileşenler üreticiden üreticiye değişmekle birlikte her marka mürekkepte farklı miktarlarda (özellikle diğer katkı maddeleri) bulunmaktadır ve bu da tükenmez kalem mürekkeplerinin kimliklendirilmesini zorlaştırmaktadır. Boyar madde muhteviyatı; sülfonik, karboksilik, fenolik ve nadiren amino fonksiyonel gruplarını içerdiğinden ışığa çok duyarlıdır ve yavaşça doğal koşullarda ya da çevresel faktörlerin de etkisi ile ayrışır [32].



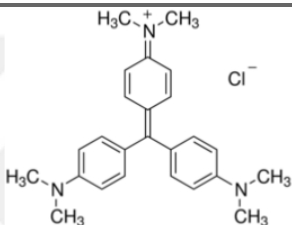
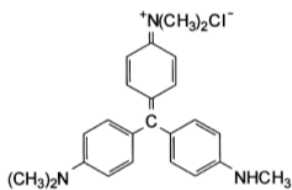
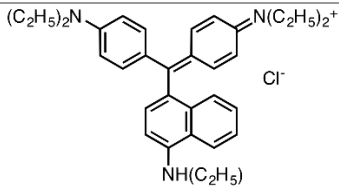
Şekil 2.3. Tükenmez kalem mürekkebi bileşenlerinin toplam hacim içindeki yüzdeleri [33,34]

2.2.3.1.1. Boyar Maddeler ve Pigmentler

Tükenmez kalem mürekkeplerinde doğal (inorganik veya organik kaynaklı) veya sentetik boyalar kullanılmaktadır. Maliyet açısından kullanım alanları kısıtlı olan inorganik boyalar sentetik ve organik boyaların aksine ışığa karşı değişim göstermeyip ışığa karşı

kararlı ve dayanıklı bir yapı sergilemektedirler [12,35]. Piyasada bulunan ve günlük hayatta kullanılan tükenmez kalem mürekkepleri maliyeti düşük, dayanıklılığı ve renk kalıcılığı yüksek bazik boyalar içermekte, boyar madde olarak kristal viyole, metil viyole ve viktorya mavisi türevi pigmentler kullanılmaktadır (Tablo 2.3) Bu pigmentler, suda çözünmezler ve genelde substrata ilgileri yoktur. Moleküler formülde sabit ya da değişken yükü taşıyan atom ise genellikle azottur [2-4].

Tablo 2.3. Tükenmez kalem mürekkeplerinde kullanılan boyar maddeler [4-36]

Boyarmadde	Molekül Formülü	Yapısal Formülü
Kristal Viyole	$C_{25}H_{30}ClN_3$	
Metil Viyole	$C_{24}H_{28}ClN_3$	
Viktorya Mavisi	$C_{33}H_{40}ClN_3$	

a) *Kristal Viyole*: IUPAC numarası tris (4-(dimetilamino)fenil)metilium klorid olan ve katyonik trifenilmetan boya grubuna dahil olan *kristal viyolenin* (CV, heksametil pararosanilin) molekül ağırlığı 407,98 g/mol, erime noktası ~205 °C ve absorpsiyonu 590 nm'dir. Su, aseton, kloroform, eter, etanol ve ksilen gibi çözücülerde çözünmezken metanolde iyi çözünmektedir. Bazik ortamda koyu mor, asidik ortamda sarı-kahverengi bir renge sahip olan kristal viyole [37], tükenmez kalemde, tekstilde kumaş boyamalarında, ressamların kullandığı boyalarda ve mikrobiyolojide bakteri boyamasında yaygın olarak kullanılmaktadır [38]. Işık etkisi altında kararsız yapıdadır.

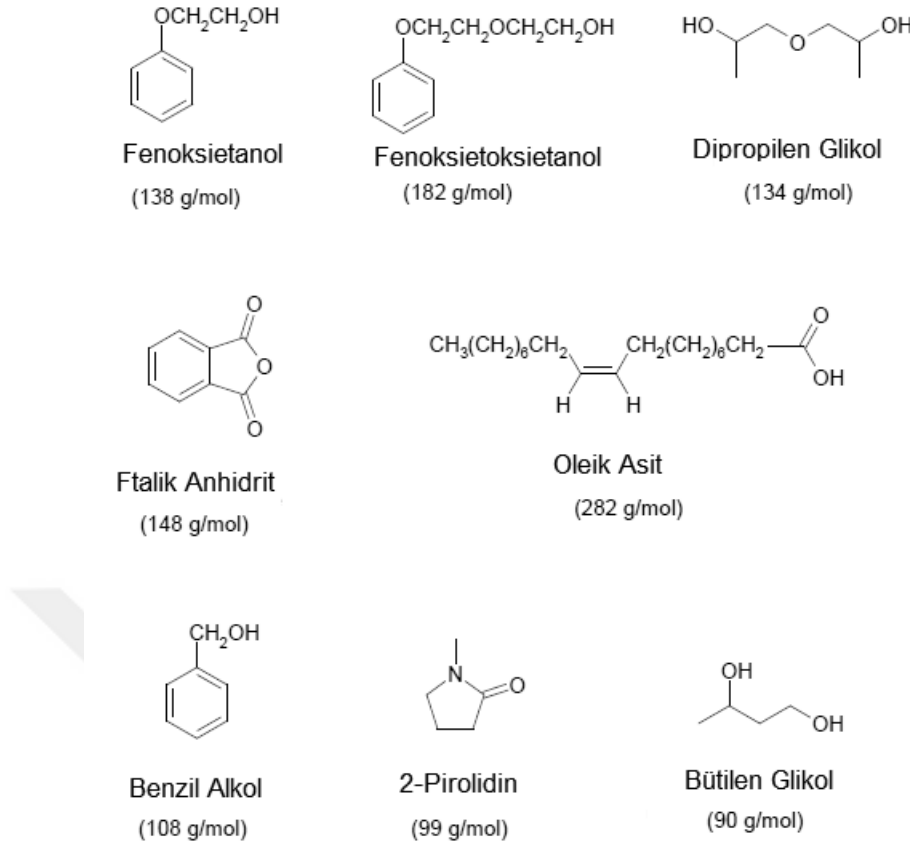
b) *Metil Viyole*: Tetra metil, penta metil ve hekza metil pararosanilin karışımlarından oluşan [39], trifenil metan kimyasal boya sınıfına dahil olan metil viyole (MV)'nin molekül ağırlığı 393,95 g/mol ve erime noktası ~137 °C'dir [7]. Suda, etanol ve metanolde iyi çözünmekle birlikte ksilende çözünmeyen metil viyole, bazik ortamda koyu mor-mavi ve asidik ortamda sarı-kahverengi renk göstermektedir. Işık etkisi altında kararsız yapıdadır.

c) *Viktorya Mavisi*: Molekül ağırlığı 506.09 g/mol olan viktorya mavisini (VB) trifenilmetan kimyasal boya sınıfına dahildir [40]. Suda az çözünüp etanol de ise hiç çözünmeyen viktorya mavisinin erime noktası yaklaşık ~206 °C'dir. Tüm bazik ve sentetik boyalar arasında en fazla floresan gösteren ve en parlak yapıya sahip olan viktorya mavisinin absorpsiyon dalga boyu 600 nm'dir ve koyu mavi bir renge sahiptir.

Gözlü görülür bir şekilde belgelerin ve tablo resimlerin üzerindeki boyaların bir süre sonra rengini kaybetmeye başlaması çoğu bazik ve sentetik boyada olduğu gibi bu boyar maddelerin (CV, MV, ve VB) fazla floresan göstermesi ve parlak yapıya sahip olmasının aksine ışığa karşı aşırı hassas olduğunu ve hızlıca solduklarını göstermektedir [7]. Bu renk değişimlerinin mürekkebin saflığına veya içerdiği kirliliğe, yazı hattındaki mürekkep miktarının az oluşuna veya yoğunluğuna, yazılan kağıdın emici özelliklerine, ışık, ısı, hava dolaşımı, nem ve yabancı kimyasallarla yapılmış ikincil uygulamalara, bilinçli olarak belgenin ışığa maruz bırakılması gibi pek çok değişken koşula bağlıdır.

2.2.3.1.2. Çözücüler

Tükenmez kalem mürekkeplerinde renklendiricinin çözünmesinde, reçinenin ve renklendiricinin kağıda tatbikinin seyreltilmesinde, mürekkebin akıcı bir kıvamda olmasında, mürekkebin mürekkep haznesinden kağıt üzerine tatbik edilmesinde ve tatbik edildikten sonra hızlıca kurummasını sağlamada glikol bazlı çözücüler (genellikle alkoller ve etilen glikole çeşitli alkil grupların bağlanmasıyla oluşan eter) kullanılmaktadır [2,34]. Kullanılan çözücülere benzil alkol, dietil glikol fenil eter, etilen glikol, heksilen glikol, mono fenil eter, etilen ve dietilen glikol, 1,3 bütillen glikol, benzil alkol, dipropilen glikol, mono metil eter, fenoksietanol, fenoksietoksietanol, bütillen glikol, ftalik anhidrit, oleik asit, 2-pirolidin vb. kimyasal çözücüler örnek verilebilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Tükenmez kalem mürekkeplerinde kullanılan bazı çözücüler [9]

2.2.3.1.3. Reçineler

Monomerlerin polimerizasyonu ile elde edilen ve moleküler ağırlığı fazla olan reçineler, mürekkebin kağıt yüzeyine akışını ayarlamak için tükenmez kalem mürekkeplerine eklenmektedirler [3]. Mürekkebin kağıt üzerine tatbik edildikten sonra kuruma aşamasında polimerleşerek mürekkebin kağıda tutunmasını reçine sağlamaktadır. Mürekkep bileşeni olarak kullanılan ve doğal veya sentetik yoldan temin edilen reçineler temel olarak keton, asetofenon formaldehit, sülfamid, ksilen, sikloheksanon formaldehit, rosin gibi doğal reçineler, fenol formaldehit, çeşitli alkid polimerler, ftalik anhidrit, yağ asitleri, diols gibi alkoller, gliserol, trimetiloetan ve pentaeritritoldür [24]. Reçineler, suda çözünmezken mürekkep muhteviyatında bulunan organik çözücüler içerisinde çözünmektedirler.

2.2.3.1.4. Diğer Katkı Maddeleri

Mürekkebe; bozunmayı engelleyici koruyucular, tükenmez kalem ucundaki bilyenin rahat hareket etmesini sağlamak için kullanılan oleik asit gibi yağlayıcı maddeler [3],

mikrobiyal üremeye karşı kullanılan biyositler, yüzey aktif maddeler, korozyon önleyiciler ve mürekkep içerisinde suda çözünen polimerik yapıyı stabilize etmek için ek bileşenler [4], pH ayarlayıcılar, tamponlar ve kalemin tıkanmasını önleyen diğer katkı maddeleri adı altında çeşitli maddeler eklenmektedir [41]. Bunların dışında üreticiler mürekkebe, 1) yıllar boyu hiç değişmeyen ve 2) her yıl değişen, ne olduğu ve ne oranda olduğu sadece üretici tarafından bilinen iki kimyasal marker (işaret) katmaktadırlar [12]. Bu işaretler genellikle nadir toprak elementlerinden oluşmakla birlikte ne oranda katıldığı üretici tarafından gizli tutulmaktadır.

2.3. Adli Belge İnceleme Açısından Mürekkep Analizi

Mürekkepler de kullanılan “kapalı sistem” kavramı yazma aracının mürekkep haznesi içindeki mürekkebi; “açık sistem” ise kağıt yüzeyine uygulanmış hava, ışık, nem vb. gibi dış etkenlere maruz kalan mürekkebi tanımlamaktadır [15]. Işık, ısı, hava sirkülasyonu, nem, yabancı kimyasallar, sıcaklık, komşu materyaller gibi saklama koşulları; gözenek büyüklüğü, pH, kaplama gibi kağıt özellikleri; çözücüler, boyalar, reçineler ve diğer katkılar gibi mürekkep bileşimini oluşturan maddelerin mürekkebin solması üzerine etkisi bulunmaktadır [42,43]. Mürekkebi oluşturan bileşenlerin zaman içindeki fizikokimyasal değişimlerinin analizleri yapılarak belgenin hangi tarihte oluşturulduğu sorusuna yanıt verilebilmektedir. Literatürde bu analizlerin yorumlanmasında üç temel yaklaşım dikkati çekmektedir:

a) Statik Yaklaşım

Hazne içinde bulunan mürekkebin hiç değişime uğramadığı veya çok az değişime uğradığı genel kabul gören bir görüştür [44]. Statik yaklaşım ise hazne dışında bulunan mürekkebin çevresel etkenlerle değişim göstermeyen bileşenlerini (işaretler vb.) inceleyen ve açık sistemler için tanımlanan bir yaklaşımdır. Diğer bir ifade ile mürekkebin zamanla değişmeyen bileşenlerine ve mürekkebin üretim yılına odaklanmaktadır. Statik yaklaşım; mukayese edilen iki mürekkebin birbirinden farkının bulunmasını, mürekkebin kaynağının bir veri tabanından elde edilmesini, mürekkebin ilk piyasaya sunulduğu zamanın belirlenmesini, mürekkebin gerçek veya sahte olduğunun tespitini sağlamaktadır.

b) Mutlak Dinamik Yaklaşım

Kağıda uygulanan ve hava, ışık, nem gibi dış etkenlere maruz kalan mürekkep bileşenlerinin analiz sonucunu yorumlamak için kullanılan bir yaklaşımdır. Mürekkep bileşenleri dış etkenlere maruz kalınca; renklendiricilerin bozunmaya (boyaların solmaya), reçinelerin polimerleşip sertleşmeye (tespit) ve çözücülerin buharlaşıp uçmaya (kurumaya)

başlaması gibi bazı fiziko-kimyasal prosesler meydana gelmektedir. Analitik açıdan bunların analizleri yapılarak belge üzerine yazılan mürekkebin hangi tarihte yazıldığına dair yaklaşık bir bilgi verilebilir. Bu bilginin verilebilmesi için mürekkep bileşimi ile kağıdın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ve saklama koşullarının bilinmesi gerekmektedir [42,45].

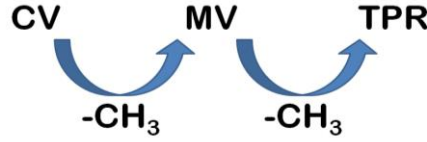
c) Bağlı Dinamik Yaklaşım

Birden çok yazılan yazının tarihinin kronolojik olarak kıyaslanması istendiği durumlarda kullanılabilecek bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım, aynı saklama koşullarında saklanan, aynı kağıt yüzeye yazılmış ve aynı formülasyona sahip mürekkep yazıları ile oluşturulan belgeler arasındaki tek farkın yazılma zamanı olduğu durumlarda kullanılabilmektedir [42].

2.3.1. Mürekkep Boyar Maddelerinin (Pigmentlerin) Solması

Yaygın olarak tükenmez kalem mürekkeplerinde kullanılan triarilmetan boyaların tipik olarak parçalanması demetilasyon ile mümkün olmaktadır. Bu demetilasyon yani solma, kağıt imalatında yaygın olarak kullanılan bir bileşik olan titanyum dioksitin varlığında hızlanan fotokatalize bir olaydır [46].

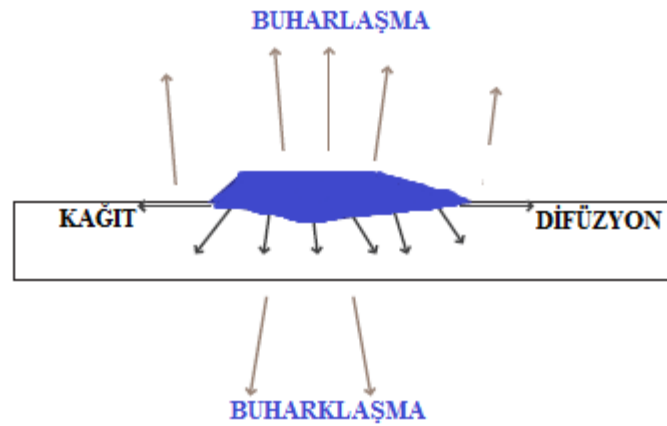
Mürekkep boyar maddelerinden kristal viyole, metil viyole ve tetrametilpararosanilin mavi ve siyah tükenmez kalemlerde ortak bulunurken viktorya mavisi boyar maddesi ise sıklıkla mavi tükenmez kalemlerde bulunmaktadır [25]. Metilen mavisi ailesinden olan kristal viyole ve metil viyole boya ları ışığa maruz bırakıldıklarında kararsız yapı sergileyerek ve metil gruplarını kaybederek Şekil 2.5'teki tepkimede gösterildiği gibi solarlar ve bu solma sonucunda yazının rengi açılmaktadır. Bu solma tepkimesinde ayrılan metil grupları ($-CH_3$) yerine hidrojen bağlanması ile kristal viyole (CV) metil viyoleye, metil viyole (MV) de tetrametilpararosaniline (TPR) dönüşür. Maruz kalınan ışığın şiddeti ve süresi, ortamdaki oksijenin varlığı, kağıdın fiziksel ve kimyasal özelliği (yüzey özelliği, kağıdın gözenek yapısı ve kağıdın içerisinde kalan çözücü miktarı) gibi faktörler ışığa bağlı solmayı önemli ölçüde etkilemektedirler. Bu faktörlere bağlı olarak solma tepkimesinin hızı değişmekle birlikte; kuvvetli mor ötesi ışık altında hızlı, normal ışıktaki daha yavaş ve ışıksız karanlığa yakın ortamda solma en yavaştır [6,47]. Viktorya mavisi ise daha kararlı yapıda olup maruz kalınan ışığın şiddetine göre zamanla bir metil grubu kaybedip fotodegradasyon ürünü VB- CH_3 molekülüne dönüşebilmektedir.



Şekil 2.5. Metil viyole ailesinden tükenmez kalem mürekkep boyar maddelerinin N-demetilasyon sonucu solması

2.3.2. Çözücünün Buharlaşması

Mürekkep muhteviyatında bulunan çözücülerin işlevi mürekkepte bulunan bileşenleri çözerek homojen bir dağılım oluşturmak ve boyar maddeleri ile reçineyi kalemin haznesinden kağıda taşımaktır [2,48]. Mürekkep kağıda tatbik edildikten sonra çözücü molekülleri buharlaşır, kağıdın içine göçerek yayılır ve kağıt tarafından adsorbe edilerek zamanla çözücülerin kuruma süreci gerçekleşmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kağıt üzerine tatbik edilen mürekkebin kuruma süreci [42]

Çözücü analizinde; mürekkep kağıda uygulandığı andan itibaren değişik zamanlarda alınan örneklerin analizlenmesi ile elde edilen değerlerin aşağıda belirtilen eşitlikte yerine konması ile 2 yıla kadar mürekkep yaş tayini yapılabilmektedir [48, 49]. Bu eşitlikte; y : çözücünün zamanla azalma miktarı, m_0 :değişmez bir sabit, m_f :hızlı buharlaşan kısmın kütlesi, m_s : yavaş buharlaşan kısmın kütlesi, t_f :hızlı buharlaşmanın zamanı, t_s :yavaş buharlaşmanın zamanını ifade etmektedir.

$$y(t) = m_0 + m_f e^{-(t/t_f)^{1/2}} + m_s e^{-(t/t_s)^{1/2}}$$

Dr. Atakan Avcı ve arkadaşları tarafından 1990'lı yılların sonunda geliştirilerek literatüre kazandırılan "Mürekkep Çözücüsünün Buharlaşmasının Termodinamiği" isimle çalışma ile geliştirilen denklemde uçucu olmayan çözücülerden uçucu olan çözücülerin buharlaşmasının zamana bağlı değişimini göstermektedir [50] 2012 yılında belge inceleme konusunda otorite sahibi Amerikalı Antonio Cantu bu denklemde uçucu olmayan çözücünün yerine kağıdın selüloz yapısı ve uçucu çözücü olarakta mürekkebin çözücüsü olan fenoksietanolün konması durumunda pratikte çözücülerin analizine bağlı mürekkep yaş tayininde geçerli matematiksel eşitlik olarak kabul edilebileceğini literatürde belirtmiştir [51]. Mavi ve siyah tükenmez kalemelerde mürekkep yapısında çoğunlukla 2-fenoksietanol (PE) kullanılmaktadır.

2.3.3. Reçinelerin Polimerleşmesi ve Sertleşmesi

Mürekkep yaş tayininde reçinelerin incelenmesi ilk defa Dieter Kirsch tarafından yapılmış ve kullandığı metod hali hazırda önemli yaş tayini yöntemlerinden birisi olarak dünyada kabul edilmektedir [12,52]. Mürekkep kağıda tatbik edildikten hemen sonra muhteviyatında bulunan reçine katılaşp sertleşmekte ve moleküllerin çapraz bağlanarak birbirine yakınlaşmasını sağlayan karmaşık bir fizikokimyasal olaylar sonucunda polimerleşmeye başlamaktadır. Reçinelerin sertleşmesi ile çözünürlükleri ortadan kalkmakta ve buna bağlı olarak da renklendiriciler ve çözücüler, oluşturulan ağın içinde hapsolarak koruma altına alınmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar zamana bağlı bu polimerleşmenin hızlı olduğunu ve 8 ila 24 ay arasında tamamlandığını göstermektedir [2,53]. Literatürde geliştirilen ileri analitik tekniklerle, belge sahteciliği alanında reçinelerin kullanılması ile aynı kalemde farklı zamanlarda çıkan yazıların oluşturulma tarihi ve aynı veya farklı belgeler üzerindeki tükenmez kalemler arasındaki fark tespit edilebilmektedir [54].

2.3.4. Markerların (İşaretlerin) Analizi

Mürekkep muhteviyatına konulan markerlar (işaretler) , İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) veya Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi (AAS) cihazları ile belgeye zarar vermeden belirlenerek mürekkep karşılaştırmaları yapılabilir. Mürekkep muhteviyatına konan işaretinlerin (genelde nadir toprak elementi konulur) konulduğu yıl bildirilmiş ise veya kayıtlarda var ise belgenin oluşturulma yaşı tespit edilebilir [15].

2.4. Yazının Oluşturulduğu Zamanın Tespitinde Mürekkep Yapı Tayinin Kullanımı

Mürekkep yapı ve yaş tayinin değerlendirilmesinde boyaların solması, çözücülerin buharlaşması, reçinelerin polimerleşmesi olmak üzere üç temel yaklaşım kullanılmaktadır [2]. Aynı veya farklı belge üzerindeki yazılar aynı veya benzer kağıtlara yazılmışsa ve benzer saklama koşullarında saklanmışsa, kıyaslama yapmak daha mümkündür. Adli belge inceleme laboratuvarlarına ve belge inceleme uzmanlarına bilirkşi olarak en çok sorulan sorulardan biri aynı belge üzerindeki aynı formüle sahip mürekkeple yazılmış farklı yazıların hangisinin önce hangisinin sonra yazıldığının (Bağıl Yaş) tespit edilmesidir [2]. Diğer sorulan bir soru da bir mürekkebin başka bir mürekkeple karşılaştırmaksızın kendi fizikokimyasal değişimlerine bakılarak yazının yaşının tespit edilmesidir (Mutlak Yaş). Bağıl yaş tayini için karşılaştırılacak mürekkeplerin aynı belge üzerinde ve bütün olarak aynı koşullarda saklanmış olması gerekirken mutlak yaş tayini için belgenin uzun süre gün ışığına ve aşırı neme maruz bırakılmamış ve kuvvetli ısı işleminden geçirilmemiş olması gerekmektedir. Bu şekilde boyar maddelerin metil kaybederek (Şekil 2.4.) solma miktarından mürekkep yapı tayini yapılmakta ve mürekkep yapı tayininden belge yaşı tespitine gidilebilmektedir.

Mürekkepte kullanılan çözücünün farklı sıcaklıklara karşı buharlaşma miktarlarının oranından kısa erimli yaş tayini yapılırken [24], mürekkep boyar maddelerinin metil kaybederek bir alt gruba dönüşüm ve solması ile uzun erimli yaş tayini [7,55,56] ve bu iki yöntem ile de dinamik yaklaşım çerçevesinde mürekkepler arasındaki yaş farkları belirlenebilmektedir. Literatürde mürekkep yapı ve yaş tayini ile ilgili bir çok araştırma bulunmakla birlikte yapılan ilk çalışmaları kronolojik bir sıra içerisinde Tablo 2.4'te gösterilmektedir.

Kullanılan metodlar açısından literatürü inceleyecek olursak; 1959-1963 yılları arasında *Kikuchi* “HCL Kullanarak Kağıda Uygulanan Mürekkebin Dağılma Sürelerinin Ölçülmesi” [12,58-60], 1960’da *Werner Hoffman* “Farklı Mürekkep Karşılaştırmalarında Kağıt Kromatografisi ve İnce Tabaka Kromografisi, Spektrofotometri Kullanımı” [12], 1965’te *Nakamura ve Shimoda* “Tükenmez Kalem Mürekkeplerindeki Metil Viyole Ailesinin TLC ile Ayrılması” [12], 1980’de *Cantu ve Brunella* “Farklı Alan ve Çekitleme Oranı” [12], 1982’de *Stewart* “Kağıda Uygulanan Mürekkep İçerisindeki Çözücülerin Zamanla Azaldığının GC-FID (GazKromatografisi-Alev İyonizasyon Dedektörü) ile Tespiti” [12], 1985’te *Humecki* “Mürekkep Çözücüsündeki Değişimlerin FTIR (İnfrared Spektroskopisi Yöntemi) ile İncelenmesi” [12], 1987’de *Cantu ve Prough* “Solvent Ekstraksiyon Yöntemi,

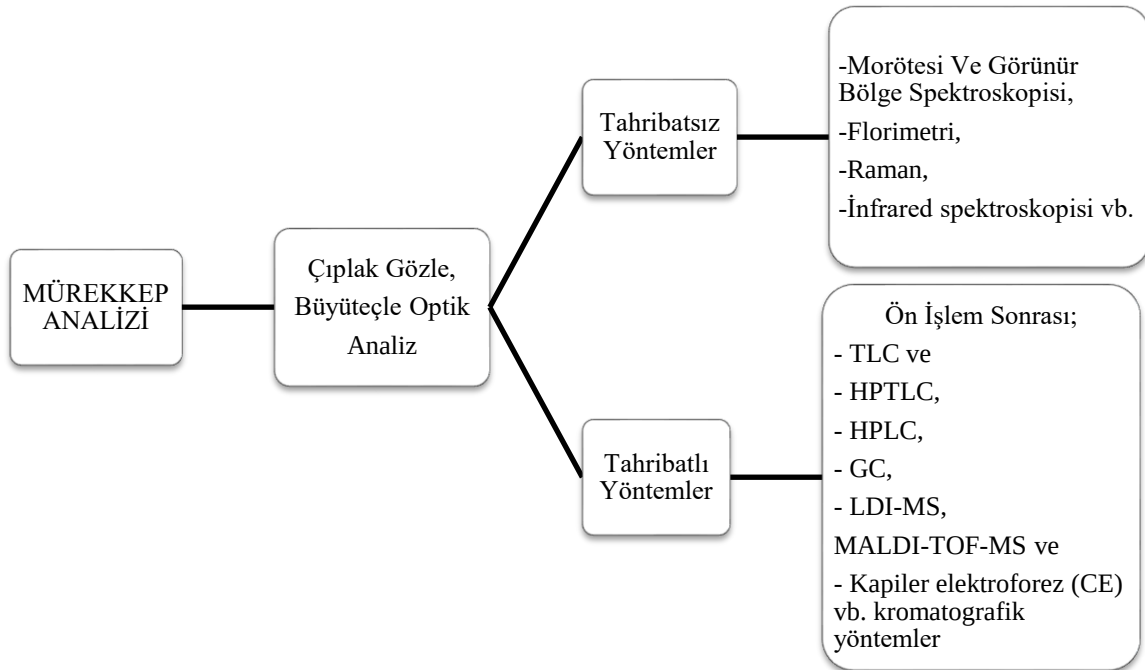
Mürekkebi Isıtma ve kendisiyle Karşılaştırma Yönteminin Uygulanması” [12], 1987’de *Brunelle* “Tek Solvent Ekstraksiyon Tekniği” [1], 1988’de *Brunelle* “Boya Oranı Tekniği” [12], 1988’de *Cantu* “Mürekkebin Isıtılarak Yapay Yaşlandırma Modeli” [61], 1990’da *Isaacs&Clayton* “Solvent Ekstraksiyon/Spektrofotometri” [12], 1993-1995’te *Aginsky&Brunelle* “Renksiz Uçucu Bileşenlerin TLC ile UV Altında Çözünmesi” [62], 1993-2000 yılları arasında *Aginsky, Brazeau, Gaudreau* “Gaz Kromatografisi ve Spektrofotometrik Metodu İle Değişken Bileşiklerin/Boyaların Oranlarının Hesaplanması, Solid Faz Mikroekstraksiyon ve GC-MS İle Değişken Bileşiklerin Azalma Miktarının Ölçülmesi” [12,63], 2002’de *Brazeau ve Gaudreau* “GC-MS Sistemi Kullanılması” [64], 2003’te *Andrasko* “Solid Faz Mikroekstraksiyonu ve GC-MS Kullanılması” [65] ve *La Porte ve ark.* “Fenoksietanol Miktarının Ölçülmesi” [66], 2004’te *Locicirio, Mazzella, Dujourdy, Lock ve Margot* “Fenoksietanol miktarının GC-MS ile Ölçülmesi” [2], 2005’te *Kirsch, Weyermann, Koehler ve Spengler* “Reçinelerin MALDI ve ESI-MS ile İncelenmesiyle, Şüpheli Belge Doğrulamasında ve Tükenmez Kalem Mürekkebinin Yaş Tespitinde Kullanılması” [2], 2005’te *Bugler, Buchner ve Dallmayer* “Tükenmez Kalem Mürekkeplerinin TD-GC/MS ile Analizi” [24] ve “Tükenmez Kalem Mürekkeplerinin TD-GC/MS ile Yaş Tayini” [67], 2007’de *Weyermann ve ark.* “Fenoksietanol miktarının GC-MS ile Ölçülmesi” [47], 2008’de *Weyermann, Spengler* “Yapay Yaşlandırma Grafiklerine Dayanarak Doğal Yaşlanma Grafiğinin Modellenmesi” [68] gibi çalışmalar bu alanda analitik yöntemler açısından öncü çalışmalardır.

Tablo 2.4. Mürekkep yapı ve yaş analizi ile ilgili ilk çalışmalar [12]

Tarih	Yazar	Literatür
1920 [17]	C. Mitchell	“Examination of the Age of Ink in Writing” The Analyst Dergisi’ (İlk Çalışma)
1935 [57]	Soderman H., J. O’Connel	Modern Criminal Investigation, 1st ed., Literary Digest” adıylayazılmış Funk & Wagnalls Company tarafından basılmıştır. (İlk Kitapta Bölüm)
1959 [58], 1960 [59], 1963 [60]	Y. Kikuchi	Mavi ve siyah mürekkeplerin yaş tayini “Estimation of Age of Blue Black Ink writing I, II, ve III” adı altında “Japanese Police Science Laboratory Report” dergisi (İlk Makaleler)
2002 [3]	Brunelle	Advances in the Forensic Analysis and Dating of Writing Ink (İlk Kitap)
2005 [4]	Celine Weyermann	Mass Spectrometric Investigation of the Aging Processes of Ballpoint Ink for the Examination of Questioned Documents (İlk Tez)

2.5. Belge İncelemede Mürekkep Analizinde Kullanılan Analitik Yöntemler

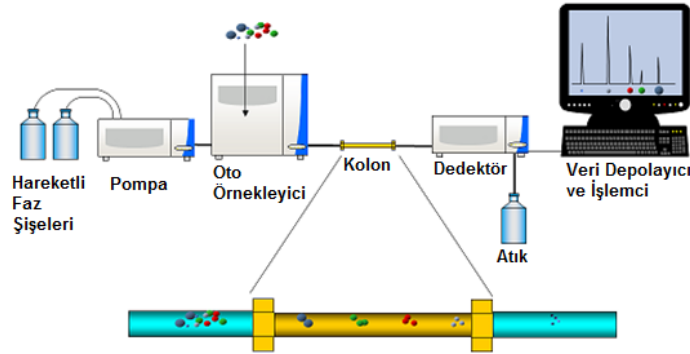
1930’lu yıllardan günümüze kadar mürekkep analizleri konusunda birçok yöntem uygulanmakla birlikte 2000’li yılların başından itibaren mürekkep yapı ve yaş analizi ile ilgili yapılan çalışmalar ivme kazanmıştır [69]. Yapılan çalışmalarda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC), FTIR, raman spektroskopisi, MALDI-TOF-MS, ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-Vis), Uçuş Zamanlı İkincil İyon Kütle Spektrometresi (TOF-SIMS) vb. analitik yöntemler kullanılmıştır [2, 70]. Bu analitik yöntemler içerisinde özellikle belgeye zarar vermeyen ve örneklerin analizi için ön işlem gerektirmeyen yöntemler belge inceleme uzmanlarının dikkatini çekerek araştırmalar bu yönde devam etmiştir. İncelemeler genellikle mavi ve siyah tükenmez kalem mürekkeplerinde bulunan kristal viyole ve metil viyole gibi boyar maddelerin ve yüzey aktif maddeler ile reçinelerin solma süreçleri ile solventlerin buharlaşmasını temel alan yöntemler üzerine yoğunlaşmıştır [71,72]. Şekil 2.7’de gösterilen bu yöntemler; belgeye zarar veren ve vermeyen yöntemler olarak iki başlık altında toplanmakla birlikte öncelikle optik olarak belgenin ve mürekkebin incelenmesi hangi analitik yöntemin uygulanacağına dair karar verilmesi açısından önemlidir [24,73].



Şekil 2.7. Mürekkep analizinde kullanılan yöntemler [2]

2.5.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, küçük dolgu maddeleriyle dolu bir kolonda, yüksek basınç altında gerçekleştirilen kromatografi yöntemidir (Şekil 2.8). Mürekkep analizi çalışmalarında mürekkep muhteviyatında bulunan boyar madde ve pigmentlere odaklanan, boyaların solması sonucu oluşan solma ürünlerinin kalitatif ve kantitatif incelendiği analitik bir yöntemdir [6]. Bu çalışmalarda; siyah ve mavi tükenmez kalem mürekkebi boyar maddelerinin zamana karşı değişimleri, doğal ortamda bırakılmış gerçek belge örnekleri ile yapay soldurmaya tabi tutulmuş belge örneklerindeki boyar madde ürünlerinin oranları kıyaslanmaktadır [37,74]. Sistemin çalışma prensibi kısaca şu şekildedir; örnek, enjeksiyon sistemi adı verilen bir sistemle doğrudan analitik kolona ya da ön kolona verilir. Analitlerin alıkonma zamanlarına göre analitik kolondan çıktıktan sonra tek veya seri halde bağlanmış dedektörlerden geçerek verdikleri sinyal büyüklüklerine göre miktar tayinleri yapılır. Analizlenecek maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine uygun dedektör (ultraviyole/görünür bölge dedektörü (UV/VIS) , fotodiyot dizisi dedektörü (DAD), floresans dedektörü (FLD), iletkenlik dedektörü (CDD), refraktif indeks dedektörü (RID), elektrokimyasal dedektör (ECD), Kütle dedektörü (MS), evaporatif ışık dağıtıcı dedektör (EL) seçilir [75].



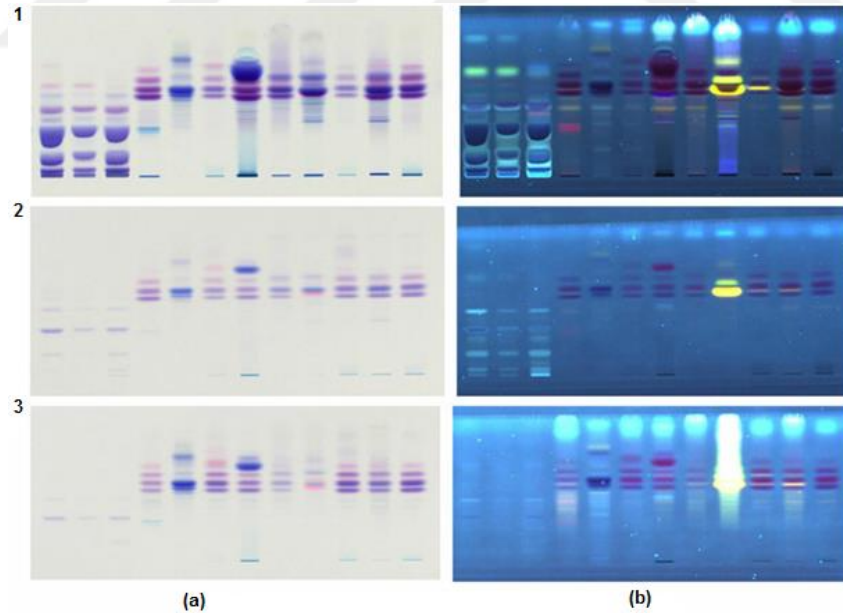
Şekil 2.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Sistemi [76]

2.5.2. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC)

HPTLC, hem mürekkepleri ayırt etmek hem de mürekkep formüllerini tanımlamak için kullanılan analitik bir sistemdir [77,78]. HPTLC sistemi; uygulama, yürütme ve tarama olmak üzere 3 ünitelerden oluşmakta ve tarama sistemi olan bilgisayar ile hem kromatogramlar hem de UV spektrumları kaydedilmektedir [79]. Tanımlama, yürütme sonuçlarının cihazın

kütüphanesindeki verilerle karşılaştırılması ile yapılmaktadır. Çalışma prensibi kısaca şu şekildedir; mürekkep numunesi uygun bir çözücüde çözüldükten sonra cam, alüminyum veya plastik bir levha üzerine ince bir katman şeklinde sabitlenmiş bir fazdan oluşan silika jel, selüloz veya alüminyum oksit üzerine nokta veya şerit olarak aktarılır (sabit faz). Daha sonra çözücü veya çözücü sistemler (mobil faz, hareketli faz) kapiler etkiyle plakaya yayılır. Numunelerin elektriksel kuvvetle plakada “göçme” oranlarının (R_F değeri) hesaplanmasıyla ayırım gerçekleşmektedir (Şekil 2.9). R_F değeri $[(\text{Örneğin Yürüdüğü Mesele})/(\text{Çözücünün yürüdüğü mesafe})]$ formülüyle hesaplanmaktadır.

Sabit fazda bulunan farklı bileşiklerin mobil faz ile etkileşimleri birbirinden farklı olduğu için levha üzerinde farklı noktalara farklı hızlarla ulaşmaktadırlar [80]. En çok ayrılan mürekkep bileşenleri renklerinden kaynaklanan kromatogram üzerinde kolaylıkla tespit edilirken diğer renksiz mürekkep bileşenleri ise UV ışığı ile veya levhaya uygun bir renklendirici ayaç eklenmesi sureti ile gözlemlenebilmektedir. HPTLC, kolay uygulanabilirliği ve hızlı kalitatif bilgi vermesi açısından mürekkep örnekleri arasında ayırım yapmak için kullanılan en yaygın ve başarılı yöntemlerden biri olmakla birlikte karmaşık analitik teknikleri çözmede ve hassasiyette bazı eksiklikleri bulunabilmektedir [77,78].

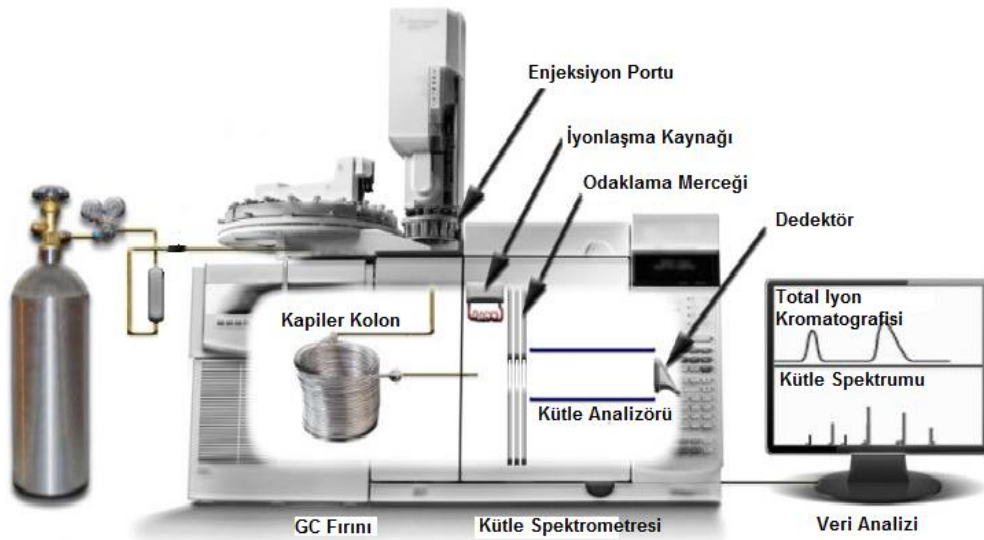


Şekil 2.9. HPTLC’de Mobil faz olarak n-butanol - izo-propil alkol-su-asetik asit kullanıldığı (20:10:10:1 v/v/v/v) silika jel üzerinde mürekkep örneklerinin analizi. (a)Görünür ışık, (b)UV 366 nm, (1)Kartuşlardan mürekkepler, (2) Işığa maruz kalmamış kağıttan çıkarılan mürekkepler, (3)Işığa maruz kalmış kağıttan çıkarılan mürekkepler. 1.–3. bantlar dolmakalem mürekkepleri; 4.–12. bantlar tükenmez mürekkepleri [81].

2.5.3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

GC-MS sistemi (Şekil 2.10) tükenmez kalem mürekkebi içeriğinde bulunan uçucu bileşenlerin (çözücülerin) zamana bağlı buharlaşmasını ölçmek için kullanılan analitik yöntemdir [66]. Bu yöntemde temel yaklaşım mutlak yaşı belirleyebilmektir ve bunun için uçucuların farklı zamanda analizinden elde edilen kromatogramlar veya solventin cihazda farklı sıcaklıklarda uçurulması ile elde edilen kromatogramların birbirlerine oranları (buharlaşan solventin pik alanının mürekkebin uçmayan sabit bir bileşene oranlanması) kullanılmaktadır. Böylelikle çözücülerin zamana bağlı kaybolmasını (buharlaşmasını) gösteren yaşlanma eğrisi tanımlamak olasıdır [82].

Bügler tarafından bu konu ile ilgili yapılan ve literatüre kazandırılan çalışmalarda, mürekkep içeriğinde bulunan ve ısıya daha fazla duyarlılık gösteren fenoksi etanolün farklı ısılara maruz bırakılması ile miktarında meydana gelen değişikliklerin grafiksel olarak incelendiği yöntem mürekkep yaş tayininde en çok tercih edilen yöntemlerden birisidir [31]. Bu yöntem ile, tenaks tüpüne yerleştirilen belgeden alınan ve 90°C ile 200°C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta desorbe edilen numunenin yüksek duyarlılık sebebi ile SIM (Selected Ion Monitoring) modunda analiz edilmesi ile elde edilen pik alan değerlerinin $[\%V = M_{90^{\circ}C} / (M_{90^{\circ}C} + M_{200^{\circ}C}) \times 100]$ formülü [15] ile miktarları karşılaştırılarak, farklı ısılara maruz kalmış mürekkep numunesi içerisindeki çözücü miktarının zamanla değişimi belirlenmiş olmaktadır.



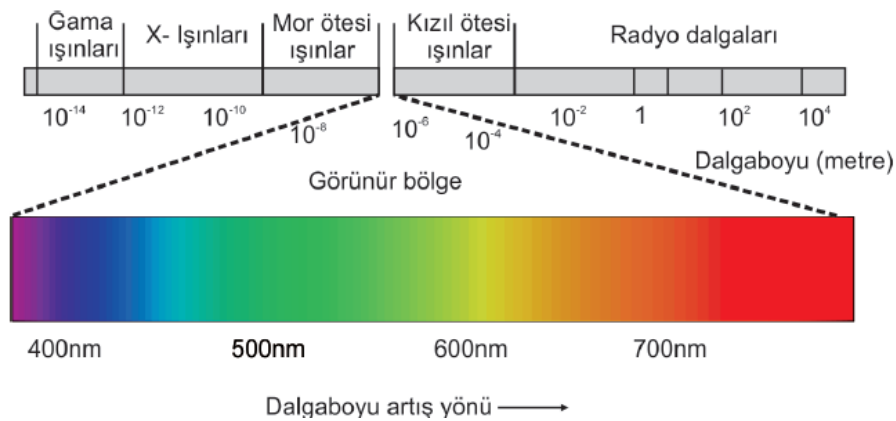
Şekil 2.10. GC-MS sistemi bileşenleri [83]

2.5.4. Kapiler Elektroferez Yöntemi (CE)

Doğru akımın uygulandığı iletken bir çözelti içerisindeki moleküllerin veya yüklü/yüksüz taneciklerin elektriksel bir alan içerisinde diferansiyel göç etme hızlarına dayanan bir yöntemdir [84]. Bu yöntem, geleneksel elektroforetik uygulamaların kapiler bir boru içerisinde optimize edilmiş halidir. CE sistemi bir örnek/tampon enjeksiyon modülü, kapiler bir kanal, yüksek voltaj kaynağı, elektrodlar ve dedektör sistem olmak üzere beş kısımdan oluşmaktadır. İç çapı yaklaşık 20-100 μm olan, adsorbe bileşenlere yanıt vermeyen ve yüksek ısı iletkenliğine sahip kapiler sistem, enjeksiyon ve dedeksiyonun gerçekleştiği kısımdır. CE yöntemi ile çok çeşitli mürekkep örneklerinin çok sayıda bileşenleri analiz edilebilmektedir.

2.5.5. İnfrared Spektroskopisi Yöntemi

Belgelerin üzerinde bulunan mürekkeplerin elektromanyetik spektrumun (Şekil 2.11) yakın infrared bölgesindeki soğrulma ve yansıma özelliklerinin incelenmesi, belgede herhangi bir tahribata neden olmayıp belge bütünlüğünü bozmaksızın inceleme yapılmasını sağlamaktadır [80,85]. Belgenin ışıkla aydınlatılmasında belirli dalga boyları yansırken bazıları soğrulur. Işığın soğrulması ile birlikte elektromanyetik enerji analizi yapılan örneğin moleküllerine veya atomlarına geçerek soğrulan parçacıkların taban durumunda uyarılmış duruma geçmesini sağlar. Bu parçacıklar tekrar taban durumuna geçerken, uyarılma enerjisi ya ısı enerjisine ya da kısmen luminesans (ışıma) yaparak, verilen tepki ölçülmek sureti ile mürekkep ve alt ünitelerinin ayırt edilmesi sağlanmaktadır. Analiz edilecek herhangi iki mürekkep arasında soğurma ve yansıma farkının olmaması durumunda mürekkeplerin aynı mürekkep olduğunu söyleyebilmemiz için luminesans inceleme, spektroskopisi (Raman, İnfrared) vs. gibi analitik yöntemler kullanılarak sonucun kesinliği sağlanabilir.



Şekil 2.11. Elektromanyetik spektrum [86]

2.5.6. Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi belgeye zarar vermeyen, analiz maliyetinin düşük olduğu, katı, sıvı ve gaz örneklerin incelenbildiği bir yöntem olduğundan belge inceleme uzmanları tarafından da tercih edilmektedir [87]. Raman spektroskopisi kağıt üzerine uygulanmış mürekkep örneklerinin incelenmesinde diğer yöntemlere kıyasla araştırmacılara ek bilgiler sağlarken tek başına mürekkep (mavi ve siyah tükenmez kalem mürekkeplerinin bazen aynı spektrum vermesi gibi) incelemelerinde yanlış sonuçlara götürme ihtimalinden dolayı tercih edilmemektedir. Bu yöntemin çalışma prensibi analizi yapılacak örneğin güçlü bir lazer (zorlanmış emisyon ile ışık çoğaltılması) kaynağıyla ışınlanmasıyla, absorblanmayıp saçılan ışığın belirli bir açıdan ölçümüne dayanmaktadır. Molekül ile etkileşen ışığın dalga boyuna göre saçılan ışığın dalga boyundaki farklar ölçülmektedir. Saçılan ışığın büyük bir kısmının enerjisi, madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olmaktadır. İspanya Alcala Polis laboratuvarı, kimyasal imza adını verdikleri bir yöntemle Raman spektroskopisini kullanarak her mürekkebin yapısının bir birinden farklı olduğu savıyla mürekkeplerin zamanla uğradığı yapısal değişimi tespit etmeye çalışmaktadırlar [88]. Polonya Adli bilimler Laboratuvarında doğal yaşlanmış belgeler ile 100 saat süreyle farklı çevresel etkenlere maruz bırakılmış (oksijen, nem, radyasyon ve sıcaklık) ve yapay yaşlandırılmış belgelerin Raman spektroskopisi ile karşılaştırılmaları sonucunda mürekkebin yapısındaki değişikliği, radyasyonun diğer çevresel etkenlere oranla daha fazla etkilediğini gözlemlemişlerdir [89]. Fakat farklı zamanlarda yapılan analizlerin tekrarlanabilir olmaması sebebiyle bu sonuçlar güvenilir bulunmamaktadır.

2.5.7. Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu-Kütle Spektrometresi (LDI-MS)

2000'li yılların başından itibaren mürekkep boyar maddelerinin yapay ve doğal solma süreçlerinden elde edilen solma ürünlerinin benzer bir eğilim (parçalanma ürünleri) gösterip göstermediğinin spektrometrik olarak incelenmesinde kullanılan analitik teknik, Lazer desorpsiyon iyonizasyonu-Kütle Spektrometresi (LDI-MS) yöntemidir [56]. Bu yöntem, lazer ışığın dalga boyundaki enerjiyi absorblayabilen katı örnekteki atom ve moleküllerin üzerine lazer enerjisi gönderilmesiyle, iyonlaşan atom ve moleküllerin örnekten dışarı salınarak süblimleşmeleri prensibiyle çalışmaktadır ve boya moleküllerinin moleküler iyonlarının ayrılarak oranlanması ile mürekkep yapı analizi yapılmaktadır [90]. Kütlenin spektral analizi bir saniyeden daha kısa sürmektedir.

2.5.8. Matriks İle Desteklenmiş Lazer Dezorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF-MS)

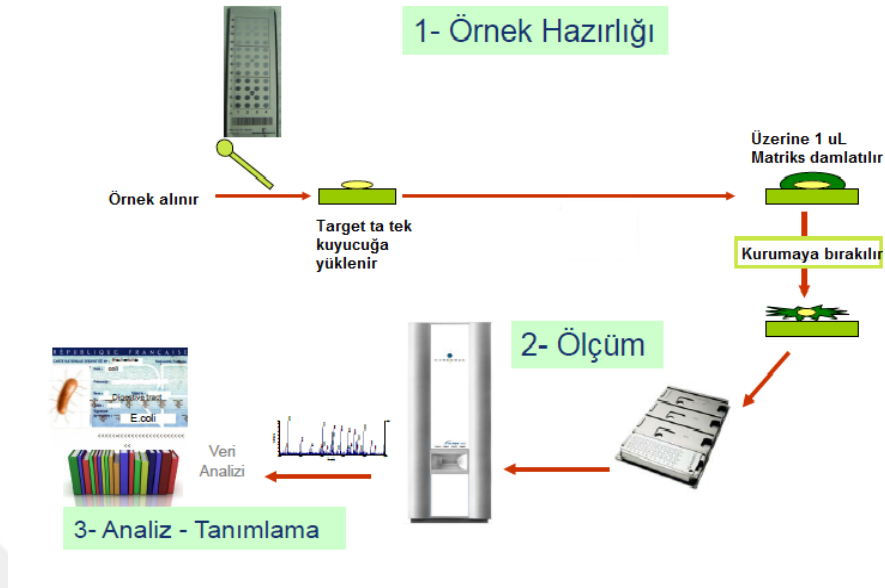
1988 yılında M. Karas ve F. Hillenkamp tarafından keşfedilen MALDI, büyük molekülleri kolayca iyonize edebilen duyarlılığı yüksek bir sistemdir ve bu özelliği sayesinde belge inceleme analizlerinde bu teknoloji önemli bir yer kazanmıştır [4,91].

MALDI-TOF-MS kompleks bileşikleri kimliklendirebilmek için çok güçlü bir metod olup son yıllarda tükenmez kalem mürekkeplerindeki boyar madde olan pigmentlerin analiz edilmesinde ve mürekkep yaşlanmasının incelendiği çalışmalarda fazla sayıda örneğin hızlı bir şekilde analiz edilebilmesi, sarf malzemelerinin ucuzluğu, analiz maliyetinin az olması, analiz için gerekli örnek miktarının düşük olması, bulguların güvenilirliğinin yüksek olması gibi avantajları sayesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sistem, diğer iyonizasyon teknikleri gibi sürekli iyon demeti oluşturmanın aksine aralıklı olarak iyon demetleri oluşturan darbeli bir iyonizasyon tekniğidir [92,93]. Uçuş Zamanı (TOF), kütle/yük oranının kareköküyle orantılıdır ve sürekli atımlı olmayan LDI kaynağı için uygun bir kütle analizörüdür. MALDI-TOF-MS düşük derişim ve düşük moleköl ağırlıklı yapıların yüksek özgülük ve duyarlılıkla ayrımını sağlamaktadır [94]. Yöntemin belirleme aralığı 10^{-15} ila 10^{-18} mol arasındadır.

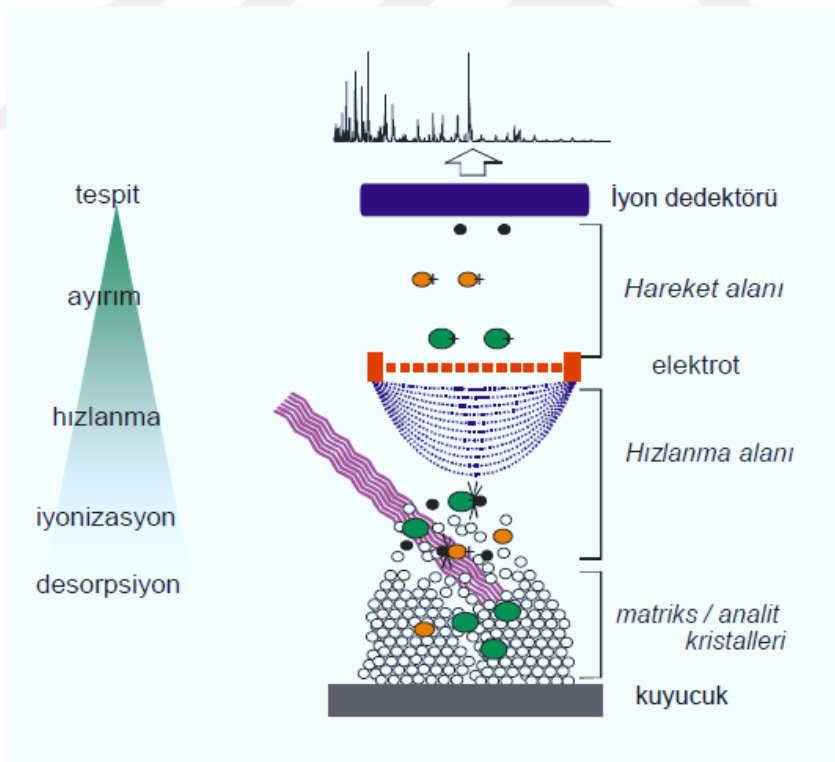
MALDI-TOF MS cihazı üç bölümden oluşmaktadır. Bunlar; iyonizasyon kaynağı, kütle analizörü ve algılama bölümüdür. İyonizasyon kaynağı MALDI ve ESI iyoizasyon kaynaklarıdır. Lazer dezorbsiyon sistemleri çeşitli kütle analizörleri ile kombine edilmekle birlikte genellikle kütle spektrometresi olarak TOF (time of flight) kullanılır. Algılama bölümünde ise iyonların kütesinin yüküne (m/z) oranının kareköküne bağlı olarak analiz yapılmakta, biyomoleküller yoğunluklarına ve m/z oranına göre tasniflenmektedir [95]. Sistemin çalışma prensibine kısaca bakacak olursak yöntem (Şekil 2.12); ışığı absorbe edebilen bir matriks varlığında, analizi yapılan molekölün yüzeyden koparıldığı ve iyonizasyonu için gerekli olan enerjinin lazer ışıması ile sağlandığı bir çarpma iyonizasyon tekniğidir [96]. Kullanılan lazer dalga boyunda optimal absorsiyonu sağlamak için az miktarda asit molekölü içeren matriks, analiti koruyarak desorpsiyon ve iyonizasyon işlemine yardımcı olmaktadır [94]. Analiz sonucunda elde edilen piklerin yoğunluğu kullanılan matriksin çeşidine bağlı olarak değişmekle birlikte 10 kDa'dan daha küçük moleküllerin analizi için genellikle 2,5-dihidroksibenzoik asit ve α -siyano-4-hidroksisinamik; 15kDa'dan daha yüksek kütlelerin tespiti için ise genellikle sinapinik asit ve ferulik asit kullanılmaktadır

[95]. Bu iyonizasyon tekniğinde her bir lazer atışında oluşan iyonların ayrılması ve çözülmesi için gerekli olan atış analizör “time of flight” olarak isimlendirilen TOF sistemidir. Bu sistem iyonların ağırlıklarıyla doğru orantılı bir sürede dedektöre ulaşmasını sağlayan iyon ayırıcı kütle analizörüdür. Burada hedef molekülün iyonlaşması, kolay iyonlaşabilen bir matriksin yüksek enerjili bir UV lazer (çalışma kolaylığı ve ucuzluğu açısından en yaygın olarak kullanılan lazer çeşidi) ile ışınlanması yardımıyla olur. İnceleme öncesinde örnek tepsisinin yerleştiği alandan vakum yardımıyla hava uzaklaştırılarak analizlenecek örnek lazer bombardımanına tabi tutulmaktadır. Alınan bu enerji, örneklerden iyonların buharlaşmasına ve gaz fazına geçmesini sağlamaktadır. Serbestleşen iyonlar elektrik alan yardımıyla (elektromanyetik alanda) hızlandırılarak lineer bir uçuş tüpüne geçmeleri sağlanır. Dezorbsiyon sonucunda açığa çıkan iyonlar; tek yüklü iyonlar olduğundan uçuş tüpünde geçirdikleri zamana göre kütle ağırlıklarından tespit edilirler. İyonlaşma sonrası TOF spektrumu kaydedilerek analizlenmektedir. MALDI-TOF-MS’te sıklıkla UV lazerler kullanılır. Bu yöntemle başlangıçta iyonlaşan matriks molekülleri yüklerini hedef moleküllere aktararak onların iyonlaşmasını sağlar. Lazer atışları ile iyonlaşan moleküller hızlandırıcı iyon mercekle yardımıyla TOF analizörüne gönderilir ve TOF kütle spektrumu zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Kütle spektrometresi, verileri kolayca kütle(m)/yük(z) oranına dönüştürür. Kullanılan lazer kaynaklarının kesikli atış yapması sayesinde bir iyon grubu ile arkadan gelen diğer iyon grubunun karışması önlenir. TOF analizöründe iyonları hızlandırmak için elektrik alan kullanılır ve dedektöre çarpan iyonlar sayılarak ölçüm alınır. İyonların dedektörde toplanma süreleri iyonik yükleri ile doğru, molekül ağırlıkları ile ters orantılı olduğundan daha hafif iyonlar dedektöre daha hızlı ulaşmaktadır (Şekil 2.13).

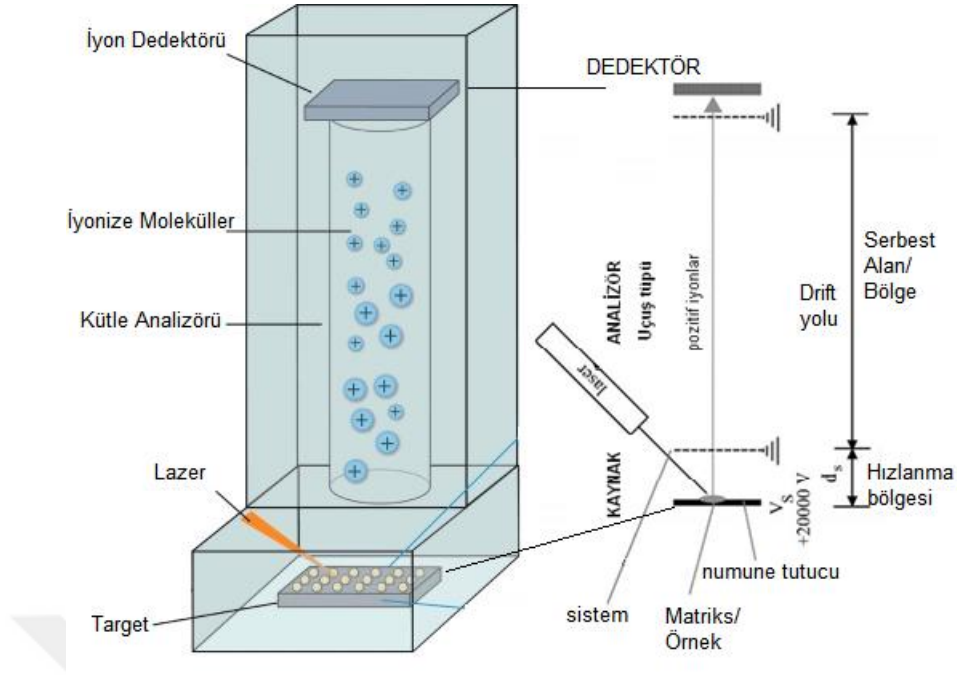
İyonların ayrılması için bu yöntemde değişik kütleli iyonların aynı gerilimle hızlandırıldıkları zaman aynı sürede değişik hızlar kazanmaları özelliğinden yararlanılır [98]. Uçuş-zamanlı (TOF) cihazlarda örneğin elektron, ikincil iyon veya lazer bombardımanlarıyla üretilen pozitif iyonlar alansız bir toplama tüpüne 103–104 V’luk elektrik alan pulslarıyla hızlandırılarak gönderilirler (Şekil 2.14). Ayırma, tüpün sonunda bulunan dedektöre iyonların ilerlemesi sırasında meydana gelir ve bir iyonun uçuş süresi 1-30 μ s arasında değişmektedir. Bütün iyonlar, aynı kinetik enerjide olduklarından, hızları kütleleri ile ters orantılı olarak değişir, bu yüzden hafif partiküller dedektöre daha önce ulaşırlar.



Şekil 2.12. MALDI-TOF-MS cihazı iş akışı [97]



Şekil 2.13. MALDI-TOF-MS tekniğinin temel prensibi [97]



Şekil 2.14. TOF analizörlü kütle spektrometresi [99]

2.6. Adli Genetik ve DNA

Adli Bilimler, olay yerinden usulüne uygun olarak toplanmış delillerin, bilimsel veriler ışığında değerlendirilerek olaya karışmış kişilerin tespitini, olay yeri ile mağdurun veya failin ilişkisini belirlemeyi amaçlamaktadır [100]. Bu ilişkinin ortaya çıkarılması ve adli makamların failin kim olduğu sorusuna yanıt verebilmesi, sıklıkla olay yerine bırakılmış biyolojik örneklerden laboratuvar koşullarında elde edilen DNA' nın miktarına ve kalitesine bağlıdır. Bu açıdan adli genetiğin amaçlarından biri, olay yerinden toplanan çevresel faktörlerden etkilenmiş ve eser miktarda elde edilen biyolojik örneklerin analizinin zor olduğu durumlarda bile farklı moleküler genetik yöntemler kullanarak olayın çözülmesi ve fail(lerin) bulunmasıdır. Diğer bir amacında olaya dahil olmayan, suçsuz kişilerin masumiyetini ortaya çıkarmaktır. Olay yerindeki biyolojik deliller; doğrudan bulunabileceği gibi, dolaylı olarak başka nesneler üzerinde de bulunabilir [101]. Tarak, kişisel takı ve süs eşyaları, sakız, sigara izmariti, zarf, pul mutfak eşyaları çatal kaşık peçete ya da bardak üzerinde bulunabilen tükürük veya epitelyum hücreleri; tırnak içlerinde bulunabilen doku artıkları; giysiler üzerinde bulunabilen deri epitel hücreleri, saç ya da kıllar; giysi, koltuk, halı, vb. her türlü eşyada bulunabilen kan ya da semen lekeleri, deri döküntü hücreleri buna örnek olarak verilebilir.

Biyolojik örneklerin analizinde teknik olanaklar, ekipman, bilgi birikimi ve deneyim ne kadar gelişmiş olursa olsun esas belirleyici faktör delilin durumudur [102]. Bu nedenle biyolojik delillerle yapılan analizlerde, delilin belirlenmesiyle başlayan tüm aşamalar titizlikle ve dikkatle uygulanmalıdır. Adli bilimlerde kişileştirme dendiğinde esasen iki biyolojik örneğin genetik materyalinin karşılaştırılması sonucunda, kaynak belirtimine gidebilmek anlaşılır. Aynı mantık parmak izi, diş izi, kurşun tayini, kıl ve lif tayini, ses spektrogramları, nötron aktivasyon analizi, kan grubu ve serum proteini tayini ve son olarak DNA incelemeleri için de geçerlidir. Bu tür karşılaştırmaların sonucunun mahkemede delil oluşturabilmesi, ancak kullanılan tekniklerin kabul görmüş bilimsel teknikler olması durumunda mümkündür.

Son yıllarda adli genetik alanında gerçekleşen yeni yaklaşım ve uygulamalar sayesinde daha güvenilir değerlendirmeler yapılmaktadır [103]. İnsan vücudunda yaklaşık olarak 100 trilyon hücre olduğu bilinmektedir. Çok çeşitli yapıları ve işlevleri olan bu hücrelerin alyuvarlar hariç deoksiribonükleik asit veya kısaca DNA olarak bilinen ortak özellikleri bulunmaktadır [104]. Doğadaki canlıların hemen hemen hepsinde genetik materyal Deoksiribonükleik asit (DNA)'tır. Her kişide tek olan DNA dizileri karşılaştırılarak örnekler analiz edilmektedir. Alec Jeffreys'in 1985 yılında DNA molekülünde minisatellit denilen polimorfizm şeklini keşfetmesinden sonra adli bilimlerde DNA kullanımı hızla gelişmiştir. DNA baz dizini üzerinde yapılan çalışmalar DNA'nın çok yüksek oranda polimorfizme sahip olduğunu belirlemiştir. DNA çok güçlü bir araç olup, canlı varlıkların hepsi, her hücrelerinde DNA bulundurur. Bu yüzden pek çok adli olayda DNA içeren delillerinden yararlanılabilir.

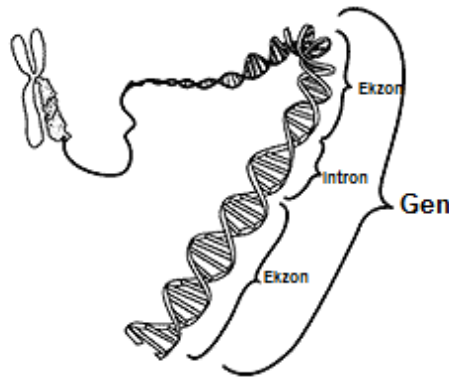
Bilimsel gelişmeler sonucunda DNA'nın keşfi, suçları araştırma alanında yeni bir çığır açmış ve en yeni gelişmeler arasında kendini belli etmiştir [101]. Bir olay yerinde olayın aydınlatılması için ele geçirilen ve içerisinde çekirdekli hücre bulunan her türlü biyolojik delilden DNA teknolojisi yardımıyla suçluyu bulmak mümkün olmaktadır [105]. Bazen biyolojik delil fizyolojisi gereği çekirdeğinin bir kısmını kaybetmiş olan bir deri epitel döküntüsü ya da köksüz bir kıl olabilmekte ve analiz sırasında sorunlar çıkabilmektedir. Olumsuz koşullara rağmen günümüz teknolojisi sayesinde, bozunmuş ya da parçalanmış en küçük DNA bölümlerini analiz edebilecek yöntemler uygulamaya konulmuş ve bu yöntemler gün geçtikçe de geliştirilmeye devam edilmektedir. Bazı çalışmalar, taze parmak izinden [106-108] veya çeşitli kimyasallara veya çevre koşullarına maruz kalmış parmak izinden bile DNA analizi yapılabileceğini göstermektedir [107, 109-112].

DNA incelemeleri, minimal başlangıç örneği gerektirdiğinden olay yerinden alınan eser miktarlardaki materyallerin analizi ile sonuca varılabilmektedir [101]. Ayrıca DNA'nın kötü çevre koşullarına rağmen zor bozunması ve DNA testlerinin geleneksel serolojik yöntemlerden daha duyarlı olmasından dolayı; DNA analizleri ile yüksek oranda başarılı elde edilebilmektedir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, biyolojik deliller adli olayların aydınlatılmasında son derece önem arz etmektedir.

2.7. Adli Bilimlerde Genetik Markırların Kullanımı

1900'lü yıllarda ayırım gücü düşük ve bireyler arasında yeterli ayrımı sağlayamayan A,B,O kan gruplarının adli bilimlerde kullanılmasına başlanmış, alt kan grupları, polimorfik enzim ve proteinlerle devam edilmiştir [113,114]. Bu sistemler çevresel koşullara maruz kalmış örneklerde kararsız yapı sergilediklerinden zamanla yerini DNA düzeyinde araştırılan genetik polimorfik markırlara bırakmışlardır [115]. Günümüzde kullanılan DNA düzeyindeki genetik markırlar klasik sistemlere göre daha hassas, kararlı, özgün, ayırım gücü yüksek, güvenilirliği fazla ve daha bilgi vericidir. Çekirdekli hücre içeren her biyolojik materyalde çok sayıda varyasyon içeren DNA molekülü bulunur [116].

DNA, kalıp özelliği ile hücre bölünmesi ve çoğalması esnasında kendisini eşleyerek yeni hücrelere genetik materyalin aktarılmasını sağlamaktadır. Genetik bilgileri içeren DNA parçaları gen olarak adlandırılır [100,117]. Bu DNA parçalarının protein kodlayan (ekzon) ve kodlamayan (intron) bölgeleri vardır (Şekil 2.15). Ekzon DNA' nın sadece %3'ünü intron ise %97'sini oluşturmaktadır. İtron bölgelerinin işlevi bilinmemekle birlikte son derece polimorfik ve oldukça yüksek ayırım gücüne sahip oldukları bilinmektedir. Polimorfizm, bu bölgelerdeki dizinden değil tekrar sayısındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır.



Şekil 2.15. DNA sarmalındaki ekzon ve intron bölgeleri [117]

DNA analizlerinin adli bilimlerde uygulanmaya başlandığı ilk dönemlerde kullanılan lokusların ayırım gücünün az olması ya da ayırım gücü yüksek olanların ise iyi kalitede (parçalanmamış) ve fazla miktarda (300-500 ng) DNA'ya ihtiyaç duymaları ve analiz sürelerinin uzun olmasından dolayı yeni sistemlerin araştırılması şart olmuştur [118]. Bu çalışmalar neticesinde de STR (Short Tandem Repeat, Kısa Tekrar Dizileri) lokusları da denilen ve ayırım güçleri yüksek, 3-5 bazlı tekrarlardan oluşan mikrosatellitler geliştirilmiştir [119]. Bu bölgeler tekrar ünite sayısının varyasyonuna bağlı olarak çok fazla miktarda uzunluk polimorfizmi gösterirler ve insan genomunda binlerce polimorfik mikrosatellit (yaklaşık her 10 bin nükleotidde bir görülürler) saptanmıştır [120,121]. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) sonrası ürün uzunlukları 150-350 bp (baz çifti) arasında olan STR'lerden, VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats, Değişken Sayılarda Ardışık Tekrar Dizileri) ve RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism, Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizmi) sistemlerine göre eski ve iyi korunmamış eser miktardaki degrade biyolojik örneklerde, tiplendirme yapmaya imkan vererek daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

STR lokuslarının yeni kullanılmaya başlandığı yıllarda her lokus tek tek çalışılmaktaydı [122]. Bu yöntem analiz maliyetini ve analiz süresini arttırdığından birden fazla lokusun aynı anda analizini sağlayacak kitler oluşturulmaya başlandı. Çoklu STR'ler, yüksek ayırım gücü sağlaması, mutasyon oranının düşük ve amplifikasyon hassasiyetinin yüksek olması, karışım analizlerindeki ve bozulmuş DNA içeren biyolojik materyallerdeki başarısı nedeniyle adli moleküler genetik çalışmalarında çok önemli bir yer edinmiştir. Ayrıca otomasyona uygunluğu ve pahalı donanım gerektirmemesi de, rutinde analiz edilecek örnek sayısının artması durumunda faydalanılan bir özelliktir.

Bazı durumlarda STR markırları ile çok az miktardaki aşırı degrade örneklerde istenilen başarı elde edilememektedir [123]. Bunun için de gelişen teknolojinin de yardımıyla alternatif markırlar geliştirilmiştir. Bunlardan biri kısa PCR ürünü oluşturan Mini-STR denilen STR lokuslarıdır. Diğer alternatif markır ise mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın kontrol bölgesindeki değişken bölgelerinin (HV1, HV2) dizinlenmesidir [124]. MtDNA'yı dizinlemek zahmetli, zaman alıcı ve pahalı olduğundan rutinde sıklıkla tercih edilen bir yöntem değildir.

STR lokuslarının isimlendirilmesinde, eğer lokus bir gen parçasıysa veya gen içerisinde yer almaktaysa o genin ismi lokusu belirlemektedir [125]. Örneğin, TH01 lokusunda, TH ifadesi 11. kromozomda yerleşmiş olan insan tirozin hidroksilaz enzimini, 01

ise tirozin hidroksilaz geninin 1. intron bölgesini ifade etmektedir. Bazen ön ek olarak ‘HUM’ eki insanı ifade etmek için lokusun başında kullanılmaktadır. Bu durumda lokus HUMTH01 olarak adlandırılır. STR lokusları gen bölgelerinin dışında yer alıyor ise isimlendirme şu şekilde yapılır: Örneğin D16S539 lokusunda; D harfi DNA, 16 rakamı hangi kromozomda yer aldığını, S harfi lokusun tek kopya dizisine sahip olduğu (single), 539 ise lokusun kromozom üzerinde yerleştiği yeri göstermektedir.

2.8. Adli Belge İncelemelerinde DNA’ nın ve DNA Teknolojilerinin Kullanımı

“Her temas bir iz bırakır” ilkesinden yola çıkarak; dokunulan yüzeyden veya giyilen giysiden dökülen birkaç epitelyum hücresinden elde edilen DNA ile olaylar aydınlatılabilmekte ve bu amaçla biyolojik materyalin miktarı ile ilgili olarak çalışmalar yapılmaktadır [8,126]. Kağıt (selüloz), günlük kullanımda sıklıkla temas edilen nesnelerin üretildiği madde olmasının yanı sıra yazılı belgelerin üzerinde kaydedildiği yüzey tipidir. Bu durum; kağıt yüzey üzerinde parmak izi aranması, görünürleştirilmesi ve bunun ötesinde bu izlerden veya kağıt yüzeyine bırakılan epitelyum hücrelerden DNA ile kimliklendirilme yapılmasını gerektirebilmektedir. Belgelerin bir diğer özelliği de içeriklerinin bozulmadan üzerlerindeki diğer delillerin çalışılmasında yatmaktadır. Bu nedenle kağıt yüzeylerde DNA izolasyonu aşamasında; kağıt üzerinden sürüntü yöntemi ile biyolojik örnek alınabilmektedir. Bu şekilde belge üzerinde herhangi bir tahribat yapmadan da çalışmak mümkün olabilmektedir. Kişinin imzasının taklidinde kişi belgeyi hiç görmediğini belirttiğinde, belgeden DNA analizi yapılması bu belgeye kişinin dokunup dokunmadığı sorusunun cevabını verebilir. Aynı kalem ile aynı anda yazılmış şüpheli yazıların analizinde zaman farkı ve kalem farkı bulunmayacağından kişinin DNA analizi diğer bulgularla değerlendirilip konu aydınlatılabilir. Adli belge incelemelerinde bu sorulara cevap arayan çalışmalar iki şekilde kullanılmaktadır. Öncelikle belge üzerindeki parmak izinden DNA’ ya ulaşmak, ikincisi ise dokunma yolu ile belge yüzeyine transfer edilen epitelyum hücrelerden DNA elde edilebilmektir. Ancak anılan bu DNA çalışmalarının hem avantajları hem de dezavantajları bulunmaktadır. Parmak izinden ya da epitelyum hücreden DNA elde etme teknikleri, rutinde kullanılan tekniklerden daha farklı ve hassastır. Çünkü belge üzerinden elde edilen DNA miktarı diğer rutin çalışmalara göre yok denebilecek kadar az ve degradedir [110]. Ancak DNA alanındaki gelişen teknoloji; değerli doküman, belge, tehdit veya fidye mektubu ya da intihar notu gibi kağıt yüzeylerden de kimliklendirme de söz konusu olabilmektedir.

2.8.1. Temas İzi ve DNA

Nesne yüzeylerine temas izinin oluşmasını sağlayan ve vücudumuzu örten en büyük organımız olan deri; bir anlamda bedeni ve organizmayı çevreden ayıran, mekanik, kimyasal ve biyolojik dış etkilere karşı bedeni koruyan dış duvardır [127]. Bu duvar her biri farklı doku yapısına sahip üç ayrı katmandan oluşmaktadır. Yüzeyden derine doğru bu tabakalar üst deri (epidermis), alt deri (dermis), deri altı (subkutis) şeklinde sıralanmaktadır. Erozyona uğrayan keratinize hücreler epidermis katmanından atılmaktadır. Yetişkin normal bir bireyden gün boyunca yaklaşık 0,5-1 gr arasında ve 400.000 civarında deri epitel döküldüğü, epiderminin 15-20 günde bir kendini yenilediği ve bu hücrelerin dökülmeden önce 30 gün süre ile vücut yüzeyinde bulunduğu yapılan araştırmalarla tespit edilmiştir [128,129]. Derinin yüzeylere teması ile (çekirdekli bir epitel hücre ~5 pg DNA içermektedir) söz konusu hücreler temas edilen yüzeylere bırakılmaktadır.

Dokunmayla dokunulan yüzeye transfer olan hücreler, dolayısı ile kişiye özgü genetik materyal olan DNA'nın da transferine olanak sağlamaktadır. Kişinin deri özelliklerine göre bazı kişiler yüzey ile temas ettiklerinde tespit edilebilir miktarda DNA'yı yüzeye bırakabilirken, bazıları bırakmayabilir. Yüzeye epitel hücre bırakma durumu iyi verici olarak ifade edilmektedir [130-132]. Van Oorschot tarafından yapılan bir araştırmada nem, sıcak, soğuk, rüzgar, asit, sigara dumanı, mikroorganizma vb. gibi kötü dış çevre koşullarının ve cinsiyet, yaş, deri yapısı ve bazı dermatolojik hastalıkların (atopik dermatitis, psoriasis, deri ülseri vb.) yüksek oranda hücre ölümüne yol açtığını ve ciltteki pullanma hızını arttırdığı ifade edilmektedir [133]. Epitel yüzeyde hücrelerin kaybedilerek dökülen hücrelerin sayısının artması temas edilen yüzeye DNA analizi çalışması için gerekli hücrelerin transferini arttırmaktadır. Yüzey üzerinde DNA analizi için yeterli epitel hücre bırakan kişiler iyi verici olarak tanımlanmaktadır. Buna karşılık standart deneysel koşullar altında sağlıklı bireylerin düz bir yüzey üzerinde tam profil elde etmeyi olası kılabacak kadar hücresel materyali bırakamayacağı bazı araştırmalarda ifade edilmektedir [134].

Temas izleri yüksek derecede tahribata uğramış biyolojik deliller olduğundan, iz bırakılan nesnenin yüzey yapısı gerek deriden dökülen epitel hücrelerin tutunmasında ve parmak izinin oluşmasında gerekse DNA analizleri üzerinde etkili olmaktadır [135-137]. Parmak ile bası uygulanan yüzeyin pürüzlü olması terleme oranını arttırarak hem papil hatlarının belirgin olmasını sağlamakta hem de çok daha fazla dökülen epitel hücrenin yüzeye tutunmasına imkan sağlamaktadır [107]. Dokunma ile gerçekleşen her transferde olduğu gibi

temasın şiddeti, süresi, izi bırakan bireyin özellikleri, izin bulunduğu ortamın olay yeri olarak nitelenip delilin laboratuvara ulaştırılmasına kadar geçen süre, bırakılan hücrelerin dolayısı ile de DNA'nın miktarını ve kalitesini belirleyebilmektedir.

Temas izlerinde bulunan epitel hücrelerden çekirdek DNA'sının elde edilmesi, iz sahibinin kimliğini belirleme açısından yararlı olmaktadır [138-140]. Yapılan çalışmalarda tam bir DNA profilinin elde edilebildiği olgular olduğu gibi, hücre sayısının veya DNA kalitesinin yetersiz olabildiği durumlarda söz konusu olabilmektedir. Kaliteli hücrenin bulunduğu fakat DNA miktarının yetersiz olduğu durumlarda eser miktardaki DNA'dan, kalitesinin yetersiz olduğu durumlarda ise bozunmuş (degrade) DNA'dan bahsedilir. Temas izi hem eser miktarda DNA içeren hem de yüksek derecede tahribata uğramış degrade özellik gösterebilen bir biyolojik örnektir. Gelişmiş örnek toplama, DNA çekitleme, miktar tayini ve polimeraz zincir reaksiyonu teknikleri sayesinde, temas edilen yüzeylerden kişi identifikasyonu yapılarak, toplanan biyolojik örnekler suç soruşturmalarında delil niteliği kazanmaktadırlar. Özellikle kağıt yüzeylerden alınan örneklerde, kağıda birden çok kişinin temas etmesi sebebi ile, elde edilen DNA analiz bulguları karışım şeklinde de olabilmektedir.

2.8.2. Eser Miktarda (Degrede) DNA İçeren Biyolojik Örneklerle Yaklaşımlar

Degrade örnekler uzun süre olumsuz çevre şartlarına maruz kaldıklarından, bu örneklerden tam ve güvenilir profil elde etmek çoğu zaman zordur. Özellikle bu örneklerle çalışmada, analiz sonrası sonuçların yorumlanması aşamasında stokastik etki, pik yükseklikleri, alelik düşme, istenmeyen artefakt pikler gibi bazı durumlar araştırmayı yapan uzmanların işini zorlaştırmaktadır [133]. Bu tür biyolojik örneklerin toplanması, laboratuvara transferi, DNA çekitlenmesi ve çoğaltılması, sonuçların doğru bir şekilde yorumlanması eser miktarda DNA'nın etkin bir şekilde çalışılarak istenilen sonuca ulaşılmasını sağlamaktadır. Biyolojik örneğin olduğu ortamda bulunan su ve nükleaz enzimleri gibi etkenler DNA'yı parçalamaktadırlar [141]. Bu parçalanma sonucunda DNA'nın rastgele kırılması tek bir analizle güvenilir sonuç elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Günümüzde Multiplex STR kullanımı sayesinde çok az DNA olsa dahi (1 ng'dan daha az DNA yeterli olmaktadır) örnekler analizlenebilir düzeylere yükseltilebilmektedir. DNA analizinde, primerin bağlanabileceği hedef bölgenin sağlam olması amplifikasyonun başarılı olabilmesi için yeterlidir. Bu şekilde hedef DNA bölgesinin uzaması tam olur. DNA'da STR bölgesini içeren bir parçalanma olması durumunda PCR başarısız olur. Dolayısı ile uzama kırık bölgede durur.

Yapılan çalışmalarda parçalanmış DNA'da PCR amplifikasyonun başarısı lokus büyüklüğü ile ters orantılı bulunmuştur [120]. Lokusun başarılı tiplendirmesi o lokusun allel uzunluğuna bağlıdır. Kimliklendirme amaçlı kullanılacak lokusların seçiminde; lokusun mendel kalıtım yasalarına uyması, mutasyon sıklığının bilinmesi, lokusun ayırım gücü, yapısı, kromozomdaki yeri, alellerin dengede ve multipleks çoğaltmaya uygun olması, güvenilirliği, tekrarlanabilirliği vb. özelliklerinin olması gerekmektedir.

Birkaç hücreyi analiz edebilecek kadar hassas bir teknik olan 'LCN' (Low Copy Number-Düşük kopya sayısı) veya 'LT-DNA' (Low Template DNA- düşük miktar kalıp DNA) olarak adlandırılan analiz teknikleri, 100 pg'dan daha az miktarda DNA içeren örneklerin analizi için kullanılmaktadır [142]. Ancak düşük miktardaki DNA ile yapılan bu analizler, alel kaybı, alel eklenmesi, lokus kaybı, heterozigot pik dengesizliği, 'stutter' ürünlerinin oluşumu (PCR reaksiyonunun uzama aşamasında DNA polimeraz enzimi, bir tekrar ünitesini atladıktan sonra DNA ipliğine bağlanır ve o bölgeyi çoğaltır, bu durum DNA iplik kayması olarak nitelendirilmektedir) ve 'stutter' pik yüksekliklerindeki tutarsızlık gibi stokastik etkilere oldukça duyarlı olmakla birlikte laboratuvar kaynaklı kontaminasyon gibi riskleri de taşımaktadır.

Degrede DNA içeren örnekler kullanılarak, ticari STR multipleksleri ile yapılan PCR analizleri sonucunda genetik bilgi ya kısmen elde edilmekte ya da hiç elde edilememektedir [143]. Sonuç alınamayan durumlarda uzmanlar STR multiplekslerinden daha düşük ayırım gücüne sahip, zaman ve maliyeti arttıran SNP analizleri ve mitokondriyal DNA dizinleme analizlerine yönelmekte veya ticari STR multipleksleri için önerilen PCR döngü sayısını arttırarak sonuca ulaşmaya çalışmaktadırlar [144-146]. Geleneksel STR kitleri genelde aynı lokusları içermekte, fakat bunlar primer pozisyonlarının yeniden düzenlenmesi ile farklı ampikon boyutlarına sahip olmaktadır [147]. Özellikle bozulmuş DNA'ları tiplendirmek için, STR tekrar bölgelerine oldukça yakın yeni primerler tasarlanmıştır [143]. Küçük PCR ürünleri elde edilen bu primer değişiklikleri PCR için uygun kalıp molekül (DNA) potansiyelini artırmaktadır. Örneğin, AmpFISTR® MiniFiler™ kiti bu şekilde geliştirilmiştir.

Nesne üzerinden toplanan örneklerde, o nesneye temas eden kişi sayısınca biyolojik örneği yüzeyinde bulunmaktadır. Bu karışım örnekleri adli uygulamalarda sıklıkla karşılaşılan iki veya daha fazla kişinin oluşturduğu biyolojik örneklerdir [148]. Karışık DNA örneklerinin tiplendirilmesinde de mtDNA, Y kromozomu ve otozomal DNA kullanılabilir. Karışık DNA profillerini biyolojik artefaktlar ve teknolojik temeller göz önünde bulundurularak

yorumlanması gerekmektedir. İlk olarak Clayton ve arkadaşları tarafından tanımlanan ve Uluslararası Adli Genetik Topluluğunun (ISFG- International Society of Forensic Genetics) DNA komisyonu tarafından da kabul edilen DNA karışımlarının yorumlanmasına ait altı basamak Şekil 2.16’de gösterilmiştir [149,150].



Şekil 2.16. Karışım Örneklerinin Yorumlanmasında İzlenecek Yöntemler [149,150]

2.9. DNA Miktar Tayini Yöntemleri

DNA izolasyon işleminden sonra elde edilen izolatta PCR öncesinde ne kadar DNA olduğunun bilinmesi, yapılacak olan analizler için uygun DNA konsantrasyonunun ayarlanması için gereklidir [151,152]. DNA miktarı; spektrofotometrik, florimetrik yöntemler ve kantitatif PCR (qPCR-Gerçek zamanlı PCR- Real Time PCR) yöntemleriyle belirlenebilmektedir. Florimetrik yöntem; molekül tarafından ışığın absorbansına dayanan spektrofotometrik bir tekniktir. Floresan boya DNA molekülünün zincire bağlandığında yayılan floresan ışığa florimetre cihazı ile ölçülür. DNA miktarı ile floresan ışığa şiddetindeki artış doğru orantılıdır ve DNA miktarları 260 nm dalga boyunda cihaz da otomatik olarak belirlenmektedir.

2.10. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Oligonükleotid primerler kullanılarak, *in vitro* koşullarda DNA polimeraz enzimi tarafından kısa süre içerisinde çok küçük bir miktar DNA baz dizisinden milyonlarca defa DNA parçacığı çoğaltılmasıdır [152]. PCR işleminde ortamda çoğaltılacak bölgeye has

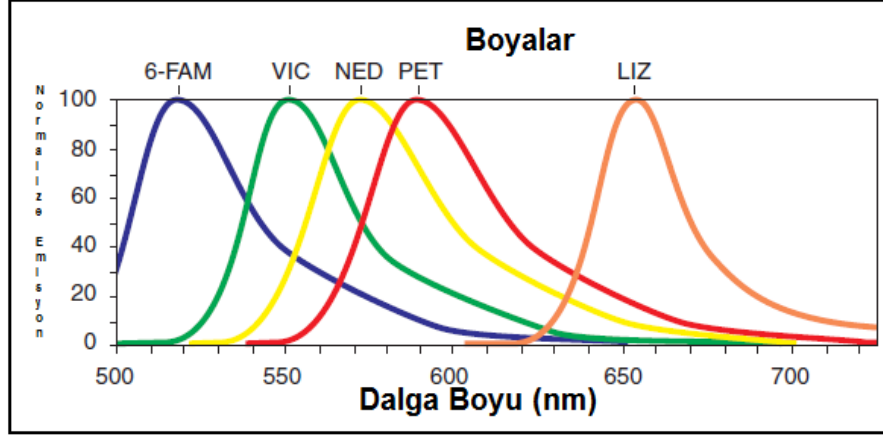
primerler, kalıp DNA, taq DNA ve polimeraz enzimi, deoksinükleotitler, tampon sıvı, pH, Mg^{+2} iyonlarının bulunması gerekmektedir. Bu bileşenler belirli oranlarda bir tüp içerisinde karıştırılarak hava ısıtmalı olan PCR makinelerine yerleştirilir. Belirli sıcaklık değişimlerinde kalıp DNA'nın açılması, primerlerin bağlanarak DNA sarmalının uzamasını sağlanmaktadır. Her PCR siklusu sonunda, hedef DNA'ya nükleik probalar veya floresan boyalar bağlandıktan sonra açığa çıkan floresanı tespit eden sistemlerle çalışılmaktadır. PCR işlemin başarılı olabilmesi için çok fazla kalıp DNA eklenirse, aygıt tarafından algılanacak linear dinamik aralığı aşan floresan yoğunluğu ("ölçek dışı" veri) elde edilirken, PCR'a eklenen alel kopyalarının toplam sayısının az olması durumunda ise, allelik dropout (düşme) meydana gelerek tam profil elde edilememekte, kısmi profil elde edilmektedir. Piyasada STR tiplendirme için kullanılan hali hazırda çok çeşitli ticari PCR kitleri bulunmakla birlikte çalışmamızda aşağıda detaylı bilgisi verilen ve birbirinden farklı özelliklere sahip üç ticari PCR kiti kullanılmıştır.

2.10.1. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti

Eser miktarda veya degrade DNA örneklerinden, güvenilir ve tam profile ulaşıp identifikasyona gidilebilmesi amacı ile konvansiyonel STR'lerden daha kısa ürünler (amplikonlar) elde etmek için çalışmalar başlatılmıştır [153]. Bu çalışmalar sonucunda 2009 yılında 9 lokus çoğaltabilen, floresan teknolojisine dayalı ve kapiler elektroforez yöntemi ile görüntülenebilen, çoğalttığı lokusların kısa olduğu ilk ticari kit geliştirilmiştir. Bu kit; primerlerin, yani DNA üzerindeki hedef bölgenin in vitro olarak belirlenip, polimeraz zincir reaksiyonunu başlatarak çoğaltılmasını sağlayan ve ortalama 20 baz çifti uzunluğunda olan kısa DNA parçalarının, ardışık tekrar bölgesinin çok daha yakınına yerleştirilmesi ile sağlanmıştır. MiniSTR'lar özellikle DNA'nın yüksek tahribata maruz kaldığı vakalarda güvenilirlik oranını arttırmak için üretilmişlerdir [145].

Applied Biosystems (ABI) tarafından geliştirilen ve 8 otozomal STR lokusu (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1P0 ve FGA) ve cinsiyet belirleyici Amelogenin lokusu olmak üzere 9 STR lokusunu tek PCR'da çoğaltabilen AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon kiti, bozulmuş veya inhibe olmuş DNA örneklerini genotiplemede başarılı sonuçlar vermektedir. Kite kullanılan STR primerleri tekrar dizinine daha yakın olduğu için, elde edilen amplikon boyutları Identifiler ve Globalfiler kitlerinden elde edilen amplikon boyutlarından daha kısadır. Kit üretiminde 5 farklı floresan boya (PET, LIZ, 6-FAM, VIC, NED) kullanılmıştır (Şekil 2.17) [154]. Tablo

2.5'te AmpFISTR® Minifiler® PCR Amplifikasyon Kiti için amplifiye edilmiş lokuslar, kromozomal lokasyonları ve karşılık gelen floresan marker boyaları gösterilmektedir. Analiz edilen örneklerin genotiplemesi için AmpFISTR® Minifiler® Allelic Ladder kullanılmaktadır. Allelik Ladder içindeki aleller ve kontrol DNA 9947A' nın genotiplemesi de tabloda ayrıca listelenmektedir.



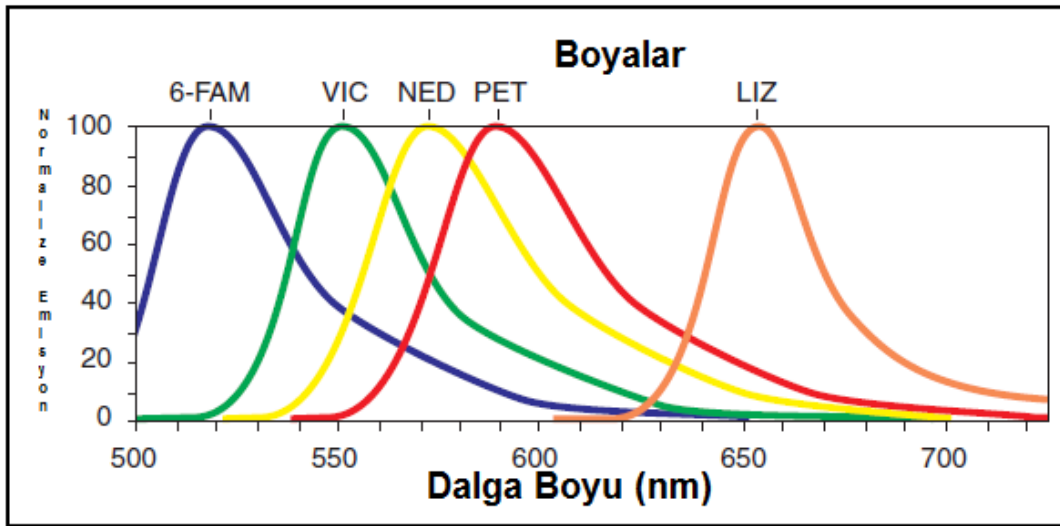
Şekil 2.17. AmpFISTR® MiniFiler® PCR Amplifikasyon kitinde kullanılan floresan boyalara ait ışım spektrumu [150].

Tablo 2.5. AmpFISTR® Minifiler® PCR Amplifikasyon Kiti lokus ve alelleri [150]

Lokus Tanımı	Kromozom Lokasyonu	Allelik Ladder içindeki Aleller	Boya	Kontrol DNA 9947A
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	6-FAM™	11
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		7,12
Amelogenin	X:p22.1-22.3 Y:p11.2	X, Y	VIC®	X,Y
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		20,23
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		28,31
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	NED™	9,10
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		12,15
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	PET®	11,12
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		24,26

2.10.2. AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon Kiti

AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kiti TPOX, D3S1358, D5S818, FGA, CSF1P0, D8S1179, D7S820, TH01, VWA, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D2S1338, D19S433 ve Amelogenin olmak üzere 15 adet tetranükleotid (4 bazlı tekrar ünitesi) tekrar bölgesi ve cinsiyet belirleyici lokus ile toplam 16 STR bölgesini tek PCR'da çoğaltabilen DNA profillemesi sistemi olarak Applied Biosystems (ABI) tarafından üretilmiştir [155]. Kite yer alan primerler, 5 farklı floresan boya kullanılarak geliştirilmiştir. Bu boyaların her biri (PET, LIZ, 6-FAM, VIC, NED) 660 nm'ye kadar farklı dalga boylarında floresan ışıma yaymaktadır (Şekil 2.18). PCR reaksiyonunda optimum sonuç elde etmek için 0.5-1.25 ng/μl aralığında DNA miktarı ile analize gidilmesi üretici tarafından önerilmektedir. AmpFlSTR® Identifiler™ kit içerisinde yer alan alelik ladder, her lokus için en yaygın alelleri içermektedir. Tablo 2.6'da amplifiye edilmiş lokusları, kromozomal lokasyonlarını ve karşılık gelen floresan marker boya göstermektedir. Analiz edilen örneklerin genotiplenmesi için AmpFlSTR® Identifiler® alelik ladder kullanılmaktadır. Alelik ladder içindeki aleller ve kontrol DNA 9947A'nın genotiplenmesi de tabloda ayrıca listelenmektedir.



Şekil 2.18. AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon kitinde kullanılan floresan boyalara ait ışıma spektrumu [155].

Tablo 2.6 AmpFlSTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon Kiti lokus ve alelleri [155]

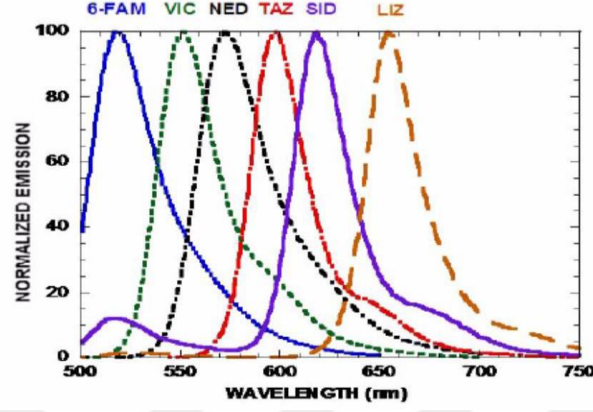
Lokus Tanımı	Kromozom Lokasyonu	Allelik Ladder içindeki Aleller	Boya	Kontrol DNA 9947A
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™	13-13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		30-30
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10-11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10-12
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC®	14-15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		8-9.3
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11-11
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11-12
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	NED™	19-23
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2		14-15
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17-18
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		8-8
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	PET®	15-19
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y		X-X
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11-11
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		23-24

2.10.3. AmpFISTR® Globalfiler™ PCR Amplifikasyon Kiti

FBI tarafından kurulan ve DNA veri bankası olan Combined DNA Index Systems (CODIS), adli bilimlerde kullanılmak üzere 16 STR lokusu belirlemiştir. Bu lokusların multipleks PCR kitleri de ticari olarak çeşitli firmalar tarafından üretilmiştir [156]. Bu lokuslar halen kullanılmakla birlikte, olay yerinden gelen aşırı derecede bozunmuş ve eser miktardaki biyolojik örneklerde tiplendirme sorunları yaşanabilmekte ve sonuç alınamamaktadır. Bunu ortadan kaldırmaya yönelik, araştırmacılar DNA üzerinde daha az yer kaplayan ve bozunmuş örneklerde dahi tiplendirme imkânı veren yeni STR lokuslarını bulmak ve optimize etmek için bu konuda çalışmalar yapmaktadırlar. GlobalFiler™ Kiti' de bu araştırmalar sonucunda ve DNA miktarının az olduğu zorlu adli vakalarda adalet daha hızlı hizmet etmek için ortaya çıkmış ve gelecekte kimliklendirmede tüm sistemlerin yerini alacağı öngörülen bir sistemdir [157-159]. GlobalFiler™ Kiti diğer kitlerden farklı olarak; uluslararası bilimsel standartlara uygun olarak adli bilimlere amaçlı üretilmiş ve CODIS, Avrupa ve FBI'ın kullandığı amplicon boyları 460 baz çiftinden küçük 24 adet STR lokusunu (D7S820, D5S818, CSF1PO, D1S1656, D13S317, D2S441, D12S391, D10S1248, D18S51, FGA, D21S11, D8S1179, VWA, D16S539, TH01, D3S1358, AMEL, D2S1338, D19S433, DYS391, TPOX, D22S1045, SE33, Y İndel.) içermekle birlikte 24 adet STR lokusu tek tüpe ve tek bir PCR ile çoğaltılabilmektedir. Degraded örneklerde başarı oranının artırılması için kit, lokuslarından en az 10 tanesi amplicon boyu 220 baz çiftinden küçük miniSTR lokusu içermektedir. Ayrıca GlobalFiler™ kiti karışım örneklerle (erkek-kadın DNA'sı) çalışmaya uygundur. Karışım örneklerde Amelogeninde yaşanabilecek alel düşmesi ya da Y kromozomda meydana gelen delesyon sonucu yanlış cinsiyet tespitini önlemek amacıyla kit, DYS391 ve Y-Indel olmak üzere 2 adet STR lokusu içermektedir. Kitin içeriğindeki primerlerin işaretlenmesi 5 farklı floresan etiket ile olmakta, PCR ürünlerinin uzunluklarının belirlenmesini sağlayan DNA size standart, primerlerden farklı altıncı bir floresan etiketle işaretlenmektedir (Şekil 2.19). Ayrıca kit, performansı geliştirilmiş, DNA enzimi içeren PCR reaksiyon karışımını içermekte ve bu karışım sayesinde PCR bileşenlerinin sayısı azaltılmış olmaktadır [160].

Bunun dışında çalışmalar, inhibitör içeren örneklerde başarı oranının artırıldığını göstermektedir. Amplifikasyon süresi 80 dakikayı geçmediğinden çoklu örnek analizlerinde daha kısa sürede sonuç elde edilmesini sağlamaktadır. Bu avantajları sayesinde çalışmamızda temas izi kalıntılarından DNA elde etme aşamasında bu teknolojiye de faydalanılmıştır.

Tablo 2.7’de kite ait amplifiye edilmiş lokuslar, kromozomal lokasyonlar ve karşılık gelen floresan marker boyalar gösterilmektedir. Analiz edilen örneklerin genotiplemesinde GlobalFiler® alelik ladder kullanılmaktadır. Alelik ladder içindeki aleller ve kontrol DNA’ sı 007’ nin genotiplemesi de tabloda ayrıca listelenmektedir.



Şekil 2.19. AmpFISTR® GlobalFiler® PCR Amplifikasyon kitinde kullanılan floresan boyalara ait ışıma spektrumu [161].

2.11. Elektroforez

Elektroforez; molekül boyutu farklılığı, elektriksel alandaki hareket kabiliyeti, faz ayrımı gibi özelliklere göre ayırım yapan bir tekniktir [162]. 1980 yıllarda DNA’ nın ayrıştırılmasında agaroz jel elektroforezi, poliakrilamid jel elektroforezi olarak kullanılan bu yöntem 1990’lı yıllarda sistemin otomatikleştirilmesi ve kapiller bir boru içerisinde gerçekleştirmeye elverişli olması ile birlikte popülerliği hızla artmıştır. Kapiller elektroforezin ana elemanları; dar bir kapiller, kapillere polimer dolduran şırınga, her iki kutupta geçirgenliği sağlayan tampon hazneleri ve yüksek voltajlı güç kaynağıdır [120]. Bunların yanında bir lazer, bir floresan dedektör, tarayıcı ve bilgisayar da kullanılır.

Negatif yüklü DNA molekülleri polimer içerisinde ve yüksek voltaj altında anoda doğru hareket eder [162]. Hareket hızı; polimer yapısı, DNA molekülün büyüklüğü ve elektriksel kuvvete bağlıdır. Kapiller tüp her örnek için yeniden polimerle doldurulur. DNA örneği kapiller içine alınarak sabit voltaj ve sabit sıcaklıkta anoda doğru hareket eder. DNA molekülleri, kapillerin silika ile kaplanmayan bölgesinden geçen DNA molekülleri, elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA’ nın bulunduğu jel matriks bu monokromatik ışık ile taranır.

Tablo 2.7. AmpFlSTR® Globalfiler® PCR Amplifikasyon Kiti lokus ve alelleri [161]

Lokus Tanımı	Kromozom Lokasyonu	Allelik Ladder içindeki Aleller	Boya	Kontrol DNA 007
D3S1358	3p21.31	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	6-FAM™	15, 16
vWA	12p13.31	11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		14, 16
D16S539	16q24.1	5, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15		9, 10
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11, 12
TPOX	2p23-2per	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		8, 8
Y indel	Yq11.221	1, 2	VIC®	2,2
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y		X, Y
D8S1179	8q24.13	5, 6, 7, 8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,19		12, 13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		28, 31
D18S51	18q21.33	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		12, 15
DYS391	Yq11.21	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	NED™	11,11
D2S441	2p14	8, 9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16, 17		14, 15
D19S433	19q12	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18.2, 19.2		14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		7, 9.3
FGA	4q28	13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		24, 26
D22S1045	22q12.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	TAZ™	11, 16
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18		11, 11
D13S317	13q22-31	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11, 11
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		7, 12
SE33	6q14	4.2, 6.3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20.2, 21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35, 35.2, 36, 37		17, 25.2
D10S1248	10q26.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	SID™	12, 15
D1S1656	1q42.2	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3		13, 16
D12S391	12p13.2	14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		18, 19
D2S1338	2q35	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28		20, 23

Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresans boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılarak kendi içinde karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. 6-FAM™ boya en kısa dalga uzunluğunda yayınır ve mavi olarak gösterilir, bunu VIC® boya (yeşil), NED™ boya (sarı), TAZ™ boya (kırmızı), SID™ boya (mor) ve LIZ® boya (turuncu) izler. Yayılan bu ışın bir CCD (Charge-Coupled Device) kamera tarafından algılanır. Bu veriler bir bilgisayara aktarılarak uygun bir yazılım ile değerlendirilip ekranda büyüklük ve yoğunluğu ifade eden pikler şeklinde okunur. Bunun okunabilmesi için, öncelikle floresan işaretli fragman büyüklüğü bilinen standartlar bu programa okutularak tanıtılmalıdır [163,164].

Standardizasyon işleminde alelik ladder (AL)'lar kullanılır. AL bir lokusa ait yaygın alellerin çoğunu içermekle birlikte allel boyutunun standardize edilmesi için gereklidir. İdeal bir kapiller 20-100 mm çaplı, uzunluğu 25-75cm arası değişebilen silika veya başka maddelerden yapılan bir borudur [84]. Ayrım yüksek voltaj (5-30 Kv, 1-150 mA) altında 200-500 V/cm doğru akımla sağlanır. Bu akımla hem moleküller elektrik ile yüklenir hem de tüm solüsyonun hareketi sağlanır (elektro-ozmoz) [165]. Kapiller elektroforez sisteminin kullanıldığı adli genetik incelemelerde PCR ürünlerinin LIF (Lazerle indüklenen floresan) dedektörler ile saptanması gerektiğinden PCR ürünleri floresan primerlerle işaretlenir [166].

İşaretlenmiş ve farklı büyüklükte DNA parçacıklarının her bir örneğe dahil edilmesi ile örnek içindeki alel büyüklükleri belirlenir, bu büyüklük bilinen tüm alelleri içeren bir tablo (Alelik Ladder Cetveli) ile karşılaştırılarak polimorfik tekrar sayısı belirlenir [167]. Alelik ladder, DNA analizlerinde özellikle elektroforetik ayırım yapan sistemlerde DNA dizilerinin boyutlarına göre değişen hareket farklılıklarını doğrulamak ve alel isimlendirmek için kullanılan bir referanstır [125,168]. Genotipler, örneklerden elde edilen alel boyutları ile alelik ladderdaki alel boyutları karşılaştırılarak değerlendirilir.

Analiz sonrası datalar bilgisayar ekranına elektroforegram şeklinde yansımaktadır. Tiplendirme sonucu, DNA moleküllerinin sayı ve boyut olarak derecelendirildiği elektroforegramda pik yükseklikleri olarak görülür. Tek bir kişiye ait sonuçlarda allele ait pikler tek olarak görülür. Ekstra pikler; stutter ürünler (hedeflenen ana pikten 4 baz kısa fazladan pik), inkomplet 3'A nükleotid ekleme, boya artefaktları ve karışık DNA örneklerinde görülür [119,164]. Elektroforegramda pik yüksekliği/alan oranı % 70 üzerinde ise tek örnek olduğu düşünülür. Pik yüksekliği/alan oranı % 15'in altında ise bu "stutter ürün" olarak değerlendirilir. Oran % 15-70 arasında ise bu örnekte iki veya daha fazla katılımcının olması muhtemeldir. Otozomal STR'lerin incelendiği bir elektroforegramda beklenen allel boyut aralığında 2'den fazla pik gösteren lokus olması, bir lokustaki heterozigot aleller arasında

belirgin bir pik yükseklik dengesizliğinin olması veya “stutter ürünlerin” anormal şekilde yüksek görülmesi durumunda örnek, karışım örnek olarak değerlendirilmektedir.

2.12. Belgelerin Saklandığı Ortamlarda Görülen Bozulmalar ve Nedenleri

Belgeleri oluşturan kâğıt, yüzey kaplama maddesi, mürekkep, boya gibi organik maddeler zamanla ve çevresel şartların etkisi ile bozunmaya/solmaya başlamaktadırlar [169]. Birçok fiziksel (depolama, taşıma, kullanma, ışık), kimyasal (atmosferik kirlilik, kâğıdın ve mürekkebin yapısı) ve biyolojik (mikroorganizma, böcek ve fare varlığı) faktör bu bozulma/solma sürecini hızlandırmaktadır. Bozulmalar, etmenine göre kimyasal bozulma ve biyolojik bozulma olarak sınıflandırılmaktadır. Kâğıtta meydana gelen kimyasal bozulmaların meydana getirdiği tahribatın durdurulmasında ya da yavaşlatılmasında ortam şartlarının kontrolü çok önemlidir. Depo koşullarının düzenlenmesi; kimyasal bozulmaların durdurulmasında ya da yavaşlatılmasında önemli bir basamak oluşturur [170]. Arşiv materyallerinin biyolojik bozulmasına neden olan canlılar kemirgenler, mikroorganizmalar ve böceklerdir. Arşiv ortamındaki kâğıdı mantarlar, böcekler, ısı, güneş ışığı, nem, toz ve kir tahrip etmekte ve özelliklerini bozmaktadır. Ayrıca havada bulunan asidik ve diğer gazlar, imalat sırasında ilave edilen zararlı kimyasallar, kâğıdı ve üzerindeki mürekkebi tahrip etmektedir. Adli belgelerin saklanma koşullarına göre bozulma etmenleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç başlık altında incelenmektedir.

2.12.1. Biyolojik Risk Faktörleri

Mantar, bakteri ve böcekler belgelere zarar veren biyolojik unsurlardır.

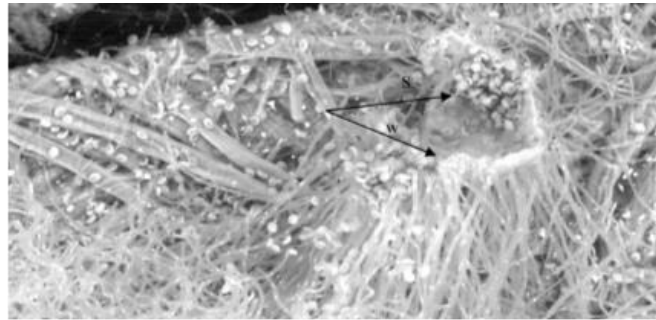
2.12.1.1. Mikroorganizmalar

Mantar ile bakterilerin ikisine birden “mikrobiyolojik etkenler” olarak ifade edilir [171]. Çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük olan bu mikrobiyolojik etkenler kâğıdın hammadde olan selülozun yanı sıra, yüzey kaplama ve dolgu maddelerini, demir ve bakır gibi metal kalıntıları, mürekkep ve pigment gibi renklendirici maddeleri besin kaynağı olarak kullanırlar. Salgıladıkları enzimler ve pigmentlerle, ürettikleri farklı metabolitlerle belgeler üzerinde tahribat meydana getirerek mürekkebin solmasına neden olmaktadır. Mantar özellikle demirli mürekkeplerin rengini soldurur. Kâğıtların mantara karşı gösterdikleri direniş farklı olup genel olarak asiditesi (pH =5,5-6) olan kâğıtlar ve reçine ile ağarlanmış

kağıtlar mantar tahribatına karşı dirençlidir. Küfler ise çok hücreli mikroorganizmalar olup, nemli nesneler üzerinde gözle görülür şekilde gelişebilirler. Kүf mantarlarının temel elementi hiflerdir. Hifler yaklaşık 2–10 mikrometre genişliğine sahip ve dallanmış iplikçikler şeklindeki oluşumlardır.

Hava akımlarıyla çok rahat taşınan mikroorganizmalar, belgelerin saklandıkları ortamın aeromikroflorasında yer alırlar [172]. Ortamdaki bağıl nemin %65 ve sıcaklığın 20°C’ nin üzerinde olması, kağıdın nem içeriğinin %8-10’a ulaşması, bağıl su aktivitesinin 0,65’den yüksek olması durumunda hava da bulunan mikroorganizmalar belgeler üzerine düşerek bunları besin kaynağı olarak kullanıp gelişim gösterirler. Mantarların üreyip çoğalmaları için gerekli olan bağıl nem ve kağıdın su aktivitesi bakterilere kıyasla daha düşük olduğundan, belgelerin saklandığı ortam koşulları mantarların gelişimi için daha uygundur (Şekil 2.20) [173]. Mantarların en önemli özelliği, onların günlük yaşantı içerisinde her zaman ve her yerde bulunabilmeleridir. Bu özelliklerinden dolayı “hep var” adını alırlar. Mantarlar ayrıca her türlü kaynağı kullanıp beslenebilir ve gelişimlerini tamamlayabilirler; bu da mantarlara “hepobur” denilmesini sağlamaktadır [174].

Selülozun mantar tarafından parçalanması ile kağıtta genellikle sarı, kahverengi ve siyah noktalar oluşmaktadır. Bazıları ise renksiz koloniler halindedir ve bunlar ortamda demir, linyin gibi madenler bulunduğunda lekelenmelere sebep olabilirler. Arşivde saklanan belgeler için zararlı olan 600’den fazla mantar cinsinin bulunduğu çeşitli çalışmalarda tespit edilmiştir [170].



Şekil 2.20: Kâğıt yüzeyde % 100 nemde gelişmiş *C. globosum* sporları [175]

Kağıt esaslı materyallerde hasara neden olan mikroorganizmaların canlılığının saptanması, metabolik basamakların ortaya çıkarılması ve bu mikroorganizmaların türlerinin saptanması, belgelerin korunması açısından büyük önem taşır [176].

Mantarlar, arşiv ortamında ısı, nem ve yapı özellikleri gibi etkenlere göre farklı tür ve oranlarda dağılım gösterir. Dünya genelinde birçok ülkede havasal mantarlar ile ilgili yapılan

çeşitli çalışmalarda, en sık saptanan cinslerin *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Aspergillus* olduğu görülmektedir [177]. Özellikle *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri çevrede çok yaygın bulunan mikroorganizmalardır. İç ortam havasında, dış ortam havasında bulunduklarından daha fazla konsantrasyonda bulunmaktadır ve toprak, yaprak, canlı bitki ve tahıllar üzerinde kolonize olmaktadır [178,179]. *S. aureus*, *Micrococcus spp.*, *E.coli*, *B. Subtilis* bakteri türleri yapılan araştırmalarda iç ortam havasında en sık rastlanan türler olduğu tespit edilmiştir. Gram (+) bakteriler genellikle Gram (-) bakterilere oranla aerosol koşullarında daha uzun yaşayabilmektedirler. *S. aureus* gibi Gram (+) bakteriler peptidoglikan zengin bir hücre duvarına sahip olduklarından *E. coli* gibi Gram (-) bakterilere göre çevre şartlarına daha dayanıklıdır [180-182].

2.12.1.2. Böcekler ve Kemiriciler

Kağıt ve diğer selüloz ürünlerine zarar verdiği bilinen biyolojik tahrip ortaklarından biri olan böcek türlerinden arşiv ortamında en sık rastlananları ve kağıda en fazla zarar verenleri; kağıt güveleri veya gümüşbalığı böceği (*Thysanurans*), hamam böcekleri (*Cockroaches*), kitap kurtları, kabuk biti veya kitap bitti (*Psocid*), termitler (*Termites*)' dir [183]. Ancak böceklerin verdiği zararlar mikroorganizmalarinkinden daha farklıdır ve fiziksel bozulmalara neden olurlar. Bunlar yumurtalarını genellikle kağıt yaprakların uç kısımlarına bırakırlar. Yumurtlamadan sonra çıkan larva, kağıt destesini içine doğru yiyerek ilerler, koza (krizalit) dönemi, için hazır olduğu zaman yüzeye tekrar geri döner. Sonunda tamamen gelişmiş böcek ortaya çıkar. Temizlik sağlanarak, arşivler muntazam olarak gözden geçirilerek ve sürekli takip edilerek kolaylıkla kontrol altına alınabilirler. Fare ve diğer kemiriciler kağıda mekanik tarzda saldırarak zarar verirler. Bunlarla mücadele etmenin en etkili yolu, onları imha etmek veya kemirici giremeyen yapılar yapmak ve onları uzaklaştırıcı malzemeler kullanmaktır [170]. Depo alanlarında karşılaşılan her böcek belgelere zarar vermemekle birlikte bunların varlıkları zararlı böcek türlerini ortama çekebilir.

2.12.2. Kimyasal Risk Faktörleri

Belgeye zarar veren kimyasal unsurlar; asidik gazlar, atmosferdeki duman, tozlar, mürekkep veya kağıdın imalatında kullanılan kimyasal maddelerin ters etkileridir [184]. Mürekkebin kimyasal özellikleri nedeni ile oluşabilecek kimyasal reaksiyonlar neticesinde kağıdın dokusunda tahribat ve mürekkebin moleküllerinde değişimler oluşabilmektedir.

Mürekkepler nemli ortamda veya sıvı teması ile dağılım göstermektedirler. Demir sülfür içeren mürekkepler ise içeriğindeki demirin zamanla oksitlenmesi ile aside dönüşmekte ve bu asit kağıdı yakarak siyahlaştırmakta ve kağıtta delinmeler meydana gelmektedir [185]. Bundan başka içeriğinde bakır bulunan mürekkepler de içeriğindeki bakırın zamanla oksitlenmesi ile aside dönüşerek kağıda parçalanma veya yırtılma şeklinde zarar vermektedir. Mürekkebin kimyasal yapısından kaynaklı kağıt üzerinde lokal olarak mürekkep yanıkları oluşabilir. Bunun dışında kağıdın tüm yüzeyinde görülebilen yanıklar ise kağıdın yapısından kaynaklı bir bozulmanın varlığını göstermektedir. Atmosferik kirlenme, özellikle iç yakımlı makinelerin, kalorifer ocaklarının, elektrik santrallerinin, kömür ve petrol gibi yakıtlar kullanan endüstrilerin açığa çıkardığı sülfürdioksit ve diazotmonoksitler türü malzemelere etki ederek kağıdın asit bozunmasını hızlandırabilmektedirler [186,187]. Toz ve kir, fiziksel ve kimyasal bozunmanın kaynaklarından olup kükürt bileşiklerinin zararlı etkisini daha da arttırmalar. Toz içine asit oluşturan maddeler bulunduğu gibi bazen bozunmayı arttıran metal iyonları da bulunmaktadır.

2.12.3. Fiziksel Risk Faktörleri

Adli belgelerin bulunduğu ortamdaki yetersiz koşullar ya da ortamdaki birden fazla olumsuz koşulun birbirini etkilemesi de kağıt ve mürekkep yapısının bozulma sürecini hızlandırmakta, kağıtta fotokimyasal, hidrolitik ve oksitleyici değişikliklere sebep olmaktadır.

Organik malzemelerin korunması ve mekanik bozulma riskinin de en aza indirgenebilmesi için dünya genelinde kabul gören tolere edilebilir bağıl nem miktarı %55-65 olarak belirlenmiştir [188]. Bununla birlikte biyolojik risk açısından da %70 sınır değerdir ve ortamdaki bağıl nemin %65'i aşmaması tavsiye edilmektedir. Uluslararası Kütüphane Dernekleri ve Kurumları Federasyonu (IFLA) ilkelerine göre her 10°C lik sıcaklık artışında belgeler üzerindeki kimyasal bozulma hızının iki katına ulaştığı belirtilmiştir. Literatürde sıcaklığın düşük bağıl nem ile kurumayı, yüksek bağıl nem ile küflenmeyi hızlandırdığı tespit edilmiştir. Bundan bahisle saklanan ortam sıcaklığının 20°C'yi aşmaması gerektiği bildirilmiştir. Belgelerin saklandığı ortamdaki ışık şiddeti veya gün ışığına maruz kaldıklarında üzerlerindeki mürekkep etkilenmektedir [68]. Güneş ışığına maruz kalan kağıt lifleri yavaş yavaş dayanıklılıklarını kaybederler. Bu tahribatın hızı; ışık şiddeti, sıcaklık ve ortamın nemi ile değişmektedir. Bağıl nemin, doğal veya yapay ışığın, sıcaklığın, ışığın dalga boyunun mürekkebin solmasını nasıl etkilediği ve kağıdın fotokimyasal yapısını nasıl bozduğu ile ilgili literatürde bazı çalışmalar bulunmaktadır [2,4].

2.13. Kağıttan Mikroorganizma Örneği Alınması ve Mikroorganizmaları Tanımlama Yöntemleri

Bakteri ve mantar gibi yüzeyde gözlenebilir mikroorganizmalar mikrobiyolojik inceleme öncesinde belge üzerinden svap ya da yapışkan bant yardımı ile alınabilir [189]. Yapışkan bandın belgeye zarar vermemesi için yapışkanlığı az olan ve mikroskopta görüntülenebilir şeffaf bantlar seçilmelidir. Svapla örnek toplama yöntemi kültür veya sulu çözelti örneği hazırlanması için uygun bir yöntemdir ve kesinlikle belgeye zarar vermemektedir. Mikroorganizmaların tespit edilmesi ve türlerinin tanımlanmasında uzun süre kültür temelli yöntemler kullanılmakla birlikte moleküler tekniklerde kullanılmaktadır [190]. Kültürel yaklaşımlar, izole edilen organizmanın fizyolojik ve biyokimyasal potansiyelinin anlaşılmasını sağlamakla birlikte, kompleks mikrobiyal komünite çeşitliliği hakkında bilgi sağlayamaz. Geleneksel kültür temelli yöntemler standart laboratuvar koşullarında sadece canlı ve kültüre edilebilir organizmaların izolasyonuna izin verir. Bu da doğal çevrelerde var olan mikroorganizmaların sadece %0.1-1'inin tanımlanabilmesi, karakterize edilerek isimlendirilmesi anlamına gelmektedir. Moleküler yöntemlerdeki gelişmeler, mikroorganizmaları izole etmeden mikrobiyolojik çeşitliliğin araştırılması açısından ve tanımlama yapmaya izin veren bir alternatif oluşturmuştur.

2.14. Besiyerleri

Besiyeri veya besiortamı, mikroorganizmaları veya hücrelerin gelişimini desteklemek amacıyla laboratuvar ortamında hazırlanmış sıvı veya jel olan besleyici ortamlara verilen genel kavramdır [191]. Genellikle mikroorganizmaları izole etme, üretme, çeşitli testleri uygulamak suretiyle ayırıcı tanı yapabilmede kullanılan sıvı veya katı besiyerleri kullanım amaçlarına göre birkaç farklı gruba ayrılan cansız ortamlardır. Mikrobiyolojik çalışmalar sırasında tüm mikroorganizmaların geliştirilebileceği nitelikte bir besiyeri olmadığından ekim yapılırken, üretilmesi/çoğaltılması düşünülen mikroorganizmanın özelliklerine göre uygun olan besiyeri veya besiyerleri seçilmektedir [192]. Genel kullanım besiyerleri; rutin olarak günlük laboratuvar çalışmalarında kullanılan ve birçok mikroorganizmanın üreyebildiği besiyerleridir (örn. jelöz agar, malt agar vb.). Özel besiyerleri ise; çalışma amacına göre üremeleri zor olan bazı mikroorganizmaların üretilmeleri için hazırlanan ve içerisine üretilecek mikroorganizmanın özelliklerine göre ek katkılar ile zenginleştirilen kompleks yapıdaki besiyerleridir. Buna örnek olarak, Endo agar ve Mac Concey gibi besiyerlerini verebiliriz.

2.15. Mikroorganizmaların Tanımlanması ve Mikrobiyal Üremenin Ölçülmesi

Küf, mantar gibi mikroorganizmaların tanımlanmasında genellikle optik olarak makroskobik ve mikroskobik gözlemler kullanılırken bakterilerin tanımlanmasında rutinde boyama yöntemi tercih edilmektedir. Boya olarak genelde kristal viyole, safranin, metilen mavisi gibi pozitif yüklü olan bazik boyalar; mikroorganizmaların yapısında bulunan polisakkaritler, nükleik asitler ve proteinler negatif yüklü moleküllere bağlanırlar ve bu mikroorganizmaların görünür hale gelmesini sağlarlar [193].

Mikroorganizmaların üremelerini saptamak için uygun optimal koşullarda (genelde etüvde) üremiş kültürler kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların üremesi hacmin ölçülmesi, kuru veya yaş ağırlık tayini, bulanıklık tayini gibi çeşitli yöntemlerle tayin edilir [191,192]. Belli miktardaki kültürlerde inkübe edilmiş olan mikroorganizmaların üreme durumu, ya standart bulanıklık tüpleri (McFarland, Brown) ile karşılaştırarak veya spektrofotometrik yöntemle (optikal densite tayini ile) tespit edilmektedir [194]. McFarland standartları, baryum klorit ve sülfürik asitin farklı hacimlerde karıştırılması sonucu oluşan baryum sülfatın neden olduğu bulanıklık esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle McFarland standardının farklı bulanıklık düzeyleri ile farklı sayılardaki bakterilerin oluşturduğu süspansiyonlardaki bulanıklıkların gözle karşılaştırılarak içerdikleri bakteri sayısının yaklaşık olarak saptanması ve standardize edilmesi sağlanır. Bu yöntemde bir ortamdaki mikropların sayısı yaklaşık olarak, McFarland standart tüplerinin bulanıklığı skalası yardımı ile tayin edilebilmektedir [195].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyisel çalışmanın genetik inceleme kısmı İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü Adli Bilimler Laboratuvarı bünyesinde bulunan Fen Bilimleri Anabilim Dalı'na bağlı Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı ve Öğrenci Laboratuvarındaki cihaz ve gereçler; mikrobiyolojik kısmı ise Tıp Bilimleri Anabilim Dalı'na bağlı Adli Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan cihaz ve gereçler kullanılarak çalışıldı. Tarafımızca oluşturulan ve belli fiziksel koşullara maruz bırakılan farklı kalitedeki kağıtlar üzerindeki farklı tükenmez kalem mürekkebi örneklerinden alınan numuneler ile iki farklı arşivde saklanan belge örneklerinden alınan numunelerde bulunan tükenmez kalem mürekkebi içerisindeki boyar maddelerin moleküler dönüşümlerinin incelendiği kısım ise Acıbadem Sağlık Grubu bünyesindeki Acıbadem Üniversitesi Labmed Tıbbi Laboratuvarındaki cihaz ve gereçler kullanılarak yürütüldü. Çalışmamızın laboratuvar uygulamalarına 2015 yılı Haziran ayında başlanıp, deneyler ve gerekli tüm hesaplamalar 2018 yılı Temmuz ayında tamamlandı.

Çalışmanın genetik kısmında yer alan öncü çalışmalar, araştırmacının kendisinin bası uygulayarak oluşturduğu temas izi (el sürüntüsü) örnekleri ile yapıldı. Geliştirilen yöntemin doğruluğunun tespiti için optimizasyon çalışmaları biri araştırmacının kendisi olmak üzere iki kadın ve iki erkek toplam dört gönüllüden ağız içi sürüntüsü ve farklı kağıt yüzey tipleri üzerine temas izi (el sürüntüsü) örnekleri alınarak STR analizi ile DNA profillemesi gerçekleştirildi. El sürüntü örneklerine PCR işlemi 3 farklı STR kiti (AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR, AmpFlSTR® IdentiFiler™ PCR ve AmpFlSTR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kiti) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular neticesinde geliştirilen yöntem 1 gün ile 10 yıl zaman aralığında aynı kişi tarafından farklı tükenmez kalemlerle yazılmış bir günlükten ve bir hukuk bürosu arşivinden alınan örneklerle uygulandı. Çalışmanın mikrobiyoloji kısmında belgenin saklama koşullarında ortamda bulunabilecek olan mikroorganizmaların mürekkebin bileşiğindeki boyar maddelerin zamanla değişimine etkisini incelemek için, arşiv ortamında ve belge üzerinde olabilecek küf, mantar ve bakteri türlerinin belirlenerek, bu mikrobiyolojik etkenlerle kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş belgeler aşama aşama incelendi. Işık etkisi ile farklı mürekkeplerin bileşiğindeki boyar maddelerin zamanla moleküler dönüşümlerinin incelenmesi aşamasında ise, piyasadan rastgele seçilmiş farklı marka ve modeldeki 5'er adet mavi ve siyah tükenmez kalem ile kristal viyole (CV), metil viyole (MV), pararosanilin (PR) ve viktorya mavisi (VB) boyar maddelerinin ayrı ayrı

hazırlanan standard çözeltileriyle piyasadan rastgele seçilmiş iki farklı kalitedeki kağıt tipine çizgiler çizildi ve bu numunelere yapay soldurma tekniği uygulandı. Optimize edilen yöntem, hazırlanan örnekler ve biri hukuk bürosu arşivi biri hastane temizlik kayıt defteri arşivi olmak üzere iki ayrı arşivden 1.2 mm'lik panç yardımıyla alınan numunelere uygulandı.

3.1.Çalışmanın Genetik İnceleme Aşaması

3.1.1. Genetik İnceleme Çalışmalarında Kullanılan Gereçler

Çalışmanın genetik inceleme deneyleri boyunca kullanılan tüm gereçler, bunların marka ve modelleri Tablo 3.1’de verildiği gibidir.

Tablo 3.1. Genetik analizlerde kullanılan gereçlerin adları, marka ve modelleri

Kullanılan Gereç	Marka-Model
Otomatik pipet ve uçları; 0.1- 2.5 µL 2.5- 20 µL 10- 100 µL 100- 1000 µL	Eppendorf Research
Mikrosantrifüj	Heraus Biofuge 15
Vorteks	Heidolph
Isıtıcı Blok Thermomixer	Termomixer compact
Florimetre	Fluorometer Qubit® Invitrogen™
Heraus DNA İzolasyon Kabini	Thermo Scientific Heraeus, HERAsafe KS12
Buzdolabı	Sharp SJ-PT69R
Derin Dondurucu	Uğur-500 BK
PCR Cihazı	GeneAmp® 9700 PCR System
Minisantrifüj	Zentrifuge 3200
Su Banyosu	Nüve
3130 Genetik Analizör	ABI PRISM® 3130 - Applied Biosystems
Otoklav	Nüve-OT4060
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore Direct Q3
Agaroz Jel Güç Kaynağı	Bio-Rad
UV Transillüminatör	Biometra
Yatay Elektroforez Tankı	Biometra
Jel Görüntüleme Sistemi	Biometra
Elektronik Hassas Terazi	Precisa XB 220 A
İmmersiyon Mikroskobu	Nikon
Panç	Miltex 3 mm

3.1.2. Genetik İnceleme Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal Madde ve Kitler

Çalışmanın genetik inceleme aşaması boyunca kullanılan tüm kimyasal maddelerin ve kitlerin adları, marka ve özellikleri Tablo 3.2’de verildiği gibidir.

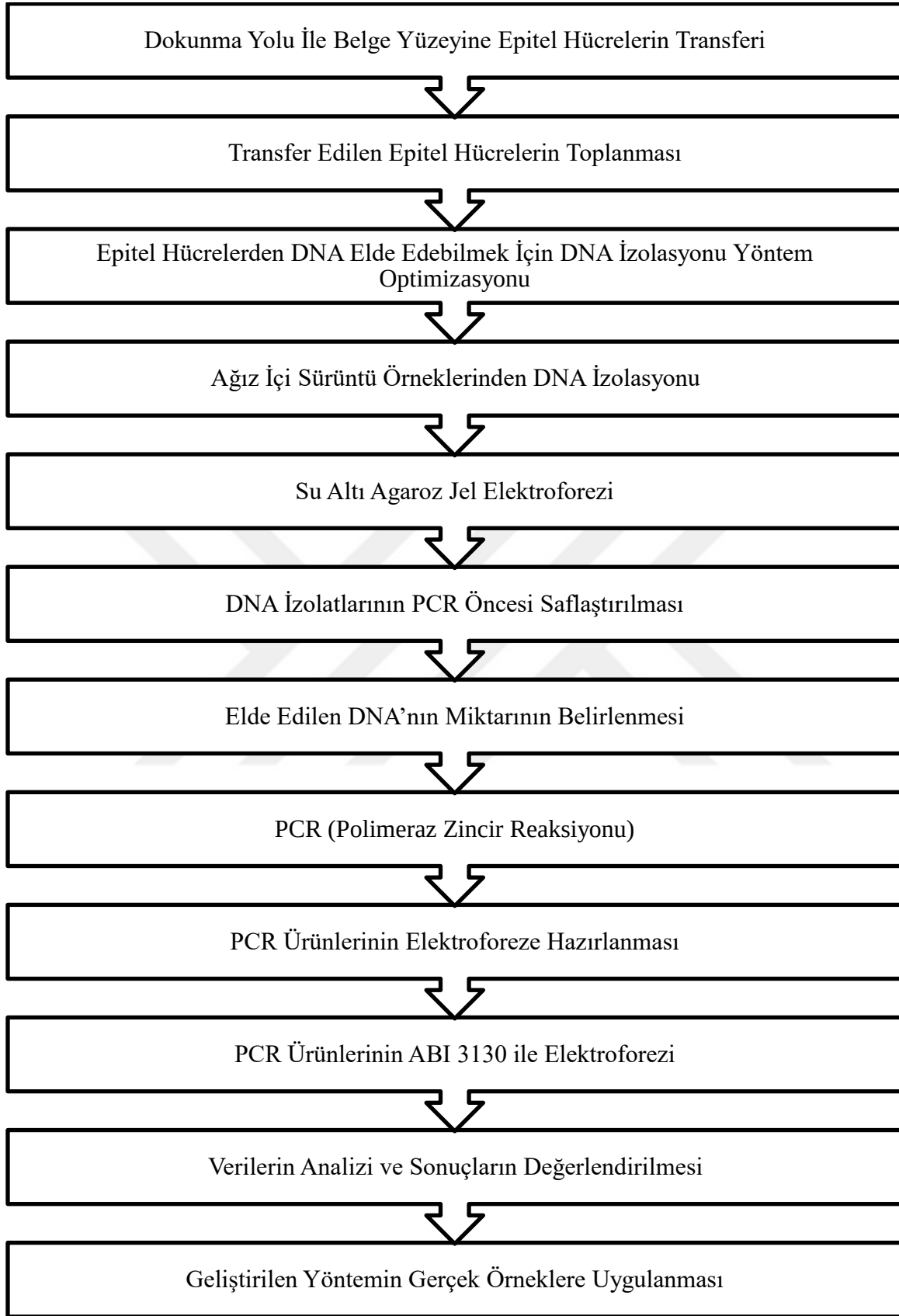
Tablo 3.2. Genetik analizlerde kullanılan kimyasal madde ve kitlerin listesi

Çalışmadaki Kullanım Amacı	Malzemenin Adı	Markası/Özellği
Sterilizasyon	Zefirolum Fort Çözelti 1000 mL- Zefiran	Kimpa
Ağız İçi Sürüntü Örneği Alımı	Normal Steril Swap	HydraFlock® Standard Tapered
Sürüntü Örneklerinden Epitel Hücre Toplanması	Yeni Nesil Steril Swap Normal Steril Swap	4N6 FLOQSwabs® Crime Scene HydraFlock® Standard Tapered
DNA Çekilmesi	DNA İzolasyon Kitleri	Qiagen QIAamp® DNA Mini Kit (Ağız İçi Sürüntü Örnekleri İçin)
		Qiagen QIAamp® DNA Micro Kit (Temas İzleri İçin)
	Çözeltiler	DDT(Diklorodifeniltrikloroetan), PBS (Fosfat Tamponu)
	Etanol	Merck® (%95)
	Proteinaz K	Qiagen®
DNA Kalitesinin Belirlenmesi / Agaroz Jel Elektroforezi	Agaroz	PeqGold®
	Etidyum Bromür	Sigma®
	Disodyum Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	Sigma®
	Tris Hidroksil Metil Amino Metan (Tris baz)	Sigma®
	6X Yükleme Tamponu	Fermentas®
DNA İzolatlarının Saflaştırılması	Genomik DNA Pürifikasyon Kiti	Merck® Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters
DNA Miktar Ölçümü	Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen®, USA
PCR Aşaması	PCR Amplifikasyonunda Kullanılan Kitler	AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kit
		AmpFISTR® Identifiler PCR Amplifikasyon Kit
		AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kit
Elektroforez Aşaması	Polimer Pop-4	Applied Biosystems™ POP-4™ Polymer for 3130 Genetic Analyzers
	“Alel size” ile yürüyen örneklerin “size”lerinin karşılaştırılması	GeneScan™-500 LIZ™ Size Standard
		GeneScan™-600 LIZ™ Size Standard
	10X EDTA Tamponu	Life Technologies
	Piklerin Tanımlanmasında kullanılan Referans Madde	AmpFISTR® Identifiler™ , AmpFISTR® MiniFiler™ ve AmpFISTR® GlobalFiler™ Allelic Ladder
	Hi-Di Formamid	Applied Biosystems™

3.1.3. Çalışmanın Genetik İnceleme Basamağının Laboratuvar Aşaması

Çalışmanın bu aşaması Haziran 2015-Kasım 2015 ayları arasında yapıldı. Kağıt yüzey üzerine bırakılan temas izi örnekleri ile birlikte kontrol amaçlı mukayese yapabilmek ve çalışmanın başarı oranını belirleyebilmek için aynı kişiye ait ağız içi sürüntü örnekleri de kullanıldı. Belgeye temas süresinin, farklı yüzey tipindeki belgelerin ve belgenin saklandığı koşulun; teması gerçekleştiren kişinin cinsiyeti, yaşı, kullandığı kozmetik ürünler, epitelyum vericiliği, bireysel ve çevresel şartlar elde edilen DNA miktarını ve kalitesini etkilediği bilindiğinden analizler yapılırken bu parametreler de dikkate alındı. Öncü çalışmalar ve yöntem geliştirme aşamasında araştırmacının kendi el sürüntüsü örnekleri kullanıldı. Belge üzerinden 4 farklı yöntemle toplanan eser miktardaki degrade epitel hücrelerinden saf ve miktarı fazla DNA elde edebilmek için modifiye edilen silika temelli izolasyon yöntemi taze örneklerle uygulandı. Çekitlenen DNA'nın varlığı ve kalitesi agaroz jel elektroforezinde gözlemlenerek DNA saflaştırıldı. Saflaştırma sonrasında konsantre edilen DNA'lar üç farklı PCR kiti ile çoğaltıldı. DNA tiplendirilmesinde öncelikle degrade örneklerin identifikasyonuna uygun olduğu bilinen AmpFISTR® Mini STR™ yöntemi daha sonra AmpFISTR® Identifier PCR™ yöntemi ve en son yeni nesil teknoloji olan AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR yöntemi kullanıldı. PCR sonrası ürünler ABI 3130 kapiler elektroforez sisteminde tiplendirildi. Yöntem optimizasyonu sonrasında araştırmacı dışında, onam formu (EK1) imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul eden 3 gönüllü kişinin ağız içi sürüntü örnekleri ve el sürüntüsü örnekleri kullanılarak yöntemin geçerliliği sağlandı. Elde edilen bulgular neticesinde geliştirilen yöntem, 1 gün ila 10 yıl zaman aralığında yazılmış bir günlük sayfalarından ve bir hukuk bürosu arşivinden rastgele alınan toplam 18 adet örneğe uygulandı.

Çalışmamızın genetik laboratuvarı aşaması Şekil 3.1'de ifade edildiği gibi 12 basamakta gerçekleştirildi.

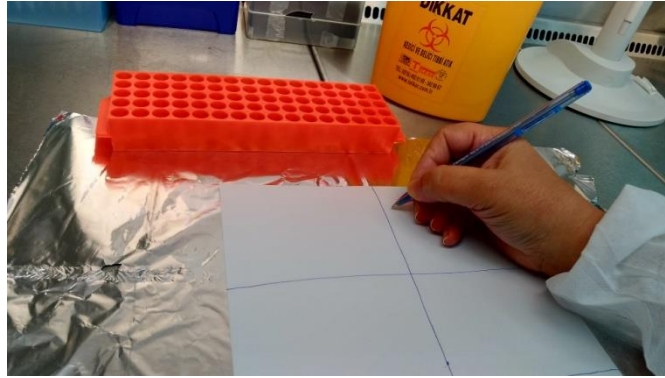


Şekil 3.1. Genetik analiz basamaklarının iş akış şeması

3.1.4. Dokunma Yolu İle Belge Yüzeyine Epitel Hücrelerin Transferi

Çalışmanın amacı doğrultusunda 4 farklı kalitede kağıt yüzey (magazin kağıdı, çek tipi senet kağıdı, 80g/m² ve 100g/m² A4 fotokopi kağıdı) seçildi. Bu yüzeylerde iz oluşturma işlemi için araştırmacı tarafından basit dokunma (kalem tutar şekilde kağıt yüzeyinde elin hareket ettirilmesi) yöntemi ile kağıt yüzeylerde rastgele belirlenen bölgelere 10 sn (saniye) süre ile bası uygulandı. DNA analizine imkan veren uygun kalitede ve yeterli miktarda epitel hücrenin kağıt yüzeyden toplanabilmesi için geliştirilecek yöntemin belirlenebilmesi amacıyla her bir yüzey tipinden eş 4'er numune hazırlandı (Şekil 3.2). Bakteriyal kontaminasyonu minimuma indirmek amacıyla;

- DeneySEL çalışma öncesinde her bir kağıt yüzey ile kullanılan sarf malzemeler 30 dk süre ile UV altında bekletildi,
- Bası uygulanmasından 10 dk öncesinde araştırmacının elini yıkaması ve bası uygulayıcaya kadar herhangi bir yere dokunmaması sağlandı,
- Bası uygulama işlemi, UV uygulanan ve zefirol (%10 yoğunlukta) ile silinerek steril edilen kabin içerisinde gerçekleştirildi,
- Kağıt yüzeyden gelebilecek kontaminasyon varlığını kontrol edebilmek için her basamakta kağıt yüzeyden negatif kontrol alınarak analize dahil edildi.

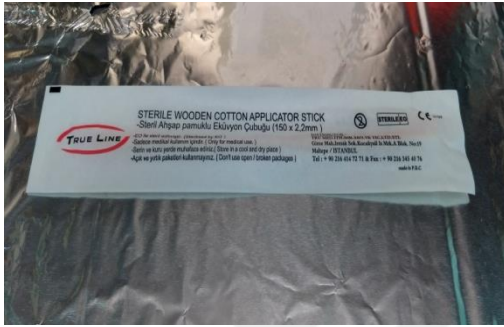


Şekil 3.2. DNA analizi için el sürüntü örneklerinin oluşturulması

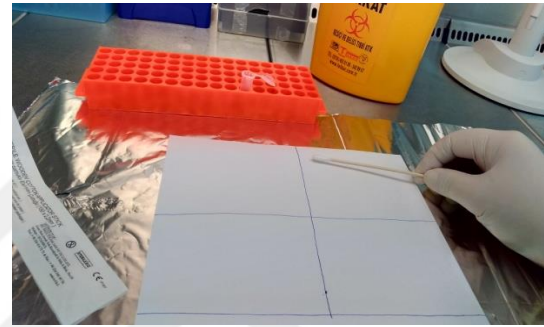
3.1.5. Transfer Edilen Epitel Hücrelerin Toplanması

Kağıt yüzey üzerinden epitel hücrelerin toplanmasında; herhangi bir tahribat yapmadan normal svap aracılığı ile, yeni nesil svap aracılığı ile ve mikroskop altında epitel hücrelerin toplanması yöntemleri ile bunlara ek olarak bası izinin bulunduğu bölgenin 3 mm' lik panç yardımı ile kesilerek doğrudan izolasyonda kullanılması yöntemi denendi.

- İlk olarak çalışmada kullanılan yüzeylerden sürüntü alınması serum fizyolojik ile ıslatılmış normal swap aracılığı ile gerçekleştirildi (Şekil 3.3).
 - Kağıt yüzeye bırakılan epitel hücrelerin parçalanıp degrade olmaması için bası uygulanan bölgedeki yüzey üst taraftan alt tarafa doğru tek yönde taranarak sürüntü örneği alındı (Şekil 3.4).
 - Alınan sürüntü örneğinden ve bası izinin uygulanmadığı bölgeden alınan negatif kontrolden Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit ile DNA çekitlendi.
 - Su altı agaroz jel elektroforezi uygulandı (Şekil 4.1).



Şekil 3.3. Normal swap örneği

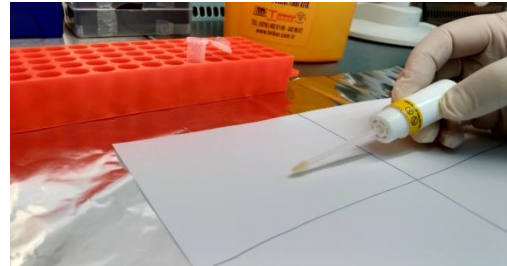


Şekil 3.4. Normal swap ile hücre toplama

- İkinci olarak kağıt yüzeylerden sürüntü alınması serum fizyolojik ile ıslatılmış yeni nesil swap aracılığı ile gerçekleştirildi (Şekil 3.5).
 - Kağıt yüzeye bırakılan epitel hücrelerin parçalanıp degrade olmaması için bası uygulanan bölgedeki yüzey üst taraftan alt tarafa doğru taranarak tek yönde sürüntü örneği alındı (Şekil 3.6).
 - Alınan sürüntü örneğinden ve bası izinin uygulanmadığı bölgeden alınan negatif kontrolden Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit ile DNA çekitlendi.
 - Su altı agaroz jel elektroforezi uygulandı (Şekil 4.2).

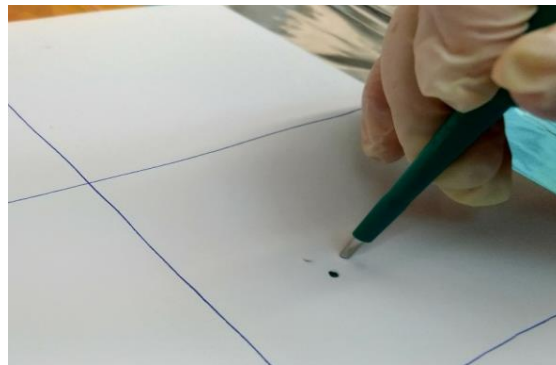


Şekil 3.5. Yeni nesil swap örneği



Şekil 3.6. Yeni nesil swap ile hücre toplama

- Üçüncü olarak kağıt yüzeylerden epitel hücre toplanması mikroskop altında yapıldı.
 - Serum fizyolojik ile ıslatılmış svap aracılığı ile tüm kağıt yüzeyi tarandı.
 - Tarama sonrası svabın ucu ependorfun içine makasla kesilerek alındı.
 - Üzerine 25 µl serum fizyolojik eklendi. 2000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
 - Üst pelet atılıp alt pelet steril lama aktarıldı.
 - Hava kabarcığının oluşmamasına dikkat edilerek lam üzerine lameli kondu.
 - Mikroskop altında hücre olan yerler işaretlendi. Lamel, lam üzerinden dikkatlice kaldırılarak steril svap yardımıyla hücreler steril ependorf tüpe indirildi.
 - Svabın örnek alınan ucu ependorfun içine makasla kesilerek alındı.
 - Üzerine 25 µl serum fizyolojik eklendi.
 - 2000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
 - Üst pelet atılıp alt pelet üzerine 20 µl % 96-100 saflıkta etanol eklenmesi sureti ile şoklanarak sabitlendi ve 15 sn vorteklendi.
 - Alınan sürüntü örneğinden ve bası izinin uygulanmadığı bölgeden alınan negatif kontrolden Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit ile DNA çekitlendi.
 - Su altı agaroz jel elektroforezi uygulandı (Şekil 4.3).
- Dördüncü olarak kağıt üzerine oluşturulan izlerin bulunduğu bölge 3 mm’ lik panç yardımıyla kesildi (Şekil 3.7).
 - Alınan kesitten ve bası izinin uygulanmadığı bölgeden alınan negatif kontrolden Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit ile DNA çekitlendi.
 - Su altı agaroz jel elektroforezi uygulandı (Şekil 4.4).



Şekil 3.7. Bası uygulanan bölgeden 3 mm’ lik panç yardımıyla kesit alınması

3.1.6. Epitel Hücrelerden DNA Elde Edebilmek İçin DNA İzolasyonu Yöntem Optimizasyonu

Belge üzerinde el sürüntüsü örneklerinin bıraktığı epitel hücrelerden DNA çekitleme amacıyla silika temelli Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kiti kullanıldı. 4 farklı kalitedeki kağıt tipinden 4 farklı yöntemle toplanan temas izi örneklerinden DNA izolasyonu aşamasında herhangi bir bulaş olup olmadığının kontrolü için her inceleme aşamasında incelenen örnek ile birlikte birer adet bası uygulanmamış negatif kontrol örneği de çalışıldı. İzolasyon aşamasında az sayıda ve degrade hücre ile çalışıldığından elde edilen DNA' nın kalitesini ve miktarını arttırabilmek için kit prosedürü öncü çalışma sonrasında modifiye edildi.

3.1.6.1. Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü [197]

- Epitel hücrelerin bulunduğu normal steril svabın ve yeni nesil steril svabın örnek toplanan kısmı, mikroskop altında hücre toplanan svabın örnek alınan kısmı ve basının uygulandığı bölgeden alınan kesit steril 1,5 mL ependorf tüp içerisine ayrı ayrı yerleştirildi.
- 180 µL ATL tamponu (doku lizis tamponu, Qiagen) eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- 85°C' de 60 dk ısıtıcı blokta (Eppendorf®, Thermomixer Compact) inkübe edildi.
- Örnek tüplerine 20 µL proteinaz K (Proteinleri Parçalayıp Uzaklaştıran Enzim, Qiagen) eklenerek 15 sn vortekslendi
- 56°C' de 1 saat ısıtıcı blokta inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında 200µL AL tamponu (lizis tamponu, Qiagen) eklenerek 15 sn vortekslendi ve 70°C' de 10 dk ısıtıcı blokta inkübe edildi.
- 200 µl % 96-100 saflıkta etanol eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- Steril bir pens yardımıyla svap, tüpün içerisinden çıkartılarak atıldı.
- Elde edilen karışım QIAamp® Microspin kolona aktarıldı.
- 8000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir steril toplama tüpüne (2 mL) aktarıldı.
- 500 µL AW1 tamponu (Yıkama tamponu 1, Qiagen) eklendi.
- 8000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir steril toplama tüpüne (2 mL) aktarıldı.
- 500 µL AW2 tamponu (Yıkama tamponu 2, Qiagen) eklendi.
- 8000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir steril 1.5 mL' lik ependorf tüpüne yerleştirildi.

- Kolon tamamen tampondan uzaklaştırılmak üzere son defa 1 dk boyunca boyunca 14000 rpm’de santrifüj edildi.
- QIAamp® Microspin kolon, steril ve etiketlenmiş 1.5 mL’ lik ependorf tüpüne yerleştirildi.
- Üzerine 100 µL AE tamponu (Elüsyon tamponu, Qiagen) eklendi.
- Oda ısısında 1-2 dakika inkübe edilerek 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Elde edilen DNA izolatları kısa süreli kullanım için +4°C’ ye, uzun süreli saklamak için -20 °C’ ye kaldırıldı.

Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü ile 3 mm’lik kesit şeklinde alınan kağıt numunesinin doğrudan izole edildiği örnekler hariç, beklenen kalitede (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) ve miktarda (Tablo 4.1) DNA elde edilemedi. Çalışmadaki amacımız kağıt bütünlüğüne fiziksel bir zarar vermeden yöntem optimizasyonu sağlamak olduğundan, kağıdın kesilmesi suretiyle elde edilen bulgular gözardı edilerek izolasyon kiti prosedürü aşağıdaki basamaklar doğrultusunda modifiye edildi.

3.1.6.2. Modifiye Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü

İzole DNA miktarını ve kalitesini arttırmak için modifiye kit protokolünde kullanılmak üzere öncelikle DDT (Diklorodifeniltrikloroetan) ve PBS (Fosfat tamponu) çözeltileri hazırlandı.

I) 1 M DTT (pH: 5,2) Hazırlanması;

- 5 gr DTT (molekül ağırlığı 154.25 g/mol) tartıldı.
- Üzerine 32.5 mL (~30 mL) 10 mM NaAc (Sodyum Asetat; pH 5.2) eklendi.
- Çözünme gerçekleşene kadar vorteklendi ve ultrasonik su banyosunda degaze edildi.
- Hazırlanan karışım 0.22 µm porlu filtre ile filtrasyon işlemi sonrasında -20°C’de muhafaza edildi.

II) 1 X PBS (pH: 7,4) Hazırlanması;

- 8 gr NaCl (sodyum klorür), 0.2 gr KCl (potasyum klorür), 1.44 gr Na₂PO₄ (sodyum fosfat), 0.24 gr KH₂PO₄ (potasyum fosfat) tartıldı ve 1 L’lik Balon jojeye (Isolab) aktarıldı.
- Üzerine 800 mL distile su eklendi.

- 1 dk boyunca çalkalandı.
- HCl (hidroklorik asit) ile pH: 7.4' e ayarlandı.
- Hacim 1 L' ye tamamlandı.
- 20 dk 121°C' de otoklavlandı.
- Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Modifiye edilen Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü aşağıda belirtilen basamaklardan oluşmaktadır;

- Epitel hücrelerin bulunduğu normal steril svabın ve yeni nesil steril svabın örnek alınan kısmı, mikroskop altında hücre toplanan svabın örnek toplanan kısmı ve basının uygulandığı bölgeden alınan kesit steril 1,5 mL ependorf tüp içerisine ayrı ayrı yerleştirildi.
- 200 µL ATL tamponu (doku lizis tamponu, Qiagen) eklendi ve 15 sn vortekslendi.
 - a) Örnek tüplerine 20 µL proteinaz K (proteinleri parçalayıp uzaklaştıran enzim, Qiagen) ve 1µL DDT* eklenerek 15 sn vortekslendi.
 - veya
 - b) Örnek tüplerine 20 µL proteinaz K (Proteinleri parçalayıp uzaklaştıran enzim, Qiagen) ve 200 µL PBS** eklenerek 15 sn vortekslendi.
- 56°C'de 1 saat ısıtıcı blokta (Eppendorf®, Thermomixer Compact) her 5 dakikada bir 5 sn vorteks yapılarak inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında 1 µL taşıyıcı RNA ve 200 µL AL (lizis tamponu, Qiagen) tamponu eklenerek 15 sn vortekslendi.
- 70°C' de 10 dk ısıtıcı blokta 3 dakikada bir 5 sn vorteks yapılarak inkübe edildi.
- 200 µl % 96-100 saflıkta etanol eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- Steril bir pens yardımıyla svap, tüpün içerisinden çıkartılarak atıldı.
- Elde edilen karışım QIAamp® Microspin kolona aktarıldı.
- 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir (2 mL) steril toplama tüpüne aktarıldı.
- 600 µL AW1 tamponu (Yıkama tamponu 1, Qiagen) eklendi.
- 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir (2 mL) steril toplama tüpüne aktarıldı.
- 600 µL AW2 tamponu (Yıkama tamponu 2, Qiagen) eklendi.
- 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.

- Kolon yeni bir steril 1.5 mL’lik ependorf tüpüne yerleştirildi.
- Kolon tamamen tampondan uzaklaştırılmak üzere son defa 1 dk boyunca 14000 rpm’de santrifüj edildi.
- QIAamp® Microspin kolon, steril ve etiketlenmiş 1.5 mL’lik ependorf tüpüne yerleştirildi.
- Üzerine 20 µL AE tamponu (Elüsyon tamponu, Qiagen) eklendi.
- Oda ısısında 1-2 dakika inkübe edilerek 14000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi.
- Elde edilen DNA izolatları kısa süreli kullanım için +4°C’ ye, uzun süreli saklamak için -20 °C’ ye kaldırıldı.

**DDT, **PBS: Öncü çalışma sonucunda aynı örnekten DDT veya PBS çözeltilerinin ayrı ayrı kullanıldığı iki farklı DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA miktarlarına bakıldı. DDT kullanılması ile elde edilen DNA’ ların miktarı ve saflığı daha iyi olduğundan yöntem optimizasyonunda bu çözelti kullanıldı (Tablo 4.2).*

3.1.7. Ağız İçi Sürüntü Örneklerinden DNA İzolasyonu

Belge üzerine bırakılan el sürüntüsü örnekleri ile birlikte kontrol amaçlı mukayese yapabilmek ve çalışmanın başarı oranını belirleyebilmek için aynı kişiye ait ağız içi sürüntü örneği de kullanıldı. Ağız içi sürüntü örnekleri steril swaplar ile ağız içinden alınarak oda sıcaklığında kurutuldu. Toplanan örnekler çalışılacak zamana kadar -20°C’de muhafaza edildi.

İncelenmek üzere toplanan sürüntü örneklerinden, DNA izolasyonu silika temelli QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) ticari kiti kullanılarak yapıldı. Bu yöntem şu aşamaları içermektedir [198]:

- Sürüntü alınan ağız içi swap çubuğunun örnek alınan kısmı steril 1,5 mL ependorf tüp içerisine yerleştirildi ve bistüri ile kesildi.
- 180 µL ATL tamponu (doku lizis tamponu, Qiagen) eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- 85°C’de 10 dk ısıtıcı blokta (Eppendorf®, Thermomixer Compact) inkübe edildi.
- Örnek tüplerine 20 µL proteinaz K (proteinleri parçalayıp uzaklaştıran enzim, Qiagen) eklenerek 15 sn vortekslendi.
- 56°C’de 1 saat ısıtıcı blokta inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında 200 µL AL tamponu (lizis tamponu, Qiagen) eklenerek 15 sn vortekslendi ve 70°C’ de 10 dk ısıtıcı blokta inkübe edildi.
- 200 µL % 96-100 saflıkta etanol eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- Steril bir pens yardımıyla swap tüp içerisinden çıkartılarak atıldı.

- Geriye kalan karışım QIAamp® mini spin kolona aktarıldı.
- 8000 rpm' de 1 dk santrifüj (Heraeus®, Biofuge 15) edildi.
- Kolon yeni bir steril toplama tüpüne (2 mL) aktarıldı.
- 500 µL AW1 tamponu (Yıkama tamponu 1, Qiagen) eklendi.
- 8000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni bir steril toplama tüpüne (2 mL) aktarıldı.
- 500 µL AW2 tamponu (Yıkama tamponu 2, Qiagen) eklendi.
- 8000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon yeni steril bir 1.5 mL'lik ependorf tüpüne yerleştirildi.
- Kolon tamamen tampondan uzaklaştırılmak üzere son defa 1 dk boyunca boyunca 14000 rpm'de santrifüj edildi.
- Kolon, etiketlenmiş steril yeni bir 1.5 mL' lik ependorf tüpüne yerleştirildi.
- Üzerine 100 µL AE tamponu (Elüsyon tamponu, Qiagen) eklendi.
- Oda ısısında (15-25°C) 1-2 dk inkübe edilerek 14000 rpm' de 3 dk santrifüj edildi.
- Kolon 1.5 mL' lik ependorf tüpü içerisinden çıkartılarak atıldı.
- Elde edilen DNA izotlatları kısa süreli kullanım için +4°C' ye, uzun süreli saklamak için -20 °C'ye kaldırıldı.

3.1.8. Su Altı Agaroze Jel Elektroföze

El sürüntüsü örneklerinden elde edilen DNA'nın kalitesini gözlemleyebilmek için DNA çekitlerinin varlığı %2'lik agaroz jel elektrofözeinde görüntülendi. Agaroz jel elektrofözei için gerekli malzemelerin hazırlanma prosedürü şu şekildedir:

I) TBE (Tris-Borik Asit- EDTA) tamponunun hazırlanması (10X) (pH=8.3);

- 55 g borik asit, 7.44 g disodyum etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ve 107.8 g tris baz tartıldı.
- Tartılan maddelerin hepsi 1 L'lik balon joje (Isolab) içerisinde bir miktar deiyonize suda manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırıldı.
- pH 8.3' e ayarlanarak hacim 1 L'ye tamamlandı.

II) 1X TBE tamponunun hazırlanması;

- 10X TBE tampondan seyreltme usulü ile 100 mL alınıp, 1 L'ye tamamlandı.

III) %2' lik agaroz jelin hazırlanması;

- Jel kasedi distile su ile yıkanarak kurutuldu.
- 2 gr agaroz tartıldı.
- Üzerine 20 mL 1X TBE tamponu ve 80 mL distile su eklendi.
- Tampon içerisindeki agaroz karışımı tamamen eriyip şeffaflaşmaya kadar sıcak su banyosunda kaynatıldı.
- Şeffaflaştıktan sonra eriyen agarozun içerisine 10 µL etidyum bromür eklenerek homojen bir karışım sağlanana kadar karıştırıldı.
- Karışım, 10 kuyucuklu tarak yerleştirilmiş agaroz tepsisine kabarcık oluşturmayacak şekilde döküldü.
- Polimerleşme sağlanıp jel oluşana kadar 20-30 dk beklendi.

IV) Elektroforez aşaması;

- Tarak kuyucuklara zarar vermeden yavaşça çıkarılarak jel kaptan alındı ve elektroforez tankına yerleştirildi.
- Tank, 1X TBE tamponu ile jelin üzeri kapanana kadar dolduruldu.
- 1 µL DNA izolatı 4 µL yürütme tamponu ile pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Elde edilen karışım pipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi.
- Jel 120 voltta 20 dk yürütülerek DNA varlığına bakıldı.
- Sonuçlar Biometra Jel Görüntüleme Sisteminde incelendi (Şekil 3.8).
- İnceleme sonuçları Şekil 4.1-4.4'te görülmektedir.



Şekil 3.8. Biometra Jel Görüntüleme Sistemi

3.1.9. DNA İzolatlarının PCR Öncesi Saflaştırılması

Hücre düzeyinde ve degrede örneklerle çalışıldığı için DNA'nın miktarını ve kalitesini arttırmak amacıyla PCR öncesinde temas izi örneklerine ait DNA izolatlarına saflaştırma protokolü uygulandı. Geliştirdiğimiz saflaştırma protokolü şu basamaklardan oluşmaktadır:

- Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filtre içine 200 µl 0.4 M NaOH (sodyum hidroksit) ve üzerine 20 µl DNA izolatu eklendi.
- 15 dk 3000 rpm'de santrifüj edildi.
- 400 µl 0.4 M NaOH (sodyum hidroksit) eklenerek 15 dk 3000 rpm' de santrifüj edildi (Bu işlem iki kez tekrarlandı.)
- Alt haznede biriken süzüntü döküldü.
- Nötralize etmek için 400 µl 10 mM Tris (pH 7.5) eklendi.
- 15 dk 3000 rpm' de santrifüj edildi.
- 50 µl 10 mM Tris veya ddH₂O süspanse edilerek örnek toplandı.

El sürüntüsü örneklerine ait DNA izolatlarının saflaştırılması ile elde edilen DNA miktarları Tablo 4.3' te görülmektedir.

3.1.10. Elde edilen DNA'nın Miktarının Belirlenmesi

DNA izolatlarının miktar tayini yüksek doğruluk ve hassasiyet sağlayan floresans teknolojisinin kullanıldığı florimetrik yöntemle belirlendi. Bu yöntemde 260 nm dalga boyunda ölçüm yapan Qubit® Florimetre (Invitrogen) cihazı ve Quant-iT™ dsDNA HS (High Sensitive) kit kullanılarak aşağıdaki adımlar izlendi:

- Her bir örnek için 199 µL tampon Quant-iT™ dsDNA HS Tampon ve 1 µL Quant-iT™ dsDNA HS Reaktifi olacak şekilde tampon-reaktif karışımı 2 adet standartta göz önünde tutularak hazırlandı.
- Cihaz, her ölçüm öncesinde kit içeriğinde olan ve miktarı bilinen Standart 1 ve Standart 2 kullanılarak kalibre edildi.
 - o Cihaza özgü 1. Tüpe 199 µL tampon-reaktif karışımından konup üzerine 1 µL Standart 1 eklendi, 15 sn vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dk inkübasyona bırakıldı.

- Cihaza özgü 2. Tüpe 199 μ L tampon-reaktif karışımından konup üzerine 1 μ L Standart 2 eklendi ve 15 sn vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dk inkübasyona bırakıldı.
- DNA izolatları için; tampon-reaktif karışımından cihaza özgü tüpe 199 μ L konup üzerine 1 μ L DNA izolatu eklendi. Tüpler 15 sn vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dk inkübasyona bırakıldı.
- Öncelikli olarak Standart 1 ve Standart 2 sırası ile okutularak cihaz kalibrasyonu yapıldı.
- Örnekler sırasıyla cihaza yerleştirilerek ölçümleri yapıldı.
- DNA miktarları cihazda otomatik olarak hesaplandı. Ölçüm sonuçları Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4 belirtildiği şekildedir.

3.1.11. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

El sürüntü örneklerinden elde edilen DNA çekitleri* AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti, AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon Kiti ve AmpFlSTR® GlobalFiler™ STR Kiti kullanılarak üç ayrı şekilde; ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen DNA çekitleri** ise AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak GeneAmp® 9700 PCR cihazında çoğaltıldı (Şekil 3.9). Tüm PCR ürünleri, ABI 3130 cihazında analizleri yapılınca kadar -20 °C’de derin dondurucuda muhafaza edildi.

**Hücre düzeyinde degrade örnekle çalışıldığı için PCR işlemi öncesinde, miktarı belirlenmiş olan DNA çekitlerinin nihai konsantrasyonu 0.2 ng/uL olacak şekilde sulandırma yapıldı. **Çalışmada taze biyolojik örnek kullanıldığı için PCR işleminde kullanılan miktarı belirlenmiş olan DNA çekitlerinin nihai konsantrasyonu 0.1 ng/uL olacak şekilde sulandırma yapıldı.*



Şekil 3.9. GeneAmp® 9700 PCR cihazı

3.1.11.1. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kit Protokolü

- Her bir örnek için PCR reaksiyon karışımı hazırlanması [154];
 - AmpFISTR PCR reaksiyon karışımı 10 µl
 - AmpFISTR Primer Set 5 µl
- Örnek sayısına göre* yukarıda verilen miktarlar göz önüne alınarak hazırlanan karışım 15 sn vortekslendi ve 3000 rpm' de 20 sn santrifüj edildi.
- Etiketlenmiş her bir 0.2 mL' lik MicroAmp™ PCR reaksiyon tüpüne 15 µl hazırlanan karışımdan konuldu.
- Üzerine 0.2 ng/µl konsantrasyona göre sulandırılmış 10 µl DNA izolatu eklendi.
- MicroAmp™ tüplerinin kapakları kapatılarak 3000 rpm'de 20 sn santrifüj edildi.
- Pozitif kontrol için kit içerisinde yer alan kontrol DNA'dan 10 µl, negatif kontrol için ise 10 µl steril distile su eklendi.
- Toplamda 25.0 µL'lik hacimde hazırlanan örnekler GeneAmp® 9700 PCR Cihazı'na yerleştirildi.

** Her PCR işleminde, PCR yönteminin doğruluğunu belirlemek için bir adet pozitif kontrol ve kontaminasyon olup olmadığının kontrolü için bir adet negatif kontrol kullanıldı. Örnek sayısı hesaplanırken pozitif ve negatif kontrollerde hesaplama dahil edildi.*

AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için GeneAmp® 9700 PCR cihazında modifiye edilen PCR programı koşulları Tablo 3.3' te belirtildiği şekildedir.

Tablo 3.3. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için GeneAmp® 9700 PCR cihazı programı

Uygulanan İşlem	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç İnkübasyonu	95°C	11 dk	1
Denatürasyon	94°C	20 sn	30
Primer Bağlanması	59°C	2 dk	
Zincir Uzaması	72°C	1 dk	
Son Uzama	60°C	45 dk	1
Bekletme	4°C	∞	∞

Kit ile çoğaltılan lokuslar D7S820, D13S317, D21S11, D2S1338, D18S51, D16S539, FGA, CSF1PO ve cinsiyeti belirleyen Amelogeninden oluşan toplam 9 STR lokusudur.

3.1.11.2. AmpFISTR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon Kit Protokolü

- Her bir örnek için PCR reaksiyon karışımı hazırlanması [155];
 - AmpFISTR PCR reaksiyon karışımı 10.5 µl
 - AmpFISTR Identifiler Primer Set 5.5 µl
 - AmpliTaq Gold DNA Polimeraz 0.5 µl
- Örnek sayısına göre* yukarıda verilen miktarlar göz önüne alınarak hazırlanan karışım 15 sn vortekslenildi ve 3000 rpm' de 20 sn santrifüj edildi.
- Etiketlenmiş her bir 0.2 mL'lik MicroAmp™ PCR reaksiyon tüplerine 15 µl bu karışımdan konuldu.
- Üzerine 0.2 ng/µl konsantrasyona göre sulandırılmış 10 µl DNA izolatu eklendi.
- MicroAmp™ tüplerinin kapakları kapatılarak 3000 rpm'de 20 sn santrifüj edildi.
- Pozitif kontrol için kit içerisinde yer alan kontrol DNA'dan 10 µl, negatif kontrol için ise 10 µl steril distile su eklendi.
- Toplamda 25 µL'lik hacimde hazırlanan örnekler GeneAmp® 9700 PCR Cihazı'na yerleştirildi.

* Her PCR işleminde, PCR yönteminin doğruluğunu belirlemek için bir adet pozitif kontrol ve kontaminasyon olup olmadığının kontrolü için bir adet negatif kontrol kullanıldı. Örnek sayısı hesaplanırken pozitif ve negatif kontrollerde hesaplama dahil edildi.

AmpFISTR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için GeneAmp® 9700 PCR cihazında modifiye edilen PCR programı koşulları Tablo 3.4' te belirtildiği şekildedir.

Tablo 3.4. AmpFISTR® Identifiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için GeneAmp® 9700 PCR cihazı programı

Uygulanan İşlem	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç İnkübasyonu	95°C	11 dk	1
Denatürasyon	94°C	1 dk	32
Primer Bağlanması	59°C	1 dk	
Zincir Uzaması	72°C	1 dk	
Son Uzama	60°C	60 dk	1
Bekletme	4°C	∞	∞

Kit ile çoğaltılan lokuslar D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, THO1, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA ve cinsiyeti belirleyen Amelogenin 'den oluşan toplam 16 STR lokusudur.

3.1.11.3. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kit Protokolü

- Her bir örnek için PCR reaksiyon karışımı hazırlanması [161];
 - AmpFISTR GlobalFiler® Master Mix 7.5 µl
 - AmpFISTR GlobalFiler® Primer Set 2.5 µl
- Örnek sayısına göre* yukarıda verilen miktarlar göz önüne alınarak hazırlanan karışım 15 sn vortekslenildi ve 3000 rpm' de 20 sn santrifüj edildi.
- Etiketlenmiş 0.2 mL' lik MicroAmp™ PCR reaksiyon tüplerine 10 µl hazırlanan karışımdan konuldu.
- Üzerine 0.2 ng/µl konsantrasyona göre sulandırılmış 15 µl DNA izolatu eklendi.
- MicroAmp™ tüplerinin kapakları kapatılarak 3000 rpm'de 20 sn santrifüj edildi.
- Pozitif kontrol için kit içerisinde yer alan kontrol DNA'dan 15 µl DNA, negatif kontrol için 15 µl steril distile su eklendi.
- Toplamda 25 µL' lik hacimde hazırlanan örnekler GeneAmp® 9700 PCR Cihazı'na yerleştirildi.

* Her PCR işleminde, PCR yönteminin doğruluğunu belirlemek için bir adet pozitif kontrol ve kontaminasyon olup olmadığının kontrolü için bir adet negatif kontrol kullanıldı. Örnek sayısı hesaplanırken pozitif ve negatif kontrollerde hesaplama dahil edildi.

GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için GeneAmp® 9700 PCR cihazında modifiye edilen PCR programı koşulları Tablo 3.5'te belirtildiği şekildedir.

Tablo 3.5. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için GeneAmp® 9700 PCR cihazı programı

Uygulanan İşlem	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç İnkübasyonu	95 °C	1 dk	1
Denatürasyon Primer Bağlanması	94 °C	10 sn	29
Zincir Uzaması	59 °C	90 sn	
Son uzama	60 °C	10 dk	1
Bekletme	4 °C	∞	∞

Kit ile çoğaltılan lokuslar; 21 otozomal STR lokusu (D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338), 1 Y-STR (DYS391), Y kromozomu üzerindeki 1 insersiyon/delesyon polimorfik belirteci (Y indel) ve Amelogenin (cinsiyet belirleyici lokus) olmak üzere toplam 24 STR lokusudur.

3.1.12. PCR Ürünlerinin Elektroforeze Hazırlanması

PCR ürünleri 4 kapilerli ABI 3130 Genetik Analizör cihazında (kapiler elektroforez cihazında) tiplendirildi. Örneklerin cihaza yüklenmesi öncesinde çoğaltılan PCR ürünlerinin, kullanılan PCR kitlerine özgü olarak elektroforeze hazırlanma prosedürleri aşağıda belirtilen şekildedir:

3.1.12.1. AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti ve AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Kiti Kullanılarak Çoğaltılan Ürünlerin Elektroforeze Hazırlanması

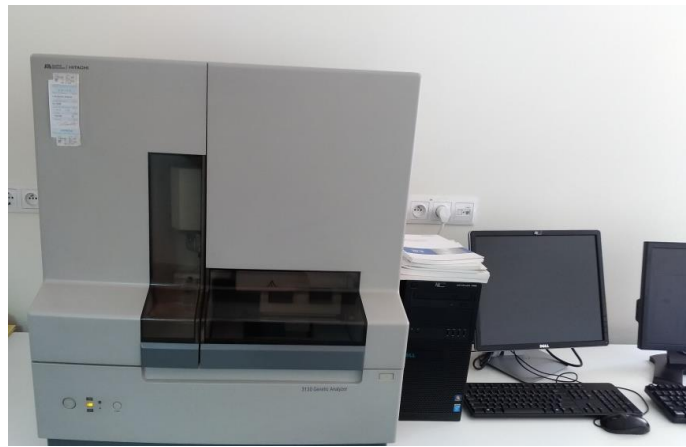
- Formamid buzdolabından (-20 dereceden) çıkartılıp oda ısısında çözülünceye kadar beklendi.
- Çözülen formamitten her örnek için 8.7 µl steril tüpe aktarıldı.
- Her bir örnek için 0.3 µl GeneScan™- LIZ 500™ (internal size standart) eklendi.
- Formamid ve liz karışımı 5 sn vortekslendi.
- Her bir MicroAmp® Optik 96-Kuyucuklu Reaksiyon Plakası kuyucuğuna 9 µL formamid-liz karışımı pipetle aktarıldı.
- AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için 2 µL PCR ürünü ve AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Kiti için 1 µL PCR ürünü eklendi.
- Yürütmenin doğruluğunun kontrolü ve örneklerin analizlenebilmesi için reaksiyon plakasında örneğin yüklendiği her 3 kuyucuktan sonraki 4. kuyucuğa AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için 2 µL, AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Kiti için 1 µL kitlere özgü “Alelik Ladder” eklendi.
- Karışımın homojen olması için pipetaj yapıldı.
- Hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edildi ve plaka ABI 3130 Genetik Analizör cihazına yerleştirildi.
- Her yürütme öncesinde örnek listesi “Data Collection Software” kullanılarak hazırlandı.

3.1.12.2. AmpFlSTR® GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti Kullanılarak Çoğaltılan Ürünlerin Elektroforeze Hazırlanması

1. Formamid buzdolabından (-20 dereceden) çıkartılıp oda ısısında çözülünceye kadar beklendi.
2. Çözülen formamidten her örnek için 9.6 µl steril tüpe aktarıldı.
3. Her bir örnek için 0.4 µl GeneScan™- LIZ 600™ (internal size standart) eklendi.
4. Formamid ve liz karışımı 5 sn vortekslendi.
5. Her bir MicroAmp® Optik 96-Kuyucuklu Reaksiyon Plakası kuyucuğuna 10 µL formamid liz karışımı ve 1 µL PCR ürünü eklendi.
6. Yürütmenin doğruluğunun kontrolü ve örneklerin analizlenebilmesi için reaksiyon plakasında örneğin yüklendiği her 3 kuyucuktan sonraki 4. kuyucuğa AmpFlSTR® GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti için 1 µL kite özgü “Alelik Ladder” eklendi.
7. Karışımın homojen olması için pipetaj yapıldı.
8. Hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edildi ve plaka ABI 3130 Genetik Analizör cihazına yerleştirildi.
9. Her yürütme öncesinde örnek listesi Data Collection Software kullanılarak hazırlandı.

3.1.13. PCR Ürünlerinin ABI 3130 İle Elektroforezi

Örneklerin elektroforezi 36 cm kapilerde ve polimer POP4 (Life Technologies) kullanılarak ABI PRISM®3130 Genetik Analizör cihazında (Şekil 3.10) Tablo 3.6’da belirtilen yürütme koşullarında gerçekleştirildi.



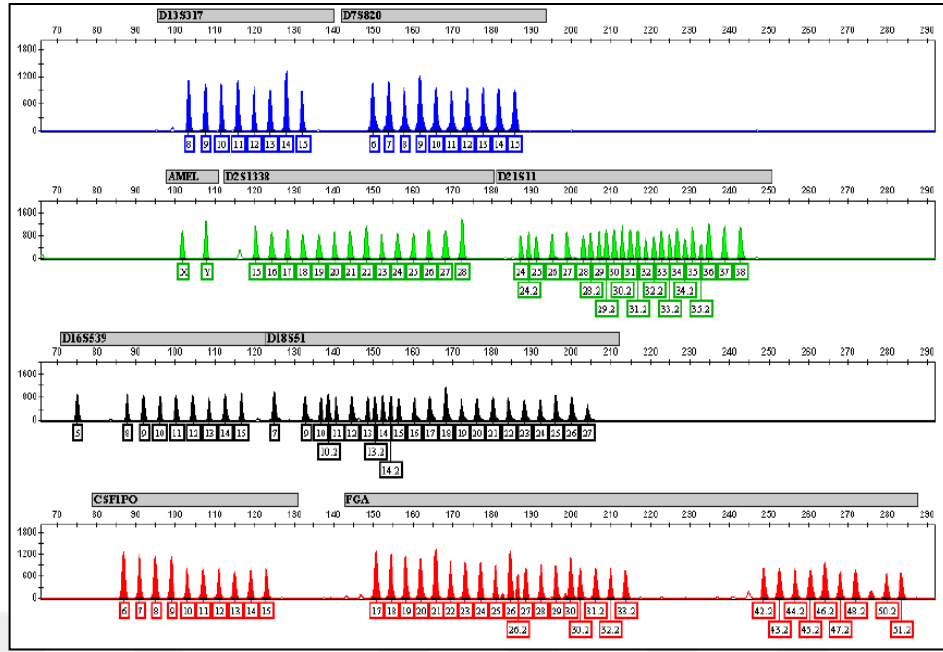
Şekil 3.10. Çalışmanın yapıldığı ABI PRISM®3130 genetik analizör cihazı

Tablo 3.6. ABI PRISM®3130 Genetik Analizör cihazı için kullanılan yürütme koşulları

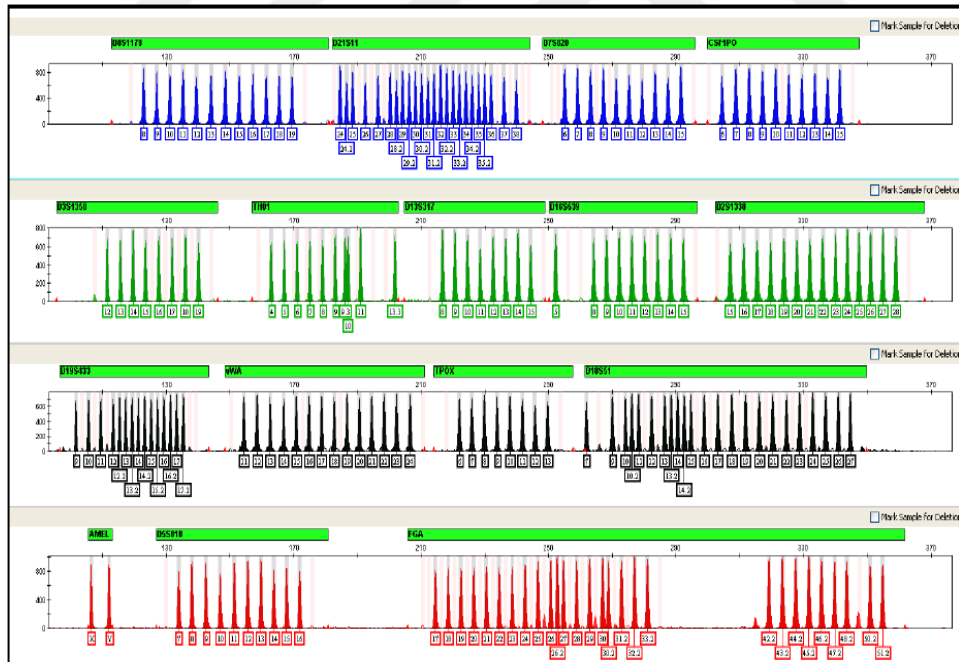
<i>Kullanılan Ticari PCR Kitleri</i>	<i>ABI 3130 Yürütme Modülü</i>	<i>Kullanılan Matriks Setleri, Boya Etiketi ve Size Standardı</i>	<i>ABI 3130 Elektroforez Yürütme Koşulları</i>
<i>AmpF_{STR}® MiniFiler™ PCR Kiti</i>	GS STR POP-4-G5	DS-33 (6-FAM™, VIC®, NED™, PET™ ve LIZ® GeneScan™ 500 LIZ®)	Yürütme öncesi voltaj:15 kV Enjeksiyon voltajı:3 kV Enjeksiyon süresi:5 sn Yürütme voltajı:15 kV Yürütme süresi:1500 sn Yürütme sıcaklığı:60 °C
<i>AmpF_{STR}® Identifiler® PCR Kiti</i>	GS STR POP-4-G5	DS-33 (6-FAM™, VIC®,NED™, PET™ ve LIZ® GeneScan™ 500 LIZ®)	Yürütme öncesi voltaj:15 kV Enjeksiyon voltajı:3 kV Enjeksiyon süresi:5 sn Yürütme voltajı:15 kV Yürütme süresi:1500 sn Yürütme sıcaklığı:60 °C
<i>AmpF_{STR}® GlobalFiler™ PCR Kiti</i>	GS STR POP-4-G5	DS-36 (6-FAM™, VIC®, NED™, TAZ™ ve SID™, LIZ® GeneScan™ 600 LIZ®)	Yürütme öncesi voltaj:15 kV Enjeksiyon voltajı:3 kV Enjeksiyon süresi:5 sn Yürütme voltajı:15 kV Yürütme süresi:1500 sn Yürütme sıcaklığı:60 °C

3.1.14. Verilerin Analizi Ve Sonuçların Değerlendirilmesi

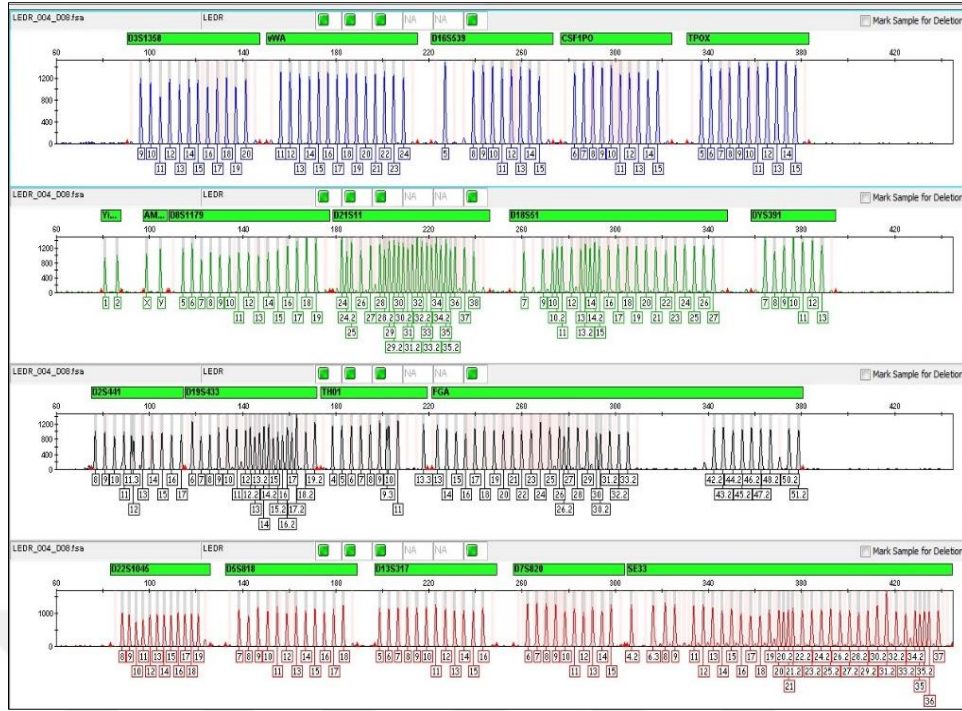
ABI 3130' daki elektroforez sonrası örneklerden elde edilen ham verilerin görüntülenmesi, elektroforegramların genotiplendirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi GeneMapper® ID-X yazılımı v1.4 (Life Technologies) analiz programı kullanılarak yapıldı. Ham verilerin GeneMapper programında doğru değerlendirilebilmesi için GeneScan™-LIZ 500™/GeneScan™-LIZ 600™ DNA standardı kontrol edildikten sonra örnekler analiz edildi. Çalışmada, örneklerle birlikte çalışılan lokusların yaygın tüm alellerini de kapsayan ve üç ayrı PCR kiti içinde bulunan Alelik Ladder' ın yer aldığı cetveller (Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13) kullanıldı. Bu cetvellerde alel tipleri bilindiğinden, elde edilen piklerin değerlendirilmesi bunlara göre yapıldı. Değerlendirmede RFU (Bağıl Floresan Ünite) pik değeri 30 olarak kabul edildi.



Şekil 3.11. AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kiti alelik ladder cetveli



Şekil 3.12. AmpFlSTR® Identifier™ PCR amplifikasyon kiti alelik ladder cetveli



Şekil 3.13. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kiti alelik ladder cetveli

Tüm örneklerin tiplendirilmesi yapıldıktan sonra analiz bulgularına göre elde edilen profil sonuçları lokus bazında mukayese edilebilirliklerine göre Tablo 4.5, Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9’ da kıyaslandı. 3 farklı PCR kiti kullanılarak STR analizi ile DNA profillemesi gerçekleştirildiği çalışmaya ait bazı elektroforegram görüntüleri AmpFISTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kiti için Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7; AmpFISTR® Identifiler™ PCR amplifikasyon kiti için Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kiti için Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’ te görülmektedir.

Aynı kağıt yüzey örneklerinden 3 farklı PCR kiti ile amplifiye edilen DNA profillerinin lokus bazında yüzdelik başarı oranları açısından kıyaslanması Şekil 4.14’te görüldüğü şekildedir. Buna göre belge üzerinde bırakılan el sürüntüsü örneklerinin kimliklendirilmesi için geliştirilen ve optimize edilen yöntem özetle şu şekildedir;

1. Yeni nesil swap ile yüzeyden epitel hücreleri toplama (bkz. md. 3.1.5),
2. Toplanan epitel hücrelere ara basamağında DDT’nin kullanıldığı modifiye Qiagen QIAamp® DNA Micro Kit prosedürünün uygulanması (bkz. md. 3.1.6.2),

3. Elde edilen DNA'nın kalitesini gözlemlemek için su altı agaroz jel elektroforezinin yapılması (bkz. md. 3.1.8),
4. DNA'nın kalite ve miktarını arttırmak için DNA izolatlarının saflaştırılması (bkz. md. 3.1.9),
5. Elde edilen DNA'nın Quant-iT™ dsDNA HS (High Sensitive) kit kullanarak miktarının belirlenmesi (bkz. md. 3.1.10),
6. El sürüntü örneklerinden elde edilen saf DNA çekitlerinin AmpFISTR® GlobalFiler™ STR Kiti kullanılarak Geneamp 9700 PCR cihazında çoğaltılması (bkz. md. 3.1.11.3),
7. Adli belge üzerinde kimliklendirme yapabilmek için PCR ürünlerinin AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kiti prosedürüne göre elektroforeze hazırlanması (bkz. md. 3.1.12.2),
8. PCR ürünlerinin ABI 3130 ile elektroforezi (bkz. md. 3.1.13),
9. Verilerin analizi ve sonuçların yorumlanarak değerlendirilmesi (bkz. md. 3.1.14).

3.1.15. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

I) İlk olarak tiplleme karşılaştırması için araştırmacının izleri dışında, gönüllü olarak çalışmaya katılan 3 kişinin UV altında 1 saat süre ile steril edilmiş 4 farklı kalitede kağıt tipine (magazin kağıdı, çek tipi senet kağıdı, 80g/m² ve 100g/m² A4 fotokopi kağıdı) yine UV altında 20 dk süre ile steril edilmiş Faber Castell FDx10 1.0 mm marka mavi tükenmez kalemle aşağıda belirtilen cümleyi rastgele yazarak metnin altına isim ve soy isimlerini yazıp imzalamaları istendi.

“Gençler arasında aşırı alkol tüketimi ile uyuşturucu kullanımı, gelişmiş ülke yetkililerinin çözmeleri gereken en önemli sorundur.”

Her gönüllünün yazdığı kağıt örneklerinden bir bölge belirlenerek rastgele numune alındı. Belge üzerinde bırakılan el sürüntüsü örneklerinin kimliklendirilmesi için geliştirilip optimize edilen ve bir önceki başlıkta özetlenen yöntem toplamda 16 numuneye (4 farklı kişi X 4 farklı kalitede kağıt tipi) uygulandı (örnekler taze olarak hazırlandı ve bekletilmeden aynı gün içerisinde çalışılarak analiz edildi). Kağıt yüzeylerden alınan örneklerden elde edilen DNA Miktarları Tablo 4.10'da ve analiz sonrası elde edilen profil sonuçlarının mukayese edilebilirliklerine göre kıyaslanması Tablo 4.11 ve Tablo 4.12'de gösterilmektedir.

II) Genellikle karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiş araştırmacıya ait günlükten aynı gün içinde oluşturulmuş 1 günlük, 1 haftalık, 1 aylık, 3 aylık, 6 aylık, 1 senelik, 2 senelik, 5 senelik ve 10 senelik sayfalardan alınan örneklerle, geliştirilen yöntem uygulandı.

Elde edilen DNA miktar sonuçları ve mukayese edilebilirliğe göre DNA profil sonuçları Tablo 4.13'te ve Tablo 4.14'te, 1. günde alınan örneğe ait ABI 3130 cihaz çıktısı elektroforegram Şekil 4.15'te görülmektedir.

III) 22 °C (± 2) sıcaklıkta ve %55 (± 5) bağıl nem ortamında karanlıkta muhafaza edilen bir hukuk bürosu arşivinden, aynı gün içinde oluşturulmuş 1 günlük, 1 haftalık, 1 aylık, 3 aylık, 6 aylık, 1 senelik, 2 senelik, 5 senelik ve 10 senelik, birden fazla kişinin imzası bulunan belgelerden alınan örneklerle geliştirilen yöntem uygulandı. Elde edilen DNA miktarları ve mukayese edilebilirliğe göre DNA profil sonuçları Tablo 4.15 ve Tablo 4.16'da, 1. günde alınan örneğe ait ABI 3130 cihaz çıktısı elektroforegram Şekil 4.16'da görülmektedir.

3.2. Çalışmanın Mikrobiyolojik İnceleme Aşaması

3.2.1. Mikrobiyolojik İnceleme Çalışmalarında Kullanılan Gereçler

Çalışmanın mikrobiyolojik inceleme aşamasında Tablo 3.7'de marka ve modelleri belirtilen gereçler kullanıldı.

Tablo 3.7. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan gereçlerin adları, marka-modelleri

Kullanılan Gereç	Marka-Model
Otomatik pipet ve uçları; 0.1- 2.5 μ L 2.5- 20 μ L 10- 100 μ L 100- 1000 μ L	Eppendorf® Research
Otoklav	Nüve-OT4060
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore Direct Q3
Etüv	Nüve®
Buzdolabı	Arçelik®
Pastör Fırını	Nüve®-FN-400
Ekim kabini	Nüve®
İmmersiyon mikroskobu	Nikon®
Heraeus İzolasyon kabini	Thermo Scientific Heraeus®, HERAsafe KS12
Elektronik hassas terazi	Precisa® XB 220 A
MALDI-TOF/MS	BRUKER® Autoflex MaX
Panç	Miltex® 5 mm
10 μ l steril tek kullanımlık iğne/halka uçlu öze	Lp® Italiana Spa

3.2.2. Mikrobiyolojik İnceleme Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Çalışmanın mikrobiyolojik inceleme aşaması boyunca kullanılan tüm kimyasal ve sarf maddelerin markaları ve standart mikroorganizma suşlarının özellikleri Tablo 3.8’de verildiği gibidir.

Tablo 3.8. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan kimyasal madde ve besi yerlerinin listesi

Çalışmadaki Kullanım Aşaması	Malzemenin Adı	Markası/Özelliği
Besiyeri ve Sarflar	Malt Agar	Merck®
	Jelöz Agar	Merck®
	Kanlı Agar	Merck®
	Petri Kabı (120 mm)	Premed®
Bakteri, Küf ve Mantar Referans Suşları ve Sarflar	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC® 6051™
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC® MP-20™
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923™
	<i>Penicillium sp.</i>	ATCC® 66372™
	<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC® 16883™
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC® 1022™
	<i>Cladosporium sp.</i>	ATCC® 32720™
	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	ATCC® 51985™
	Öze 10 µl steril tek kullanımlık iğne/halka uçlu	LP-Italiana
	Lam-Lamel	Isolab®

3.2.3. Mikrobiyolojik İnceleme Çalışmalarında Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

İnceleme için kullanılan besiyerleri; Tryptic Soy Broth (Jelöz Agar), Kanlı Agar ve Malt Ekstrakt Agar (Maya-küf Agar)’dır. Her çalışma öncesinde kontaminasyon riski de göz önünde bulundurularak besi yerleri kabin içerisinde dikkatli bir şekilde taze olarak hazırlandı. Çalışmamızda klasik ekim yöntemleri uygulanarak tiplendirme yapıldı.

3.2.3.1. Tryptic Soy Broth (TSB, Jelöz Agar, Adi Agar) Hazırlanışı

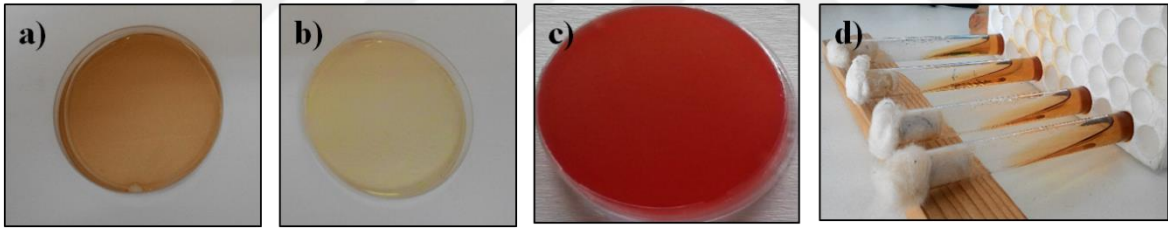
İçeriğinde 17 gr Pepton (kazeinden), 3 gr pepton (soya unundan), 2.5 gr D (+) glukoz, 5 gr NaCl (sodyum klorür) ve 2.5 gr K₂HPO₄ (dipotasyum hidrojen fosfat) bulunan ve ticari olarak elde edilen TSB besiyeri 30 g/lit olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak (her 2 dakikada bir çalkalandı) homojenize edildi. 121°C’ de 15 dk otoklavlandıktan sonra 45-50°C’ye kadar soğutuldu. Steril koşullarda tüplere (yatık olarak) ve steril petri kaplarına 12,5'er mL dökülerek buzdolabına (+4 °C) kaldırıldı (Şekil 3.14).

3.2.3.2. Malt Ekstrakt Agar (ME, Maya-küf Agar) Hazırlanışı

İçeriğinde 30 gr Malt Ekstrakt, 15 gr Agar ve 3 gr Pepton bulunan ve ticari olarak elde edilen ME agar besiyeri, 48 gr/lt olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak (her 2 dakikada bir çalkalandı) homojenize edildi. 121 °C’ de 15 dk otoklavlandıktan sonra 45-50 °C’ye kadar soğutuldu. Steril koşullarda tüplere (yatık olarak) ve steril petri kaplarına 12,5'er mL dökülerek buzdolabına (+4°C) kaldırıldı (Şekil 3.14).

3.2.3.3. Kanlı Agar Hazırlanışı

İçeriğinde 15 gr Agar, 20 gr Nutrient substrat ve 5 gr NaCl (sodyum klorür) bulunan ve ticari olarak elde edilen Tryptic Soy Agar besiyeri 40 gr/lt olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak (her 2 dakikada bir çalkalandı) homojenize edildi. 121 °C’ de 15 dk otoklavlandıktan sonra 45-50 °C’ye kadar soğutuldu. İçerisine %5 oranında 50 mL defibrine hayvan kanı ilave edildi. Homojenizasyon sağlandı. Steril koşullarda tüplere (yatık olarak) ve petri kaplarına 12,5'er mL dökülerek buzdolabına (+4 °C) kaldırıldı (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Hazırlanan besiyerleri görüntüleri a) Malt agar b) Jelöz agar c) Kanlı agar d)Yatık tüpte malt agar

3.2.4. Çalışılacak Mikroorganizmaların Belirlenmesi için Arşiv Ortamının ve Arşiv Ortamında Bulunan Belgelerin Kültür Ortamında Mikrobiyal İncelenmesi

Mikroorganizmaların, piyasadan rastgele seçilmiş mürekkepler üzerindeki mikrobiyal etkisinin incelenmesi amacı ile bir öncü çalışma yapıldı. Öncü çalışmada, tez çalışmasının diğer aşamalarında örnek alınan arşiv ortamında ve havasında, arşivden rastgele alınan kağıt numunesi örneklerinde hangi tür bakteri, küf, mantar vb. gibi mikroorganizmaların olduğunu belirlemeye yönelik literatür araştırması ile birlikte deneysel bir araştırma yapıldı. Hazırlanan besi yerleri hava sirkülasyonunun olmadığı arşiv ortamına, arşivde bulunan bir çekmece içerisine bırakıldı. Arşivde bulunan mavi tükenmez kalem ve siyah tükenmez kalemle

yazılmış, eski tarihli olduğu bilinen ve yıpranmış olan rastgele seçilmiş kağıt örneklerinin yazı yazılan kısmından 1 cm kesilerek 3 çeşit besiyerine ekim yapıldı (Şekil 3.15). Araştırma için seçilen belgelerin yer aldığı arşiv alanının sıcaklığı 22°C (±2) arasında ve bağıl nemi %60 (±5) arasında değişmektedir. Numune alım işlemi sırasında dış ortamla irtibatın kesilmesi amacıyla giriş kapısı ve camlar numune alma süresince kapalı tutuldu. Ekim yapılan jelöz ve kanlı besiyerleri 37°C’de etüv içerisinde 24 saat süre ile, malt besiyerleri ise 25-27°C’ de oda ısısında (karanlık ortamda) 7-10 gün süre ile mikrobiyoloji laboratuvarında inkübe edildi.



Şekil 3.15. Öncül çalışmanın yapıldığı malt agar ve kanlı agar besiyerleri görüntüsü

3.2.5. Üreyen Kolonilerin İdentifikasyonu

Küf ve mantarların belirlenmesi amacı ile inkübasyon süresi sonunda malt besiyerinde üreyen kolonilerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri incelendi. Makroskobik olarak petrillerdeki kolonilerin büyüklüğüne (koloni çapına), şekline, üstten ve alttan rengine, çeper özelliğine ve pigmentasyon olup olmadığına bakıldı (Şekil 4.17). Mikroskobik olarak; rengi ve üreme hızları kaydedilerek üreyen kolonilerden selefon bir bant yardımı ile örnek alındı ve bir lam üzerine yerleştirildi. Mantarların hif ve spor yapıları bozulmadan hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda 10X ve 40X objektifle koloni yapısı ve konidial başçıkların tipi incelendi (Şekil 4.18). Petri plaklarında üreyen mikrofunguslar, yatık malt besiyerlerine transfer edilerek stok kültür olarak +4 °C’deki buzdolabında saklandı.

Bakterilerin belirlenmesi amacı ile inkübasyon süresi sonunda jelöz ve kanlı besiyerinde üreyen koloniler makroskobik ve mikroskobik açıdan değerlendirildi. Makroskobik olarak; petrillerdeki kolonilerin büyüklüğüne (koloni çapına), şekline, üstten ve alttan rengine bakıldı (Şekil 4.19). Mikroskobik olarak; koloniler işaretlenerek gram boyama

için lam üzerine fiksle edildi. Fiksasyon işleminde öncelikle lam %50lik etil alkolle steril edilerek üzerine 1 damla serum fizyolojik damlatıldı. İşaretlenen tek ve saf koloniye tek kullanımlık öze ucu değdirilerek koloniden bir parça alındı. Alınan parça, lam üzerine 1-2 cmlik bir alana yayılarak serum fizyolojik ile karışması sağlandı. Hazırlanan örnek oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatların tespiti için örnek olan kısım üstte kalacak şekilde preparatlar üç kez bunzen alevinden geçirildi. Fiksasyon sonrası boyama kabına alınan lamlar üzerine kristal viyole döküldü ve kuruması için 2-3 dk beklendikten sonra fazla boyanın akması için hafifçe sudan geçirildi. Lam üzerine lugol damlatılarak kuruması için 2-3 dakika beklendi. Fazla boyanın akması için %96'lık etanol döküldü. Sudan geçirilen preparatlara sulu fuksin damlatıldı. 30 sn beklendikten sonra tekrar sudan geçirilen preparatlar, kurutma kağıdında kurutuldu. 100X büyütmede immersiyon yağı damlatılarak; ışık mikroskobunda mikrororganizmaların morfolojileri incelendi (Şekil 4.20).

3.2.6. Tükenmez Kalem Mürekkepleri ve Mikrobiyal Üreme

Tükenmez kalem mürekkeplerinde mikrobiyal üremenin etkisinin incelenmesi amacıyla öncü araştırmamız sonucu elde ettiğimiz verilere göre, uzun süreli arşiv ortamında beklemiş belge örneklerinde en çok görülen *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium lentiflavum* türlerinin Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC) standart suşları Çapa Temel Tıp Bilimleri Mikrobiyoloji Tüberküloz Laboratuvarı'ndan temin edildi. Çalışmamızda kullandığımız piyasadan rastgele seçilen 4'er adet mavi ve siyah renkli tükenmez kalem mürekkebi ile kağıt tipi marka ve modelleri ve çalışma boyunca kullanılan kodları şu şekildedir;

- S1-----Pensan MV-Pen Vision (Siyah)
- S2-----Faber Castell Speedx10 (Siyah)
- S3-----Art Ballpoint Pen (Siyah)
- S4-----Schneider slider Edge XB (Siyah)
- M1-----Faber Castell FDx10 (Mavi)
- M2-----Schneider Slider Edge XB (Mavi)
- M3-----Pensan MV-Pen Vision (Mavi)
- M4-----Art Ballpoint Pen (Mavi)
- A4 fotokopi kağıdı (Office International Copier Bond Hamur 80g/m² 210x297mm)

5 mm'lik panç yardımı ile kesilen kağıt örnekleri, eldiven vb. gibi kullanılan tüm sarf malzemeler 1 saat UV'de steril edildi. Ekim işlemi sırasında olası kontaminasyonu önlemek

için tek kullanımlık steril öze kullanıldı ve ekim sonrası etiketleme yapılan besiyerlerinin petri kapakları bunzen alevinden geçirilerek kapatıldı. Çalışmamızın, besiyerlerinin suşlarla kontamine edildiği basamağı ile “İnkbiyogram” olarak adlandırdığımız kağıt-mürekkep diskleri ile yaptığımız biyogram basamağı çalışma güvenilirliğini olumsuz etkileyebilecek herhangi bir olası kontaminasyon riskine karşı ayrı biyogüvenlik kabinlerinde gerçekleştirildi.

3.2.6.1. Mürekkep Örneklerinin Ekimi

Çalışmamızın ilk aşamasında piyasadan rastgele seçilen tükenmez kalem mürekkep örnekleri ile UV’de steril edilmiş 5 mm çaplı kağıt parçalarına çizgiler çizildi. Modelleme yönteminin kullanıldığı bu basamakta; 1) çizilen çizgi üstte ve 2) altta kalacak şekilde, 3) 2 µL hacimde direk mürekkebin kendisi ve 4) negatif kontrol amaçlı 5 mm çaplı boş kağıt parçası ayrı ayrı 3 farklı tip besiyerine ekildi. Her besiyerinden birer petride negatif kontrol amaçlı ekim yapılmaksızın inkübasyon sürecine tabi tutuldu. Ekim sonrası jelöz ve kanlı besiyerleri 37°C’de etüv içerisinde 24 saat süre ile, malt besiyerleri ise 25-27°C’de oda ısısında (karanlık ortamda) 7-10 gün süre ile mikrobiyoloji laboratuvarında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ekim yapılan petri ler üreme olup olmamasına göre kayıt altına alındı (Tablo 4.18).

3.2.6.2. Mikroorganizma Suşlarının Pasajlanması İle Kontamine Edilmiş Besiyerlerine İnkbiyogramların Ekimi

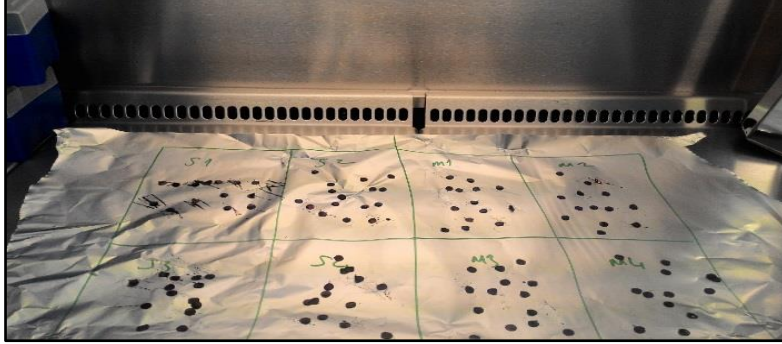
3.2.6.2.1. Mürekkep-Kağıt Disklerinin Oluşturulması

Çalışmamızın ikinci aşamasında piyasadan rastgele seçilen 4’er adet mavi ve siyah tükenmez kalem mürekkepleri, kabin içerisinde UV’de steril edilmiş 5 mm çaplı kağıt pançlara önceden %10’luk zefirol ile temizlenmiş steril yüzey üzerinde ön ve arka yüzeyine ayrı ayrı 2’şer µL hacimde difüze edildi ve kabin içerisinde 30 dk kurutuldu (Şekil 3.16). Sonrasında deneysel çalışmada kullanılacak mevcut mikroorganizmaların sayısını sabitlemek için, suşlar besiyerlerine pasajlanmadan önce 0.5 McFarland yöntemiyle süspanse edildi.

3.2.6.2.2. 0.5 McFarland Hazırlanışı

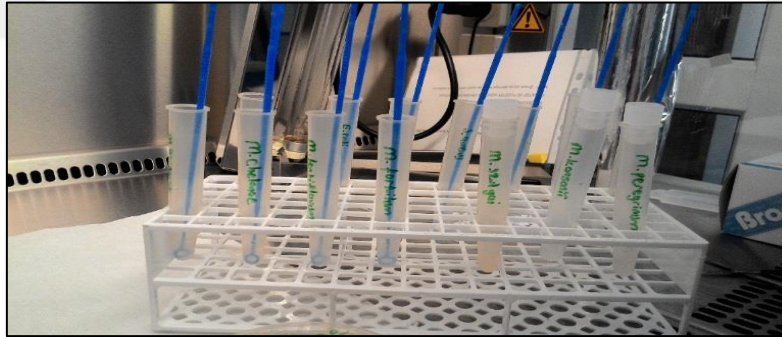
0.5 McFarland; süspansiyon içinde $1,5 \times 10^8$ cfu/mL (genellikle $1,0 \times 10^8$ ile $2,0 \times 10^8$ arasında cfu/mL) mikroorganizma varlığını ifade etmektedir. H_2SO_4 (sülfürik asit) ve $BaCl_2$ (Baryum klorit)’in molar eriyiklerinden % 1’lik çözelti hazırlandı. Hazırlanan

McFarland çözeltisi referans alınarak, steril edilmiş MRD (Maximum Recovery Diluent) içerisine petrilerde oluşan mikroorganizma kolonilerinden bir miktar öze ile alındı.



Şekil 3.16. Mürekkep-kağıt disklerinin hazırlanışı

Elle homojen olana kadar karıştırıldı. Koyu renk bir zemin üzerinde bulanıklıklar karşılaştırıldı. İstenilen McFarland referans bulanıklığı yakalanana kadar işleme devam edildi. Bu işlemler her bir mikroorganizma suşu için ayrı ayrı yapıldı. Her organizma 0.5 McFarland bulanıklığına göre ayarlandıktan sonra numuneler hazırlandı (Şekil 3.17).

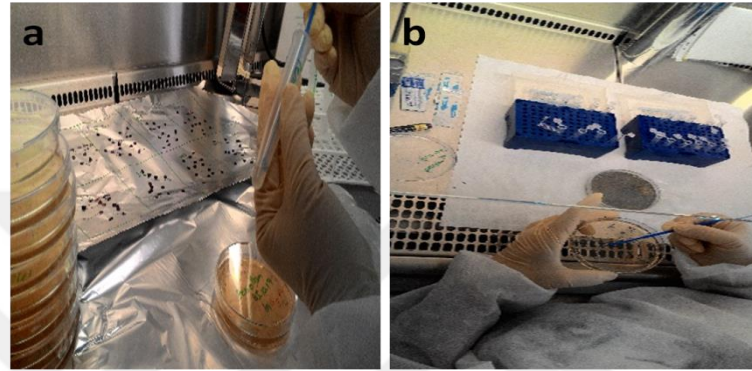


Şekil 3.17. 0.5 McFarland yöntemiyle 1.5×10^8 cfu/mL göre hazırlanmış süspansiyonlar

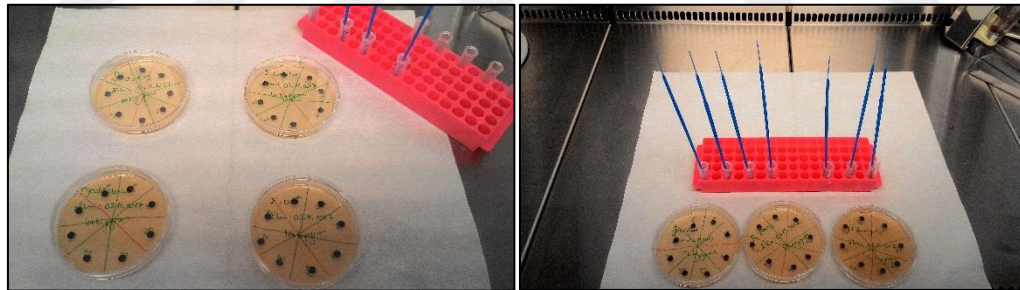
3.2.6.2.3. İnkbiyogram Disklerinin Oluşturulması

Çalışmamızda, 0.5 McFarland standardında hazırlanan süspansiyonlar malt ve jelöz besiyeri plaklarına “Yayma Kültürel Yöntem (paralel ekim)” kullanılarak pasajlandı (Şekil 3.18). Pasajlama yapılan besiyeri, çalışılan mürekkep sayısı kadar petri kabı, dışından sekiz eş parçaya bölündü. Bölünen parçalardan birisinin ortasına denk gelen yerin üzerine S1 kodlu mürekkep-kağıt diskleri ve etrafında disk merkezinden disk merkezine uzaklığı 35-40 mm olacak şekilde S2, S3, S4, M1, M2, M3 ve M4 kodlu mürekkep-kağıt diskleri yerleştirildi (Şekil 3.19). Ekim yapılan besiyerlerine etiketleme işlemi yapılarak; hangi örnekten alındığı

belirtilirdi. Negatif kontrol amaçlı; her iki besiyeri türü pasajlama ve ekim yapılmaksızın boş olarak ve mürekkep ile muamele edilmemiş steril kağıt disklerin besiyerlerine yerleştirildiği örnekler kullanıldı. Pozitif kontrol amaçlı ise çalışılan küf, mantar ve bakteri türleri malt ve jelöz besiyeri plaklarına pasajlanarak ekildi. Tüm petri kapakları bunzen alevinden geçirilerek kapatıldı. Ekim yapılan jelöz besiyerleri 37°C’de etüv içerisinde 24 saat süre ile, malt besiyerleri ise 25-27°C’de oda ısısında (karanlık ortamda) 7-10 gün süre ile mikrobiyoloji laboratuvarında inkübe edildi.



Şekil 3.18. (a) Ekim yapılmak üzere steril öze yardımıyla süspanse *Penicillium sp.* 'nin alınıp, (b) inkbiyogram araştırması için ekiminin yapılması



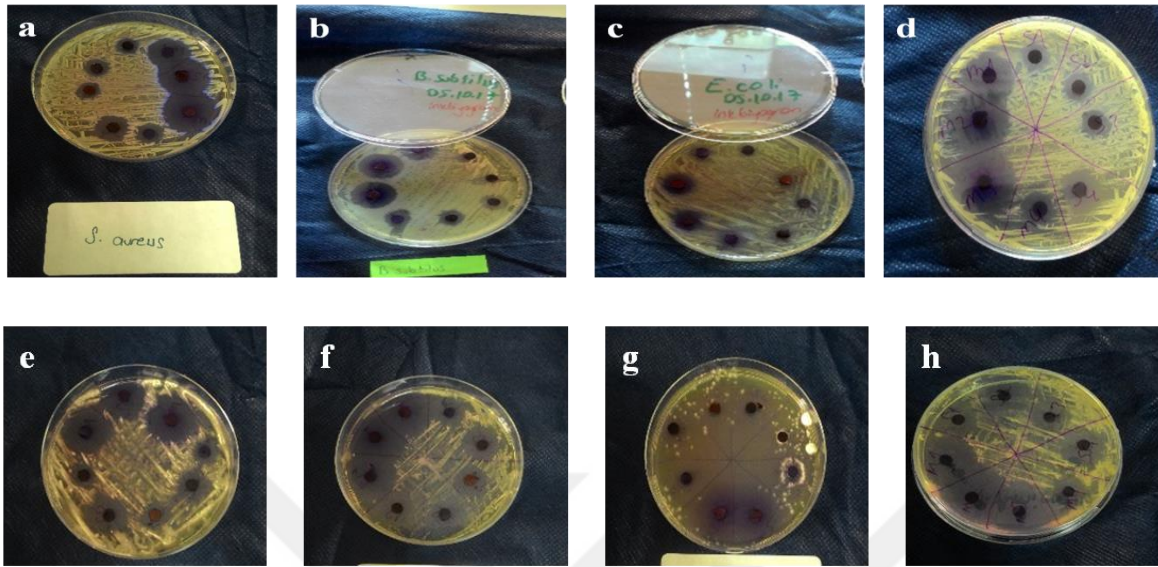
Şekil 3.19. Mürekkep-kağıt disklerinin petrilere yerleştirilmesi

İnkübasyon sonrası disklerin etrafında inhibasyon zonları varlığı gözlemlendi (Şekil 3.20). Cetvelle ölçülen inhibasyon zonlarının çapları Tablo 4.21’de ve 0. ayda kaydedilen değerlerdir.

3.2.6.2.4. Mürekkep Boyar Maddelerinin Mikrobiyal Üremeye Etkisinin İncelenmesi

İnkübasyon sonunda disklerin etrafında oluşan inhibasyon zonlarının çaplarında farklılık gözlenmesi mürekkep içerisindeki boyar maddelerin her mürekkep çeşidinde miktarının farklı olmasından kaynaklanabileceği bilgisinden yola çıkarak Çevre Gıda Analiz Laboratuvarı’nda bulunan HPLC cihazında kurum içi geliştirilen metotla mürekkeplerin yapı

tainleri yapıldı [15]. Yapı tainlerine göre elde edilen sonuçlar Şekil 4.21-4.28 arasındaki kromatogramlarda ve Tablo 4.19 da tespit edilen değerlerde gösterilmektedir.



Şekil 3.20. İnkiyogramlarda 0.aya ait inhibisyon zonlarına örnekler (a) *S. aureus*, (b) *B. subtilis*, (c) *E. coli*, (d) *M. lentiflavum*, (e) *A. flavus*, (f) *A. fumigatus*, (g) *Penicillium sp.*, (h) *Cladosporium sp.*

3.2.6.2.5. Farklı Hacimde Mürekkep İçeren Disklerin, İnhibasyon Zonlarına Etkisinin Araştırılması

0.5 McFarland konsantrasyonunda hazırlanan bakteri sınıfını temsilen *S. aureus*, küf mantarı sınıfını temsilen *A. fumigatus* mikroorganizma süspansiyonları malt ve jelöz besiyerlerine pasajlandı. Herbir mürekkepten kağıt disklerin ön ve arka yüzlerine farklı hacimlerde tatbik edilerek 80 adet (8 farklı mürekkep x 5 farklı hacim x 2 mikroorganizma türü) disk hazırlandı (Tablo 3.9).

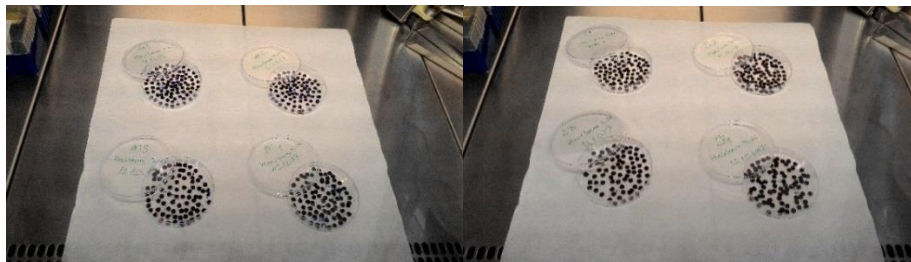
Aynı hacimde mürekkep içeren diskler, disk merkezinden disk merkezine uzaklığı 35-40 mm olacak şekilde sekize bölünmüş besiyerlerine yerleştirildi. Ekim yapılan besiyerlerine etiketleme işlemi yapılarak; hangi örnekten alındığı belirtildi. Negatif ve pozitif kontroller kullanıldı. Tüm petri kapakları bunzen alevinden geçirilerek kapatıldı. Ekim yapılan jelöz besiyerleri 37°C'de etüv içerisinde 24 saat süre ile, malt besiyerleri ise 25-27°C'de oda ısısında (karanlık ortamda) 7-10 gün süre ile mikrobiyoloji laboratuvarında inkübe edildi. Disklerin etrafında inhibasyon zonu oluşumlarının varlığı gözlemlendi ve oluşan inhibasyon zonlarının çapları ölçülerek aynı mürekkeplerin farklı hacimde mürekkep içeren diskleri karşılaştırıldı (Tablo 4.20).

Tablo 3.9. Tek bir mikroorganizma için farklı hacimde mürekkep içeren disklerin hazırlanışı

Örnek	Ön Yüzeye Uygulanan Hacim	Arka Yüzeye Uygulanan Hacim
S1a, S2a, S3a, S4a, M1a, M2a, M3a, M4a	1,0 µl	1,0 µl
S1b, S2b, S3b, S4b, M1b, M2b, M3b, M4b	1,5 µl	1,5 µl
S1c, S2c, S3c, S4c, M1c, M2c, M3c, M4c	2,0 µl	2,0 µl
S1d, S2d, S3d, S4d, M1d, M2d, M3d, M4d	2,5 µl	2,5 µl
S1e, S2e, S3e, S4e, M1e, M2e, M3e, M4e	3,0 µl	3,0 µl

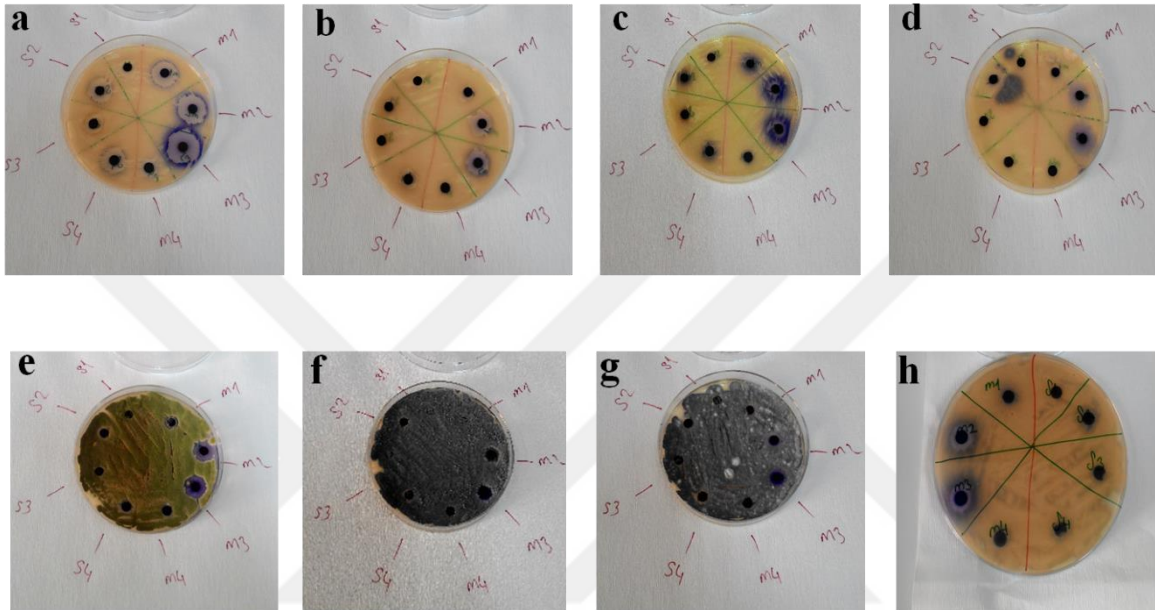
3.2.6.2.6. Zamanın İnhibasyon Zonlarına Etkisinin Araştırılması

0,5 McFarland'a göre farklı miktarlarda mürekkep içeren disklerin etrafında oluşan inhibasyon zonlarının büyüklükleri birbirine yakın olduğu bir önceki maddede tespit edildiğinden çalışmaya toplamda 4 µl mürekkep içeren disklerle devam edildi. Zamanın inhibasyon zonlarına etkisinin araştırılması için her bir mürekkepten toplam 24 adet (8 mikroorganizma türü x 3 farklı zaman) disk hazırlandı (Şekil 3.21) .

**Şekil 3.21.** 0-6 ay arasında bekletilen mürekkep-kağıt diskleri

Sıcaklığın 23°C (±2) ve bağıl nemin %55 (±8) olduğu bir ortamda 6 aya kadar güneş ışığına direk olarak maruz kalmaksızın rastgele bekletilen mürekkep-kağıt disk örnekleri 0. ayda, 3. ayda ve 6. ayda 0.5 McFarland konsantrasyonunda hazırlanan mikroorganizma süspansiyonlarının pasajlandığı uygun besiyerlerine ekildi. Diskler, disk merkezinden disk merkezine uzaklığı 35-40 mm olacak şekilde sekize bölünmüş besiyerlerine yerleştirildi. Ekim yapılan besiyerlerine etiketleme işlemi yapılarak; hangi örnekten alındığı belirtildi. Her

aylık ölçümde kör örnekler, negatif ve pozitif kontroller kullanıldı. Tüm petri kapakları bunzen alevinden geçirilerek kapatıldı. Ekim yapılan jelöz besiyerleri 37°C’de etüv içerisinde 24 saat süre ile, malt besiyerleri ise 25-27°C’ de oda ısısında (karanlık ortamda) 7-10 gün süre ile mikrobiyoloji laboratuvarında inkübe edildi. Disklerin etrafında inhibasyon zonu oluşumlarının varlığı gözlemlendi (Şekil 3.22) ve oluşan inhibasyon zonlarının çapları ölçülerek zamana karşı karşılaştırıldı (Tablo 4.21, Şekil 4.29).



Şekil 3.22. İnkbiyogramlarda 6. aya ait inhibisyon zonlarına örnekler (a) *S. aureus*, (b) *B. subtilis*, (c) *E. coli*, (d) *M. lenti flavum*, (e) *A. flavus*, (f) *A. fumigatus*, (g) *Penicillium sp.*, (h) *Cladosporium sp.*

3.2.6.2.7. Kontamine Edilmiş Kağıt-Mürekkep Disklerinin İçerisindeki Mürekkep Boyar Maddelerinin Moleküler Dönüşümüne Zamanın Etkisi

Çalışmanın bu aşamasında MALDI-TOF-MS cihazının maddi yükü gerekçesiyle, Türk resmi dairelerinde genellikle Pensan Marka kalem kullanıldığından bu tek marka mürekkep ile çalışıldı. Standart küf mantarı ve bakteri suşlarından bir parça steril öze ile alındı. 0,5 McFarland’a göre 200 µl serum fizyolojide süspanse edildi. 1 dk vorteksenerek karıştırıldı. 4 µl S1 kodlu Pensan MV-Pen Vision (Siyah) ve M3 kodlu Pensan MV-Pen Vision (Mavi) tükenmez kalem mürekkebi ayrı ayrı uygulanmış kağıt diskler, hazırlanan bu süspansiyonla (~1 µl hacimde) kontamine edildi. Toplamda hazırlanan 48 adet örnek (2 farklı tükenmez kalem mürekkebi x 8 farklı mikroorganizma x 3 farklı zaman) ve negatif kontroller, oda ısısında ayrı steril kabinlerde 30 dk kurumaya bırakıldı. Hazırlanan örnekler, kodlanmış

ependorf tüplerde sıcaklığın 23°C (± 2) ve bağıl nemin %55 (± 8) olduğu bir ortamda 6 aya kadar güneş ışığına direk olarak maruz kalmaksızın muhafaza altına alındı. Aynı ortam koşullarında ayrı bekletilen kör kağıt diskler, negatif amaçlı hazırlanan kontamine edilmemiş mürekkep-kağıt diskleri ve kontamine mürekkep-kağıt disklerinde bulunan mürekkep boyar maddelerin moleküler dönüşümleri MALDI-TOF-MS cihazında 0. ayda, 3. ayda ve 6. ayda analiz edildi. Analiz sonuçları karşılaştırılarak yorumlandı (Şekil 4.30).

3.3.Çalışmanın Mürekkep Boyar Maddelerinin Moleküler Değişimlerini İnceleme

Aşaması

Çalışmanın deneysel aşaması Acıbadem Sağlık Grubu bünyesindeki Acıbadem Üniversitesi Labmed Tıbbi Laboratuvarındaki cihaz ve gereçler kullanılarak Eylül 2017 ve Haziran 2018 ayları arasında yürütüldü. Çalışmanın bu aşamasında öncelikle MALDI-TOF-MS cihazında herhangi bir ön ekstraksiyon işlemi yapmaksızın 1.2 mm çaplı kağıt örneğinden doğrudan mürekkep yapı analizine ilişkin yöntem geliştirildi. İyi bir yüzey analizi yapabilmek için geliştirilen yöntem optimize edildi. Yöntem optimizasyonu sonrasında pararosanilin (PR), metil viyole (MV), kristal viyole (CV) ve viktorya mavisi (VB) mürekkep boyar maddelerinin ayrı ayrı hazırlanan standard çözeltileri ile piyasadan rastgale seçilmiş 5'er adet mavi ve siyah tükenmez kalem mürekkepleri iki farklı kalitedeki kağıt tipine tatbik edildi. Bası farkını ortadan kaldırmak için çizgiler aynı kişi tarafından aynı zemin üzerinde farklı kalitelerde A4 fotokopi kağıdına (80g/m^2 ve 100g/m^2) 3 cm mesafe aralıklarıyla çizildi.

Yapay soldurma tekniği uygulanan örneklerde zamanla kağıt üzerindeki mürekkep boyar maddelerinin solma oranları MALDI-TOF-MS ile analizlendi ve zamana karşı bir solma eğrisi çizilmesi amaçlandı. Bu solma eğrisinin gerçeğe uygunluğunun irdelenmesi için iki farklı arşivden gerçek örnekler alınarak geliştirilen yöntemle analizlendi. Yapay solma sonrası analiz edilinceye kadar, numunelerin ve iki farklı arşivden alınan gerçek örneklerin saklandığı karanlık ortamın nemi %50 (± 10) ve sıcaklığı 22 (± 4) $^{\circ}\text{C}$ dir.

3.3.1. Mürekkep Boyar Maddelerinin Moleküler Değişimlerinin İncelenmesi Çalışmalarında Kullanılan Gereçler

Çalışmada kullanılan tüm gereçler, bunların marka ve modelleri Tablo 3.10.'de verildiği gibidir.

Tablo 3.10. Çalışmanın mürekkep boyar maddelerinin moleküler değişimlerini inceleme aşamasında kullanılan gereçlerin adları, marka-modelleri

Kullanılan Gereç	Marka-Model
Otomatik pipet ve uçları; 0.1- 2.5 µL, 2.5- 20 µL, 10- 100 µL, 100- 1000 µL	Brand®
Vorteks	ProScientific® 652 VSM-3
MALDI-TOF/MS	Bruker® Autoflex MaX
Bidistile ultra saf su cihazı	Milli Direct® Q3
Ultrasonik Banyo	HydraUltrasonic®
± 0,1 mg duyarlılıkta hassas dijital elektronik terazi	Precisa® XB 220 A
Ultrasonik su banyosu	Bandelin Sonorex®
Panç	Harris® 1.2 mm
Lüksmetre	VC® 1010 A

3.3.2. Mürekkep Boyar Maddelerinin Moleküler Değişimlerinin İncelenmesi Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Çalışmanın mürekkep boyar maddelerinin moleküler değişimlerini inceleme aşaması boyunca kullanılan tüm kimyasal ve sarf malzemelerin adları, marka ve özellikleri Tablo 3.11.'de verildiği gibidir.

3.3.3.Kalem Ve Kağıt Numuneleri

Piyasadan rastgele seçilip temin edilen iki farklı kalitedeki kağıt tipi ve rastgele seçilmiş 5'er adet mavi ve siyah renkli tükenmez kalem marka ve modelleri ile çalışma boyunca kullanılan kodları;

- Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm (Siyah)-(S1)
- Faber Castell Speedx10 1.0 mm (Siyah)-(S2)
- Art Ballpoint Pen 1.0 mm (Siyah)-(S3)
- Schneider slider Edge XB (Siyah)-(S4)
- Bigpoint 930 (Siyah)-(S5)
- Faber Castell FDx10 1.0 mm (Mavi)-(M1)
- Schneider Slider Edge XB (Mavi)-(M2)
- Pensan MV-Pen Vision (Mavi)-(M3)
- Noki Wonder Ball (Mavi)-(M4)
- Bigpoint 932 (Mavi)-(M5)
- A4 fotokopi kağıdı (Office International Copier Bond Hamur 80g/m² 210x297mm)-(K1)
- A4 fotokopi kağıdı (Office International Copier Bond Hamur 100g/m² 210x297mm)-(K2)

Tablo 3.11. Çalışmanın mürekkep boyar maddelerinin moleküler değişimlerini inceleme aşamasında kullanılan kimyasal ve sarf malzemelerin listesi

Çalışmadaki Kullanım Aşaması	Malzemenin Adı	Markası/Özelliği
Mürekkep İçeriğindeki Boyar Maddeler	Kristal viyole (C.I.42555)	Merck® (Almanya)
	Metil viyole 2B Certificied (Boya içeriği %80)	Sigma Aldrich® (Almanya)
	Viktorya mavisi(Standart Fluka for microscopy)	Sigma Aldrich® (Almanya)
	Pararosanilin	Sigma Aldrich® (Almanya)
Kullanılan Kimyasallar	Metanol (HPLC grade)	Merck® (Almanya)
	Etanol (HPLC grade)	Merck® (Almanya)
	Distile su	Merck® (Water LC-MS Grade)
	Trifluoroasetik asit (TFA)	Sigma Aldrich® (Almanya)
Cihaz Kalibrasyonu	Polipropilen Glikol	Zivak Technologies®
Örneklerin Cihaz Analiz Plakasına Sabitlenmesi (Target)	Yapıştırıcı	Pritt Stick®

3.3.4. Standart Çözeltilerin ve Analiz Örneklerinin Hazırlanması

3.3.4.1. PR, MV, CV, VB Çözeltilerinin ve Analiz Örneklerinin Hazırlanması

PR, MV, CV ve VB standartlarına ait çözeltiler aşağıda bildirildiği şekilde hazırlanarak +4°C’ de (± 2) ve karanlıkta muhafaza edildi. Hazırlanan çözeltiler kullanımlarından önce oda sıcaklığına getirildi.

PR, MV, CV ve VB’ nin zaman içindeki dönüşümünün incelenmesi amacıyla 0.30 gr Metil viyole 2B Certificied (boya içeriği %80), Kristal viole, Viktorya Pure Blue (VPBBO) ve 0.25 gr Pararosanilin, ayrı ayrı tartıldı. 20 ml metanolde çözülerek maksimum doygunlukta dört adet çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler ile iki farklı kalitedeki kağıt tipine 3 cm aralıklı düz çizgiler çizildi. 0. zamanda ilk panç örneği alındıktan sonra kağıtlar üzerindeki çizgiler 5 saat boyunca 300 Watt 1760 Lüks ksenon lamba kullanılarak 30 cm mesafede ışık kaynağına maruz bırakıldı, ışık şiddeti Lüksmetre ile ölçüldü (Şekil 3.23). Her saat sonunda her bir örnek için karanlığa yakın bir ortamda en az 3 panç alındı ve analiz edilinceye kadar karanlıkta saklandı. Her bir örnek MALDI-TOF-MS cihazına ait örnek yükleme plakasına

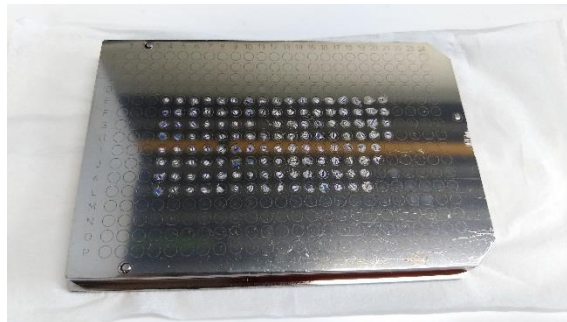
(target) Pritt Stick marka yapıştırıcı yardımı ile sabitlenerek herhangi bir ön işleme gerek kalmaksızın kağıt yüzeyden direk analizleri yapıldı.

3.3.4.2. Tükenmez Kalem Mürekkep Örneklerinin Analize Hazırlanması

İki farklı kalitedeki A4 fotokopi kağıdına *Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm (Siyah)*, *Faber Castell Speedx10 1.0 mm (Siyah)*, *Art Ballpoint Pen 1.0 mm (Siyah)*, *Schneider slider Edge XB (Siyah)*, *Bigpoint 930 (Siyah)*, *Faber Castell FDx10 1.0 mm (Mavi)*, *Schneider Slider Edge XB (Mavi)*, *Pensan MV-Pen Vision (Mavi)*, *Noki Wonder Ball (Mavi)*, *Bigpoint 932 (Mavi)* marka tükenmez kalem mürekkepleri ile 3 cm aralıklı düz çizgiler çizildi. 0.zamanda ilk panç örneği alındıktan sonra kağıtlar üzerindeki çizgiler 5 saat boyunca 300 Watt 1760 Lüks ksenon lamba kullanılarak 30 cm mesafede ışık kaynağına maruz bırakıldılar. Işık şiddeti Lüksmetre ile ölçüldü (Şekil 3.23). Her saat sonunda herbir tükenmez kalem mürekkep örneği için karanlığa yakın bir ortamda en az 3 panç alındı ve analiz edilinceye kadar karanlıkta saklandı. Her bir örnek MALDI-TOF-MS cihazına ait örnek yükleme plakasına Pritt Stick marka yapıştırıcı yardımı ile sabitlenerek kağıt yüzeyden direk analizleri yapıldı (Şekil 3.24).



Şekil 3.23. 300 Watt 1760 Lüks ksenon lamba kullanılarak 30 cm mesafede ışık kaynağına maruz bırakılan mürekkep örnekleri



Şekil 3.24. MALDI-TOF-MS örnek yükleme plakasına Pritt Stick yapıştırıcı yardımı ile sabitlenen kağıt numuneleri

3.3.5. MALDI-TOF-MS Cihazının Örnek Yükleme Plakasının (Target) Temizlik Prosedürü

Analizlenecek numuneler örnek yükleme plakasına her yüklemenden önce herhangi bir bulaşı önlemek ve bir önceki analizden kalan yapıştırıcı maddeyi plakadan uzaklaştırmak amacıyla yapıştırıcı içeriği baz alınarak geliştirilen aşağıdaki prosedüre uygun olarak plaka temizlendi.

1. Distile su ile plaka yıkanarak mekanik kuvvetle kağıt örnekleri yüzeyden uzaklaştırıldı.
2. %70'lik etanolün bulunduğu küvet içerisine plaka konarak tüm yüzeyinin etanolle kaplanması sağlandı ve bu şekilde 5 dk çalkalayıcıda bekletildi.
3. Plaka küvetten alınarak LC-MS Grade su ile yıkandı, üzerine %70'lik etanol döküldü.
4. Yüzey partikül bırakmayan özel bir mendille (Kimwipes marka) silindi.
5. 3. ve 4. basamaklardaki işlemler 2 kez tekrarlandı.
6. 500 µL %80'lik TFA (Trifloroasetik Asit) ve 200 µL LC-MS Grade su karıştırılarak yüzeye tatbik edildi.
7. Yüzey partikül bırakmayan özel mendille (Kimwipes) silindi.
8. LC-MS Grade su ile yüzey tekrar yıkanarak Kimwipes mendille silindi.
9. Plaka azot gazı altında kurutuldu.

3.3.6. Yöntemin MALDI-TOF-MS Cihazına Uyarlanması ve Optimizasyonu

Çalıştığımız mürekkep boyar maddelerinin molekül ağırlıkları düşük olduğundan, yöntem geliştirme öncesinde standart olarak Polipropilen Glikol maddesi kullanılarak MALDI-TOF-MS cihazının (Şekil 3.25) kalibrasyonu yapıldı. Cihazla ilgili ölçüm parametrelerinin optimizasyonunda, standart A4 fotokopi kağıdına metil viyole standardı ile çizilen çizgide zamanla oluşan küçük piklerin ortaya çıkışının sağlanması için 30 saat boyunca 300 Watt 1760 Lüks ksenon lamba kullanılarak 30 cm mesafede ışık kaynağına maruz bırakılan örnek kullanıldı.

3.3.6.1. İyon Kaynağı (Ion Source) Değerinin Belirlenmesi

Dedektör voltajı 1777 değerinde sabit tutuldu. Farklı değerler denenerek girilen iyon kaynağına karşılık elde edilen resolüsyon değeri Tablo 4.22 ve iyon kaynağının belirlenmesi için farklı değerlerin denenmesi sonucunda elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.31'de görülmektedir.



Şekil 3.25. Çalışmada kullanılan MALDI-TOF-MS cihazı

3.3.6.2. Lazer Pulslu İyon Ekstraksiyonu (Pulsed Ion Extraction) Belirlenmesi

Dedektör voltajı 1777 ve iyon kaynağı 17,2 değerinde sabit tutuldu. Lazer pulslu iyon ekstraksiyonu için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.23 ve lazer pulslu iyon ekstraksiyonunun belirlenmesi için farklı değerlerin denenmesi sonucunda elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.32’de görülmektedir.

3.3.6.3. Örnekleme Hızı ve Sayısallaştırıcı Ayarının (Sample Rate And Digitizer Settings) Belirlenmesi

Dedektör voltajı 1777, iyon kaynağı 17,2 ve lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150 değerinde sabit tutuldu. Örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.24 ve örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı hızının belirlenmesi için farklı değerlerin denenmesi sonucunda elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.33’te görülmektedir.

3.3.6.4. Reflektör Değerinin Belirlenmesi

Dedektör voltajı 1777, iyon kaynağı 17,2 , lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150 ve örnekleme hızı-sayısallaştırıcı ayarı 2 değerinde sabit tutuldu. Reflektör değerinin belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.25 ve reflektör değerinin belirlenmesi için farklı değerlerin denenmesi sonucunda elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.34’te görülmektedir.

3.3.6.5. Lazer Atım Hızının Belirlenmesi

Dedektör voltajı 1777, iyon kaynağı 17,2 , lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150 ve örnekleme hızı-sayısallaştırıcı ayarı 2 ve reflektör değeri 9,7 değerinde sabit tutuldu. Lazer atım hızının belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.26 ve lazer atım hızının belirlenmesi için farklı değerlerin denenmesi sonucunda elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.35'te görülmektedir.

3.3.6.6. Dedektör Voltajının Belirlenmesi

Dedektör voltajı 1777, iyon kaynağı 17,2 , lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150 ve örnekleme hızı-sayısallaştırıcı ayarı 2, lazer atım hızı 100 ve reflektör değeri 9,7 değerinde sabit tutuldu. Dedektör voltajının belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.27 ve dedektör voltajının belirlenmesi için farklı değerlerin denenmesi sonucunda elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.36'da görülmektedir.

3.3.6.7. Atış (Shot) Frekansının Belirlenmesi

Dedektör voltajı 1804, iyon kaynağı 17,2 , lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150 ve örnekleme hızı-sayısallaştırıcı ayarı 2, lazer atım hızı 100 ve reflektör değeri 9,7 değerinde sabit tutuldu. Shot frekansının belirlenmesi için farklı değerlerin denenmesi sonucunda elde edilen maksimum resolüsyon değeri Tablo 4.28 ve Şekil 4.37' de görülmektedir.

3.3.6.8. Lazer Enerjisinin Belirlenmesi

Dedektör voltajı 1804, iyon kaynağı 17,2 , lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150 ve örnekleme hızı-sayısallaştırıcı ayarı 2, lazer atım hızı 100, shot frekansı 100 ve reflektör değeri 9,7 değerinde sabit tutuldu. Lazer enerjisinin belirlenmesinde zamana bağlı yapay solma ayrımının görülebilmesi için 1 saate ve 5 saate kadar yapay soldurulan standart 80 gr/m² A4 fotokopi kağıdına uygulanmış Schneider Slider Edge XB (Mavi) mürekkebe ait 3'er örneğin (K1M2) 3 tekrarlı analizi kullanıldı. Lazer enerjisinin belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık gelen, her birinin zamanla kağıt üzerinde solmasına ilişkin oluşan ve zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen fotodegradasyon ürünü piklerin iyon şiddeti ile metil viyole (MV) iyon şiddetleri toplamının kristal viyole (CV) iyon şiddetine oranı temel alınarak elde edilen değerlere göre zamana bağlı solmada ayırım aralığının en iyi görüldüğü ve fazla olduğu değer seçildi (Tablo 4.29 ve Şekil 4.38).

3.3.7. Optimizasyon Sonrası Işık Etkisi İle Yapay Solan Örneklerin Analizi

80 g/m² (K1) ve 100g/m² (K2) A4 fotokopi kağıdı üzerine çizilen tükenmez kalem mürekkeplerinden ve mürekkep boyar madde standartlarından 3'er adet alınan numuneler MALDI-TOF-MS'te 3 tekrarlı analizlendi (bkz. EK 1-28 "Tükenmez kalem mürekkepleri ve boyar madde standartlarının spektrumları"). Analiz sonrası elde edilen piklerin iyon şiddetlerinden zamana karşı solma eğrileri çizildi (Şekil 4.39-4.70). Tükenmez kalem mürekkeplerinin ve mürekkep boyar madde standartlarından olan kristal viyole ve metil viyolenin, 0-5 yıl arasına tekabül eden yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrileri aşağıda ki formülde belirtildiği gibi, her birinin zamanla kağıt üzerinde solmasına ilişkin oluşan ve zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen fotodegradasyon ürünü küçük pikler ile metil viyole (MV) iyon şiddeti toplamının kristal viyole (CV) iyon şiddetine oranı temel alınarak çizildi. Mürekkep boyar madde standartlarından pararosnilin (PR) ve viktorya mavisini (VB) için ise, bu standartların zamanla kağıt üzerinde solmasına ilişkin ortaya çıkan fotodegradasyon ürünü küçük piklerin iyon şiddetinin temel piklerin iyon şiddetine oranları kullanılarak zamana karşı solma eğrileri çizildi. 80 g/m² (K1) ve 100g/m² (K2) A4 kağıdı üzerindeki farklı bazı mavi ve siyah tükenmez kalem örneklerinin 0-5 saat soldurma sonrası spektrumları Şekil 4.71-4.74 arasında görülmektedir. ANOVA analizi ile farklı kağıt türleri üzerinde bulunan farklı mürekkep türleri içerisindeki boyar maddelerin zamana bağlı değişimlerinin karşılaştırılması yapıldı (Tablo 4.30-4.35) .

$$r_{Solma} = \frac{\sum_{j=372}^{314} i_{j-14}}{i_{372}}$$

3.3.8. Doğal Solmanın Gerçekleştiği Arşiv Belgelerinden Alınan Örneklerin Analizi

Yapay soldurma tekniği uygulanan örneklerde zamanla kağıt üzerindeki mürekkep boyar maddelerinin solma oranlarının tespiti için geliştirilen yöntemin gerçeğe uygunluğunun irdelenmesine yönelik olarak hukuk bürosu arşivi ve hastane temizlik kayıt defteri arşivinde aynı koşullarda beklemekte olan belgelerden her yılın Nisan ayına ait mavi ve siyah tükenmez kalemle yazılmış aynı belgeden ve üçer adet olacak şekilde 0-5 yıllık zaman aralığında toplam 72 adet örnek "Gelişigüzel Örnekleme" yöntemiyle alındı. 1.2 mm'lik panç yardımı ile alınan herbir numunenin 3 tekrarlı olacak şekilde analizi yapıldı. Analiz sonrası elde edilen piklerden, zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen fotodegradasyon ürünü küçük pikler ile metil viyole (MV) iyon şiddeti toplamının kristal viyole (CV) iyon şiddetine oranı temel alınarak hesaplama yapıldı (Şekil 4.75-4.86).

4. BULGULAR

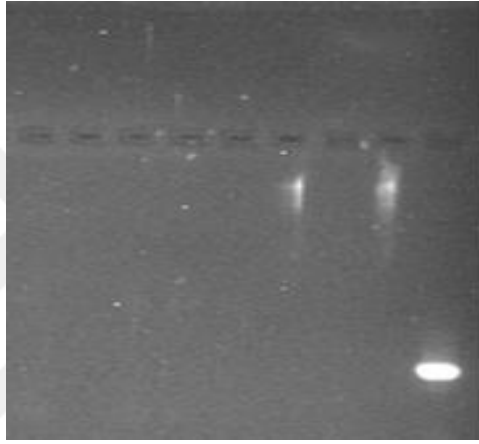
4.1. Genetik Çalışma Bulguları

Çalışmanın deneysel aşaması İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü bünyesinde bulunan Adli Moleküler Genetik Laboratuvarı ve Adli Moleküler Genetik Öğrenci Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada materyal olarak kullanılan el sürüntüsünün bıraktığı biyolojik kalıntılar; magazin kağıdı, çek tipi senet kağıdı, 80g/m² ve 100g/m² A4 fotokopi kağıdı olmak üzere 4 farklı kağıt yüzeyden; herhangi bir tahribat yapmadan normal swap aracılığı ile, yeni nesil swap aracılığı ile, mikroskop altında epitel hücre toplama yöntemi ve bası izinin bulunduğu bölgenin 3 mm' lik panç yardımı ile kesilerek doğrudan izolasyonda kullanılması yöntemleri olmak üzere 4 farklı yöntemle toplandı. Toplanan sürüntü ve kesit örneklerine silika temelli DNA izolasyon işlemi uygulandı. DNA izolasyon işlemi sonrasında izolasyonun başarısını gözlemlemek için DNA izolatları %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Beklenen kalite ve miktarda DNA elde edilemediğinden izolasyon prosedürü modifiye edildi ve izolasyon sonrası çekitlenen DNA'lar saflaştırıldı. PCR işleminde kullanılacak amplifikasyon kitine özgü konsantrasyonda DNA miktarını ayarlayabilmek için Qubit Florimetre Cihazı ile florimetrik olarak DNA miktar tayini yapıldı. Daha sonra aynı örneklerde insan genomik DNA'sına özgü primerler kullanılarak PCR işlemi 3 farklı STR kiti (AmpFI STR® MiniFiler™ PCR, AmpFI STR® IdentiFiler™ PCR ve AmpFI STR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kiti) ile gerçekleştirildi. PCR işlemi sonrasında ABI 3130 cihazında elektroforezi yapılan örnekler Genemapper IDx yazılım programı kullanılarak analizlendi ve genotiplendirildi.

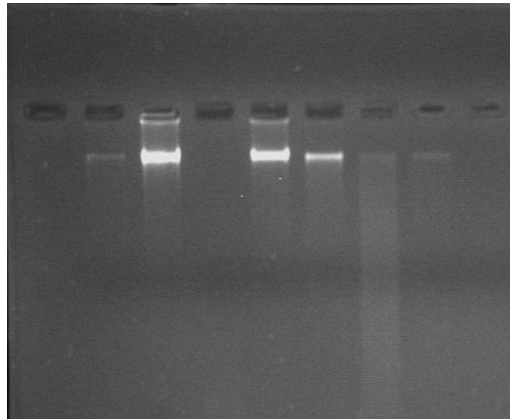
Çalışma boyunca iç kontrolü sağlamak amacıyla; negatif kontrol (NK) kullanılarak kontaminasyon varlığı, pozitif kontrol (PK) kullanılarak da STR kitlerinin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi. Kullanılan negatif kontrollerde herhangi bir çoğalma gözlenmezken, pozitif kontrollerde ise her kite özgü kit içeriğindeki genotipi bilinen profillerle karşılaştırılma yapılarak kullanılan kitin doğru çalışıp çalışmadığı kontrol edildi. Elde edilen bulgular neticesinde geliştirilen yöntem 1 gün ila 10 yıl zaman aralığında farklı tükenmez kalemle aynı kişi tarafından yazılmış bir günlükten ve bir hukuk bürosu arşivinden alınan örneklerle uygulandı. Çalışmamızın genetik laboratuvarı uygulamalarına 2015 yılı Haziran ayında başlanmış, deneyler 2015 yılı Kasım ayında tamamlanmıştır.

4.1.1. DNA İzolasyonundan Elde Edilen İzolatlara Ait DNA Bulguları ve Miktarları

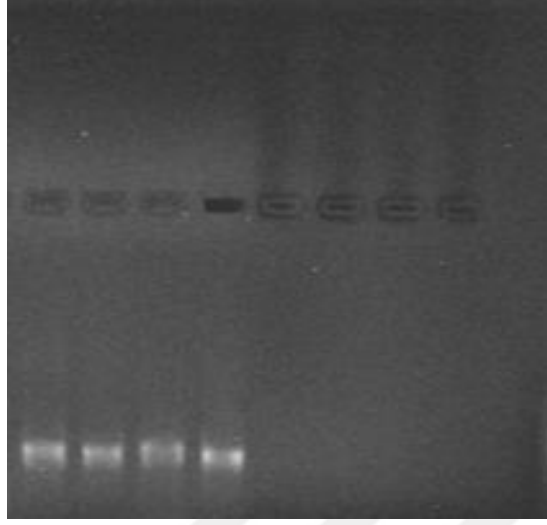
Silika temelli yöntemin uygulandığı DNA izolasyon işlemi sonrası izolasyonun başarılı olup olmadığının tespiti için DNA varlığı %2'lik agaroz jel elektroforezi ile gözlemlendi. %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4' görülmektedir. Şekil 4.1'de normal swap aracılığı ile alınan sürüntülerin izolasyonunda tüm kağıt tiplerinde DNA varlığı gözlenmezken, tüm kağıt tiplerinden Şekil 4.2'de yeni nesil swap aracılığı ile alınan sürüntü örneklerinden ve Şekil 4.3'te mikroskop altında toplanan epitel hücrelerden elde edilen izolatlarda DNA varlığı az da olsa görülmektedir. Şekil 4.4'te kağıdın 3 mm'lik panç yardımıyla kesilerek direk kullanılması ile elde edilen izolatlarda tüm kağıt tiplerinde DNA varlığı ciddi oranda görülmektedir.



Şekil 4.1. Serum fizyolojik ile ıslatılmış normal swap aracılığıyla alınan sürüntü örneklerinin izolasyonu sonrasında elde edilen izolatların %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü



Şekil 4.2. Serum fizyolojik ile ıslatılmış yeni nesil swap aracılığıyla alınan sürüntü örneklerinin izolasyonu sonrasında elde edilen izolatların %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü



Şekil 4.3. Kağıdın yüzeyinden mikroskop altında toplanan hücrelerin izolasyonu sonrasında elde edilen DNA izolatlarının %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü



Şekil 4.4. Kağıttan alınan kesitten izolasyon sonrasında elde edilen DNA izolatlarının %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

DNA izolasyon işlemi sonrasında Qubit Florimetre cihazı ile florimetrik olarak DNA miktar tayini yapıldı ve elde edilen DNA miktarları Tablo 4.1'de gösterildiği şekilde kaydedildi.

Tablo 4.1. Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü ile el sürüntüsü örneklerinden elde edilen DNA miktarları

Örnek Toplama Yöntemi	Örnek Toplanan Kağıt Cinsi	DNA Miktarı (ng/μL)
<i>Mikroskop Altında Epitel Hücre Toplama</i>	Magazin kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
	Çek tipi senet kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
<i>Yeni Nesil Swapla Yüzeyden Epitel Hücre Toplama</i>	Magazin kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
	Çek tipi senet kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
<i>Normal Swapla Yüzeyden Epitel Hücre Toplama</i>	Magazin kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
	Çek tipi senet kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	< 0,05
	Negatif Kontrol	< 0,05
<i>Basının Uygulandığı Bölgenin 3 mm Kesilerek Kullanılması</i>	Magazin kağıdı	1.03
	Negatif Kontrol	< 0,05
	Çek tipi senet kağıdı	0.63
	Negatif Kontrol	< 0,05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.82
	Negatif Kontrol	< 0,05
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.97
	Negatif Kontrol	< 0,05

İzolasyon kitinin modifiye edilmesi aşamasında aynı başlangıç materyaline sahip örneklerle DDT ve PBS nin ayrı ayrı uygulanması ile elde edilen izolatlar içerisindeki DNA miktarları kıyaslandığında; DDT’ nin kullanıldığı modifiye Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedüründen miktarı daha yüksek DNA elde edildiği Tablo 4.2’ de görülmektedir.

Tablo 4.2. Modifiye Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü ile el sürüntüsü örneklerinden elde edilen DNA miktarları

Örnek Toplama Yöntemi	Örnek Toplanan Kağıt Cinsi	DNA Miktarı (ng/μL)	
		DDT' nin kullanıldığı izolat	PBS'nin kullanıldığı izolat
Mikroskop Altında Epitel Hücre Toplama	Magazin kağıdı	1.65	0.81
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Çek tipi senet kağıdı	0.48	< 0.05
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.21	< 0.05
Yeni Nesil Swapla Yüzeyden Epitel Hücre Toplama	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.33	0.28
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Magazin kağıdı	1.89	1.15
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
Normal Swapla Yüzeyden Epitel Hücre Toplama	Çek tipi senet kağıdı	0.96	< 0.05
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.57	0.34
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.71	0.50
Basının Uygulandığı Bölgenin 3 mm Kesilerek Kullanılması	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Magazin kağıdı	1.22	0.46
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Çek tipi senet kağıdı	<0.05	< 0.05
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
Basının Uygulandığı Bölgenin 3 mm Kesilerek Kullanılması	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.42	< 0.05
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.95	< 0.05
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Magazin kağıdı	2.17	1.38
Basının Uygulandığı Bölgenin 3 mm Kesilerek Kullanılması	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Çek tipi senet kağıdı	1.03	0.27
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.63	0.59
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
Basının Uygulandığı Bölgenin 3 mm Kesilerek Kullanılması	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.94	0.95
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05

Hücre düzeyinde eser miktarda ve degrede örneklerle çalışıldığı için izole edilen DNA'nın miktarını ve kalitesini arttırmak amacıyla PCR öncesinde el sürüntü örneklerine ait DNA izolatlarına saflaştırma protokolü uygulandı. El sürüntüsü örneklerine ait DNA izolatlarının saflaştırılmadan önce ve saflaştırıldıktan sonraki elde edilen DNA miktarları karşılaştırmalı olarak Tablo 4.3'te görülmektedir.

Tablo 4.3. El sürüntüsü örneklerine ait DNA izolatlarından saflaştırma öncesi ve sonrasında elde edilen DNA miktarları

Örnek Toplama Yöntemi	Örnek Toplanan Kağıt Cinsi	DNA Miktarı (ng/μL)	
		Saflaştırma Öncesi	Saflaştırma Sonrası
Mikroskop Altında Epitel Hücre Toplama	Magazin kağıdı	1.65	2.18
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Çek tipi senet kağıdı	0.48	0.59
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.21	1.74
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
Yeni Nesil Svapla Yüzeyden Epitel Hücre Toplama	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.33	1.83
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Magazin kağıdı	1.89	2.67
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Çek tipi senet kağıdı	0.96	1.36
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
Normal Svapla Yüzeyden Epitel Hücre Toplama	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.57	2.20
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.71	2.39
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Magazin kağıdı	1.22	1.71
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
Basının Uygulandığı Bölgenin 3 mm Kesilerek Kullanılması	Çek tipi senet kağıdı	<0.05	0.26
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.42	0.61
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.95	1.07
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
Basının Uygulandığı Bölgenin 3 mm Kesilerek Kullanılması	Magazin kağıdı	2.17	3.28
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	Çek tipi senet kağıdı	1.03	1.54
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.63	1.80
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05
Basının Uygulandığı Bölgenin 3 mm Kesilerek Kullanılması	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	1.94	2.85
	Negatif Kontrol	< 0.05	< 0.05

İncelenmek üzere araştırmacı hariç üç gönüllünün ağız içi sürüntü örneklerinden, silika temelli QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) ticari kiti kullanılarak DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA miktarları Tablo 4.4'te görüldüğü şekildedir.

Tablo 4.4. Ağız içi sürüntü örneklerinden elde edilen DNA miktarları

Örnek	DNA Miktarı ng/ μ L
1	4.18
2	3.59
3	2.08
4	1.73

4.1.2. Üç Farklı STR Kiti Kullanımı ile Elde Edilen Bulgular ve STR Profilleri

Saflaştırılan el sürüntüsü örneklerine ait DNA izolatları insan genomik DNA'sına özgü primerler içeren 3 farklı ticari STR kiti ile PCR işlemine tabi tutularak amplifiye edildi. PCR işlemi sonrasında çalışılan örnekler için ham veriler Genemapper IDx yazılım programında analiz edilerek örnekler genotiplendirildi. Çalışmanın başından itibaren iç kontrol amacı ile negatif kontrol (NK) kullanılarak (hem kör kağıt örneklerinden alınan numuneler hem de izolasyon aşamasında izolasyonun başından itibaren kullanılan negatif kontrol) kontaminasyon varlığı, genotipi bilinen her bir PCR kitine özgü pozitif kontrol (PK) kullanılarak da ilgili PCR kitinin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi.

Araştırmacıya ait farklı kağıt yüzeylerden 3 farklı PCR kiti ile elde edilen DNA profillerinin beklenen ve gözlenen lokus sayılarına göre mukayese edilebilirliği Tablo 4.5'te kıyaslandı. Buna göre AmpFISTR® MiniFiler™ PCR Kiti (Tablo 4.6), AmpFISTR® IdentifilerFiler™ PCR Kiti (Tablo 4.7) ve AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR Kiti (Tablo 4.8) ile yapılan PCR analizlerinde magazin kağıdından alınan sürüntü örneğinde mukayeseye elverişli profil elde edilirken çek tipi senet kağıdı, 80g/m² ve 100g/m² A4 fotokopi kağıdı örneklerinde mukayeseye elverişli olmayan kısmi profil elde edildiği gözlemlendi.

Tablo 4.5. Araştırmacıya ait farklı kağıt yüzeylerden farklı PCR kitleri ile elde edilen edilen DNA profillerinin beklenen ve gözlenen lokus sayılarına göre mukayese edilebilirliği

Kullanılan Ticari PCR Kiti	Örnek	Tam Veya Kısmi Profil	Beklenen Lokus Sayısı	Gözlenen Lokus Sayısı
AmpFISTR® Minifiler® PCR Amplifikasyon Kiti	Magazin kağıdı	Tam Profil	9	9
	Çek tipi senet kağıdı	Kısmi Profil	9	3
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	9	6
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	9	8
AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon Kiti	Magazin kağıdı	Tam Profil	16	16
	Çek tipi senet kağıdı	Kısmi Profil	16	5
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	16	11
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	16	15
AmpFISTR®GlobalFiler™ Amplifikasyon Kiti	Magazin kağıdı	Tam Profil	22*	22
	Çek tipi senet kağıdı	Kısmi Profil	22*	11
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	22*	18
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	22*	20

*Y İndel ve DYS391 lokusları erkek bireylere özgü olup kadın bireylerde gözlenmediğinden değerlendirme 22 STR lokusu üzerinden yapıldı.

Tablo 4.6. AmpFISTR® Minifiler® PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak lokus bazında elde edilen DNA sonuçları

Lokus	Magazin kağıdı	Çek tipi senet kağıdı	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı
<i>D16S539</i>	+	+	+	+
<i>CSF1PO</i>	+	+	+	+
<i>D21S11</i>	+	-	-	+
<i>D18S51</i>	+	-	+	+
<i>FGA</i>	+	-	-	-
<i>D13S317</i>	+	-	+	+
<i>D7S820</i>	+	-	+	+
<i>D2S1338</i>	+	-	-	+
<i>Amelogenin</i>	+	+	+	+

+ alel gözlemlendi
- alel gözlemlenmedi.

Tablo 4.7. AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak lokus bazında elde edilen DNA sonuçları

Lokus	Magazin kağıdı	Çek tipi senet kağıdı	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı
<i>D3S1358</i>	+	+	+	+
<i>vWA</i>	+	-	+	+
<i>D16S539</i>	+	+	+	+
<i>CSF1PO</i>	+	+	+	+
<i>TPOX</i>	+	-	+	+
<i>D8S1179</i>	+	-	-	+
<i>D21S11</i>	+	-	-	+
<i>D18S51</i>	+	-	+	+
<i>D19S433</i>	+	+	+	+
<i>THO1</i>	+	-	-	+
<i>FGA</i>	+	-	-	-
<i>D5S818</i>	+	-	+	+
<i>D13S317</i>	+	-	+	+
<i>D7S820</i>	+	-	+	+
<i>D2S1338</i>	+	-	-	+
<i>Amelogenin</i>	+	+	+	+

+ alel gözlemlendi.
- alel gözlemlenmedi.

Tablo 4.8. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak lokus bazında elde edilen DNA sonuçları

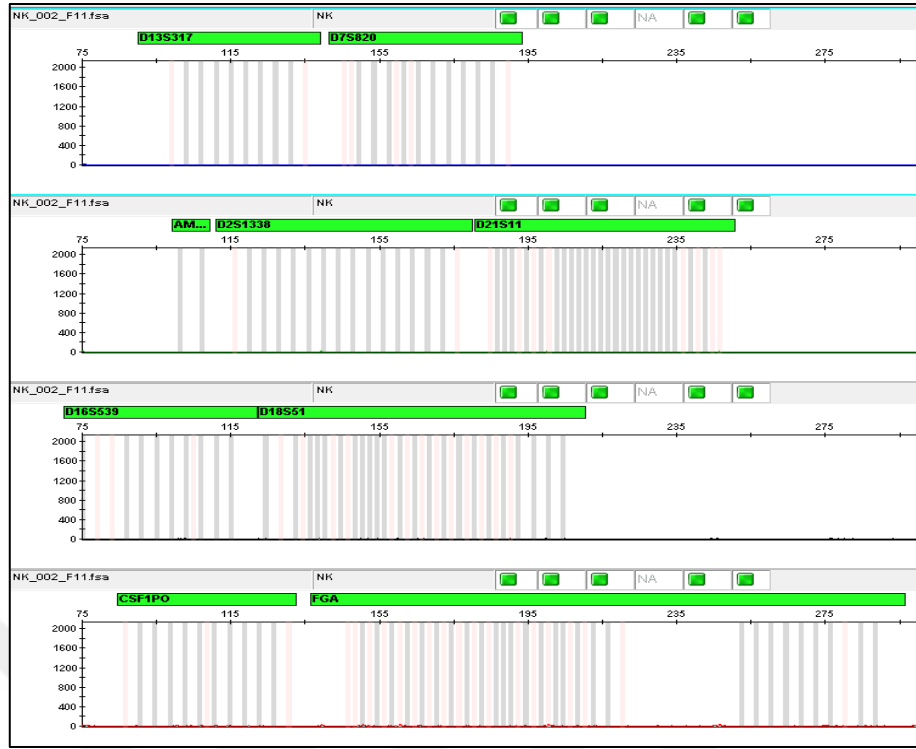
Lokus	Magazin kağıdı	Çek tipi senet kağıdı	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı
D3S1358	+	+	+	+
vWA	+	-	+	+
D16S539	+	+	+	+
CSF1PO	+	+	+	+
TPOX	+	-	+	+
D8S1179	+	-	-	+
D21S11	+	-	-	+
D18S51	+	-	+	+
DYS391	*	*	*	*
D2S441	+	+	+	+
D19S433	+	+	+	+
THO1	+	-	-	+
FGA	+	-	-	-
D22S1045	+	+	+	+
D5S816	+	-	+	+
D13S317	+	-	+	+
D7S820	+	-	+	+
SE33	+	+	+	-
D10S1248	+	+	+	+
D1S1656	+	+	+	+
D12S391	+	+	+	+
D2S1338	+	-	+	+
Amelogenin	+	+	+	+
Y İndel	*	*	*	*

* Y İndel ve *DYS391* lokusları erkek bireylere özgü olup kadın bireylerde gözlenmemektedir.

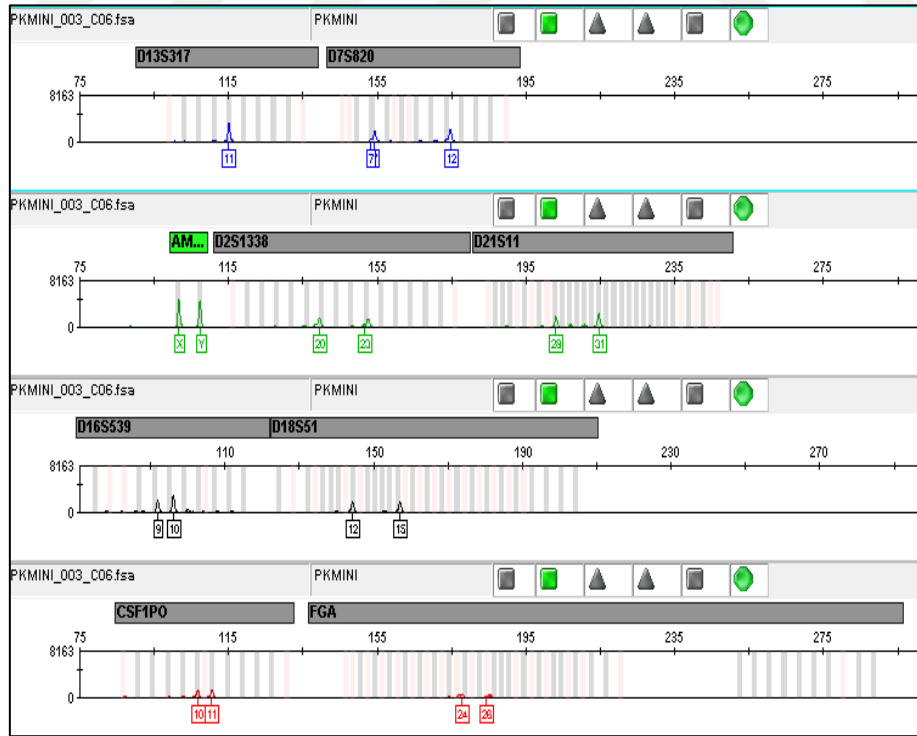
+ alel gözlemlendi.

- alel gözlemlenmedi.

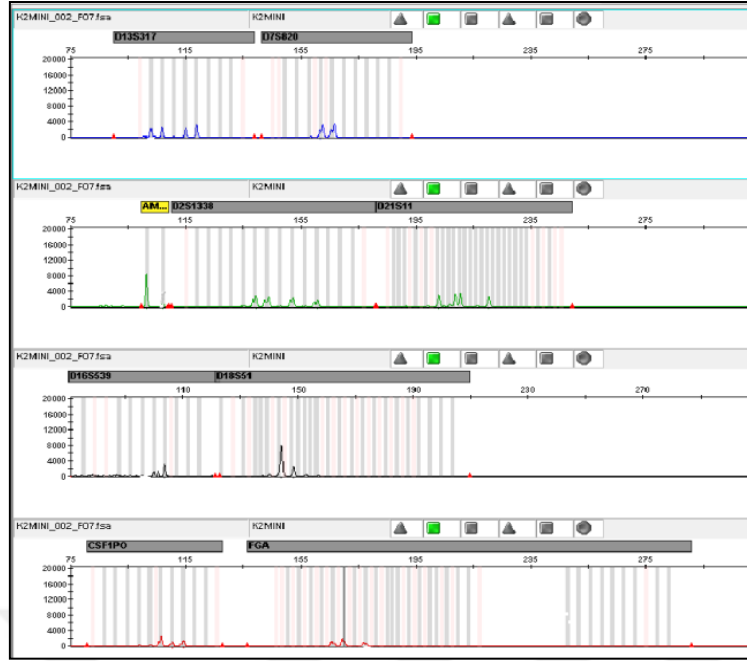
AmpFISTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kitinin kullanıldığı çalışmaya ait negatif kontrol, pozitif kontrol ve magazin kağıdından alınan sürüntü örneğine ait elektroforegram görüntüleri sırası ile Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’ de görülmektedir.



Şekil 4.5. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kitinin negatif kontrolüne ait elektroforegram

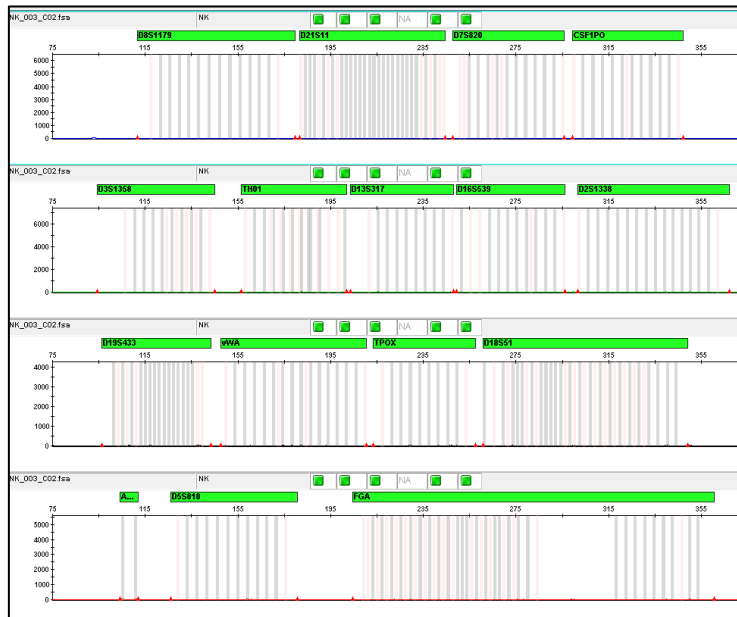


Şekil 4.6. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kitinin pozitif kontrolüne ait elektroforegram

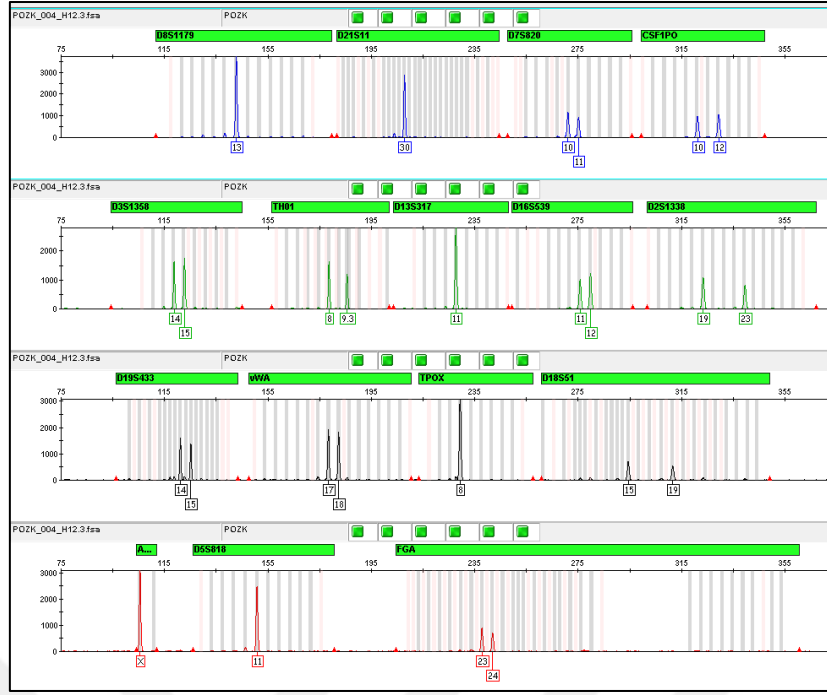


Şekil 4.7. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR amplifikasyon kiti ile magazin kağıdından alınan sürüntü örneğine ait elektroforegram

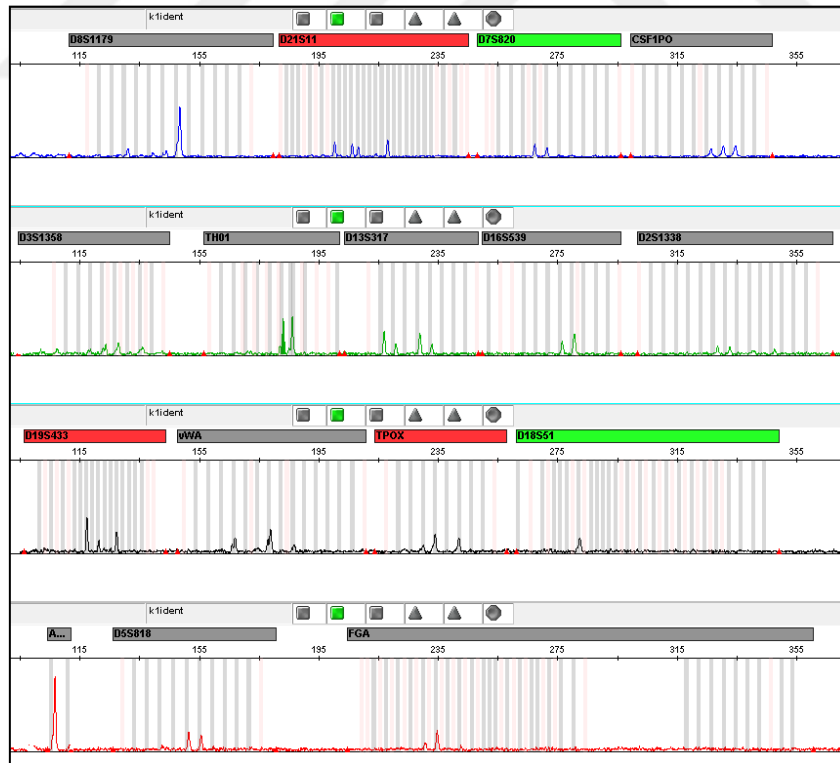
AmpFISTR® Identifiler™ PCR amplifikasyon kitinin kullanıldığı çalışmaya ait negatif kontrol, pozitif kontrol ve magazin kağıdından alınan sürüntü örneğine ait elektroforegram görüntüleri sırası ile Şekil 4.8 , Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da görülmektedir.



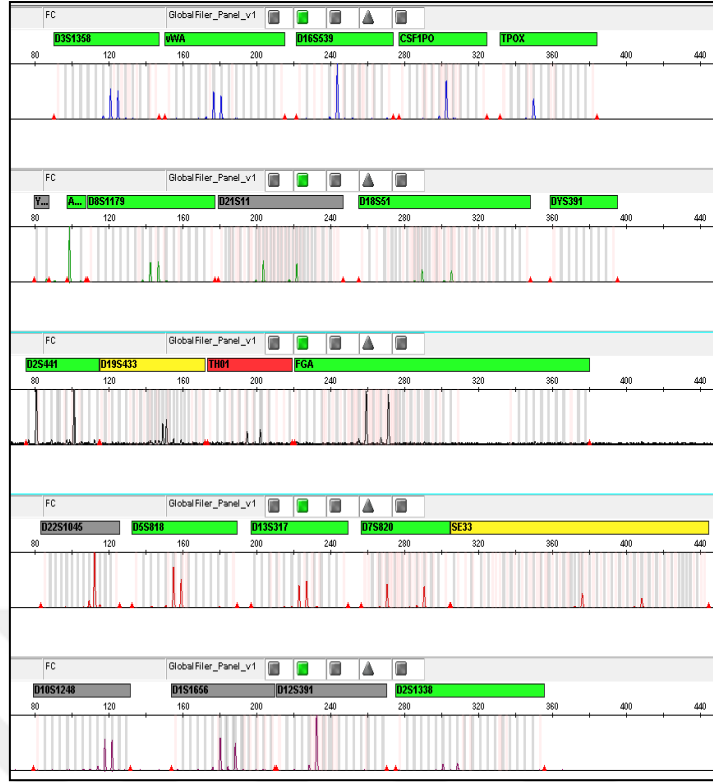
Şekil 4.8. AmpFISTR® Identifiler™ PCR amplifikasyon kitinin negatif kontrolüne ait elektroforegram



Şekil 4.9. AmpFISTR® Identifiler™ PCR amplifikasyon kitinin pozitif kontrolüne ait elektroforegram



Şekil 4.10. AmpFISTR® Identifiler™ PCR amplifikasyon kiti ile magazin kağıdından alınan sürüntü örneğine ait elektroforegram



Şekil 4.13. AmpFISTR® GlobalFiler™ PCR amplifikasyon kiti ile magazin kağıdından alınan sürüntü örneğine ait elektroforegram

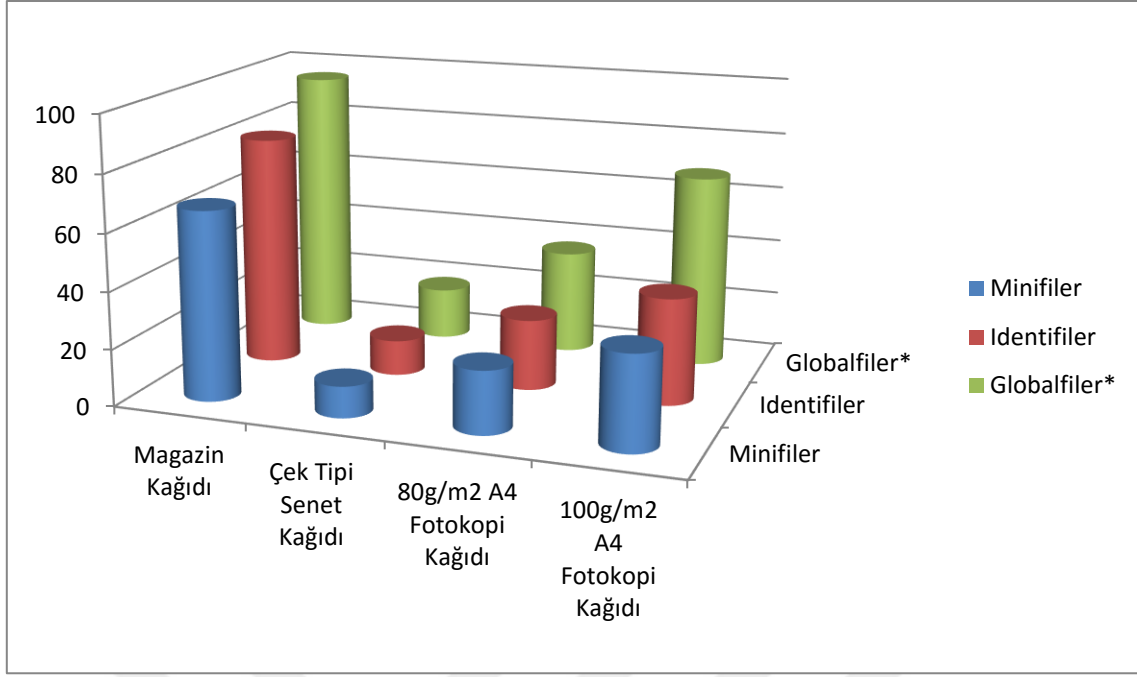
Kitlerin başarı yüzdesi her bir kit için her örnekte $[(\text{güvenilir lokus sayısı} \times 100) / (\text{kitte mevcut lokus sayısı})]$ formülü kullanılarak hesaplandı (Tablo 4.9). Lokuslarda görülen alellere ait piklerde pik dengesizlikleri olan ve 30 RFU'dan küçük olan lokuslar güven aralığı dışında bırakılarak hesaplamaya dahil edilmedi.

Aynı kağıt yüzey örneklerinden 3 farklı PCR kiti ile amplifiye edilen DNA profillerinin lokus bazında yüzdelik başarı oranları açısından kıyaslanması Şekil 4.14' te görüldüğü şekildedir. Her bir kit için tüm örneklerdeki başarı yüzdelerinin ortalaması ise şöyledir: Minifiler %33,3; Identifiler %39,5; Globalfiler; %54,6.

Tablo 4.9. Farklı kağıt yüzeylerden elde edilen DNA profillerinin güvenilirliği

	Kit Adı/Toplam Lokus Sayısı	Allel Gözlenen Lokuslar	İdentifikasyonda Kullanılabilecek Güvenilir Lokuslar
Magazin kağıdı	MiniFiler™ /9	D7S820, D13S317, D21S11, D2S1338, D18S51, D16S539, FGA, CSF1PO, Amelogenin	D7S820, D13S317, D18S51, D16S539, FGA, Amelogenin
	Identifiler™ /16	D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, Amelogenin	D8S1179, D21S11, D7S820, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, Amelogenin
	GlobalFiler™/22*	D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338, Amelogenin	D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338, Amelogenin
Çek tipi senet kağıdı	MiniFiler™ /9	D16S539, CSF1PO, Amelogenin	Amelogenin
	Identifiler™ /16	D3S1358, D16S539, CSF1PO, D19S433, Amelogenin	D3S1358, Amelogenin
	GlobalFiler™/22*	D3S1358, D16S539, CSF1PO, D2S441, D19S433, D22S1045, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, Amelogenin	D3S1358, SE33, D10S1248, Amelogenin
80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	MiniFiler™ /9	D16S539, CSF1PO, D18S51, D13S317, D7S820, Amelogenin	D16S539, Amelogenin
	Identifiler™ /16	D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D18S51, D19S433, D5S818, D13S317, D7S820, Amelogenin	CSF1PO, D16S539, D18S51, Amelogenin
	GlobalFiler™/22*	D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D18S51, D2S441, D19S433, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338, Amelogenin	D3S1358, D16S539, CSF1PO, TPOX, D18S51, D22S1045, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338, Amelogenin
100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	MiniFiler™ /9	D7S820, D13S317, D21S11, D2S1338, D18S51, D16S539, CSF1PO, Amelogenin	D13S317, D16S539, Amelogenin
	Identifiler™ /16	D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, Amelogenin	D8S1179, CSF1PO, D16S539, D18S51, D2S1338, Amelogenin
	GlobalFiler™/22*	D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338, Amelogenin	D3S1358, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, D13S317, D7S820, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338, Amelogenin

* Y İndel ve DYS391 lokusları erkek bireylere özgü olup kadın bireylerde gözlenmediğinden değerlendirme 22 STR lokusu üzerinden yapıldı.



*Y İndel ve DYS391 lokusları erkek bireylere özgü olup kadın bireylerde gözlenmediğinden değerlendirme 22 STR lokusu üzerinden yapıldı.

Şekil 4.14. Magazin kâğıdından, Çek Tipi Senet kâğıdından, 80g/m² A4 fotokopi kâğıdından ve 100g/m² A4 fotokopi kâğıdından elde edilen DNA örnekleri için kit sistemlerinin başarı oranları

4.1.3. Gerçek Örnek Bulguları

Araştırmacı dahil dört kişinin katıldığı ve md 3.1.15-I' de belirtilen şekilde hazırlanan temas izi örnekleri bekletilmeden taze olarak aynı gün içerisinde çalışılarak analiz edildi. Tablo 4.10, Tablo 4.11 ve Tablo 4.12 analiz bulguları verilmiştir.

Tablo 4.10. Farklı kişilerin oluşturduğu belgelerin kağıt yüzeylerinden alınan örneklerden elde edilen DNA Miktarları

	Kağıt Yüzey Tipi	Elde Edilen DNA Miktarı (ng/μL)
1. Kişi	Magazin kağıdı	0.67
	Çek tipi senet kağıdı	0.06
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.15
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.25
2. Kişi	Magazin kağıdı	0.98
	Çek tipi senet kağıdı	0.09
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.19
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.31
3. Kişi	Magazin kağıdı	0.63
	Çek tipi senet kağıdı	0.07
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.20
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.27
4. Kişi	Magazin kağıdı	0.81
	Çek tipi senet kağıdı	< 0.05
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.12
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	0.14

Tablo 4.11. Farklı kişilerin oluşturduğu belgelerin kağıt yüzeylerinden alınan örneklerden elde edilen DNA profillerinin mukayese edilebilirliği

	Kağıt Yüzey Tipi	Tam Veya Kısmi Profil	Beklenen Lokus Sayısı*	Gözlenen Lokus Sayısı
1. Kişi	Magazin kağıdı	Tam Profil	24	24
	Çek tipi senet kağıdı	Kısmi Profil	24	12
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	24	18
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	24	22
2. Kişi	Magazin kağıdı	Tam Profil	24	24
	Çek tipi senet kağıdı	Kısmi Profil	24	11
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	24	15
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	24	20
3. Kişi	Magazin kağıdı	Tam Profil	22	22
	Çek tipi senet kağıdı	Kısmi Profil	22	10
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	22	16
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	22	20
4. Kişi	Magazin kağıdı	Tam Profil	22	22
	Çek tipi senet kağıdı	Kısmi Profil	22	9
	80g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	22	16
	100g/m ² A4 fotokopi kağıdı	Kısmi Profil	22	21

* Y İndel ve DYS391 lokusları erkek bireylere özgü olup kadın bireylerde gözlenmediğinden erkek bireylerde beklenen lokus sayısı 24 ve kadın bireylerde beklenen lokus sayısı 22'dir.

Tablo 4.12. Farklı kişilerin oluşturduğu belgelerin kağıt yüzeylerinden alınan örneklerin AmpFlSTR® GlobalFiler® PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak amplifiye edilmesi ile lokus bazında elde edilen DNA sonuçları

Lokus	Magazin kağıdı				Çek tipi senet kağıdı				80g/m ² A4 fotokopi kağıdı,				100g/m ² A4 fotokopi kağıdı			
	1. Kişi	2. Kişi	3. Kişi	4. Kişi	1. Kişi	2. Kişi	3. Kişi	4. Kişi	1. Kişi	2. Kişi	3. Kişi	4. Kişi	1. Kişi	2. Kişi	3. Kişi	4. Kişi
D3S1358	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
vWA	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D16S539	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CSF1PO	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
TPOX	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D8S1179	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
D21S11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D18S51	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
DYS391	+	+	*	*	+	+	*	*	+	+	*	*	+	+	*	*
D2S441	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D19S433	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
TH01	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
FGA	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D22S1045	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
D5S816	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D13S317	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
D7S820	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SE33	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D10S1248	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D1S1656	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
D12S391	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
D2S1338	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Amelogenin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Y İndel	+	+	*	*	+	+	*	*	+	+	*	*	+	+	*	*

* Y İndel ve DYS391 lokusları erkek bireylere özgü olup kadın bireylerde gözlenmemektedir.

+ alel gözlenmiştir

- alel gözlenmemiştir

Genellikle çekmece içerisinde, karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiş araştırmacıya ait günlükten aynı gün içinde oluşturulmuş 1 günlük, 1 haftalık, 1 aylık, 3 aylık, 6 aylık, 1 senelik, 2 senelik, 5 senelik ve 10 senelik kağıt yüzeylerden alınan sürüntülere geliştirdiğimiz yöntem uygulandı. Elde edilen DNA miktar sonuçları Tablo 4.13’de, mukayese edilebilirliğe göre DNA profil sonuçları Tablo 4.14’te ve 1. günde alınan örneğe ait ABI 3130 cihaz çıktısı elektroforegram Şekil 4.15’ te görülmektedir.

Tablo 4.13. Tek kişiye ait günlüğün kağıt yüzeylerinden alınan sürüntülerden elde edilen DNA miktarları ve DNA profillerinin mukayese edilebilirliği

	Elde edilen DNA miktarı	Tam Veya Kısmi Profil	Beklenen Lokus Sayısı*	Gözlenen Lokus Sayısı
1 günlük	0.81	Tam Profil	22	22
1 haftalık	0.22	Kısmi Profil	22	16
1 aylık	0.10	Kısmi Profil	22	9
3 aylık	0.06	Kısmi Profil	22	7
6 aylık	< 0.05	Profil elde edilemedi	22	1*
1 senelik	< 0.05	Profil elde edilemedi	22	1*
2 senelik	< 0.05	Profil elde edilemedi	22	1*
5 senelik	< 0.05	Profil elde edilemedi	22	1*
10 senelik	< 0.05	Profil elde edilemedi	22	Lokus gözlenmedi

* Sadece cinsiyeti belirleyen amelogenin lokusu gözlemlendi

Tablo 4.14. Aynı kişiye ait günlükten elde edilen lokus bazında elde edilen DNA sonuçları

Lokus	1 günlük	1 haftalık	1 aylık	3 aylık	6 aylık	1 senelik	2 senelik	5 senelik	10 senelik
D3S1358	+	+	-	-	-	-	-	-	-
vWA	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D16S539	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CSF1PO	+	+	+	-	-	-	-	-	-
TPOX	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D8S1179	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D21S11	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D18S51	+	+	+	+	-	-	-	-	-
DYS391*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D2S441	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D19S433	+	+	-	-	-	-	-	-	-
THO1	+	+	-	-	-	-	-	-	-
FGA	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D22S1045	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D5S816	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D13S317	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D7S820	+	+	+	+	-	-	-	-	-
SE33	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D10S1248	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D1S1656	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D12S391	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D2S1338	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Amelogenin	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Y İndel*	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Y İndel ve DYS391 lokusları erkek bireylere özgü olup kadın bireylerde gözlenmemektedir.

+ alel gözlenmiştir

- alel gözlenmemiştir

Arşiv ortamında saklanan ve birden fazla kişinin imzası bulunan 1 günlük, 1 haftalık, 1 aylık, 3 aylık, 6 aylık, 1 senelik, 2 senelik, 5 senelik ve 10 senelik kağıt yüzeylerden alınan

sürüntülere geliştirdiğimiz yöntem uygulandı. Elde edilen DNA miktar sonuçları Tablo 4.15 ve mukayese edilebilirliğe göre DNA profil sonuçları Tablo 4.16’da, 1. günde alınan örneğe ait ABI 3130 cihaz çıktısı elektroforegram Şekil 4.16’da görülmektedir.

Tablo 4.15. Birden fazla kişinin imzası bulunan belgelerden alınan örneklerden elde edilen DNA miktarları ve DNA profillerinin mukayese edilebilirliği

Kağıt Yüzey Tipi	Elde edilen DNA miktarı	Tam Veya Kısmi Profil	Gözlenen Lokus Sayısı
1 günlük	1.62	Kısmi Miks Profil	22
1 haftalık	0.79	Kısmi Miks Profil	16
1 aylık	0.24	Kısmi Miks Profil	9
3 aylık	0.11	Kısmi Miks Profil	7
6 aylık	< 0.05	Profil elde edilemedi	1*
1 senelik	< 0.05	Profil elde edilemedi	1*
2 senelik	< 0.05	Profil elde edilemedi	1*
5 senelik	< 0.05	Profil elde edilemedi	1*
10 senelik	< 0.05	Profil elde edilemedi	Lokus gözlenmedi

* Sadece cinsiyeti belirleyen amelogenin lokusu gözlendi.

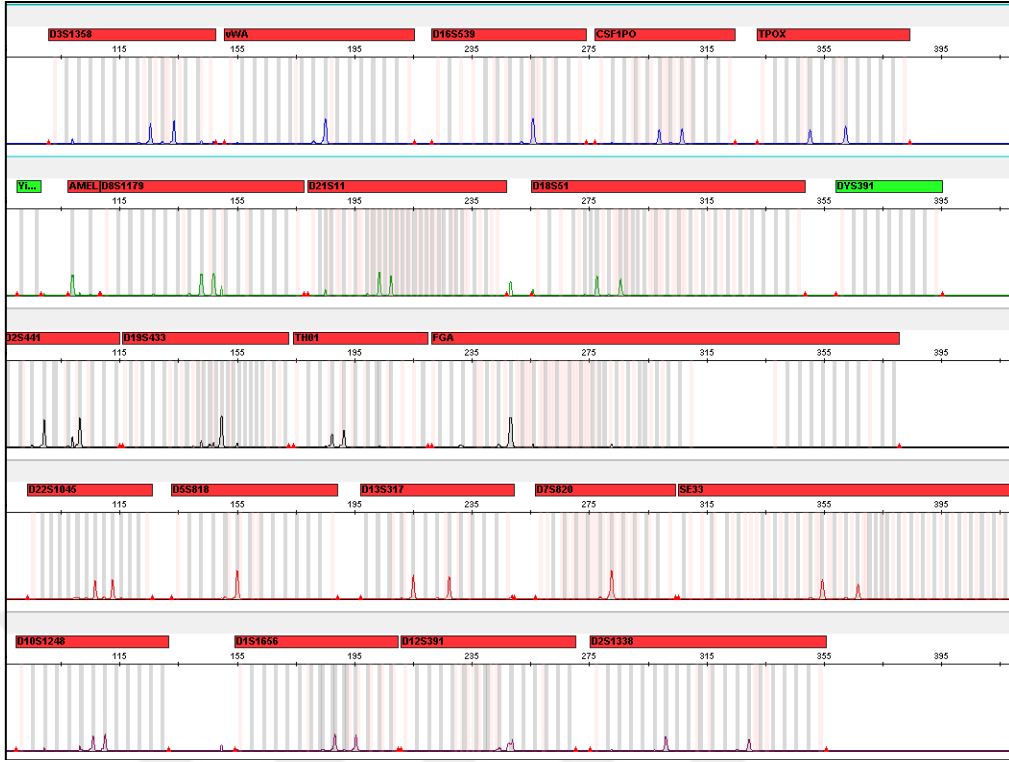
Tablo 4.16. Birden fazla kişinin imzası bulunan belgelerden lokus bazında elde edilen DNA sonuçları

Lokus	1 günlük	1 haftalık	1 aylık	3 aylık	6 aylık	1 senelik	2 senelik	5 senelik	10 senelik
D3S1358	+	+	-	-	-	-	-	-	-
vWA	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D16S539	+	+	+	+	-	-	-	-	-
CSF1PO	+	+	+	-	-	-	-	-	-
TPOX	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D8S1179	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D21S11	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D18S51	+	+	+	+	-	-	-	-	-
DYS391	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D2S441	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D19S433	+	+	-	-	-	-	-	-	-
THO1	+	+	-	-	-	-	-	-	-
FGA	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D22S1045	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D5S816	+	+	-	-	-	-	-	-	-
D13S317	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D7S820	+	+	+	+	-	-	-	-	-
SE33	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D10S1248	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D1S1656	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D12S391	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D2S1338	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Amelogenin	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Y İndel	-	-	-	-	-	-	-	-	-

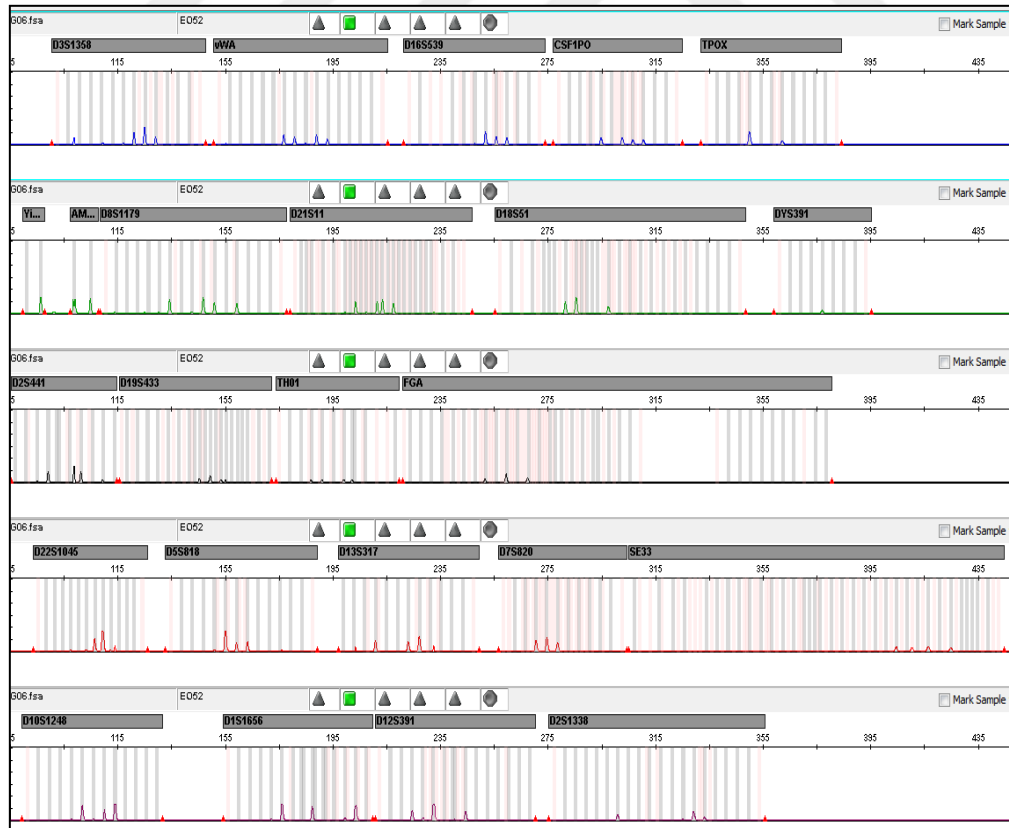
* Y İndel ve DYS391 lokusları erkek bireylere özgü olup kadın bireylerde gözlenmemektedir.

+ alel gözlenmiştir

- alel gözlenmemiştir



Şekil 4.15. Günlükten 1. günde alınan örneğe ait elektroforegram



Şekil 4.16. Birden fazla kişinin imzası bulunan 1 günlük belgeden alınan örneğe ait elektroforegram

4.2. Mikrobiyolojik Çalışma Bulguları

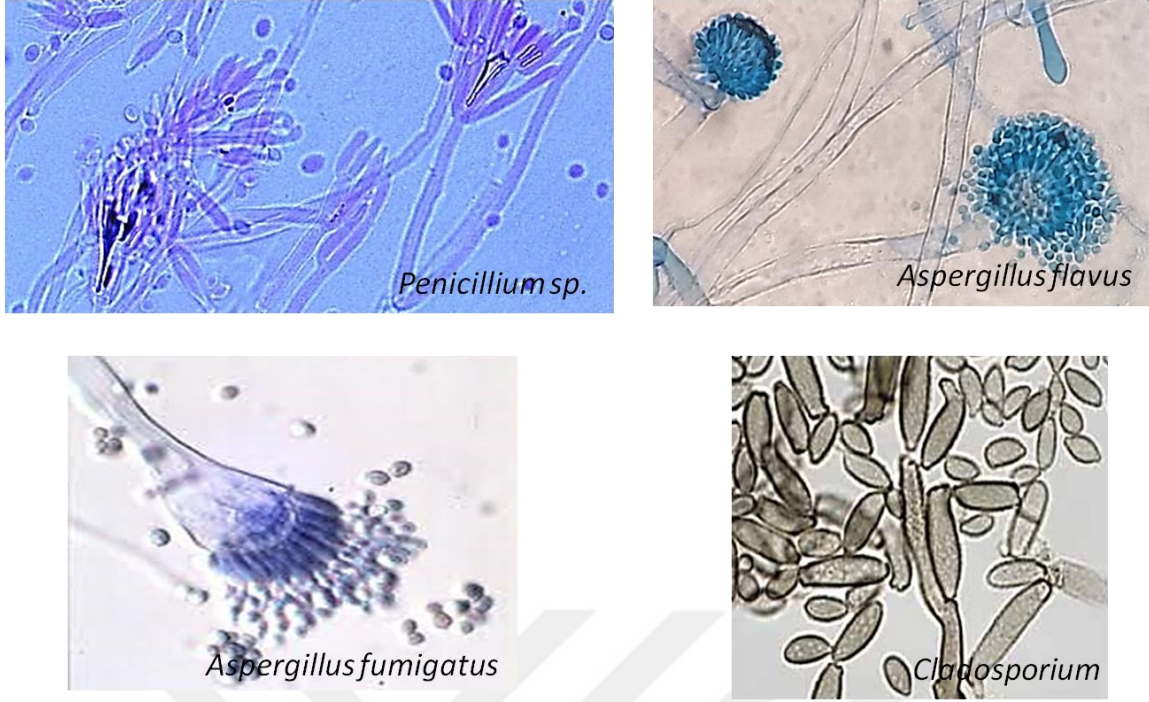
Çalışmanın deneysel aşaması İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp Enstitüsü bünyesinde bulunan Adli Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Araştırmanın bu aşamasında herhangi bir belgenin saklama koşullarında ortamda bulunabilecek olan mikroorganizmaların, tükenmez kalem mürekkebinin bileşiğindeki boyar maddelerin zamanla değişimine etkisini incelemek için, arşiv ortamında ve belge üzerinde olabilecek küf, mantar ve bakteri türlerini belirlemeye yönelik mikroorganizmalar açısından kültür araştırması yapıldı. Tespit edilen ve standart suşları Çapa Temel Tıp Bilimleri Mikrobiyoloji Tüberküloz Laboratuvarı'ndan temin edilen *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium lentiflavum* mikrobiyolojik etkenleri ile kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş ve kurutularak oda ısısında 6. aya kadar bekletilmiş örnekler aşama aşama incelendi. Çalışmamızın mikrobiyoloji laboratuvarı uygulamalarına 2016 yılı Mayıs ayında başlanmış, deneyler 2017 yılı Nisan ayında tamamlanmıştır.

4.2.1. Üreyen Kolonilerin İdentifikasyonu

Küf ve mantarların belirlenmesi amacı ile inkübasyon süresi sonunda malt besiyerinde üreyen kolonilerin mikroskobik ve makroskobik özellikleri incelendi. Makroskobik olarak petrilerdeki kolonilerin büyüklüğüne (koloni çapına), şekline, üstten ve alttan rengine, çeper özelliğine ve pigmentasyon olup olmadığına bakıldı (Şekil 4.17). Mikroskobik olarak preparatlara tatbik edilen kolonilerin ışık mikroskobunda 10X ve 40X objektifle koloni yapısı ve konidial başçıkların tipi incelendi (Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Küf ve mantar üreme olan bazı besiyerlerindeki kolonilerin makroskobik görüntüsü

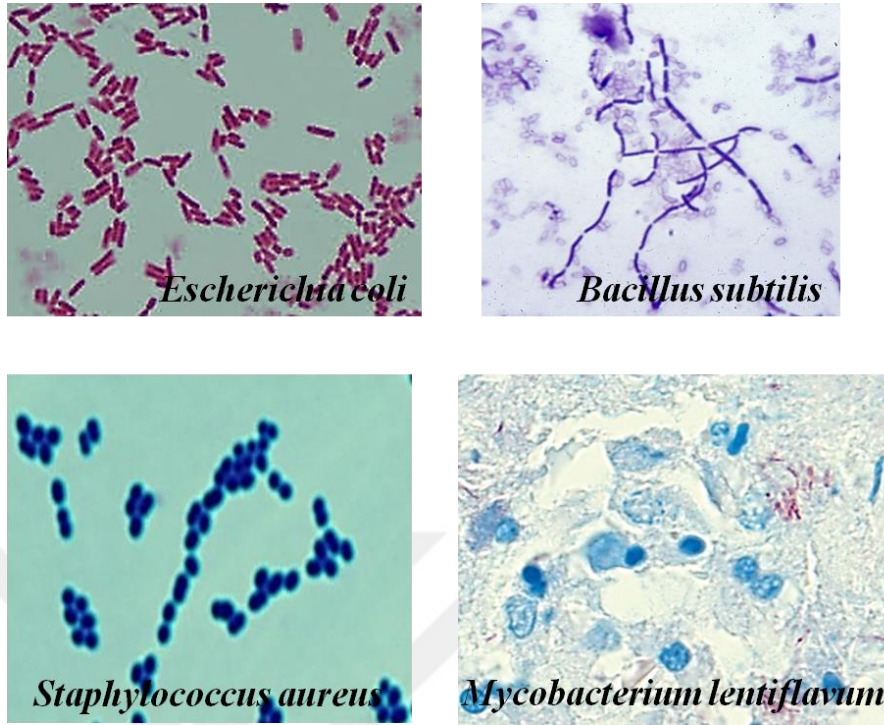


Şekil 4.18. Besi yerlerinde üreyen bazı küf ve mantarların mikroskopik görüntüsü

Bakteri türlerinin belirlenmesi amacıyla inkübasyon süresi sonunda kanlı ve jelöz besiyerinde üreyen mikroorganizma kolonilerinin makroskopik (Şekil 4.19) yapıları gözle ve gram boyamanın yapıldığı mikroorganizmaların morfolojileri 100X büyütmede immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskobu altında incelendi (Şekil 4.20)



Şekil 4.19. Bakteriye üreme olan besiyerlerindeki kolonilerin makroskopik görüntüsü



Şekil 4.20. Besi yerlerinde üreyen bakterilerin mikroskopik görüntüsü

Mikroorganizmaların piyasadan rastgele seçilmiş mürekkepler üzerindeki mikrobiyal etkisinin incelenmesi amacı ile yapılan öncü çalışmada, çeşitli besiyerlerinde üreyen ve izole edilen en yaygın funguslar *Penicillium sp.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium sp.*; en yaygın bakteri türleri ise *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium lentiflavum* türleri (Tablo 4.17) olduğu sonucuna varıldı ve çalışmaya standart suşları temin edilen bu mikroorganizmalarla devam edildi.

4.2.2. Tükenmez Kalem Mürekkeplerinde Mikrobiyal Üremenin Etkisinin İncelenmesi

Modelleme yönteminin kullanıldığı bu basamakta 1) çizilen çizgi üstte ve 2) altta kalacak şekilde, 3) 2 µL direk mürekkebin kendisi ve 4) negatif kontrol amaçlı 5 mm çaplı boş kağıt parçası ayrı ayrı 3 farklı tip besiyerine ekildi. İnkübasyon sonrası ekim yapılan petriler üreme olup olmasına göre kayıt altına alındı (Tablo 4.18).

Tablo 4.17. İzole edilen küf mantarlarının ve non toksik bakterilerin farklı ortamlara göre dağılımları

Örneğin Alındığı Yer	Küf- Mantar	Bakteri
Arşiv Ortamı	<i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Tricoderma sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Acremonium sp.</i> <i>Ulaclodium sp.</i>	<i>Bacillus sp</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Arşiv Çekmecesı	<i>Penicillium sp.</i> <i>Chrysonilia sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Epicoccum sp.</i> <i>Moniliella sp.</i>	<i>Bacillus sp</i> <i>E. coli</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Rafta Bekleyen Rastgele Seçilmiş Siyah Tükenmez Kalemle Yazılmış Belge	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Neocartorya sp.</i> <i>Verticillium sp.</i> <i>Alternaria sp.</i>	<i>Bacillus sp</i> <i>E. coli</i> <i>Staphylococcus sp.</i>
Rafta Bekleyen Rastgele Seçilmiş Mavi Tükenmez Kalemle Yazılmış Belge	<i>Penicillium sp.</i> <i>Verticillium sp.</i> <i>Alternaria sp.</i> <i>Aspergillus sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i>	<i>Bacillus sp</i> <i>E. coli</i> <i>Staphylococcus sp.</i>

Tablo 4.18. Farklı şekillerde ekilen örneklerin farklı besi yerlerinde üreme olup olmaması

Mürekkep Çeşidi	Besi Yeri Türü	Mürekkep Besi Yerine Ekilen Kağıdın Üst Tarafında	Mürekkep Besi Yerine Ekilen Kağıdın Alt Tarafında	Mürekkebin Kendisinin Ekimi
M1	Jelöz Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
	Malt Besi Yeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
	Kanlı Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
M2	Jelöz Besiyeri	Üreme Var	Üreme Var	Üreme Var
	Malt Besi Yeri	Üreme Var	Üreme Var	Üreme Var
	Kanlı Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
M3	Jelöz Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Var
	Malt Besi Yeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
	Kanlı Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
M4	Jelöz Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
	Malt Besi Yeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
	Kanlı Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
S1	Jelöz Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
	Malt Besi Yeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
	Kanlı Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
S2	Jelöz Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Var
	Malt Besi Yeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
	Kanlı Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
S3	Jelöz Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
	Malt Besi Yeri	Üreme Var	Üreme Yok	Üreme Yok
	Kanlı Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
S4	Jelöz Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Var
	Malt Besi Yeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok
	Kanlı Besiyeri	Üreme Yok	Üreme Yok	Üreme Yok

S1; Pensan MV-Pen Vision (Siyah), S2; Faber Castell Speedx10 (Siyah), S3; Art Ballpoint Pen (Siyah), S4; Schneider slider Edge XB (Siyah), M1; Faber Castell FDx10 (Mavi), M2; Schneider Slider Edge XB (Mavi), M3; Pensan MV-Pen Vision (Mavi), M4; Art Ballpoint Pen (Mavi)

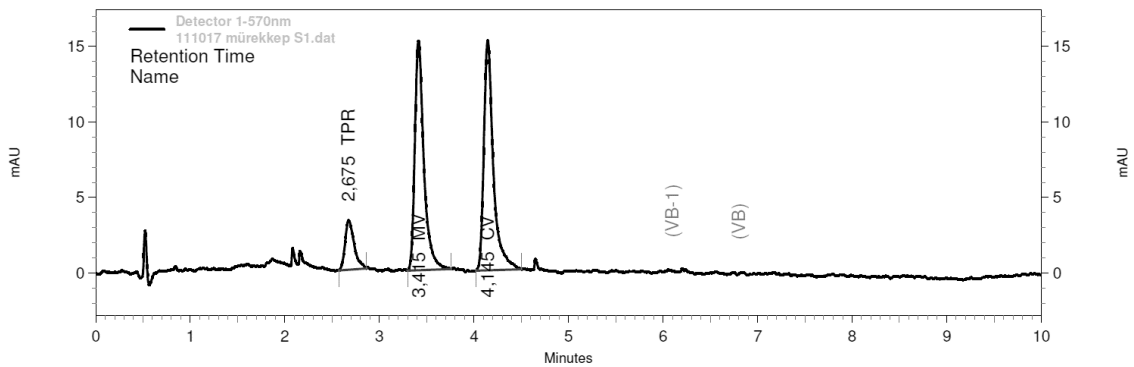
İnkübasyon sonrası negatif kontrol amaçlı ekim yapılmış fakat disk koyulmamış besiyerlerinde ve mürekkep ile muamele edilmeyen kör disklerin ekildiği besiyerlerinde mikrobiyal etkenlerin üremediği görülmektedir. Çalışılan mikroorganizmaların canlılığının

devamlılığının kontrolü için pozitif kontrol amaçlı saf olarak pasajlanan her bir mikroorganizmanın ekildiği besiyerlerinde beklenen şekilde üremenin gerçekleştiği gözlemlendi. Üreme olup olmasına göre incelenen 72 örnek sonrasında kanlı besiyeri agarında üreme olmaması ve jelöz besiyeri agarında çalışmamızın amacına hizmet eden mikroorganizmaların üreyebilmesi sebebi ile çalışmanın devamında kanlı besiyeri agarı kullanılmadı.

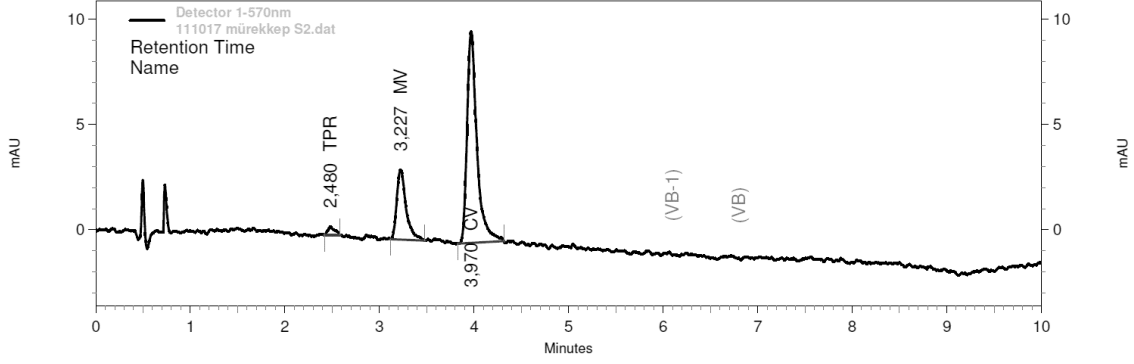
4.2.3. Mikroorganizma Suşları İle Kontamine Edilmiş Besiyerlerine Ekilen İnkbiyogramlarda Gözlenen Mikrobiyal Üreme

İnkbiyogramların ekim işlemi ve uygun koşullarda inkübasyonu sonrası disklerin etrafında inhibasyon oluşumlarının varlığı gözlemlendi ve oluşan inhibasyon zonlarının çapları ölçülerek karşılaştırıldı (Tablo 4.19).

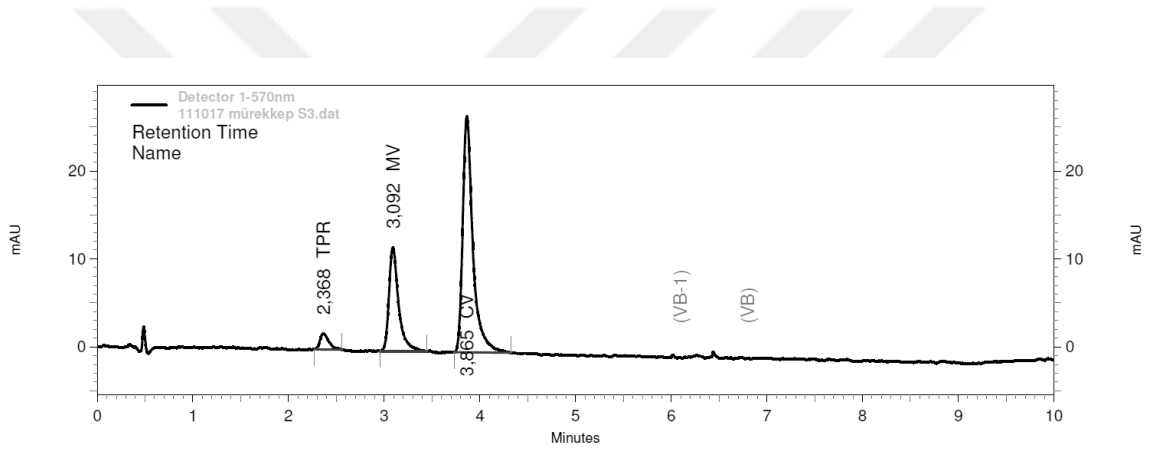
0. ayda farklı tükenmez kalem mürekkep disklerin etrafında oluşan inhibasyon zonlarının çaplarında farklılık gözlenmesi mürekkep içerisindeki boyar maddelerin ve koruyucuların, her mürekkep çeşidinde miktarının ve toplam hacim içerisindeki yüzdesinin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Bu bilgidan yola çıkarak Çevre Gıda Analiz Laboratuvarı'nda bulunan HPLC cihazında kurum içi geliştirilen metotla yapılan mürekkep yapı tayini sonuçları Şekil 4.21-Şekil 4.28 arasında gösterilen kromatogramlarda görülmektedir.



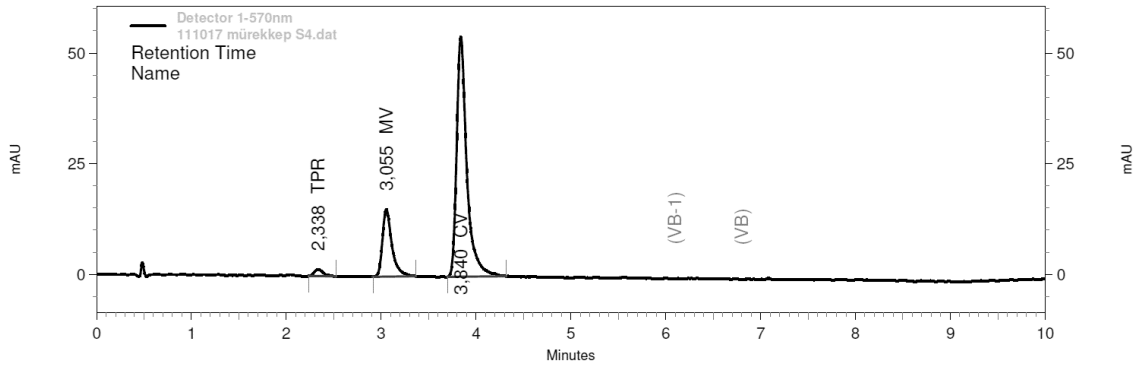
Şekil 4.21. Çalışmada kullanılan Pensan MV-Pen Vision (S1-Siyah) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini



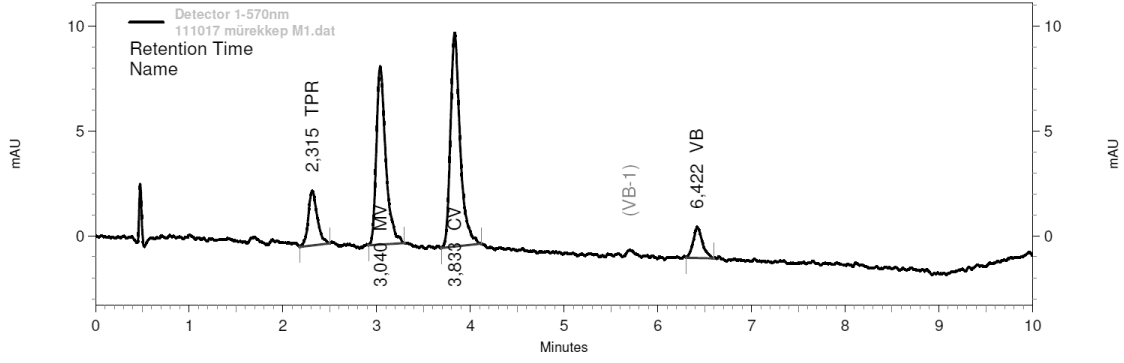
Şekil 4.22. Çalışmada kullanılan Faber Castell Speedx10(S2-Siyah) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini



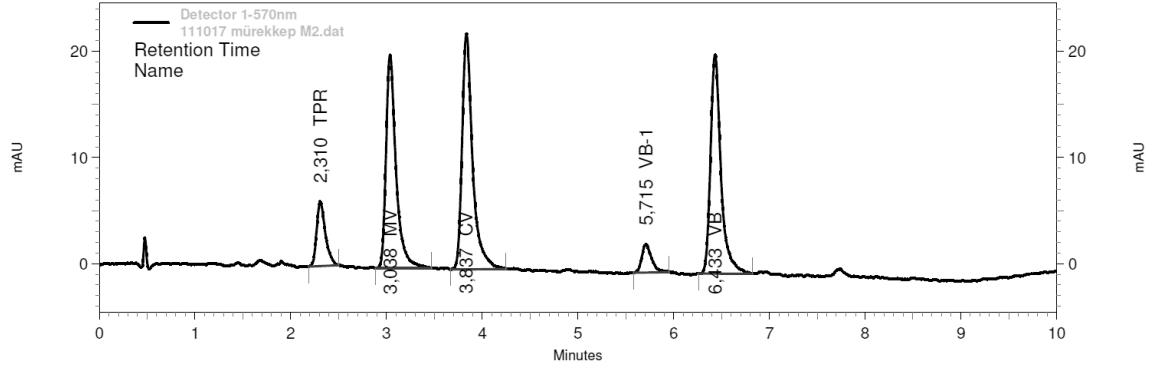
Şekil 4.23. Çalışmada kullanılan Art Ballpoint Pen (S3-Siyah) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini



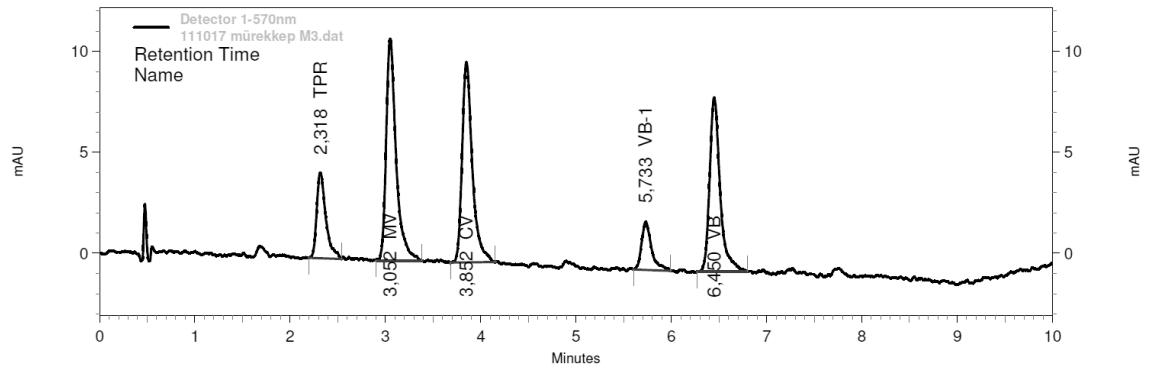
Şekil 4.24. Çalışmada kullanılan Schneider Slider Edge XB (S4-Siyah) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini



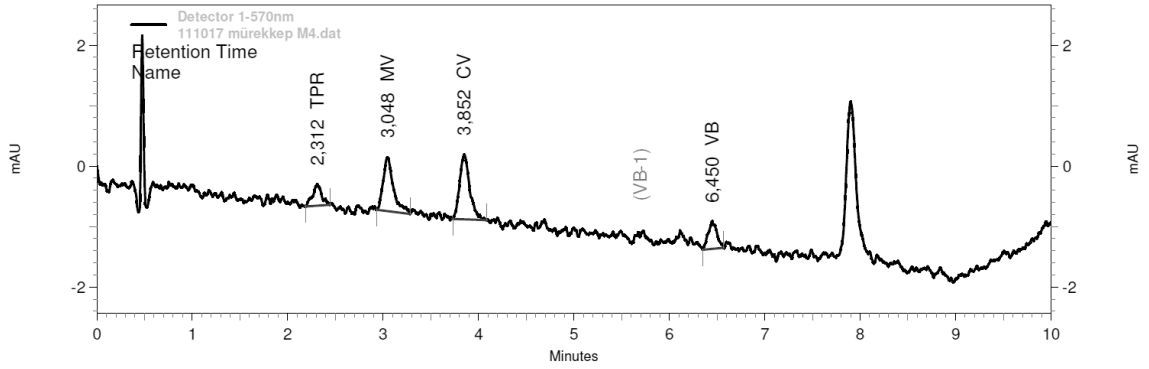
Şekil 4.25. Çalışmada kullanılan Faber Castell FDx10 (M1-Mavi) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini



Şekil 4.26. Çalışmada kullanılan Schneider Slider Edge XB (M2-Mavi) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini



Şekil 4.27. Çalışmada kullanılan Pensan MV-Pen Vision (M3-Mavi) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini



Şekil 4.28. Çalışmada kullanılan Art Ballpoint Pen (M4-Mavi) tükenmez kalem mürekkebinin kromatografik yapı tayini

0. ayda farklı tükenmez kalem mürekkep disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çaplarında farklılık gözlenmesi mürekkep içerisindeki boyar maddelerin her mürekkep çeşidinde miktarının farklı olmasından kaynaklanabileceği bilgisinden yola çıkarak Çevre Gıda Analiz Laboratuvarı'nda bulunan HPLC cihazında kurum içi geliştirilen metotla yapılan yapı tayini sonuçları Tablo 4.19'da görülmektedir. İnkübasyon sonunda disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çaplarındaki değişimler, zonlarda genişleme veya daralma olması, bir inhibisyon alanının gözlenmesi mürekkep içerisindeki boyar maddelerden olan MV'nin her mürekkep çeşidinde miktarının farklı olmasından kaynaklandığı sonucuna varıldı.

0.5 McFarland konsantrasyonunda hazırlanan *S. aureus* ve *A. fumigatus* mikrobiyal etkenlerinin ayrı ayrı pasajlandığı besi yerlerinde farklı hacimlerde mürekkep içeren kağıt diskler ile yapılan inkbiyogramlar sonunda oluşan inhibisyon zonları büyüklükleri ölçülerek aynı konsantrasyondaki mikrobiyal etkene karşılık farklı miktarda mürekkeplerin verdiği tepkilerin aynı olduğu tespit edildi (Tablo 4.20).

Tablo 4.19. Çalışmada kullanılan tükenmez kalem mürekkebi boyar maddelerinin toplam miktar içindeki yüzdelik miktarı

Mürekkep Türü	Boyar Madde	Alan	Yükseklik	% Alan
M1	TPR	17319	2596	10,85
	MV	58999	8493	36,95
	CV	73275	10176	45,89
	VB	10094	1473	6,32
M2	TPR	38420	6077	7,25
	MV	146158	20082	27,58
	CV	170016	22171	32,08
	VB	156142	20622	29,47
M3	TPR	28374	4239	10,68
	MV	79482	10994	29,91
	CV	74103	9900	27,89
	VB	66323	8632	24,96
M4	TPR	2338	356	11,82
	MV	6686	896	33,81
	CV	7884	1073	39,87
	VB	2867	456	14,50
S1	TPR	21714	3257	9,52
	MV	100902	15161	44,23
	CV	105517	15222	46,25
	VB	-	-	-
S2	TPR	2066	400	2,11
	MV	22755	3315	23,28
	CV	72903	10048	74,60
	VB	-	-	-
S3	TPR	11644	1790	3,97
	MV	82879	11819	28,27
	CV	198615	26819	67,75
	VB	-	-	-
S4	TPR	9859	1527	1,90
	MV	105866	15248	20,36
	CV	404175	54186	77,74
	VB	-	-	-

S1;Pensan MV-Pen Vision (Siyah), S2; Faber Castell Speedx10 (Siyah), S3; Art Ballpoint Pen (Siyah), S4; Schneider slider Edge XB (Siyah), M1; Faber Castell FDx10 (Mavi), M2; Schneider Slider Edge XB (Mavi), M3; Pensan MV-Pen Vision (Mavi), M4; Art Ballpoint Pen (Mavi)

Tablo 4.20. Aynı mürekkeplerin farklı hacimde mürekkep içeren kağıt diskleri ile yapılan inkbiyogram sonuçları

Örnek	İnhibisyon Zonu Çapı (cm)	Örnek	İnhibisyon Zonu Çapı (cm)	Örnek	İnhibisyon Zonu Çapı (cm)	Örnek	İnhibisyon Zonu Çapı (cm)	Örnek	İnhibisyon Zonu Çapı (cm)
S. aureus için;									
S1a	1,60	S1b	1,55	S1c	1,60	S1d	1,50	S1e	1,55
S2a	2,40	S2b	2,50	S2c	2,50	S2d	2,45	S2e	2,40
S3a	1,70	S3b	1,75	S3c	1,75	S3d	1,70	S3e	1,65
S4a	2,20	S4b	2,15	S4c	2,15	S4d	2,25	S4e	2,25
M1a	2,40	M1b	2,35	M1c	2,40	M1d	2,35	M1e	2,45
M2a	2,50	M2b	2,40	M2c	2,45	M2d	2,50	M2e	2,45
M3a	2,60	M3b	2,55	M3c	2,60	M3d	2,60	M3e	2,55
M4a	1,55	M4b	1,50	M4c	1,50	M4d	1,55	M4e	1,55
A. fumigatus için;									
S1a	2,25	S1b	2,30	S1c	2,30	S1d	2,35	S1e	2,25
S2a	2,55	S2b	2,45	S2c	2,50	S2d	2,55	S2e	2,45
S3a	1,75	S3b	1,85	S3c	1,80	S3d	1,85	S3e	1,80
S4a	1,95	S4b	1,90	S4c	1,90	S4d	1,85	S4e	1,90
M1a	3,10	M1b	3,05	M1c	3,00	M1d	2,95	M1e	2,90
M2a	2,75	M2b	2,85	M2c	2,80	M2d	2,80	M2e	2,85
M3a	2,65	M3b	2,55	M3c	2,60	M3d	2,60	M3e	2,65
M4a	2,50	M4b	2,45	M4c	2,40	M4d	2,45	M4e	2,45

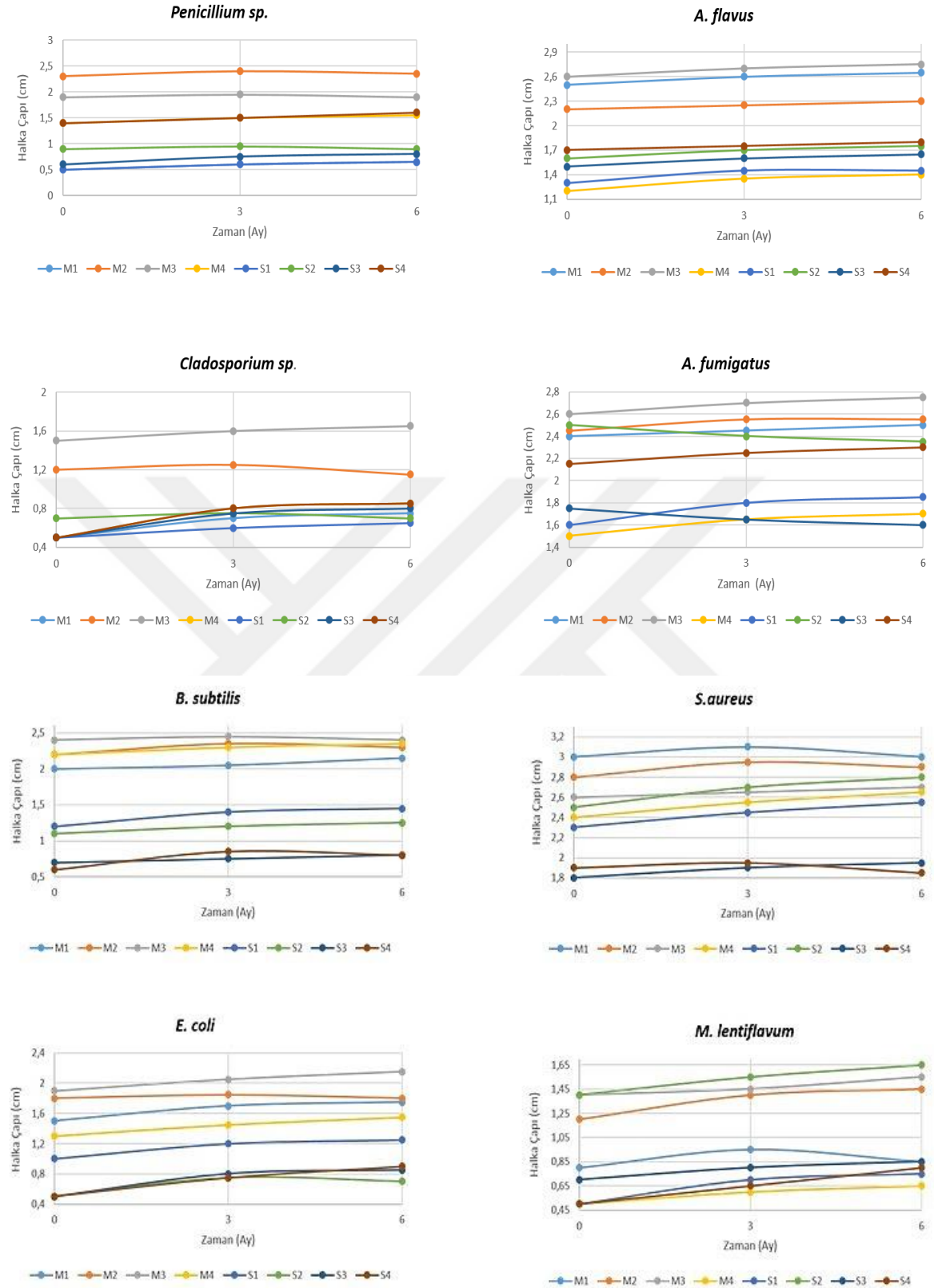
S1;Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm (Siyah), S2; Faber Castell Speedx10 1.0 mm (Siyah), S3; Art Ballpoint Pen 1.0 mm (Siyah), S4; Schneider slider Edge XB (Siyah), M1; Faber Castell FDx10 1.0 mm (Mavi), M2; Schneider Slider Edge XB (Mavi), M3; Pensan MV-Pen Vision (Mavi), M4; Art Ballpoint Pen 1.0 mm (Mavi),mürekkep hacimleri (a):1,0 µl; (b):1,5 µl; (c):2,0 µl; (d): 2,5 µl; e:3,0 µl

6 aya kadar güneş ışığına direk olarak maruz kalmaksızın rastgele bekletilen mürekkep-kağıt disk örneklerinin 0. ayda, 3. ayda ve 6. ayda 0.5 McFarland konsantrasyonunda hazırlanan mikroorganizma süspansiyonlarının pasajlandığı uygun besiyerlerine ekilen ve uygun şartlarda inkübe edilen disklerin etrafında gözlenen inhibasyon zonlarının çapları Tablo 4.21’de ve zamana karşı karşılaştırma grafikleri Şekil 4.29’da görülmektedir.

Tablo 4.21. İnkbiyogramların Zon Çaplarının Zamana Bağlı Değişimi

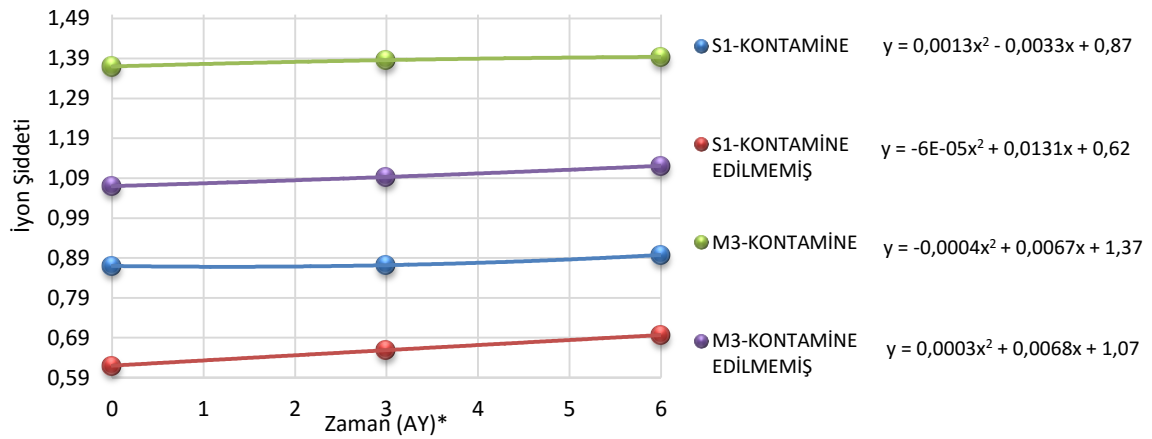
	MİKROBİYAL ETKEN	M1 (cm)	M2 (cm)	M3 (cm)	M4 (cm)	S1 (cm)	S2 (cm)	S3 (cm)	S4 (cm)
0. AY	<i>Penicillium sp.</i>	<0,60	2,30	1,90	1,40	<0,60	0,90	0,60	1,40
	<i>A. flavus</i>	2,50	2,20	2,60	1,20	1,30	1,60	1,50	1,70
	<i>A.fumigatus</i>	2,40	2,45	2,60	1,50	1,60	2,50	1,75	2,15
	<i>Cladosporium sp.</i>	<0,60	1,20	1,50	<0,60	<0,60	0,70	<0,60	<0,60
	<i>B. subtilis</i>	2,00	2,20	2,40	2,20	1,20	1,10	0,70	0,60
	<i>E.coli</i>	1,50	1,80	1,90	1,30	1,00	<0,60	<0,60	<0,60
	<i>S.aureus</i>	3,00	2,80	2,60	2,40	2,30	2,50	1,80	1,90
	<i>M. lentiflavum</i>	0,80	1,20	1,40	<0,60	<0,60	1,40	0,70	<0,60
3. AY	<i>Penicillium sp.</i>	0,60	2,40	1,95	1,50	0,60	0,95	0,75	1,50
	<i>A. flavus</i>	2,60	2,25	2,70	1,35	1,45	1,70	1,60	1,75
	<i>A.fumigatus</i>	2,45	2,55	2,70	1,65	1,80	2,40	1,65	2,25
	<i>Cladosporium sp.</i>	0,70	1,25	1,60	0,80	0,60	0,75	0,75	0,80
	<i>B. subtilis</i>	2,05	2,35	2,45	2,30	1,40	1,20	0,75	0,85
	<i>E.coli</i>	1,70	1,85	2,05	1,45	1,20	0,75	0,80	0,75
	<i>S.aureus</i>	3,10	2,95	2,65	2,55	2,45	2,70	1,90	1,95
	<i>M. lentiflavum</i>	0,95	1,40	1,45	0,60	0,70	1,55	0,80	0,65
6. AY	<i>Penicillium sp.</i>	0,65	2,35	1,90	1,55	0,65	0,90	0,80	1,60
	<i>A. flavus</i>	2,65	2,30	2,75	1,40	1,45	1,75	1,65	1,80
	<i>A.fumigatus</i>	2,50	2,55	2,75	1,70	1,85	2,35	1,60	2,30
	<i>Cladosporium sp.</i>	0,75	1,15	1,65	0,85	0,65	0,70	0,80	0,85
	<i>B. subtilis</i>	2,15	2,30	2,40	2,35	1,45	1,25	0,80	0,80
	<i>E.coli</i>	1,75	1,80	2,15	1,55	1,25	0,70	0,85	0,90
	<i>S.aureus</i>	3,00	2,90	2,70	2,65	2,55	2,80	1,95	1,85
	<i>M. lentiflavum</i>	0,85	1,45	1,55	0,65	0,75	1,65	0,85	0,80

S1;Pensan MV-Pen Vision (Siyah), S2; Faber Castell Speedx10 (Siyah), S3; Art Ballpoint Pen (Siyah), S4; Schneider slider Edge XB (Siyah), M1; Faber Castell FDx10 (Mavi), M2; Schneider Slider Edge XB (Mavi), M3; Pensan MV-Pen Vision (Mavi), M4; Art Ballpoint Pen (Mavi)



Şekil 4.29. İnhibisyon zonlarının farklı mikrobiyal etkene karşı zamana bağlı halka değişim eğrisi

Kontamine edilmiş kağıt-mürekkep disklerinin içerisindeki mürekkep boyar maddelerinin zamanla moleküler dönüşümüne mikrobiyal etkiyi incelemek amacıyla aynı şartlarda bekletilen kontamine edilmiş ve kontamine edilmemiş kağıt-mürekkep disklerinin 0., 3. ve 6. aydaki zamana karşı solma eğrileri çizildi. Eğri çiziminde; herbir mürekkebin zamanla kağıt üzerinde solmasına ilişkin oluşan ve zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen fotodegradasyon ürünü küçük pikler ile metil viyole (MV) iyon şiddeti toplamının kristal viyole (CV) iyon şiddetine oranı temel alındı (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Kontamine edilmiş kağıt-mürekkep disklerinin içerisindeki mürekkep boyar maddelerinin moleküler dönüşümüne zamanın etkisi

4.3. Mürekkep Boyar Maddelerinin Moleküler Değişimlerinin İncelenmesi

Çalışmanın mürekkep boyar maddelerinin moleküler değişimlerinin incelendiği aşamasının deneysel basamakları Acıbadem Sağlık Grubu bünyesindeki Acıbadem Üniversitesi Labmed Tıbbi Laboratuvarındaki cihaz ve gereçler kullanılarak Eylül 2017 ve Haziran 2018 ayları arasında yürütüldü. Çalışmanın bu aşamasında öncelikle MALDI-TOF-MS cihazında herhangi bir ön ekstraksiyon işlemi yapmaksızın 1.2 mm çaplı kağıt örneğinden doğrudan mürekkep yapı analizine ilişkin yöntem geliştirildi ve optimize edildi. Yöntem optimizasyonu sonrasında pararosanilin (PR), metil viyole (MV), kristal viyole (CV) ve viktorya mavisi (VB) mürekkep boyar maddelerinden hazırlanan standard çözeltiler ile piyasadan rastgale seçilmiş 5'er adet mavi ve siyah tükenmez kalem mürekkepleri iki farklı kalitedeki kağıt tipine tatbik edildi. Bası farkını ortadan kaldırmak için çizgiler aynı kişi tarafından aynı zemin üzerinde A4 fotokopi kağıdına (80 g/m² ve 100

g/m²) 3 cm mesafe aralıklarıyla çizildi. Yapay soldurma tekniği uygulanan örneklerde zamanla kağıt üzerindeki mürekkep boyar maddelerinin solma oranları MALDI-TOF-MS ile analizlendi ve zamana karşı solma eğrisi çizildi. Bu solma eğrisinin gerçeğe uygunluğunun irdelenmesi için iki farklı arşivden gerçek örnekler alınarak geliştirilen yöntemle analizlendi. Herhangi bir ön işleme tabi tutmaksızın direk kağıdın yüzeyinden analizlenen mürekkep örnekleri ve mürekkep boyar maddelerinin analizi sırasında lazerin tek bir noktaya sabit olarak vurulması ile örneğin iyonlaşması sağlandı (EK 2). Yapay soldurma sonrası analiz edilinceye kadar numunelerin ve iki farklı arşivden alınan gerçek örneklerin saklandığı karanlık ortamın nemi %50 (± 10) ve sıcaklığı 22 (± 2)°C dir.

Çalışmanın bu aşamasında;

[10 **mürekkep örneği** X 2 farklı kağıt tipi X 6 farklı zaman (0-5 saat) X 9 tekrar (her saate ait 3'er örneğin 3 tekrarlı analizi)] + [2 farklı kağıt tipi **kör örneği** X 6 farklı zaman (0-5 saat) X 9 tekrar (her saate ait 3'er örneğin en az 3 tekrarlı analizi)] =1188 analiz (toplamda 396 örneğin)

[4 farklı **mürekkep boyar madde standardı** X 2 farklı kağıt tipi X 6 farklı zaman (0-5 saat) X 9 tekrar (her saate ait 3'er örneğin 3 tekrarlı analizi)] + [2 farklı kağıt tipi **kör örneği** X 6 farklı zaman (0-5 saat) X 9 tekrar (her saate ait 3'er örneğin en az 3 tekrarlı analizi)]=540 analiz (toplamda 180 örneğin)

2 farklı **arşiv** X 2 farklı renk tükenmez kalem (siyah ve mavi) X 6 farklı zaman (0-5 yıl) X 9 tekrar (her yıla ait 3'er örneğin en az 3 tekrarlı analizi)=216 analiz (72 örneğin)

olmak üzere yöntem optimizasyonu hariç toplam 648 örneğin en az üç tekrarlı analizi ile minimum 1944 analiz yapılarak veriler değerlendirildi ve yorumlandı.

4.3.1. MALDI-TOF-MS Cihazında Yöntem Geliştirilmesi ve Optimizasyonu

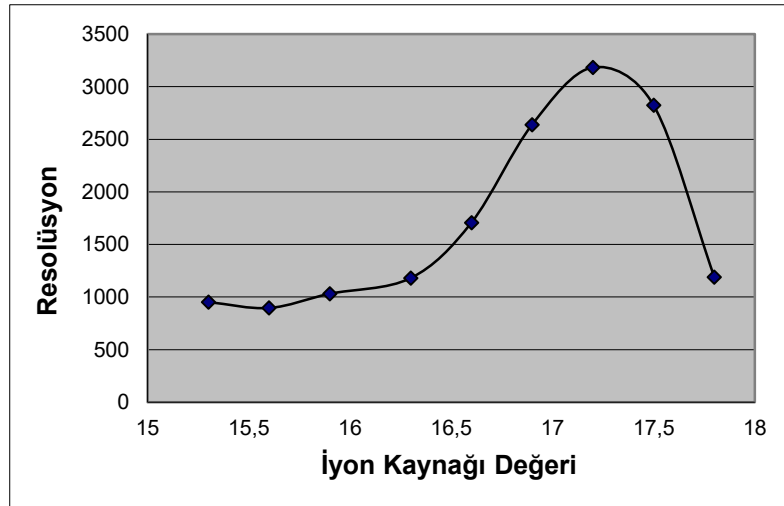
Standart A4 fotokopi kağıdına metil viyole standardı ile çizilen ve yapay soldurmaya maruz bırakılan çizginin kullanıldığı optimizasyon çalışmasında iyon kaynağının (Ion Source), lazer pulslu iyon ekstraksiyonu (Pulsed Ion Extraction), örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarının (Sample Rate and Digitizer Settings), reflektörün değeri, lazer atım hızının, dedektör voltajının, atış (Shot) frekansının ve lazer enerjisinin değerleri belirlendi.

4.3.1.1. İyon Kaynağı (Ion Source) Değeri

Dedektör voltajı 1777 değerinde sabit tutuldu. İyon kaynağında farklı değerler denenerek girilen iyon kaynağına karşılık elde edilen resolüsyon değeri Tablo 4.22 ve iyon kaynağına karşılık elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.31’de görülmektedir. Elde edilen verilere göre iyon kaynağı değeri 17,2 olarak belirlendi.

Tablo 4.22. İyon kaynağı değerine karşılık elde edilen resolüsyon değeri

İyon Kaynağı	Resolüsyon
15,3	952
15,6	896
15,9	1031
16,3	1180
16,6	1707
16,9	2639
17,2	3183
17,5	2824
17,8	1191



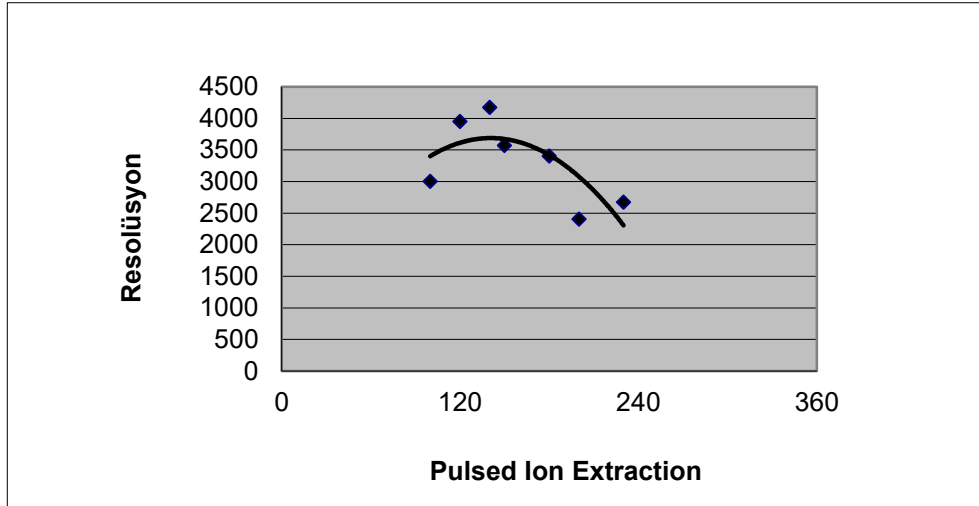
Şekil 4.31. İyon kaynağı değerine karşılık elde edilen maksimum resolüsyon

4.3.1.2. Lazer Pulsu İyon Ekstraksiyonu (Pulsed Ion Extraction)

Dedektör voltajı 1777 ve iyon kaynağı 17,2 değerinde sabit tutuldu. Lazer pulslu iyon ekstraksiyonu için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.23 ve lazer pulslu iyon ekstraksiyonu için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.32’ de görülmektedir. Elde edilen verilere göre iyon ekstraksiyonunun atım hızının değeri 150 olarak belirlendi.

Tablo 4.23. Lazer pulslu iyon ekstraksiyonu için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri

Lazer Pulsu İyon Ekstraksiyonu	Resolüsyon
100	3004
120	3950
140	4174
150	3571
230	2673
180	3403
200	2406



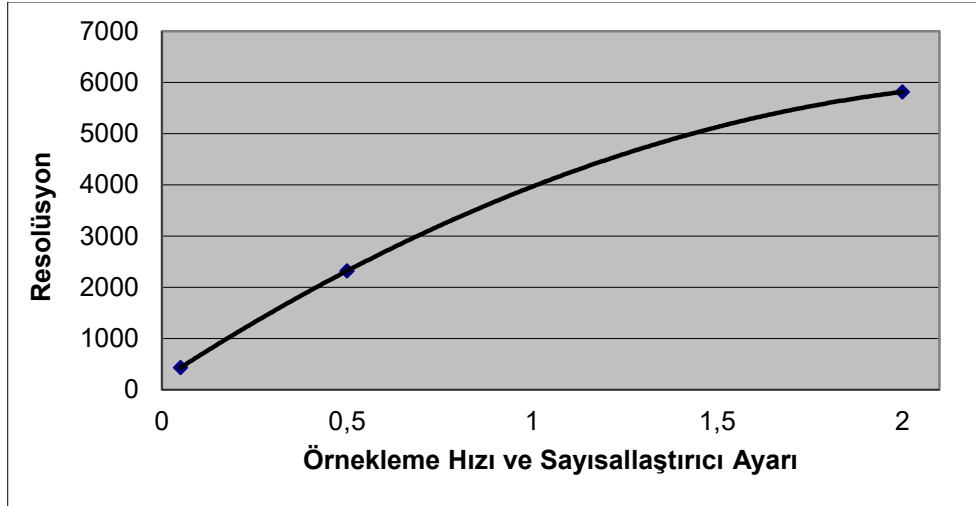
Şekil 4.32. Lazer pulslu iyon ekstraksiyonu için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon

4.3.1.3. Örnekleme Hızı ve Sayısallaştırıcı Ayarı (Sample rate and digitizer settings)

Dedektör voltajı 1777, iyon kaynağı 17,2 ve lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150 değerinde sabit tutuldu. Örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.24 ve örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı hızı için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.33'te görülmektedir. Elde edilen verilere göre örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı değeri cihazda girilebilir maksimum değer olan 2 olarak belirlendi.

Tablo 4.24. Örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri

Örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı	Resolüsyon
2	5817
0,05	433
0,5	2322



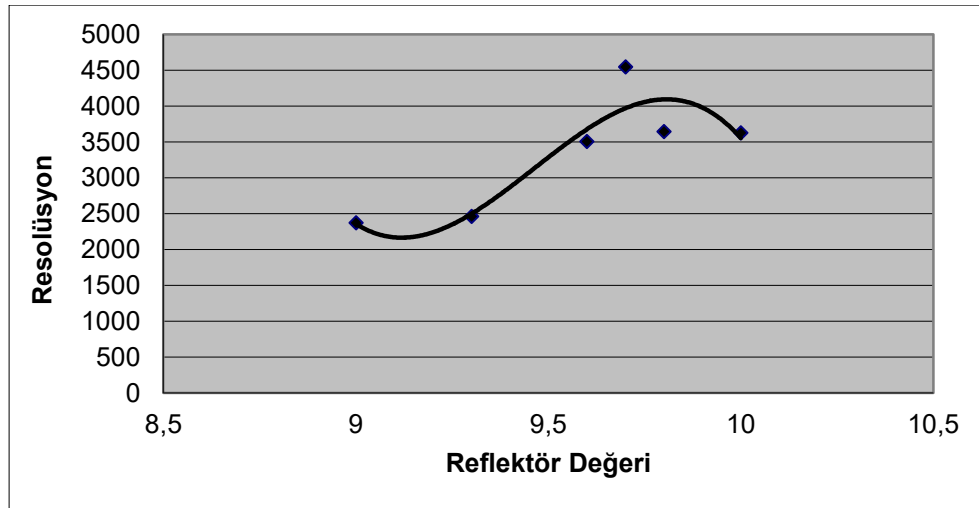
Şekil 4.33. Örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon

4.3.1.4. Reflektör Değeri

Dedektör voltajı 1777, lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150, iyon kaynağı 17,2 ve örnekleme hızı-sayısallaştırıcı ayarı 2 değerinde sabit tutuldu. Reflektör değerinin belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.25 ve reflektör değerinin belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.34 görülmektedir. Elde edilen verilere göre reflektör değeri 9,7 olarak belirlendi.

Tablo 4.25. Reflektör değeri içinden denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri

Reflektör	Resolüsyon
9	2370
9,3	2460
9,6	3505
9,7	4548
9,8	3642
10	3628



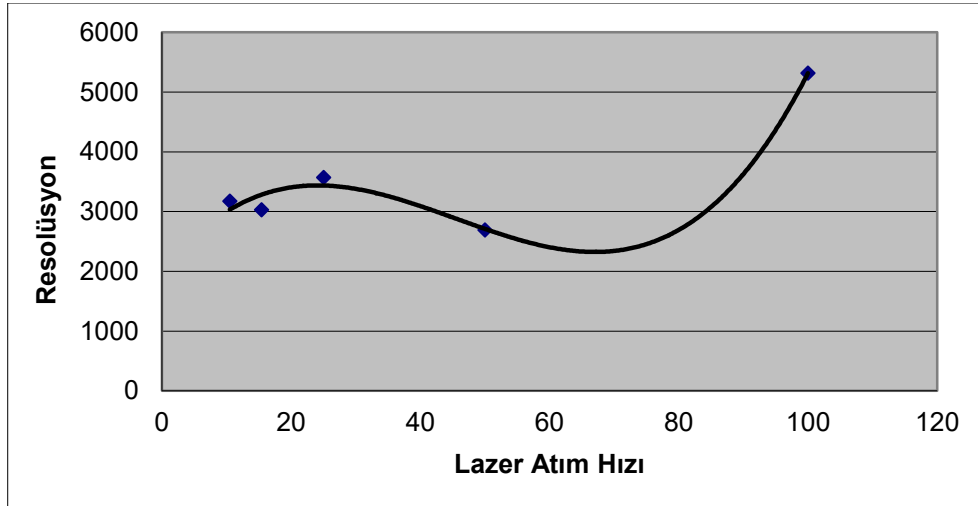
Şekil 4.34. Reflektör değeri için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon

4.3.1.5. Lazer Atım Hızı

Dedektör voltajı 1777, lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150, reflektör değeri 9,7 , iyon kaynağı 17,2 ve örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı 2 değerinde sabit tutuldu. Lazer atım hızının belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.26 ve lazer atım hızının belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.35 görülmektedir. Elde edilen verilere göre lazer atım hızı 100 olarak belirlendi.

Tablo 4.26. Farklı lazer atım hızlarına karşılık gelen resolüsyon değeri

Lazer atım hızı	Resolüsyon
10,5	3172
15,4	3029
25	3571
50	2690
100	5318



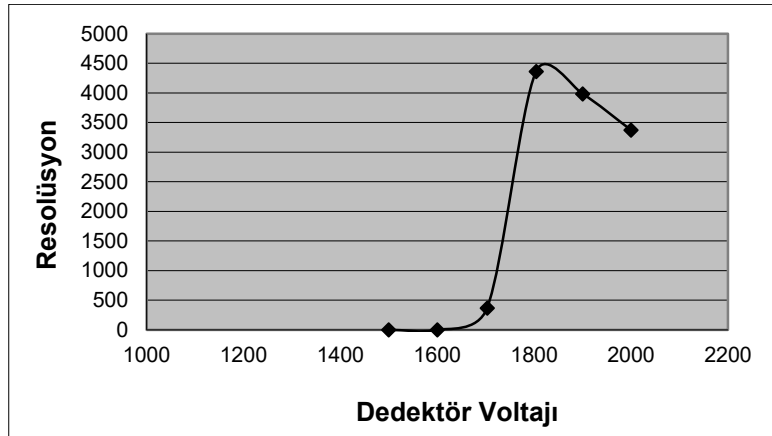
Şekil 4.35. Farklı lazer atım hızlarına karşılık elde edilen maksimum resolüsyon

4.3.1.6. Dedektör Voltajı

Lazer atım hızı 100, lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150, reflektör değeri 9,7 , iyon kaynağı 17,2 ve örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı 2 değerinde sabit tutuldu. Dedektör voltajının belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.27 ve dedektör voltajının belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık elde edilen maksimum resolüsyon değeri Şekil 4.36 görülmektedir. Elde edilen verilere göre dedektör voltajı 1804 olarak belirlendi.

Tablo 4.27. Farklı dedektör voltajı değerlerine karşılık gelen resolüsyon ve sinyal/gürültü değerleri

Dedektör Voltajı	Resolüsyon
1500	0
1600	0
1703	368
1804	4362
1900	3983
2000	3374



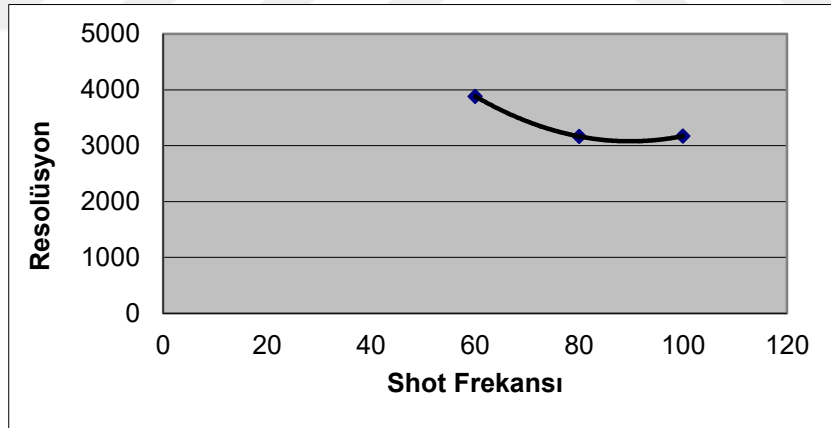
Şekil 4.36. Farklı dedektör voltajı değerlerine karşılık elde edilen maksimum resolüsyon

4.3.1.7. Atış (Shot) Frekansı

Dedektör voltajı 1804, lazer atım hızı 100, lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150, reflektör değeri 9,7 , iyon kaynağı 17,2 ve örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı 2 değerinde sabit tutuldu. Atış frekansının belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık gelen resolüsyon değeri Tablo 4.28 ve Şekil 4.37 görülmektedir. Elde edilen verilere göre shot frekansı lazer enerjisi ile uyumlu olan 100 değeri olarak belirlendi.

Tablo 4.28. Farklı atış frekansı değerlerine karşılık gelen resolüsyon ve sinyal/gürültü değerleri

Atış Frekansı	Resolüsyon
100	3173
80	3166
60	3885



Şekil 4.37. Farklı shot frekansı değerlerine karşılık elde edilen resolüsyon

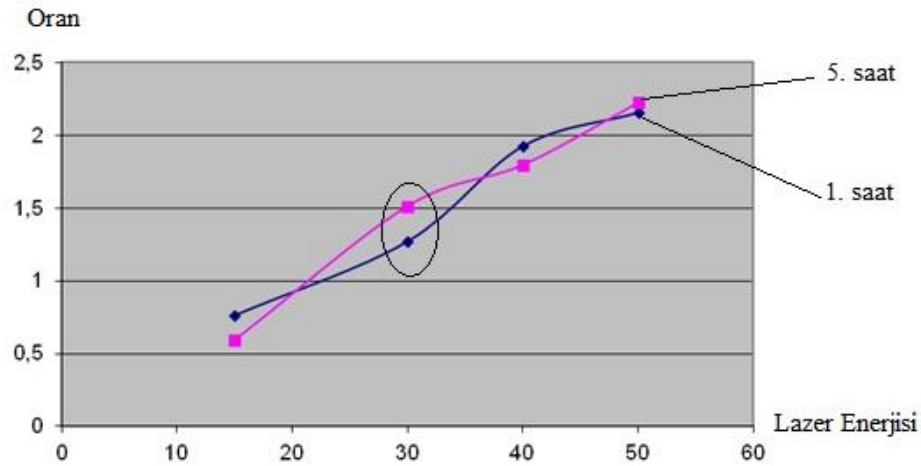
4.3.1.8. Zamana Bağlı Solmada Ayrım Aralığının En İyi Görüldüğü Lazer Enerjisinin Belirlenmesi

Dedektör voltajı 1804, lazer atım hızı 100, lazer pulslu iyon ekstraksiyonu 150, reflektör değeri 9,7 , örnekleme hızı ve sayısallaştırıcı ayarı 2, iyon kaynağı 17,2 ve shot frekansı 100 değerinde sabit tutuldu. Lazer enerjisinin belirlenmesinde zamana bağlı yapay soldurma ayrımının görülebilmesi için 1 saate ve 5 saate kadar yapay soldurulan standart

80 gr/m² A4 fotokopi kağıdına uygulanmış Schneider Slider Edge XB (Mavi) mürekkebe ait 3 örneğin (K1M2) 3'er tekrarlı analizi kullanıldı. Lazer enerjisinin belirlenmesi için denenen farklı değerlere karşılık gelen, her birinin zamanla kağıt üzerinde solmasına ilişkin oluşan ve zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen fotodegradasyon ürünü küçük pikler ile metil viyole (MV) iyon şiddeti toplamının kristal viyole (CV) iyon şiddeti oranı temel alınarak elde edilen değerlere göre zamana bağlı solmada ayırım aralığının en iyi görüldüğü ve fazla olduğu değer olan 30 değeri lazer enerjisi olarak belirlendi (Tablo 4.29 ve Şekil 4.38).

Tablo 4.29. Farklı lazerenerjisi değerlerine karşılık gelen solma değerleri (K1: 80 gr/m² A4 fotokopi kağıdı, M2: Schneider Slider Edge XB–Mavi)

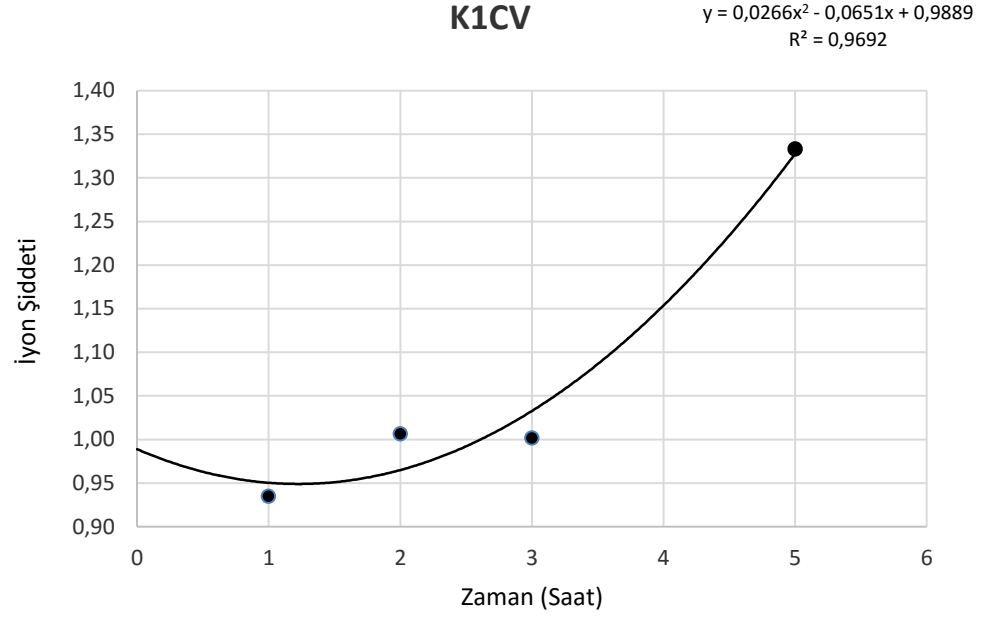
Lazer Enerjisi	K1M2 1. saat	K1M2 5. saat	Mutlak Fark
15	0,76	0,59	0,17
30	1,27	1,51	0,24
40	1,93	1,80	0,13
50	2,16	2,22	0,06



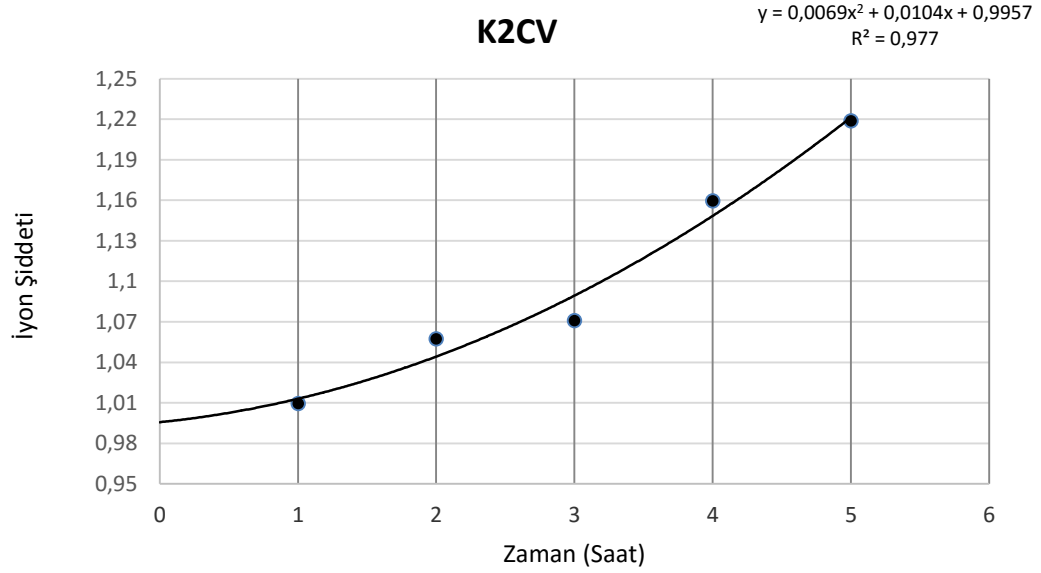
Şekil 4.38. Farklı lazer enerjisi değerlerine karşılık elde edilen solma değerleri aralığı

4.3.2. Optimizasyon Sonrası Işık Etkisi İle Yapay Soldurulan Örneklerin Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

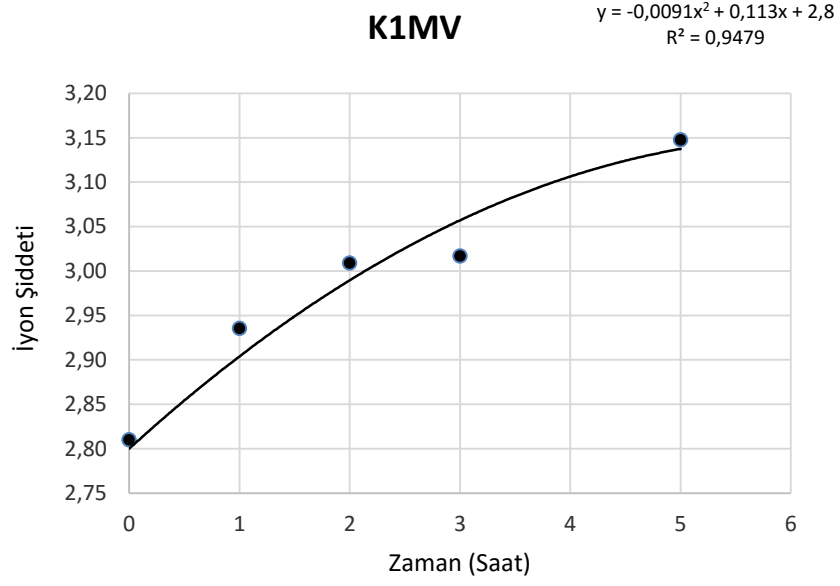
80 g/m² (K1) ve 100g/m² (K2) A4 fotokopi kağıdı üzerine çizilen tükenmez kalem mürekkeplerinin ve mürekkep boyar madde standartlarından her saat sonunda en az 3 adet alınan numuneler MALDI-TOF-MS’ te 3’er tekrarlı analizlendi (bkz. EK 4-31 “Tükenmez kalem mürekkepleri ve boyar madde standartlarının spektrumları”). Analiz sonrası elde edilen iyon şiddetlerinin zamana karşı solma eğrileri çizildi (Şekil 4.39-4.70). Bu solma eğrilerinin çiziminde tükenmez kalem mürekkeplerinin ve mürekkep boyar madde standartlarından olan kristal viyole ve metil viyolenin 0-5 saat arasına tekabül eden yapay soldurma sonrası zamana karşı solma eğrileri, her birinin zamanla kağıt üzerinde solmasına ilişkin oluşan ve zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen küçük pikler ile metil viyole (MV) iyon şiddeti toplamının kristal viyole (CV) iyon şiddetine oranı temel alındı. Mürekkep boyar madde standartlarının pararosanilin (PR) ve viktorya mavisi(VB) için ise, bu standartların zamanla kağıt üzerinde solmasına ilişkin ortaya çıkan fotodegradasyon ürünü küçük piklerin temel piklerin iyon şiddetine oranları kullanılarak solma eğrileri çizildi. Pararosanilin (PR) için, pararosanilin standardı içerisinde bulunan az miktardaki monometil pararosanilinden pararosanilin ve diğer küçük moleküllerin oluşumuna ilişkin reaksiyon zinciri baz alındı. Standart sapma (SD) ve bağlı standart sapma (%RSD) değerleri hesaplandı (Şekil 4.39-4.66). Mavi tükenmez kalem ile çizilen kağıtlarda yapay soldurma sonrası, iki farklı kağıt üzerinde her bir tükenmez kalem türü için elde edilen zamana karşı solma eğrisi Şekil 4.67’de; siyah tükenmez kalem ile çizilen kağıtlarda yapay soldurma sonrası, iki farklı kağıt üzerinde her bir tükenmez kalem türü için elde edilen zamana karşı solma eğrisi Şekil 4.68’de; PR, MV ve CV standartlarının her birinin iki farklı kalitedeki kağıt üzerinde zaman bağlı solma eğrisi Şekil 4.69’ da; VB standardının ise iki farklı kalitedeki kağıt üzerinde zamana bağlı solma eğrileri Şekil 4.70’ de görülmektedir. 80 g/m² (K1) ve 100g/m² (K2) A4 kağıdı üzerindeki farklı bazı mavi ve siyah tükenmez kalem örneklerinin 0-5 saat soldurma sonrası spektrumları Şekil 4.71-4.74 arasında görülmektedir.



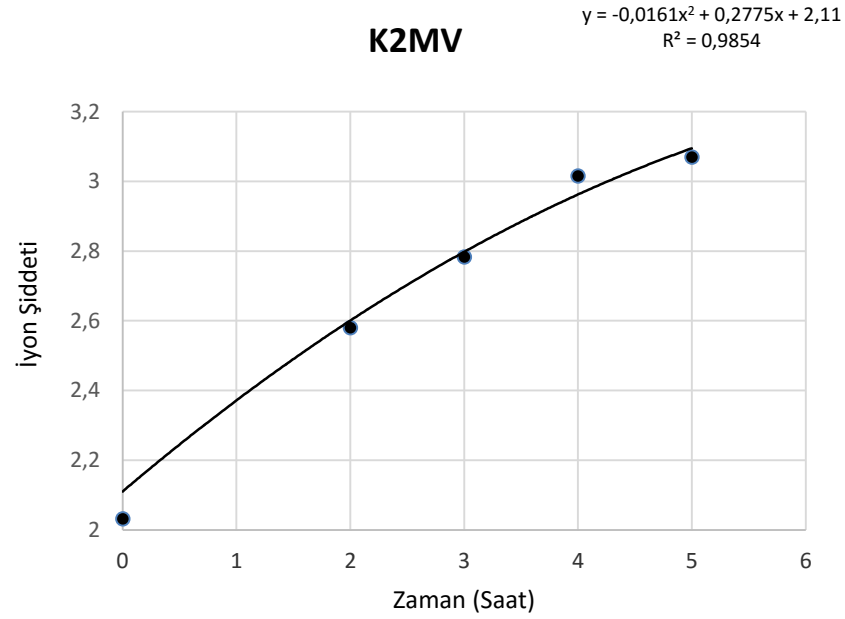
Şekil 4.39. Kristal viyole (CV) standardının 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerinde zamana bağlı solma eğrisi



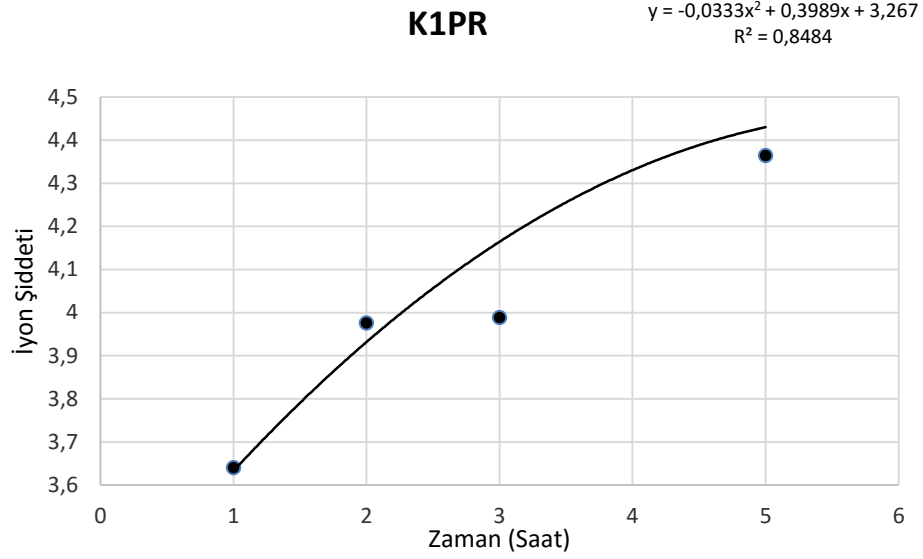
Şekil 4.40. Kristal viyole (CV) standardının 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerinde zamana bağlı solma eğrisi



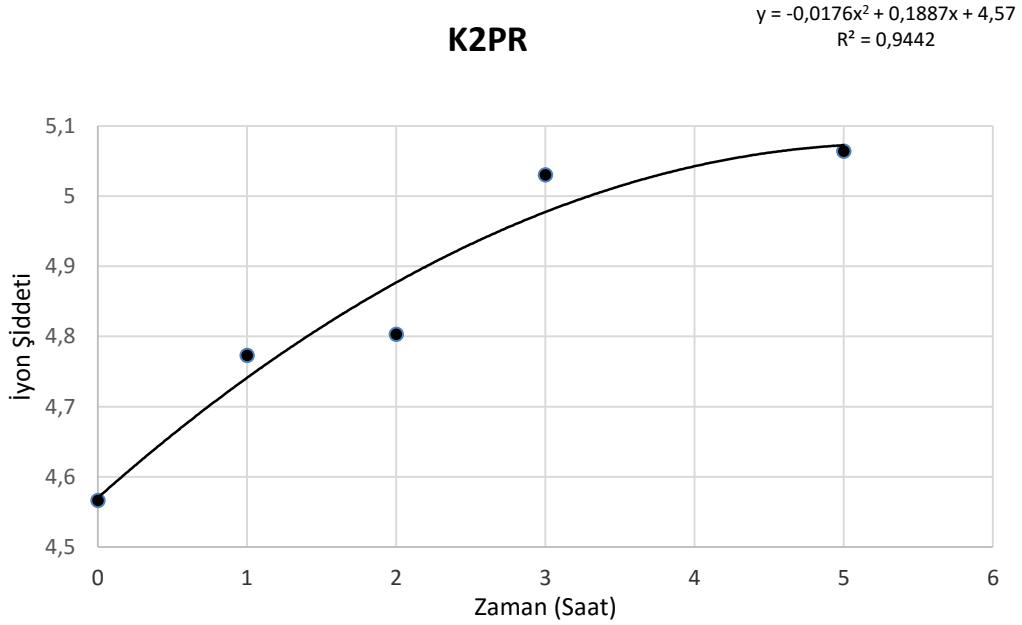
Şekil 4.41. Metil viyole (MV) standardının 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerinde zamana bağlı solma eğrisi



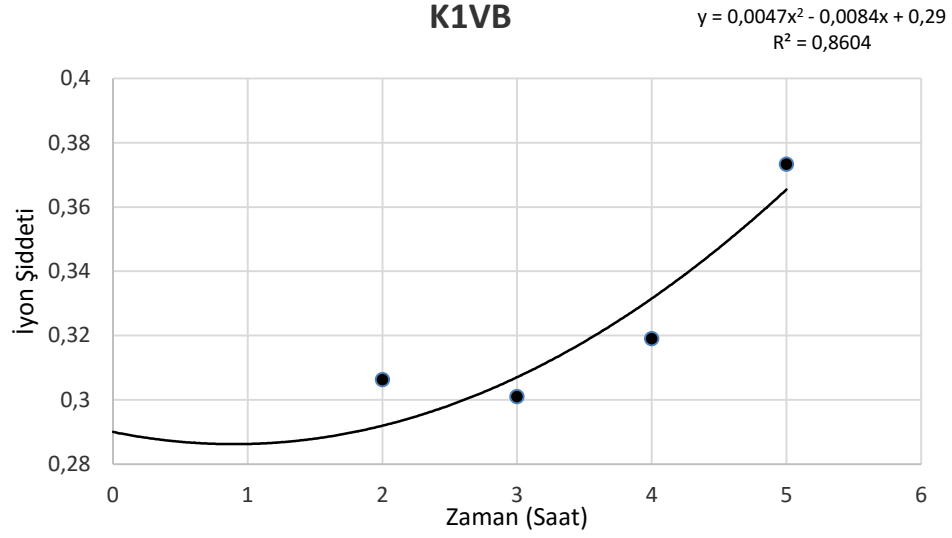
Şekil 4.42. Metil viyole (MV) standardının 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerinde zamana bağlı solma eğrisi



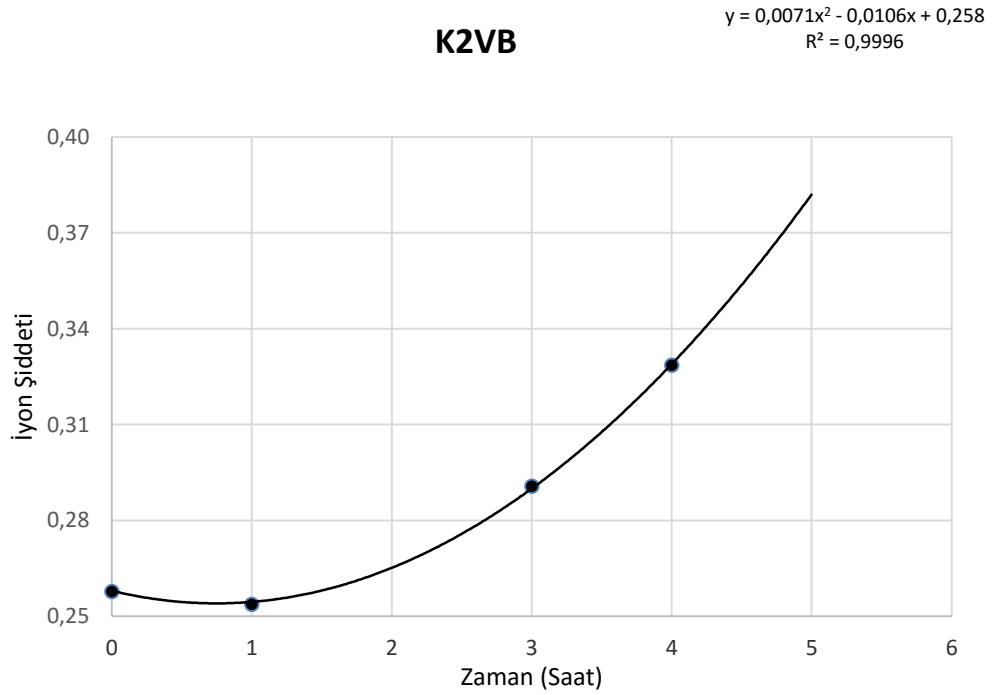
Şekil 4.43. Pararosanilin (PR) standardı içerisinde bulunan az miktardaki monometil pararosanilinden pararosanilin ve diğer küçük moleküllerin oluşumuna ilişkin 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerinde zamana bağlı solma eğrisi



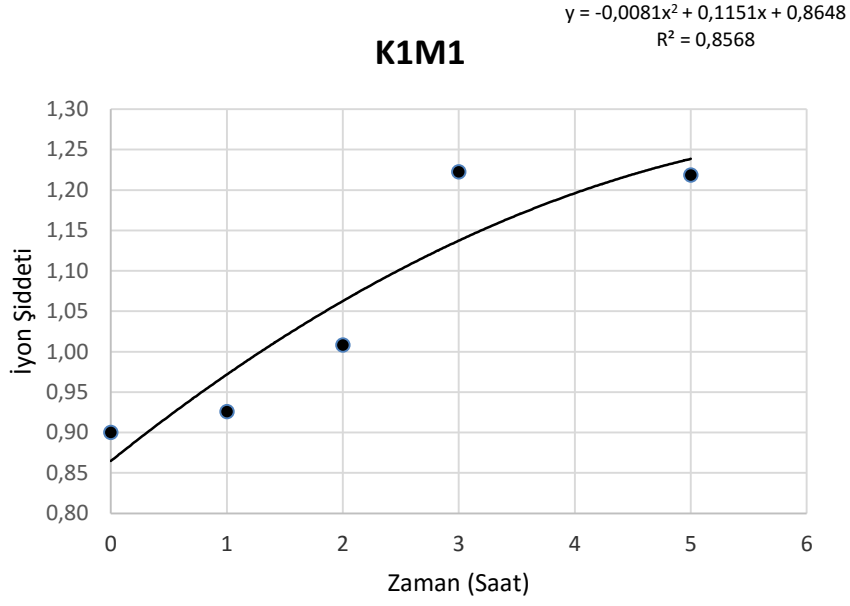
Şekil 4.44. Pararosanilin (PR) standardı içerisinde bulunan az miktardaki monometil pararosanilinden pararosanilin ve diğer küçük moleküllerin oluşumuna ilişkin 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerinde zamana bağlı solma eğrisi



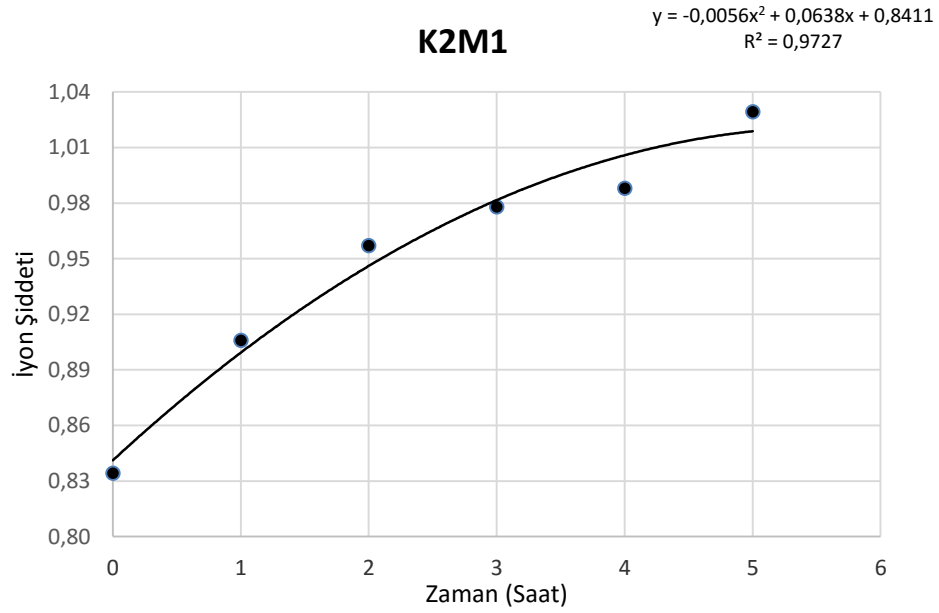
Şekil 4.45. Viktorya mavisi (VB) standardının 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerinde zamana bağlı solma eğrisi



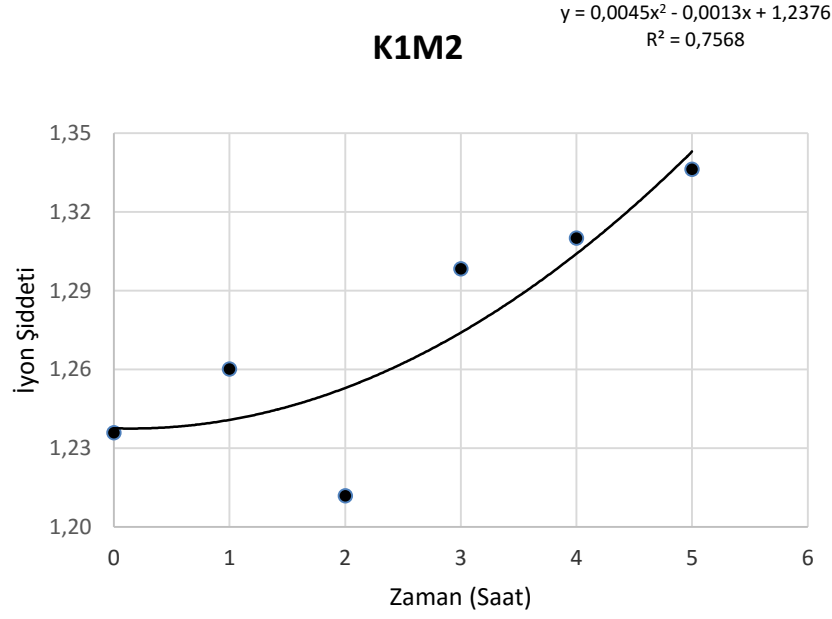
Şekil 4.46. Viktorya mavisi (VB) standardının 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerinde zamana bağlı solma eğrisi



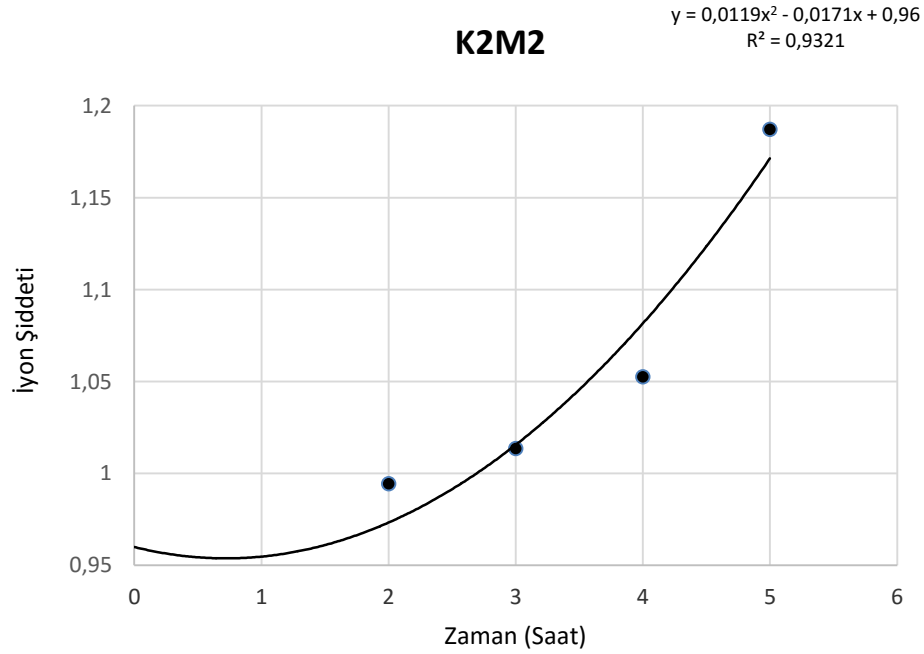
Şekil 4.47. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm (M1) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



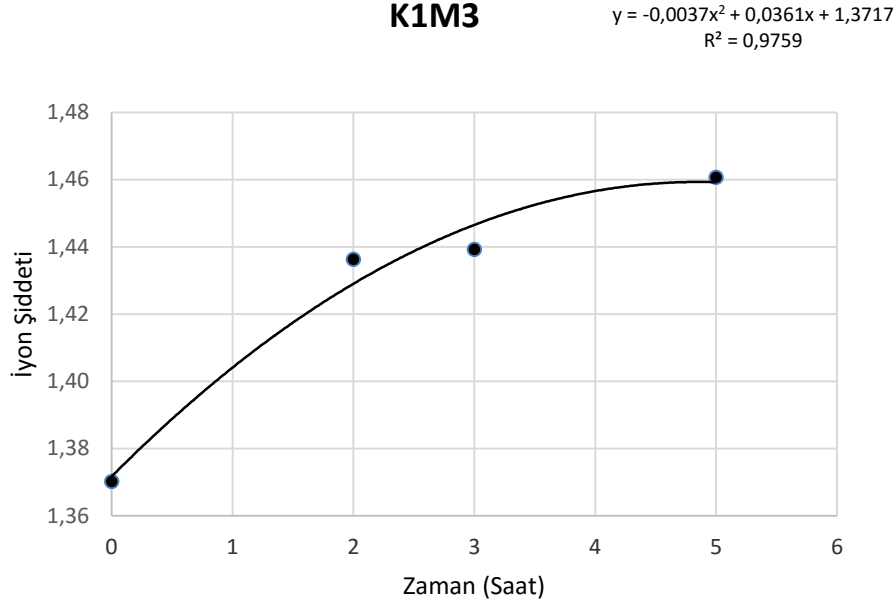
Şekil 4.48. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm (M1) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana bağlı solma eğrisi



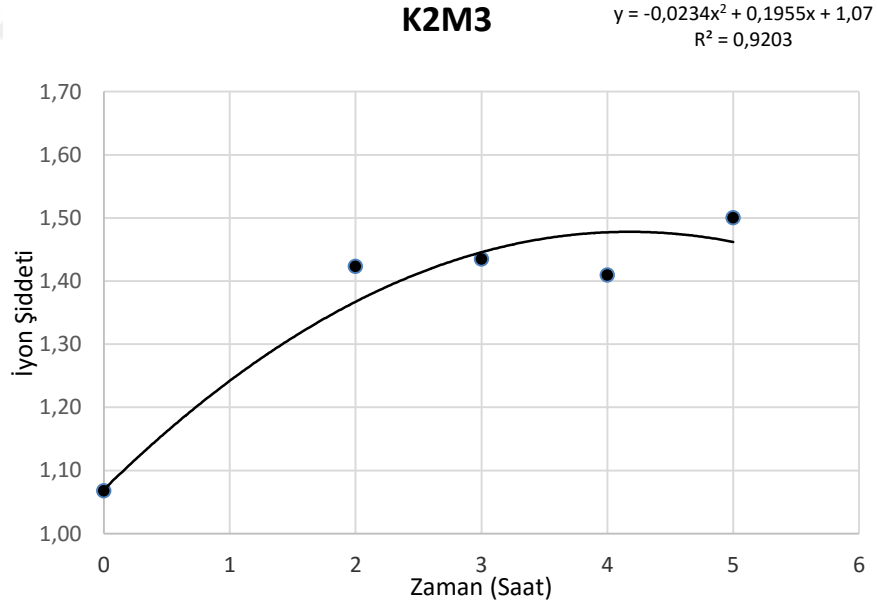
Şekil 4.49. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Mavi Schneider Slider Edge XB (M2) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



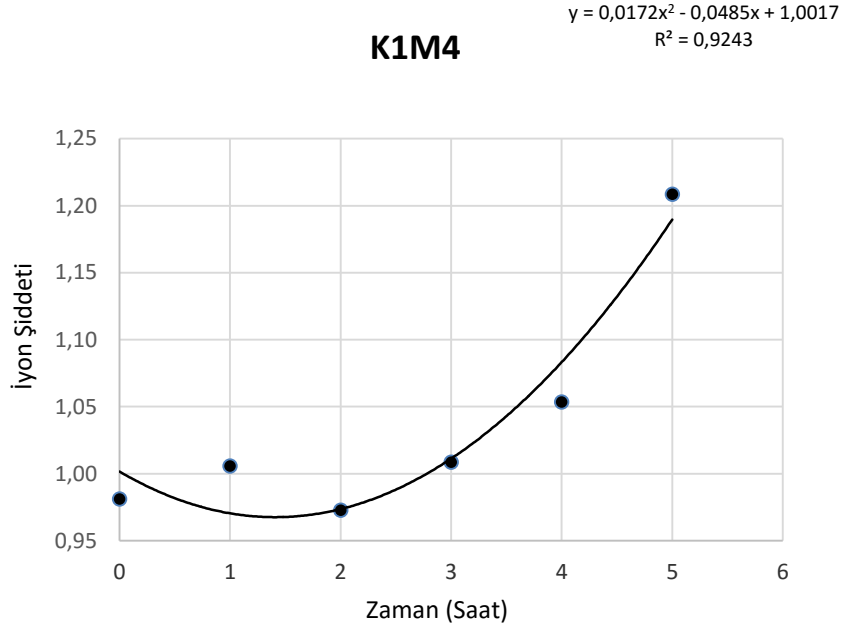
Şekil 4.50. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Mavi Schneider Slider Edge XB (M2) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



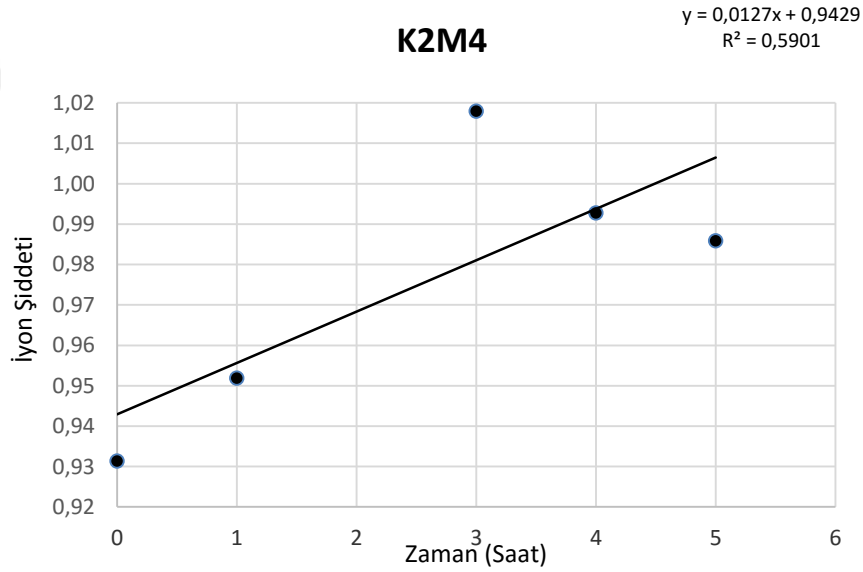
Şekil 4.51. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Mavi Pensan MV-Pen Vision (M3) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



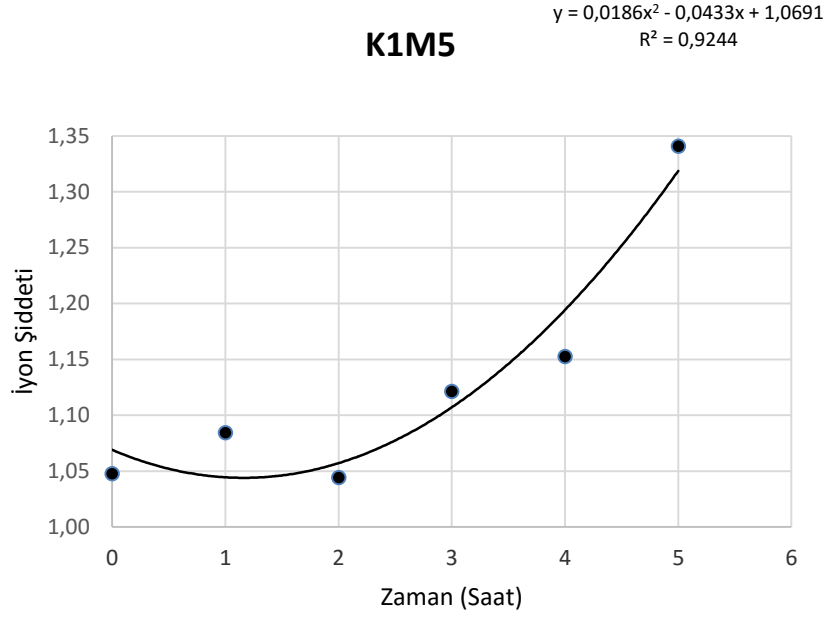
Şekil 4.52. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Mavi Pensan MV-Pen Vision (M3) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



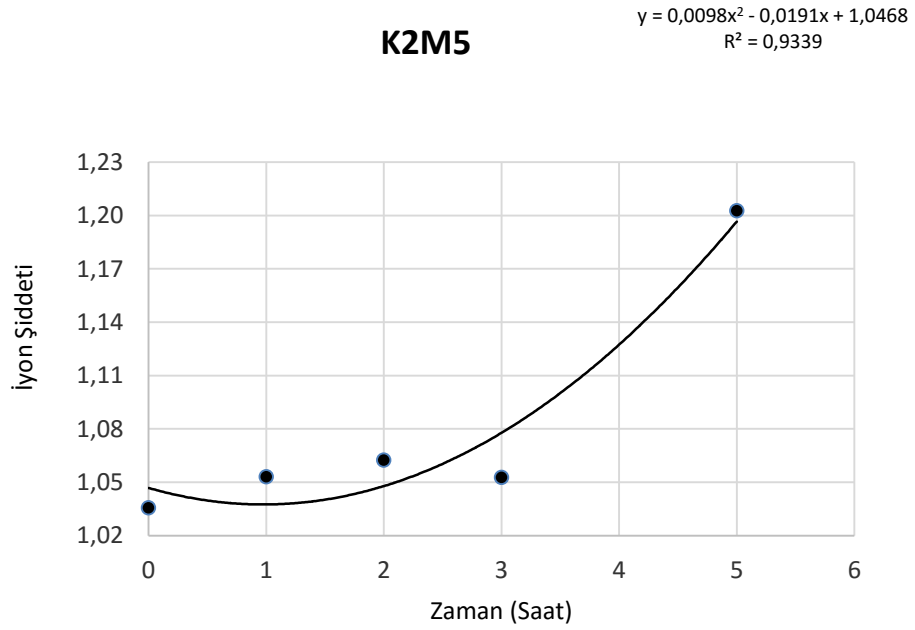
Şekil 4.53. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm (M4) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



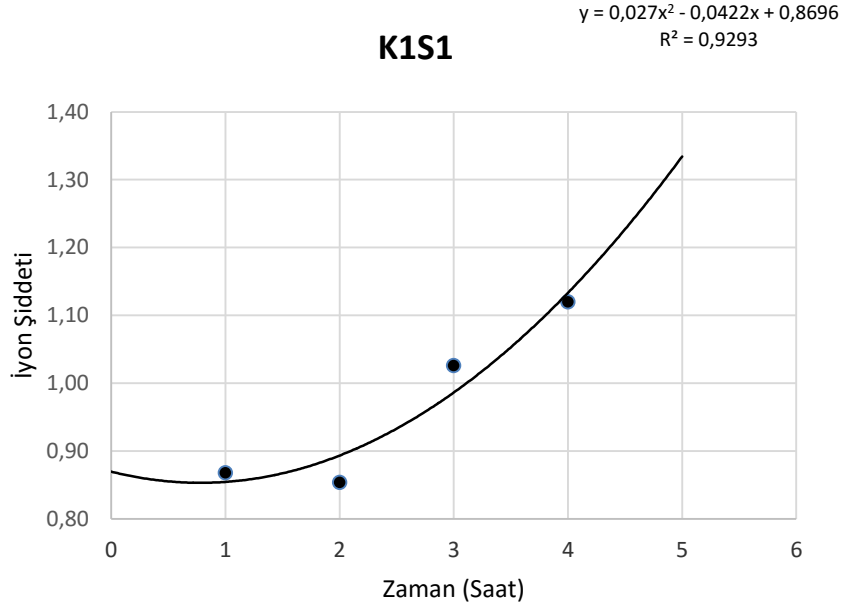
Şekil 4.54. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm (M4) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



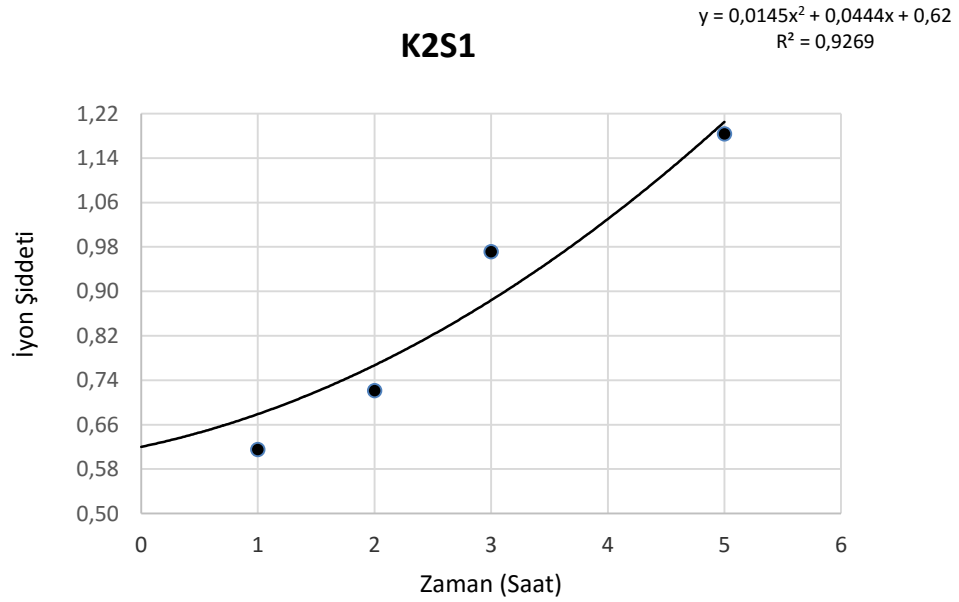
Şekil 4.55. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Mavi Bigpoint 932 (M5) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



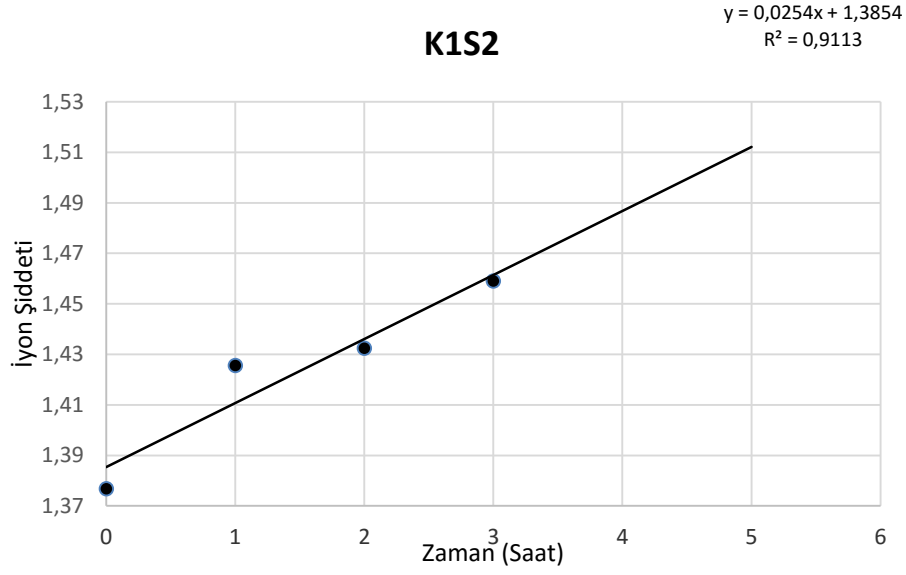
Şekil 4.56. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Mavi Bigpoint 932 (M5) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



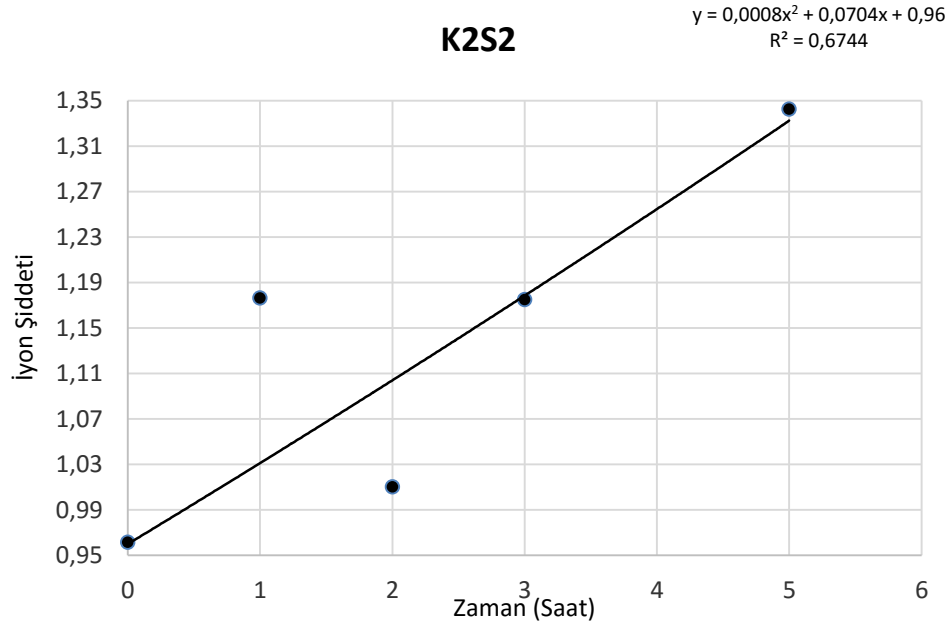
Şekil 4.57. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm (S1), tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



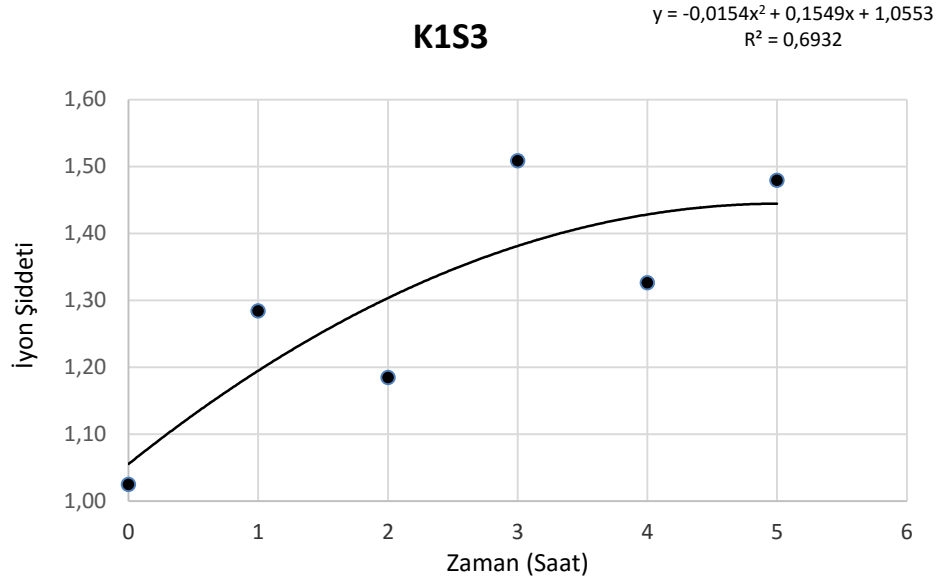
Şekil 4.58. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm (S1), tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



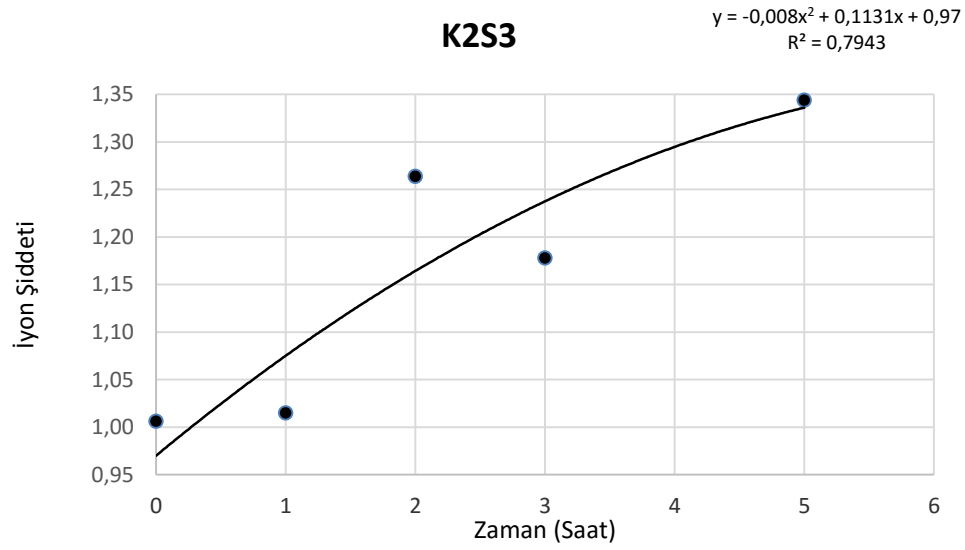
Şekil 4.59. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm (S2) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



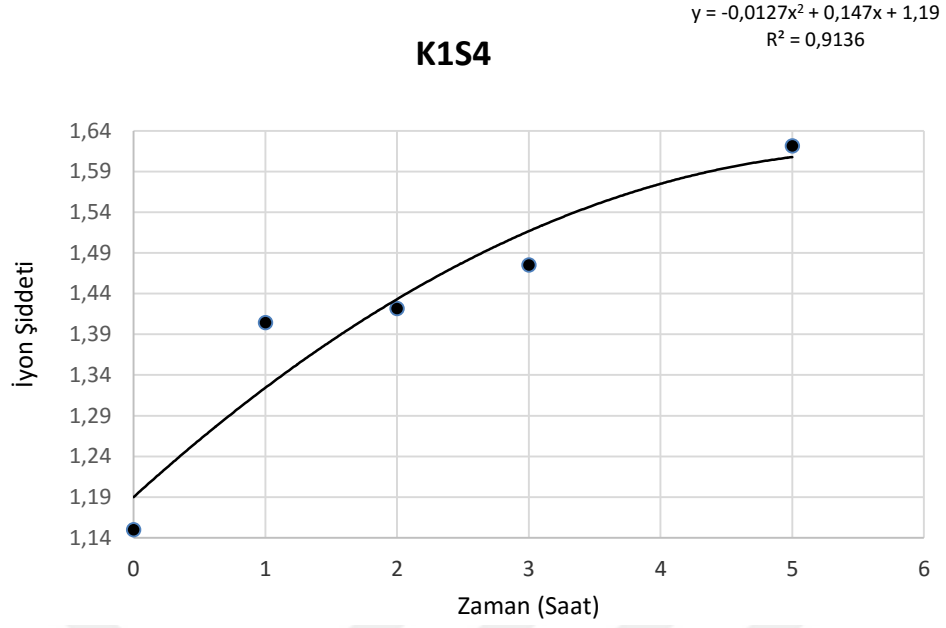
Şekil 4.60. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm (S2) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



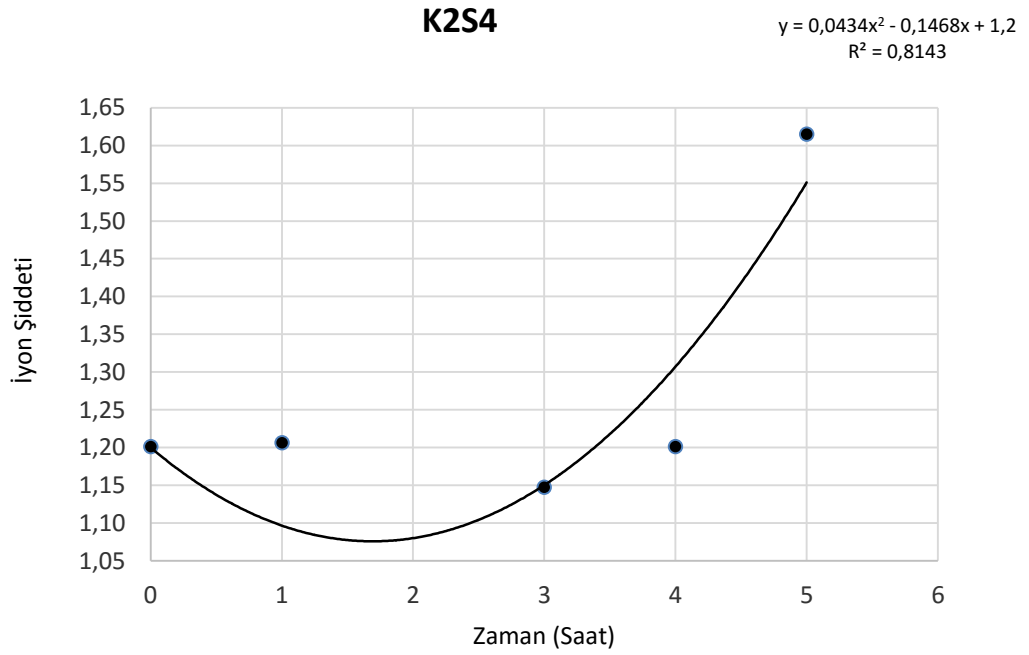
Şekil 4.61. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm (S3) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



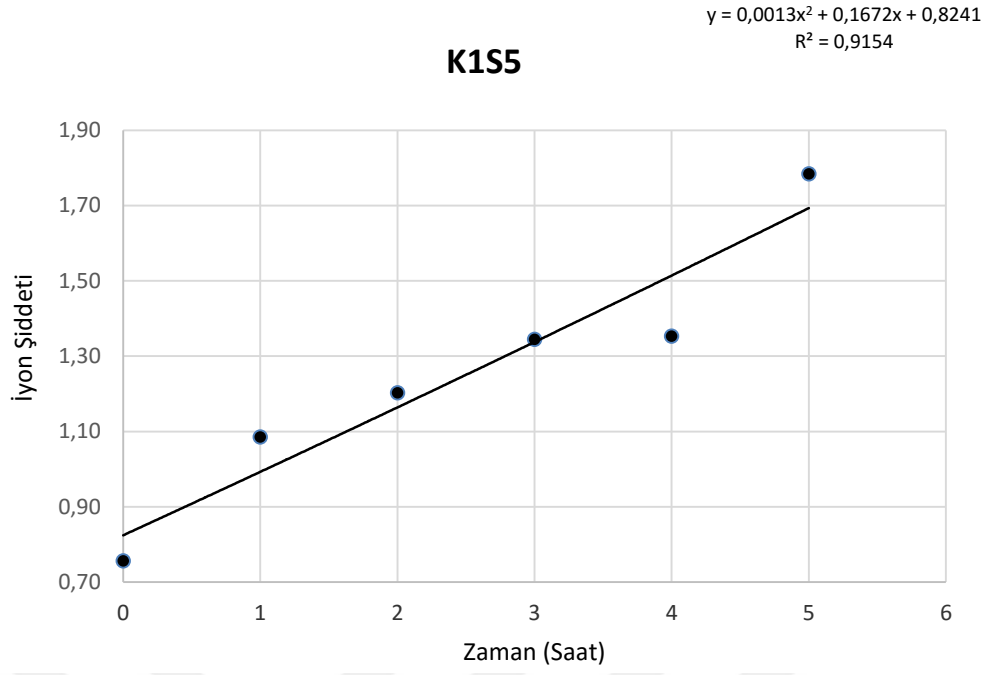
Şekil 4.62. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm (S3) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



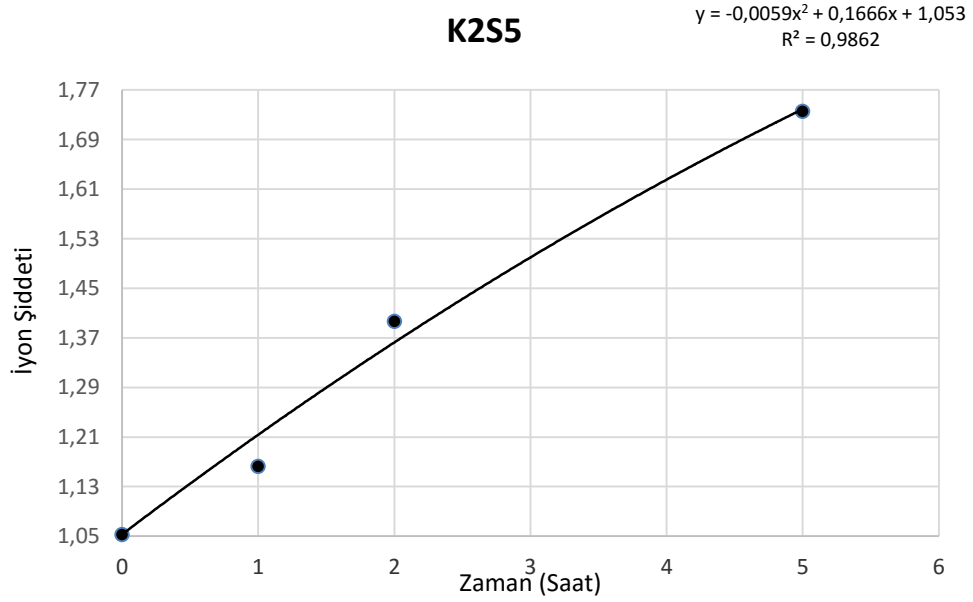
Şekil 4.63. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Siyah Schneider slider Edge XB (S4) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



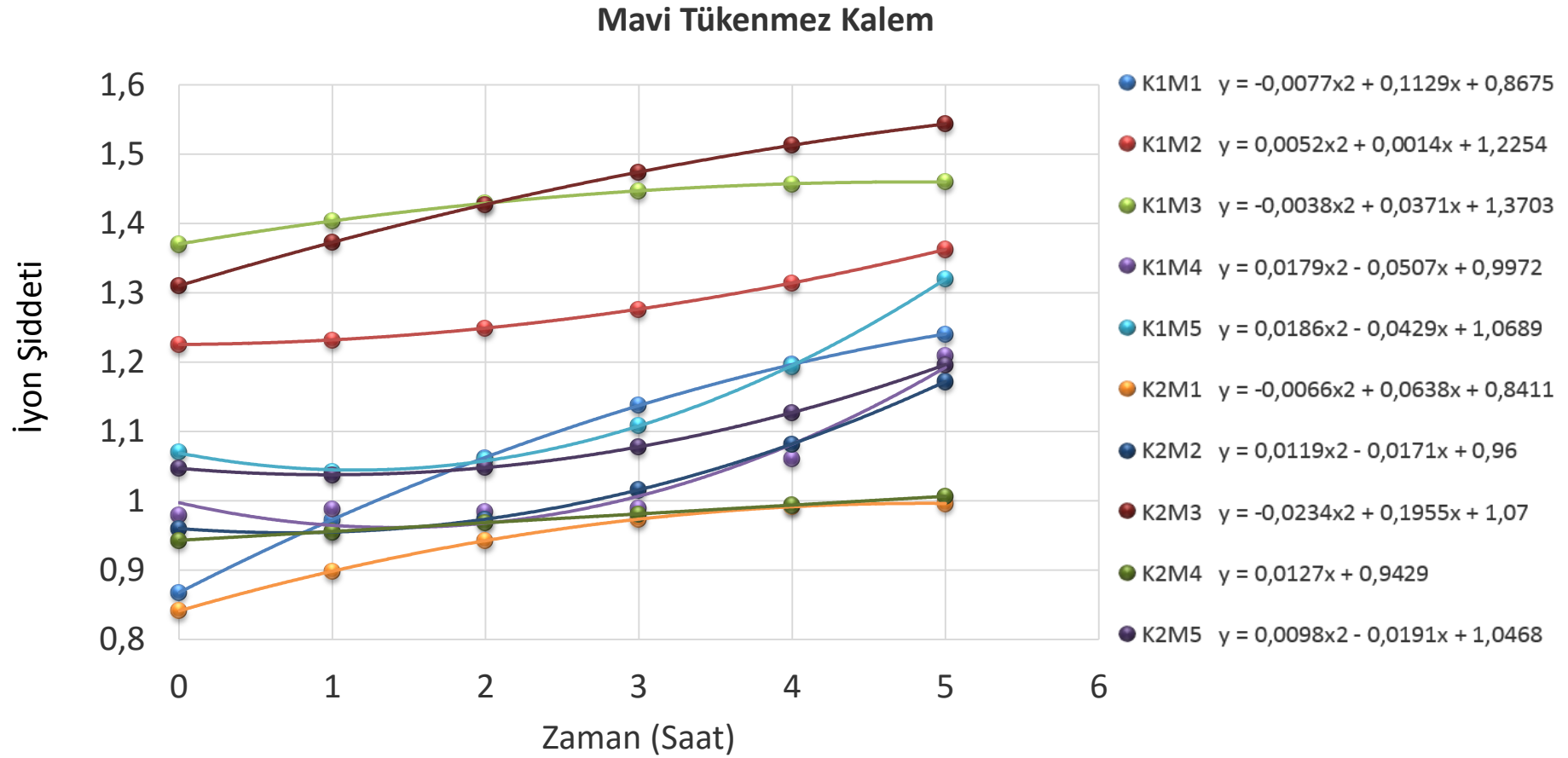
Şekil 4.64. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Siyah Schneider slider Edge XB (S4) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



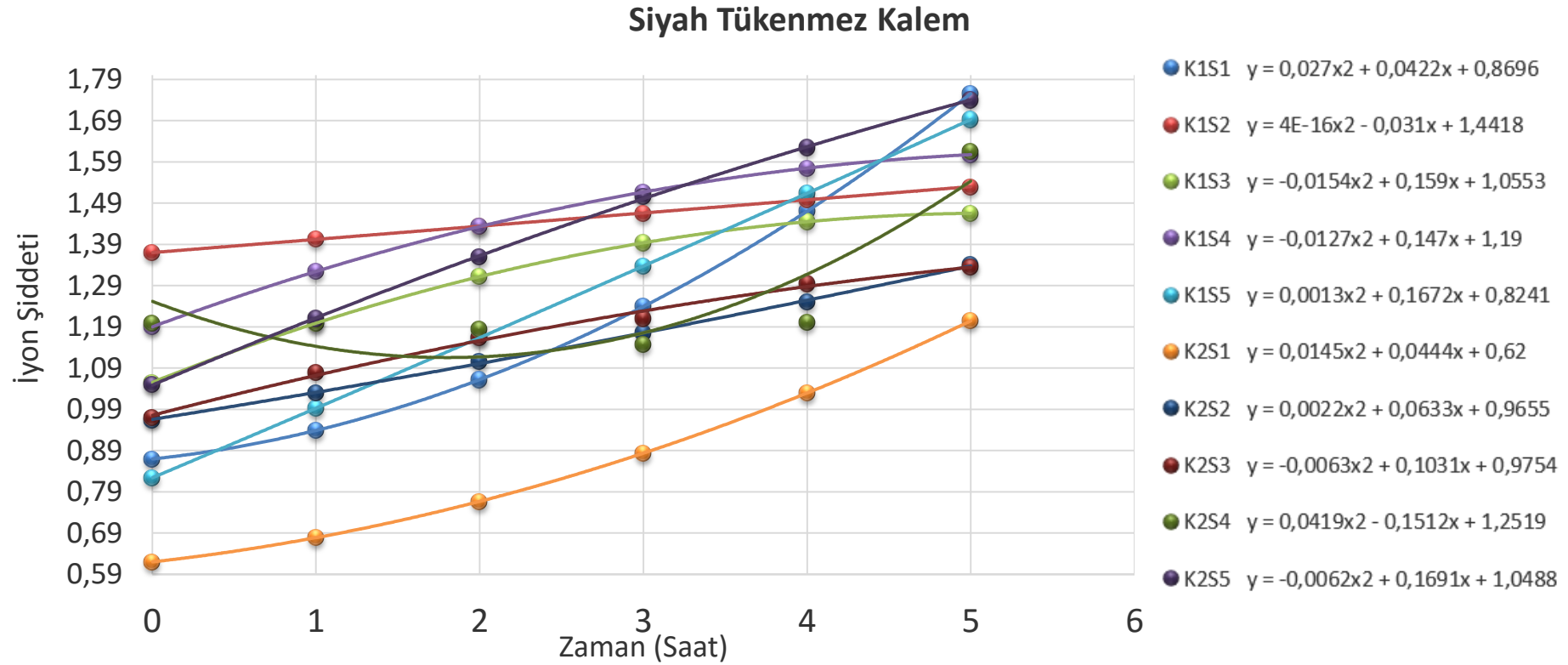
Şekil 4.65. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K1) üzerine çizilen Siyah Bigpoint 930 (S5) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



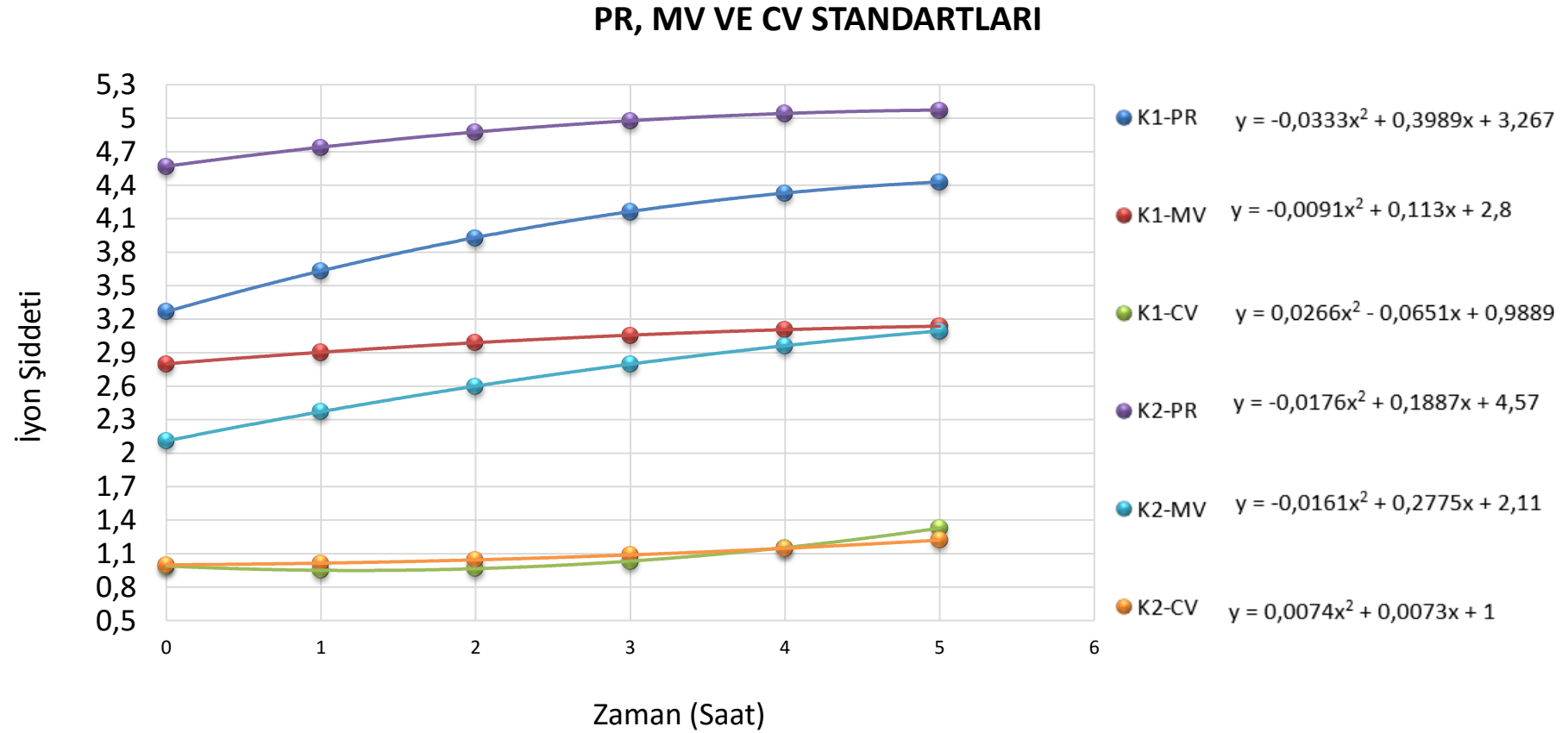
Şekil 4.66. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdı (K2) üzerine çizilen Siyah Bigpoint 930 (S5) tükenmez kalem mürekkebinin yapay soldurma sonrası elde edilen zamana karşı solma eğrisi



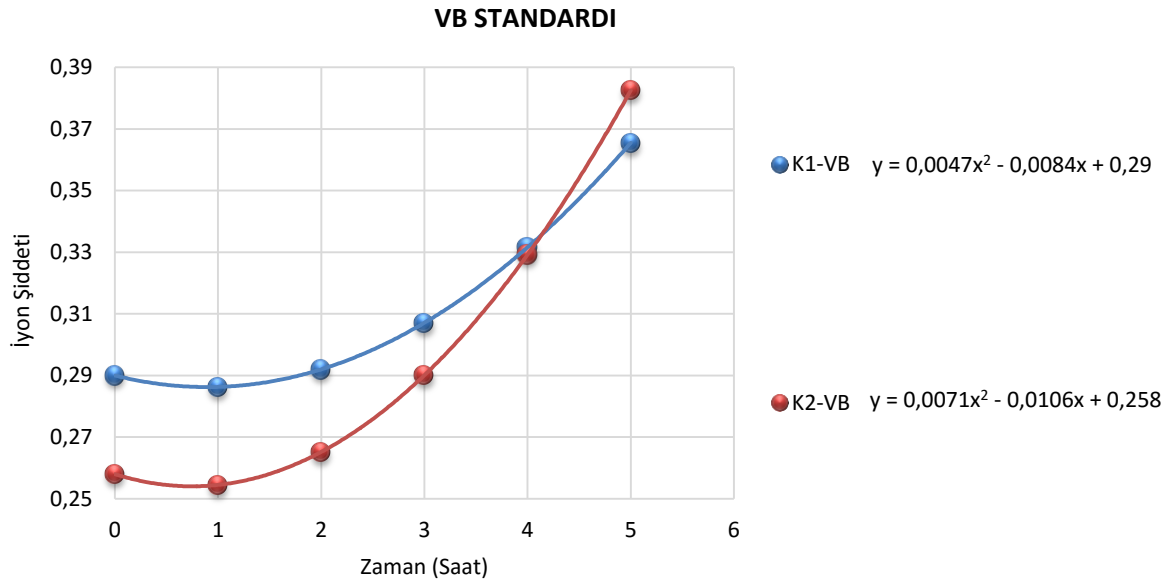
Şekil 4.67.Mavi Tükenmez Kalem ile çizilen kağıtlarda yapay soldurma sonrası, iki farklı kağıt üzerinde her bir tükenmez kalem türü için elde edilen zamana karşı solma eğrisi (K1:80 g/m² A4 fotokopi kağıdı, K2:100 g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)



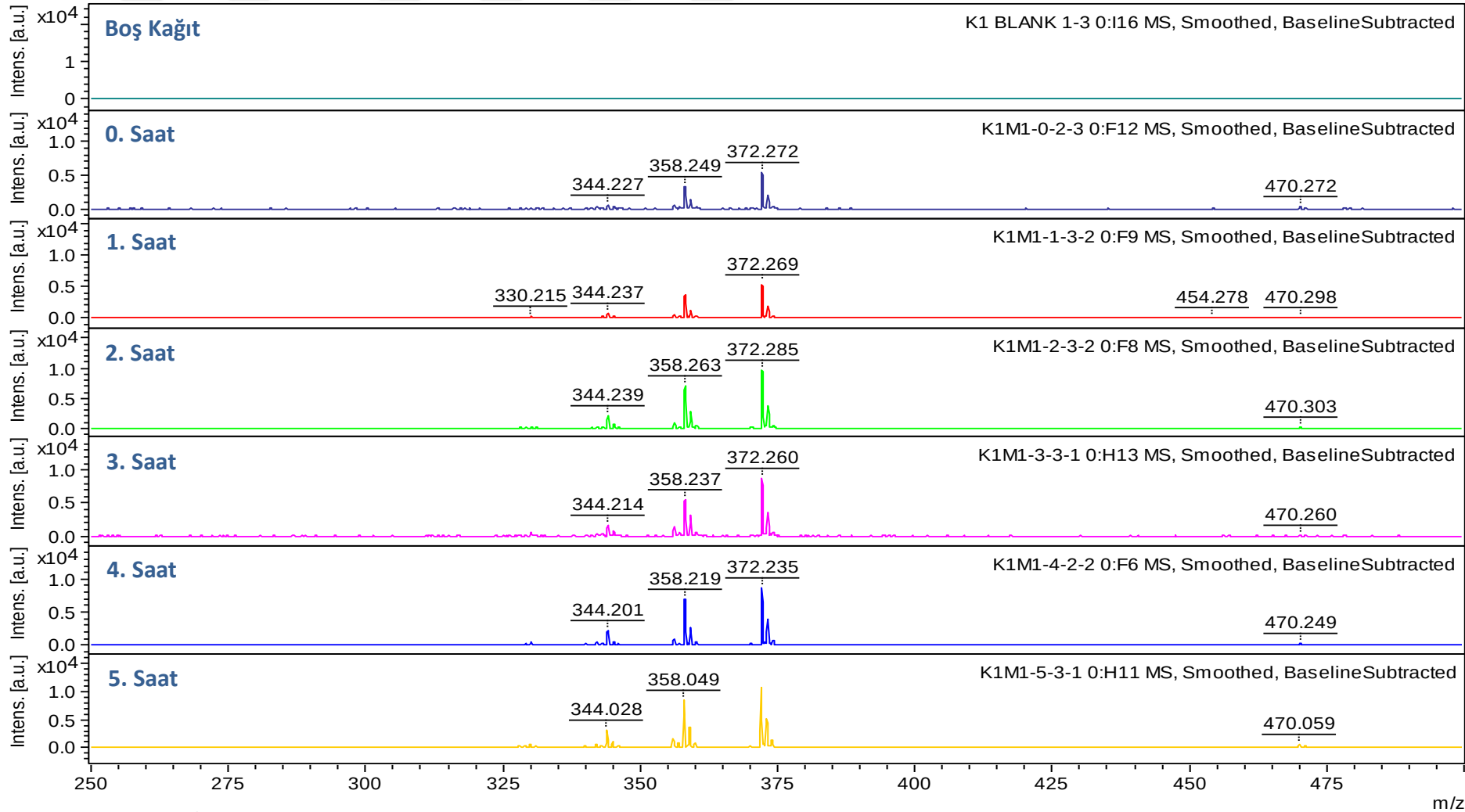
Şekil 4.68. Siyah Tükenmez Kalem ile çizilen kağıtlarda yapay soldurma sonrası, iki farklı kağıt üzerinde her bir tükenmez kalem türü için elde edilen zamana karşı solma eğrisi (K1:80 g/m² A4 fotokopi kağıdı, K2:100 g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)



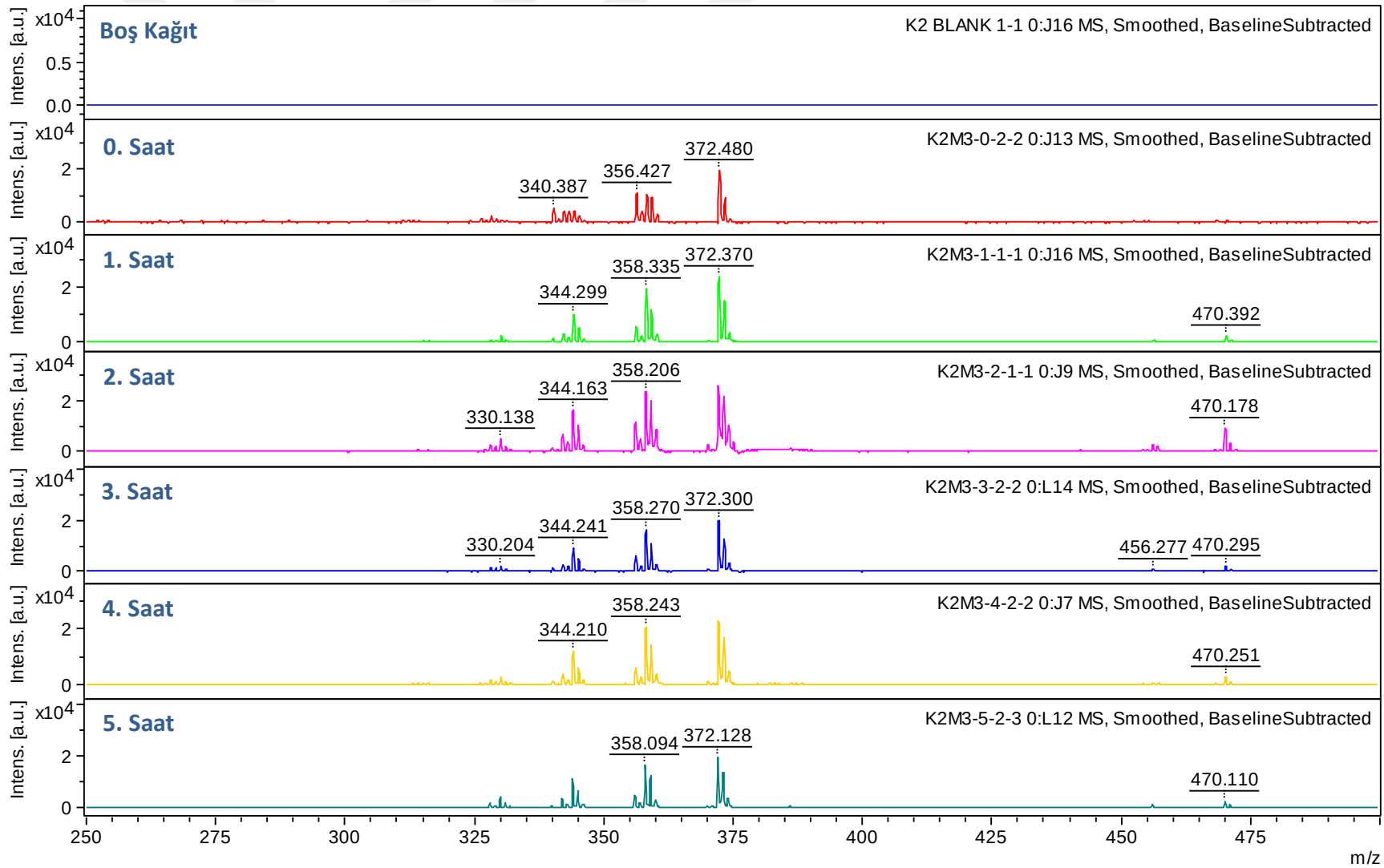
Şekil 4.69. Her bir standardın iki farklı kalitedeki kağıt üzerinde zamana bağlı solma eğrileri (K1:80 g/m² A4 fotokopi kağıdı, K2:100 g/m² A4 fotokopi kağıdı, CV: Kristal viyole, MV: Metil viyole, PR: Pararosanilin, VB: Viktorya mavisi)



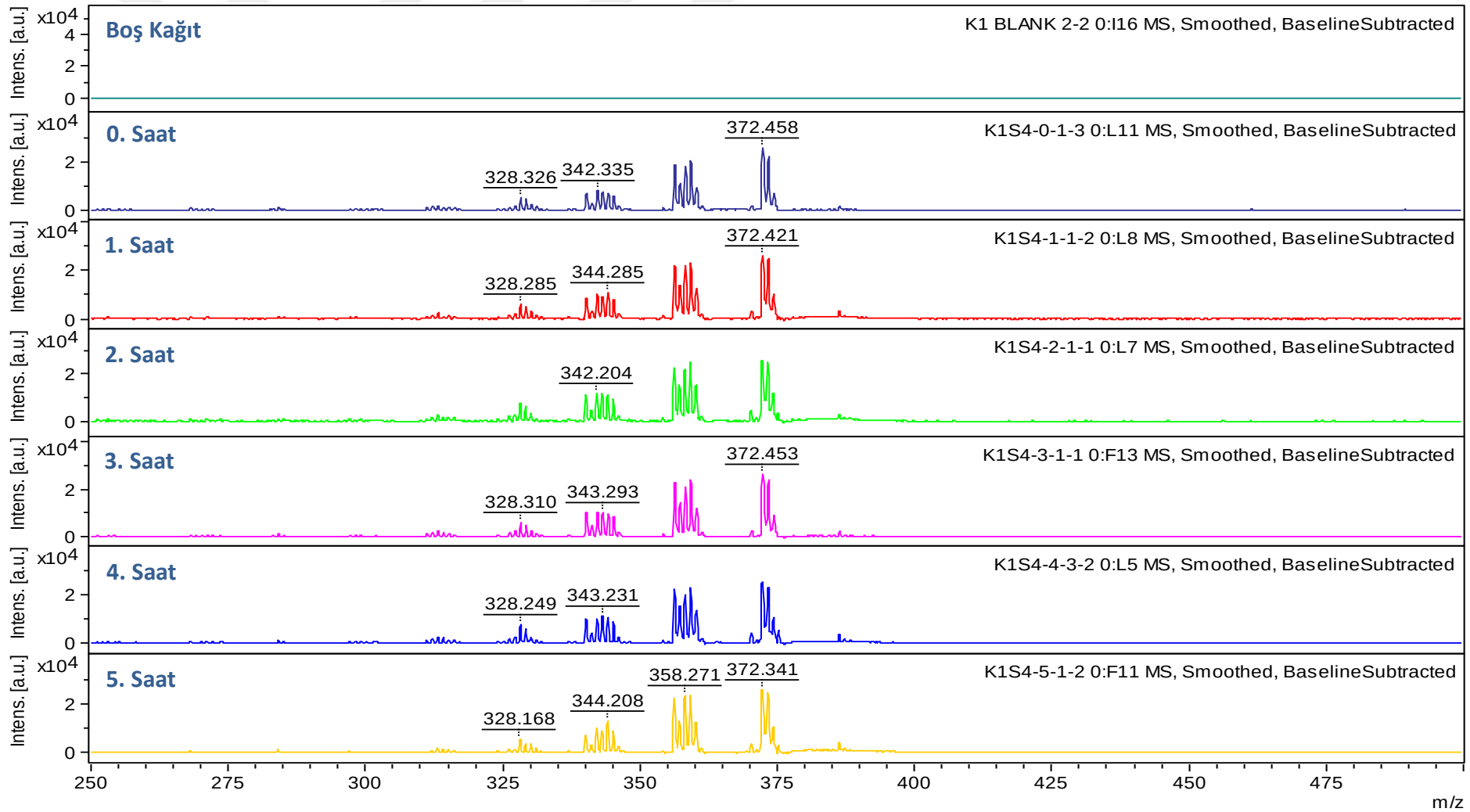
Şekil 4.70. Viktorya mavisi standardının iki farklı kalitedeki kağıt üzerinde zamana bağlı solma eğrileri (*K1:80 g/m² A4 fotokopi kağıdı, K2:100 g/m² A4 fotokopi kağıdı, VB: Viktorya mavisi*)



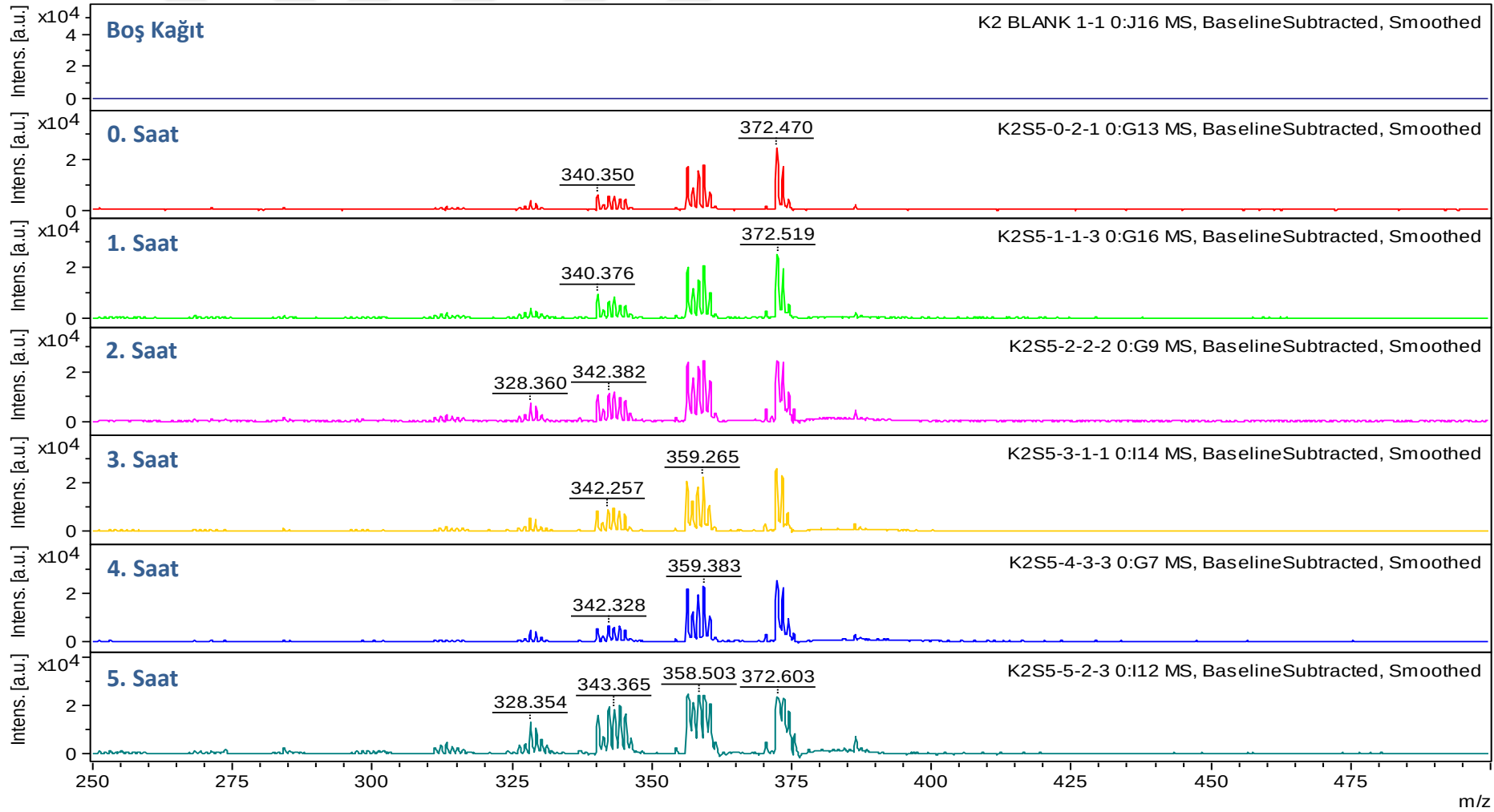
Şekil 4.71. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Faber Castell FDx10* marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebi (M1) içerisindeki pigmentlerin 0,1,2,3,4 ve 5 saat ışık altında bekletilme sonucunda alınan spektrumları ve boş kağıdın spektrumunu (K1-Blank)



Şekil 4.72. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış *Pensan MV-Pen Vision* marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebi (M3) içerisindeki pigmentlerin 0,1,2,3,4 ve 5 saat ışık altında bekletilme sonucunda alınan spektrumları ve boş kağıdın spektrumunu (K2-Blank)



Şekil 4.73. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Schneider Slider Edge XB* marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebi (S4) içerisindeki pigmentlerin 0,1,2,3,4 ve 5 saat ışık altında bekletilme sonucunda alınan spektrumları ve boş kağıdın spektrumunu (K1-Blank)



Şekil 4.74. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış Bigpoint 930 marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebi (S5) içerisindeki pigmentlerin 0,1,2,3,4 ve 5. saat ışık altında bekletilme sonucunda alınan spektrumları ve boş kağıdın spektrumunu (K2-Blank)

4.3.3. Farklı Kağıt Türleri Üzerinde Bulunan Farklı Mürekkep Türleri İçerisindeki Boyar Maddelerin Zamana Bağlı Değişimlerinin ANOVA Analizi İle Karşılaştırılması

Çalışmada tek değişken faktör (kağıt ya da kalem) olduğundan, tek-yönlü ANOVA analizi kullanıldı. ANOVA analizine ilişkin sonuçlar Tablo 4.30-4.35 arasında yer almaktadır.

Tablo 4.30. ANOVA analizi ile kağıt türü gözetmeksizin, saate göre kağıt üzerinde soldurulan MAVİ mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar (K1:80 g/m² A4 fotokopi kağıdı, K2:100 g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

Yapay soldurma zamanı	İstatistiki olarak anlamlı ölçüde uyumlu mürekkepler ^a	ANOVA sonucu bulunan F değeri ^c	Genel grup ile uyumlu olmayıp kendi arasında uyumlu olanlar ^a	ANOVA sonucu bulunan F değeri ^c	İstatistiki olarak tümünden anlamlı ölçüde farklı olanlar ^a
0 saat	K1M1, K1M4, K1M5, K2M4 ^b , K2M5 ve K2M2	2,32	K1M2, K1M3 ve K2M3	1,28	K2M1
1 saat	K1M1, K1M4, K1M5, K2M4 ^b , K2M5, K2M1, K2M2	2,35	K1M3 ve K2M3	1,49	K1M2
2 saat	K1M1, K1M4, K1M5, K2M4 ^b , K2M5, K2M1 ve K2M2	1,86	K1M3 ve K2M3	0,01	————
3 saat	K1M1, K1M4, K1M5, K2M1, K2M2, ve K2M5	2,07	K1M3, K2M3, K1M2 ve K2M4 ^b	2,80	————
4 saat	K1M1, K1M4, K1M5, K2M1, K2M2, K2M5 ve K2M4 ^b	1,78	K1M3, K2M3, K1M2	2,60	————
5 saat	K1M1, K1M2, K1M4, K1M5, K2M2 ve K2M5	2,32	K1M3, K2M3	0,69	————
			K2M1 ve K2M4 ^b	0,46	

^a iyon şiddeti oranları açısından istatistiksel uyumlu ve farklı sonuçlar veren mürekkepler, ^bK2M4'te 5 saat içindeki artış <0,2 olduğundan artış anlamlı kabul edilmemiştir, ^cF_{deneySEL} ≤ F_{kritik}, %95 n ≥ 4 (K2S3 için n=3)

Tablo 4.31. ANOVA analizi ile kağıt türü gözetmeksizin, saate göre kağıt üzerinde soldurulan SIYAH mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar (K1:80 g/m² A4 fotokopi kağıdı, K2:100 g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

Yapay soldurma zamanı	İstatistiki olarak anlamlı ölçüde uyumlu mürekkepler ^a	ANOVA sonucu bulunan F değeri ^c	Genel grup ile uyumlu olmayıp kendi arasında uyumlu olanlar ^a	ANOVA sonucu bulunan F değeri ^c	İstatistiki olarak tümünden anlamlı ölçüde farklı olanlar ^a
0 saat	K1S1, K1S3, K1S4, K2S1, K2S2, K2S3, K2S5	1,91	K2S4, K1S2 ^b	3,25	K1S5
1 saat	K1S3, K1S5, K2S2, K2S3, K2S4, K2S5, K1S4	2,09	_____	_____	K1S1, K2S1, K1S2 ^b
2 saat	K1S3, K1S5, K1S2 ^b , K2S2, K2S3, K2S4, K2S5, K1S4	2,28	K2S1, K1S1	2,15	_____
3 saat	K1S2 ^b , K1S3, K1S4, K1S5, K2S2, K2S3, K2S4	2,32	K1S1, K2S1, K2S5	1,52	_____
4 saat	K1S1, K1S2 ^b , K1S3, K1S4, K1S5, K2S2, K2S3, K2S4, K2S5	2,03	_____	_____	K2S1
5 saat	K1S3, K1S4, K1S5, K2S2, K2S3, K2S4, K2S5	1,57	_____	_____	K1S1, K1S2 ^b , K2S1

^a iyon şiddeti oranları açısından istatistiksel uyumlu ve farklı sonuçlar veren mürekkepler, ^bK1S2'de 5 saat içindeki artış <0,2 olduğundan artış anlamlı kabul edilmemiştir, ^cF_{deneySEL} ≤ F_{kritik}, %95 n≥4 (K2S3 için n=3)

Tablo 4.32. ANOVA analizi ile saate göre İNCE A4 kağıt (K1) üzerinde soldurulan MAVİ mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar (K1:80 g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

Yapay soldurma zamanı	İstatistiki olarak anlamlı ölçüde uyumlu mürekkepler ^a	ANOVA sonucu bulunan F değeri ^c	İstatistiki olarak tümünden anlamlı ölçüde farklı olanlar ^a
0 saat	K1M1, K1M2 ^b , K1M4, K1M5	2,49	K1M3 ^b
1 saat	K1M1, K1M2 ^b , K1M4, K1M5	3,45	K1M3 ^b
2 saat	K1M1, K1M2 ^b , K1M4, K1M5	3,02	K1M3 ^b
3 saat	K1M1, K1M2 ^b , K1M4, K1M5	2,63	K1M3 ^b
4 saat	K1M1, K1M2 ^b , K1M4, K1M5	3,18	K1M3 ^b
5 saat	K1M1, K1M2 ^b , K1M4, K1M5	1,19	K1M3 ^b

^a iyon şiddeti oranları açısından istatistiksel uyumlu ve farklı sonuçlar veren mürekkepler, 0-5 saat arası: ^baz artış gösterenler, ^cF_{deneysel} ≤ F_{kritik}, %95 n ≥ 4

Tablo 4.33. ANOVA analizi ile saate göre KALIN A4 kağıt (K2) üzerinde soldurulan MAVİ mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar (K2:100 g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision , M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

Yapay soldurma zamanı	İstatistiki olarak anlamlı ölçüde uyumlu mürekkepler ^a	ANOVA sonucu bulunan F değeri ^d	İstatistiki olarak diğerlerinden anlamlı ölçüde farklı olanlar ^a
0 saat	K2M1 ^b , K2M2 ^b , K2M4, K2M5 ^b	2,48	K2M3
1 saat	K2M1 ^b , K2M2 ^b , K2M4, K2M5 ^b	2,84	K2M3
2 saat	K2M1 ^b , K2M2 ^b , K2M5 ^b	3,23	K2M3, K2M4 ^c
3 saat	K2M1 ^b , K2M2 ^b , K2M5 ^b , K2M4 ^c	0,26	K2M3
4 saat	K2M1 ^b , K2M2 ^b , K2M5 ^b	0,82	K2M3, K2M4 ^c
5 saat	K2M1 ^b , K2M2 ^b , K2M5 ^b	3,03	K2M3, K2M4 ^c

^a iyon şiddeti oranları açısından istatistiksel uyumlu ve farklı sonuçlar veren mürekkepler, 0-5 saat arası: ^baz artış gösterenler, ^canlamlı bir artış göstermeyenler, ^d $F_{deneyse} \leq F_{kritik}$, %95 $n \geq 4$

Tablo 4.34. ANOVA analizi ile saate göre İNCE A4 kağıt (K1) üzerinde soldurulan SİYAH mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar (K1:80 g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

Yapay soldurma zamanı	İstatistiki olarak anlamlı ölçüde uyumlu mürekkepler ^a	ANOVA sonucu bulunan F değeri ^d	İstatistiki olarak diğerlerinden anlamlı ölçüde farklı olanlar ^a
0 saat	K1S1 ^b , K1S2, K1S3, K1S4	2,82	K1S5
1 saat	K1S2, K1S3, K1S4, K1S5	2,93	K1S1 ^b
2 saat	K1S2, K1S3, K1S4, K1S5	2,52	K1S1 ^b
3 saat	K1S2, K1S3, K1S4, K1S5	1,62	K1S1 ^b
4 saat	K1S1 ^b , K1S2, K1S3, K1S4, K1S5	1,68	—
5 saat	K1S3, K1S4, K1S5	1,35	K1S1 ^b , K1S2 ^c

^a iyon şiddeti oranları açısından istatistiksel uyumlu ve farklı sonuçlar veren mürekkepler, 0-5 saat arası: ^bçok az artış gösterenler, ^canlamlı bir artış göstermeyenler, ^d $F_{deneyse} \leq F_{kritik}$, %95 $n \geq 4$

Tablo 4.35. ANOVA analizi ile saate göre KALIN A4 kağıt (K2) üzerinde soldurulan SİYAH mürekkep türlerine ilişkin karşılaştırmalar (K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

Yapay soldurma zamanı	İstatistiki olarak anlamlı ölçüde uyumlu mürekkepler ^a	ANOVA sonucu bulunan F değeri ^b	İstatistiki olarak diğerlerinden anlamlı ölçüde farklı olanlar ^a
0 saat	K2S1, K2S2, K2S3, K2S5	1,35	K2S4
1 saat	K2S2, K2S3, K2S4, K2S5	1,63	K2S1
2 saat	K2S2, K2S3, K2S4, K2S5	2,85	K2S1
3 saat	K2S2, K2S3, K2S4, K2S5	1,98	K2S1
4 saat	K2S1, K2S2, K2S3, K2S4, K2S5	2,85	—————
5 saat	K2S2, K2S3, K2S4	2,88	K2S1, K2S5

^a iyon şiddeti oranları açısından istatistiksel uyumlu ve farklı sonuçlar veren mürekkepler,

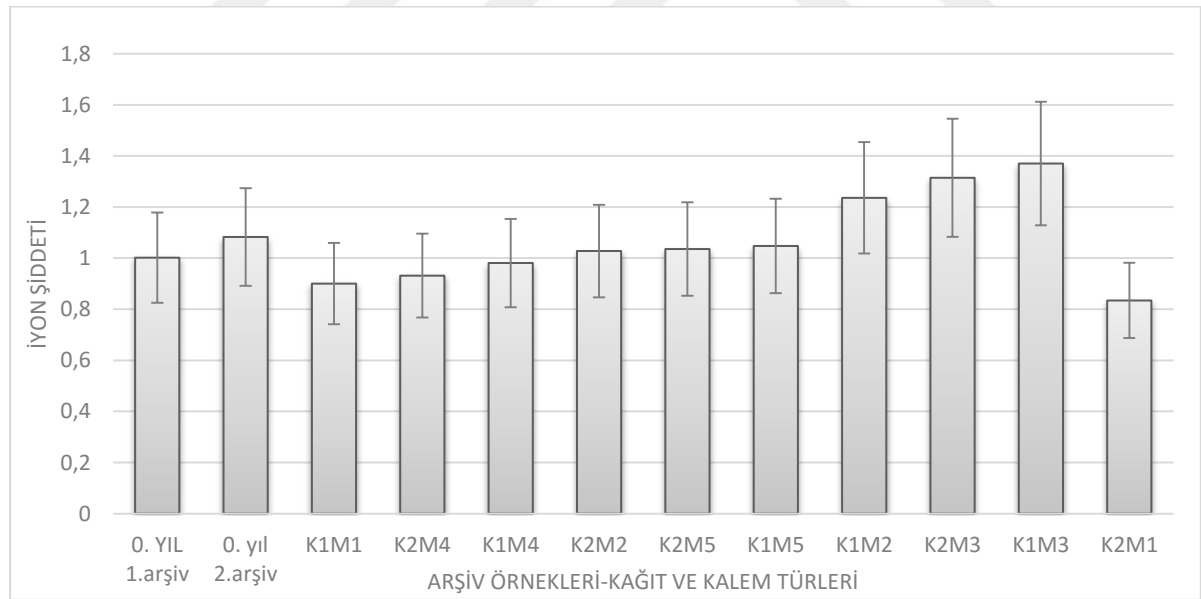
^b $F_{deneysel} \leq F_{kritik}$, %95 $n \geq 4$ (K2S3 için $n=3$)

4.3.4. Doğal Solmanın Gerçekleştiği Belgelerde CV, MV, PR ve VB Değerleri; Geliştirilen Yöntemin Uygulanabilirliği

Yapay soldurma tekniği uygulanan örneklerde zamanla kağıt üzerindeki mürekkep boyar maddelerinin solma oranlarının tespitine yönelik geliştirilen yöntemin gerçeğe uygunluğunun irdelenmesi için biri hukuk bürosu (ortamın nemi 55 ± 8 ve sıcaklığı $23 \pm 2^\circ\text{C}$) biri hastane temizlik kayıt defteri arşivi (ortamın nemi 50 ± 5 ve sıcaklığı $24 \pm 3^\circ\text{C}$) olmak üzere iki ayrı arşivde bulunan belgelerden 1.2 mm'lik panç yardımı ile her yılın Nisan ayına ait mavi ve siyah tükenmez kalemle yazılmış ve aynı belgeden 3'er adet olacak şekilde 0-5 yıllık zaman aralığında toplam 72 adet örnek "Gelişigüzel Örnekleme" yöntemiyle alındı. Alınan herbir numunenin 3 tekrarlı analizi yapıldı. Analiz sonrası elde edilen piklerden, zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen küçük pikler ile metil viyole (MV) iyon şiddeti toplamının kristal viyole (CV) iyon şiddetine oranı temel alınarak hesaplama yapıldı (Tablo 4.36-4.47). Yarı kantitatif ölçüm yapmamız sebebi ile çalışma boyunca kabul edilebilir bağıl standart sapma değeri(%RSD) maksimum %20 olarak belirlendi. (Şekil 4.75-4.86). 2018 yılında arşivlerden alınan belgelerdeki mürekkep örnekleri ile benzer, 80 g/m² (K1) ve 100g/m² (K2) A4 kağıdı üzerindeki farklı bazı mavi ve siyah tükenmez kalem örneklerinin spektrumları Şekil 4.87-4.90 arasında görülmektedir.

Tablo 4.36. 2018 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile soldurma yapılmayan 0. saatteki mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

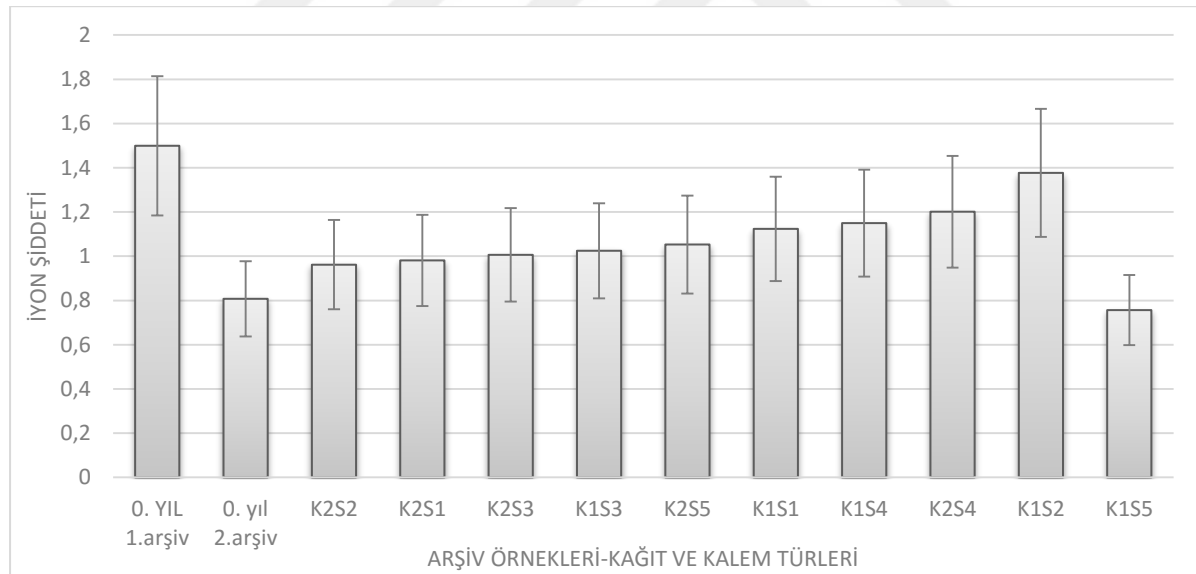
ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Mavi (2018)	1,00	0,09	8,78
Arşiv 2-Mavi (2018)	1,08	0,06	5,47
K1M1	0,90	0,10	11,27
K1M2	1,24	0,10	8,47
K1M3	1,37	0,23	16,94
K1M4	0,98	0,16	16,01
K1M5	1,05	0,08	7,69
K2M1	0,83	0,08	9,42
K2M2	1,03	0,10	10,15
K2M3	1,31	0,12	9,16
K2M4	0,93	0,06	6,39
K2M5	1,04	0,09	8,59



Şekil 4.75. 2018 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin soldurma yapılmayan 0. saatteki mavi tükenmez kalem örnekleri ile kıyaslanması (1.M: 1. Arşiv Mavi Kalem, 2.M: 2. Arşiv Mavi Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision , M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

Tablo 4.37. 2018 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile soldurma yapılmayan 0. saatteki siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Siyah (2018)	1,50	0,21	14,16
Arşiv 2-Siyah (2018)	0,81	0,06	7,36
K1S1	1,12	0,15	13,29
K1S2	1,38	0,23	16,39
K1S3	1,02	0,22	19,18
K1S4	1,15	0,08	6,96
K1S5	0,76	0,17	19,87
K2S1	0,98	0,14	14,61
K2S2	0,96	0,11	11,74
K2S3	1,01	0,09	9,41
K2S4	1,20	0,08	6,36
K2S5	1,05	0,13	11,94

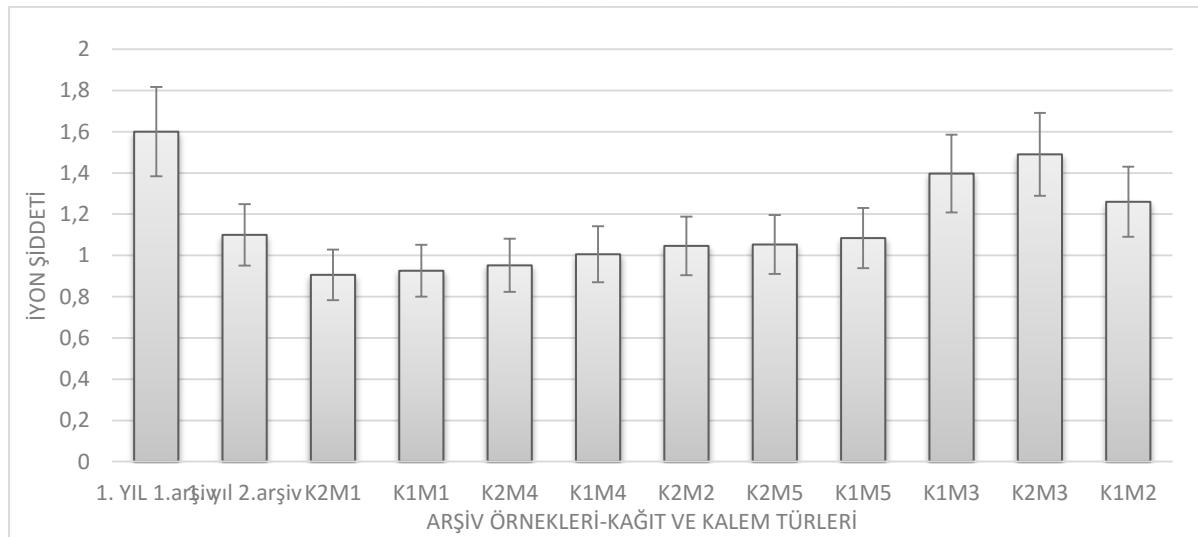


Şekil 4.76. 2018 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin soldurma yapılmayan 0. saatteki siyah tükenmez kalem örnekleri ile kıyaslanması (1.S: 1. Arşiv Siyah Kalem, 2.S: 2. Arşiv Siyah Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

Tablo 4.38. 2017 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 1 saat yapay soldurulan mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB , M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision , M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Mavi (2017)	1,60	0,22	13,52
Arşiv 2-Mavi (2017)	1,10	0,10	8,82
K1M1	0,93	0,07	7,08
K1M2	1,26	0,03	2,30
K1M3	1,40	0,14	9,77
K1M4	1,01	0,09	8,85
K1M5	1,08	0,09	8,49
K2M1	0,91	0,09	9,38
K2M2	1,05	0,13	12,07
K2M3	1,49	0,10	6,91
K2M4	0,95	0,05	4,98
K2M5	1,05	0,11	10,20

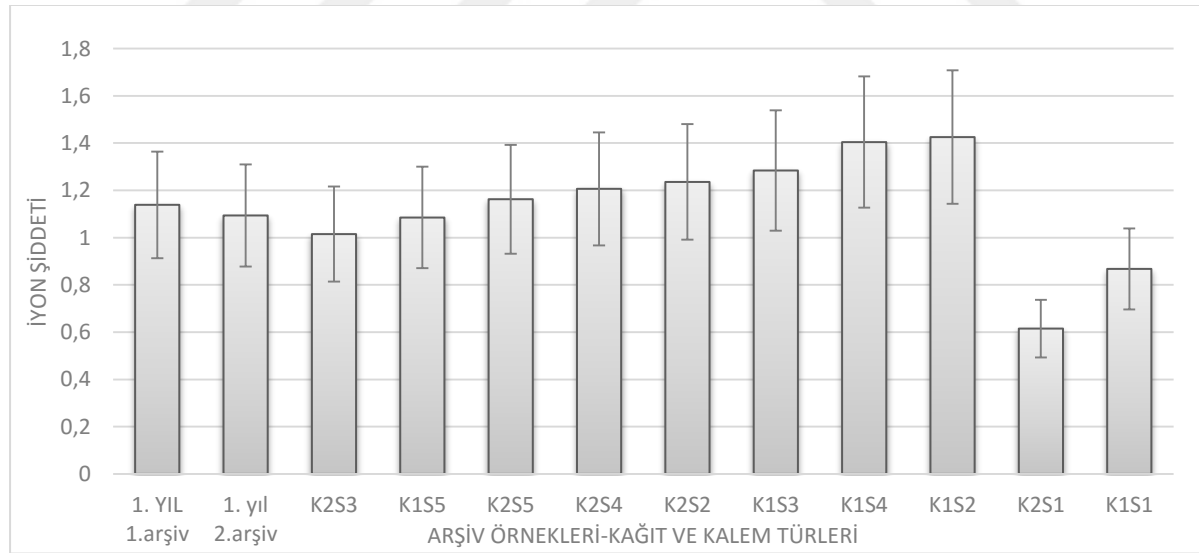
1. YIL 1. arşiv örneğinde Pensan marka mürekkep kullanılmış olabileceği bilinmektedir. Bu örnekteki çizim, M3 kalemlerine yakın çıkmakla birlikte M3 kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapma aralığında sonuç vermiştir.



Şekil 4.77. 2017 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 1 saat yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması (1.M: 1. Arşiv Mavi Kalem, 2.M: 2. Arşiv Mavi Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

Tablo 4.39. 2017 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 1 saat yapay soldurulan siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB , S5:Siyah Bigpoint 930)

ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Siyah (2017)	1,14	0,19	16,63
Arşiv 2-Siyah (2017)	1,09	0,07	6,58
K1S1	0,87	0,17	19,88
K1S2	1,43	0,14	9,80
K1S3	1,28	0,22	17,38
K1S4	1,40	0,18	12,78
K1S5	1,09	0,18	16,40
K2S1	0,62	0,05	8,15
K2S2	1,24	0,24	19,22
K2S3	1,01	0,17	17,14
K2S4	1,21	0,07	6,21
K2S5	1,16	0,13	10,78

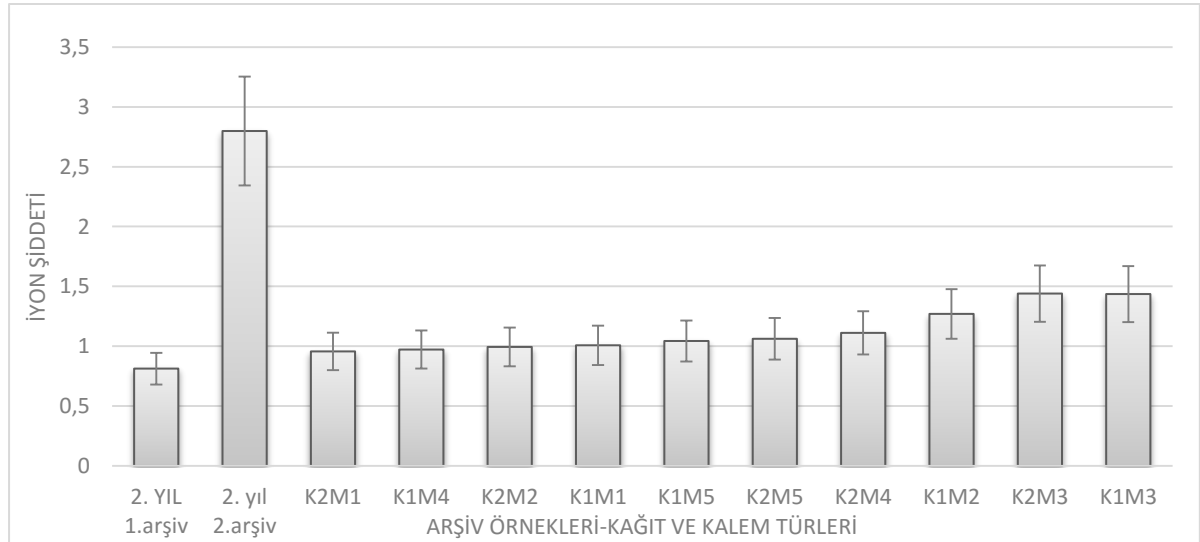


Şekil 4.78. 2017 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 1 saat yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması (1.S: 1. Arşiv Siyah Kalem, 2.S: 2. Arşiv Siyah Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

Tablo 4.40. 2016 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 2 saat yapay soldurulan mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision , M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Mavi (2016)	0,81	0,07	8,36
Arşiv 2-Mavi (2016)	2,80	0,31	11,13
K1M1	1,01	0,06	6,11
K1M2	1,27	0,10	8,11
K1M3	1,44	0,09	6,07
K1M4	0,97	0,07	7,68
K1M5	1,04	0,08	7,40
K2M1	0,96	0,08	8,57
K2M2	0,99	0,07	6,97
K2M3	1,44	0,06	4,28
K2M4	1,11	0,18	16,29
K2M5	1,06	0,07	6,25

2. YIL 2. Mavi örneğinde Pensan marka mürekkep kullanılmış olabileceği bilinmektedir. Bu örnekteki çizim, M3 kalemlerine yakın çıkmakla birlikte M3 kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapmanın dahi üzerine çıkan bir değer vermektedir. Bu da örneğin bir süre güneş ışınına veya yüksek neme maruz kaldığını düşündürmektedir.

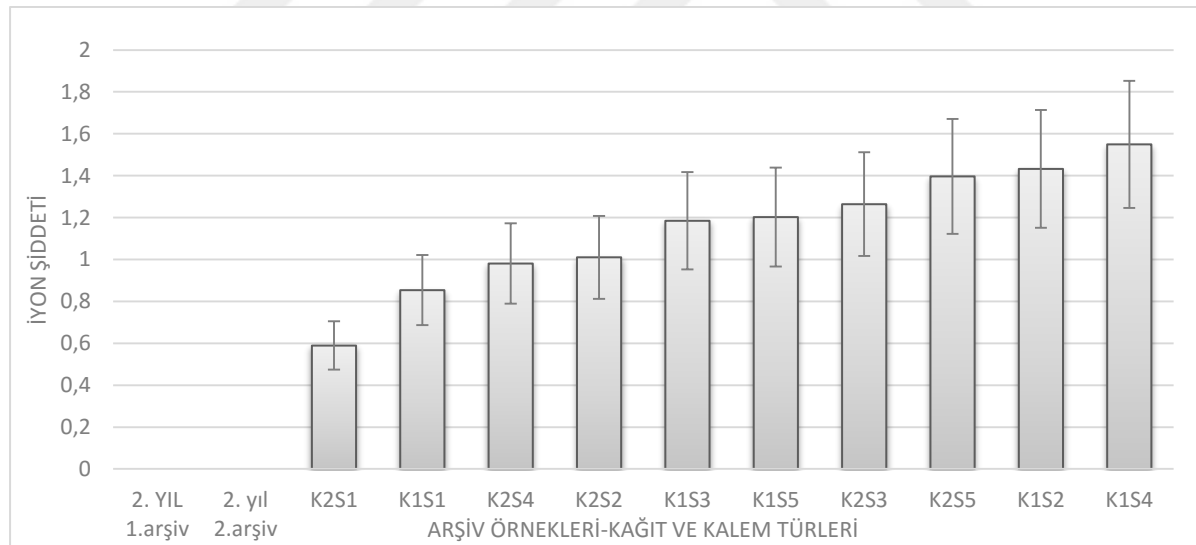


Şekil 4.79. 2016 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 2 saat yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması (I.M: 1. Arşiv Mavi Kalem, 2.M: 2. Arşiv Mavi Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

Tablo 4.41. 2016 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 2 saat yapay soldurulan siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Siyah (2016)	*	*	*
Arşiv 2-Siyah (2016)	*	*	*
K1S1	0,85	0,14	16,96
K1S2	1,43	0,28	19,66
K1S3	1,18	0,12	10,10
K1S4	1,55	0,18	11,33
K1S5	1,20	0,19	15,92
K2S1	0,59	0,11	19,06
K2S2	1,01	0,14	13,68
K2S3	1,26	0,10	8,23
K2S4	0,98	0,15	15,12
K2S5	1,40	0,23	16,70

*Bu yıllara ait arşiv örneği bulunamadığından analizi yapılamamıştır

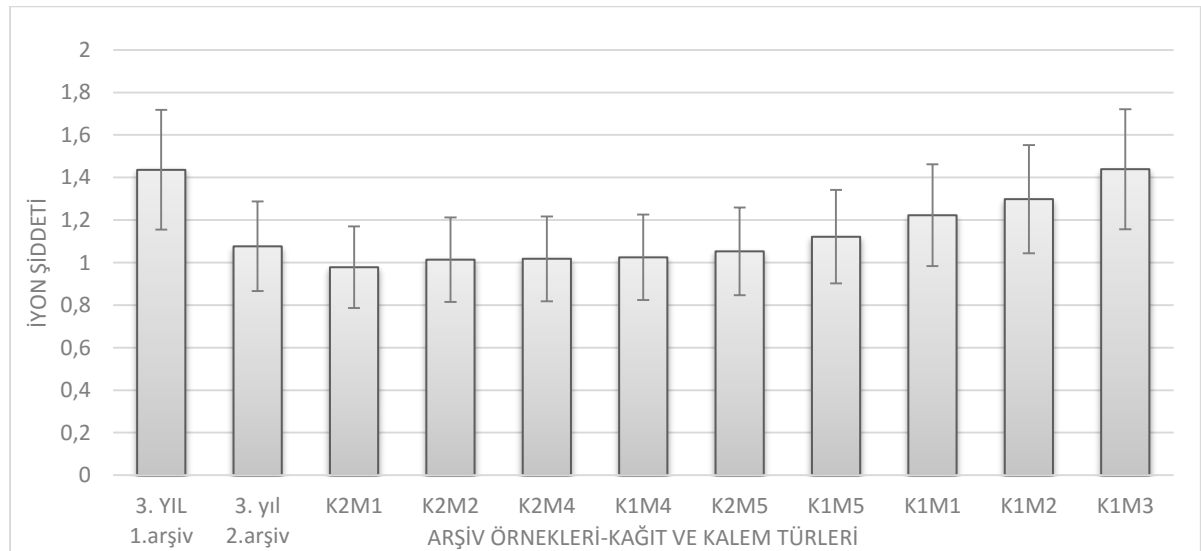


Şekil 4.80. 2016 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış 2 saat yapay soldurulan örneklerin kıyaslanması (Bu yıla ait siyah kaemle yazılmış arşiv bulunamamıştır, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

Tablo 4.42. 2015 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 3 saat yapay soldurulan mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision , M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Mavi (2015)	1,44	0,19	13,08
Arşiv 2-Mavi (2015)	1,08	0,15	13,86
K1M1	1,22	0,20	16,50
K1M2	1,30	0,12	9,45
K1M3	1,44	0,08	5,32
K1M4	1,02	0,11	10,91
K1M5	1,12	0,11	10,01
K2M1	0,98	0,13	13,21
K2M2	1,01	0,20	19,60
K2M3	1,47	0,09	6,07
K2M4	1,02	0,14	13,80
K2M5	1,05	0,10	9,11

3. YIL 1. Mavi örneğinde Pensan marka mürekkep kullanılmış olabileceği bilinmektedir. Bu örnekteki çizim, M3 kalemleriyle birebir aynı çıkmakla birlikte M3 kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapma aralığında sonuç vermiştir.

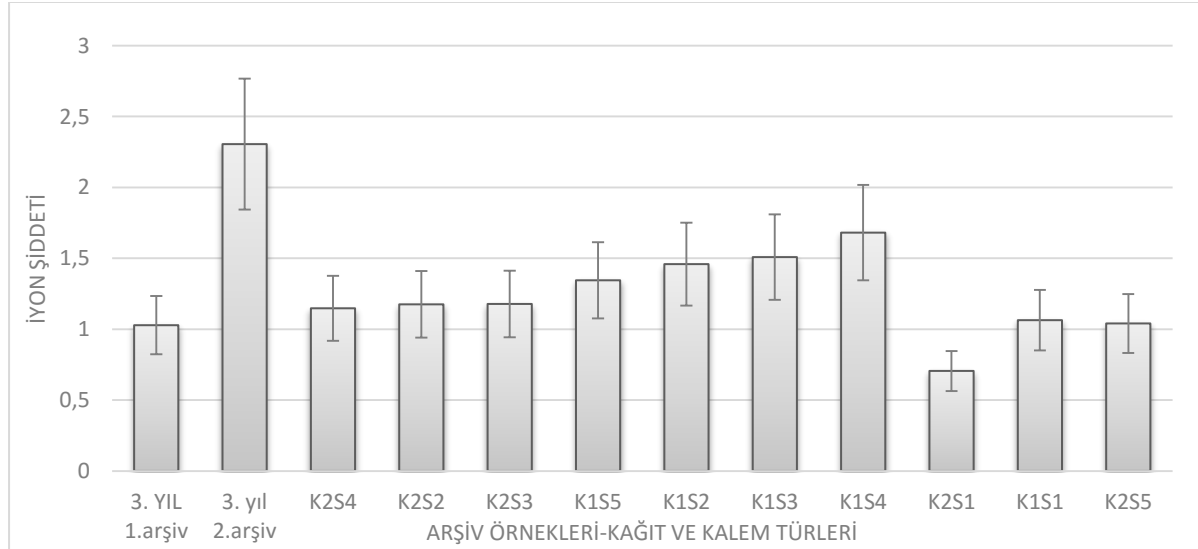


Şekil 4.81. 2015 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 3 saat yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması (1.M: 1. Arşiv Mavi Kalem, 2.M: 2. Arşiv Mavi Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

Tablo 4.43. 2015 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 3 saat yapay soldurulan siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Siyah (2015)	1,03	0,15	14,75
Arşiv 2-Siyah (2015)	2,31	0,22	9,37
K1S1	1,06	0,20	18,99
K1S2	1,46	0,23	15,84
K1S3	1,51	0,20	13,58
K1S4	1,68	0,13	7,96
K1S5	1,34	0,21	15,72
K2S1	0,71	0,14	19,27
K2S2	1,18	0,17	14,82
K2S3	1,18	0,16	13,38
K2S4	1,15	0,15	13,08
K2S5	1,04	0,15	14,89

3. Yıl 2. Siyah kalem arşiv örneğindeki çizim, tüm siyah kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapmalarının dahi üzerine çıkan bir değer vermektedir. Bu da örneğin bir süre güneş ışınına veya yüksek neme maruz kaldığını düşündürmektedir.

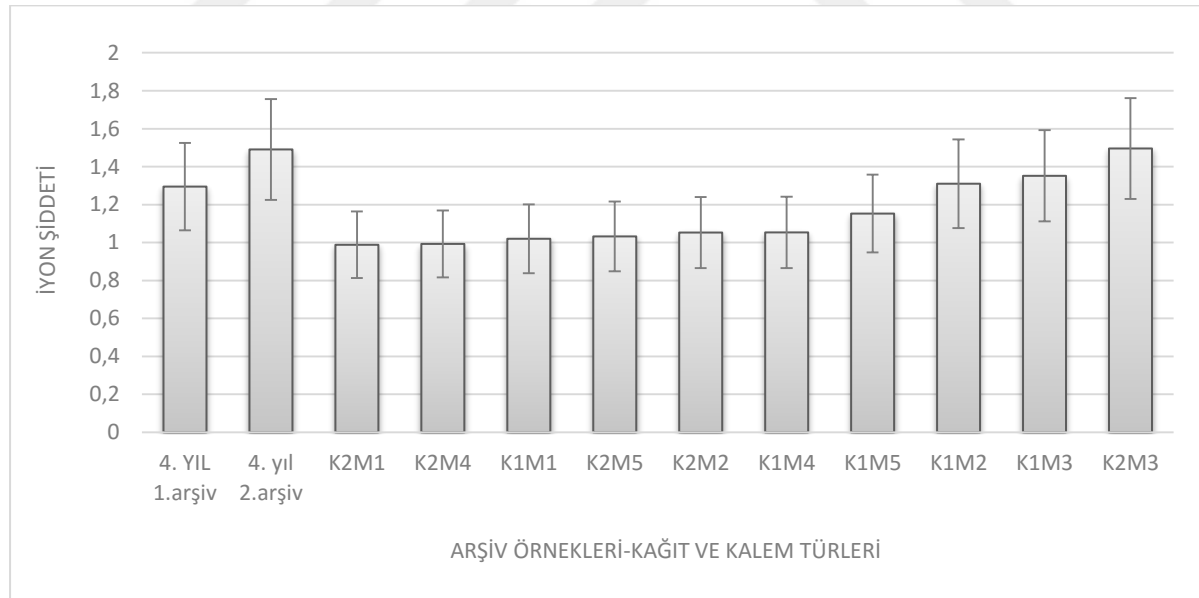


Şekil 4.82. 2015 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 3 saat yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması (1.S: 1. Arşiv Siyah Kalem, 2.S: 2. Arşiv Siyah Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

Tablo 4.44. 2014 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 4 saat yapay soldurulan mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision , M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Mavi (2014)	1,29	0,23	17,80
Arşiv 2-Mavi (2014)	1,49	0,11	7,70
K1M1	1,02	0,08	7,77
K1M2	1,31	0,18	13,74
K1M3	1,35	0,10	7,69
K1M4	1,05	0,10	9,44
K1M5	1,15	0,12	10,12
K2M1	0,99	0,07	6,91
K2M2	1,05	0,10	9,49
K2M3	1,50	0,19	12,44
K2M4	0,99	0,11	11,42
K2M5	1,03	0,10	9,81

4. YIL 2. Mavi örneğinde Pensan marka mürekkep kullanılmış olabileceği bilinmektedir. Bu örnekteki çizim, M3 kalemleriyle örtüşmekte olup M3 kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapma aralığında sonuç vermiştir.

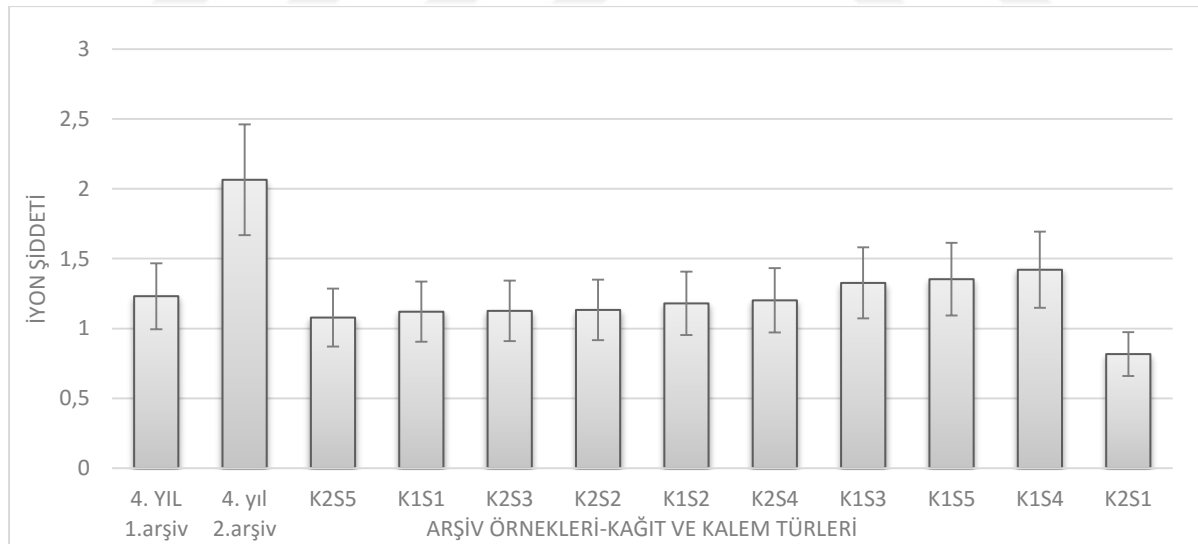


Şekil 4.83. 2014 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 4 saat yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması (1.M: 1. Arşiv Mavi Kalem, 2.M: 2. Arşiv Mavi Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

Tablo 4.45. 2014 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 4 saat yapay soldurulan siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Siyah (2014)	1,23	0,21	16,73
Arşiv 2-Siyah (2014)	2,06	0,31	15,16
K1S1	1,12	0,11	9,56
K1S2	1,18	0,18	15,19
K1S3	1,33	0,17	13,17
K1S4	1,42	0,27	18,80
K1S5	1,35	0,24	18,04
K2S1	0,82	0,15	18,68
K2S2	1,13	0,04	3,66
K2S3	1,13	0,13	11,69
K2S4	1,20	0,23	19,23
K2S5	1,08	0,11	10,59

4. YIL 2. Siyah kalem arşiv örneğindeki çizim, 4. yıla ilişkin tüm siyah kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapmalarının dahi üzerine çıkan bir değer vermektedir. Bu da örneğin bir süre güneş ışınına maruz kaldığını düşündürmektedir.

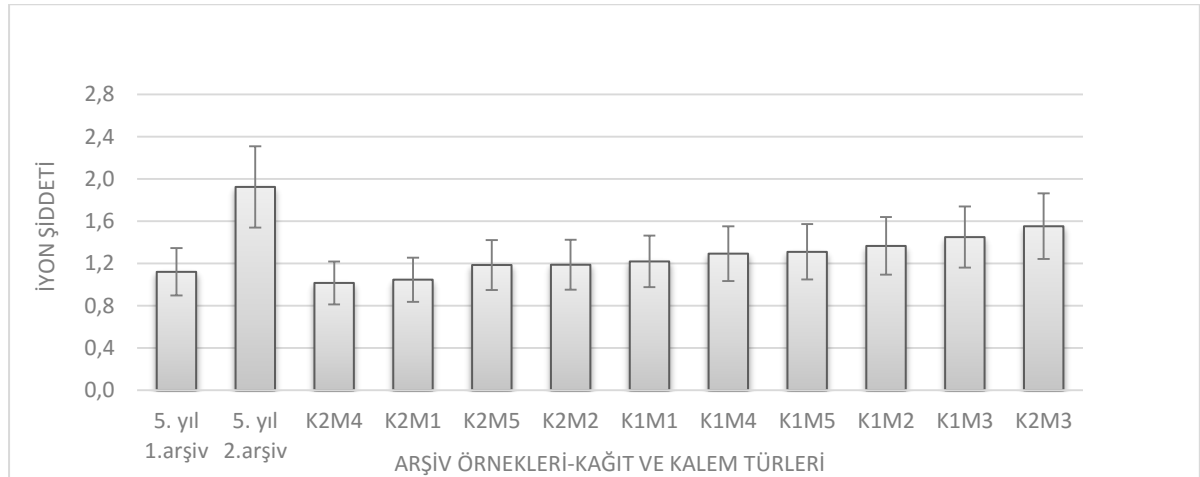


Şekil 4.84. 2014 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 4 saat yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması (1.S: 1. Arşiv Siyah Kalem, 2.S: 2. Arşiv Siyah Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

Tablo 4.46. 2013 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 5 saat yapay soldurulan mavi renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Mavi (2013)	1,10	0,17	15,35
Arşiv 2-Mavi (2013)	1,90	0,15	7,94
K1M1	1,20	0,06	5,06
K1M2	1,40	0,11	8,03
K1M3	1,40	0,06	3,88
K1M4	1,30	0,08	5,99
K1M5	1,30	0,14	10,59
K2M1	1,00	0,09	8,93
K2M2	1,20	0,17	14,42
K2M3	1,55	0,17	10,68
K2M4	1,00	0,14	13,88
K2M5	1,20	0,04	3,11

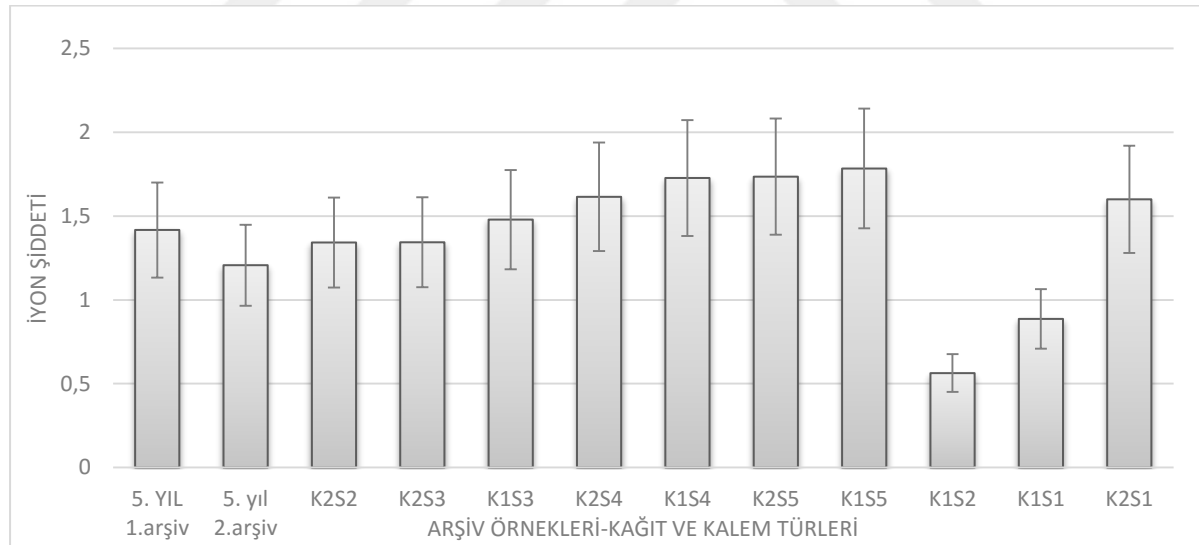
5. YIL 2. Mavi örneğinde Pensan marka mürekkep kullanılmış olabileceği bilinmektedir. Bu örnekteki çizim, en yüksek orana sahip M3 kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapmanın dahi üzerine çıkan bir değer ermektedir. Bu da örneğin güneş ışınına veya yüksek neme maruz kaldığını düşündürmektedir.



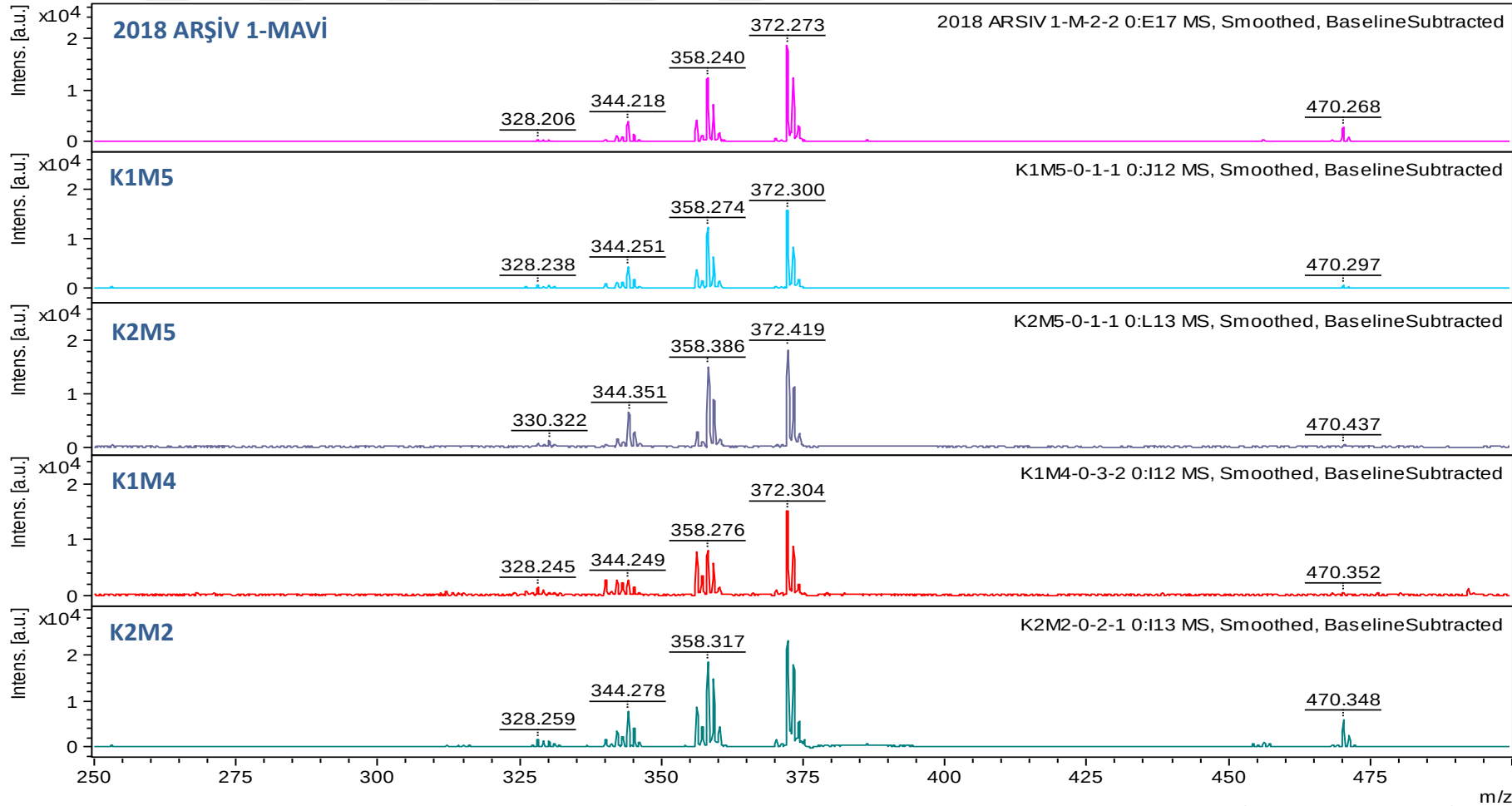
Şekil 4.85. 2013 yılına ait mavi tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 5 saat yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması (1.M: 1. Arşiv Mavi Kalem, 2.M: 2. Arşiv Mavi Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision, M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)

Tablo 4.47. 2013 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örnekleri ile 5 saat yapay soldurulan siyah renkli tükenmez kalem mürekkeplerinin iyon şiddeti, standart sapma ve %RSD değerleri (Arşiv 1: Hastane Arşivi, Arşiv 2: Hukuk Bürosu Arşivi, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)

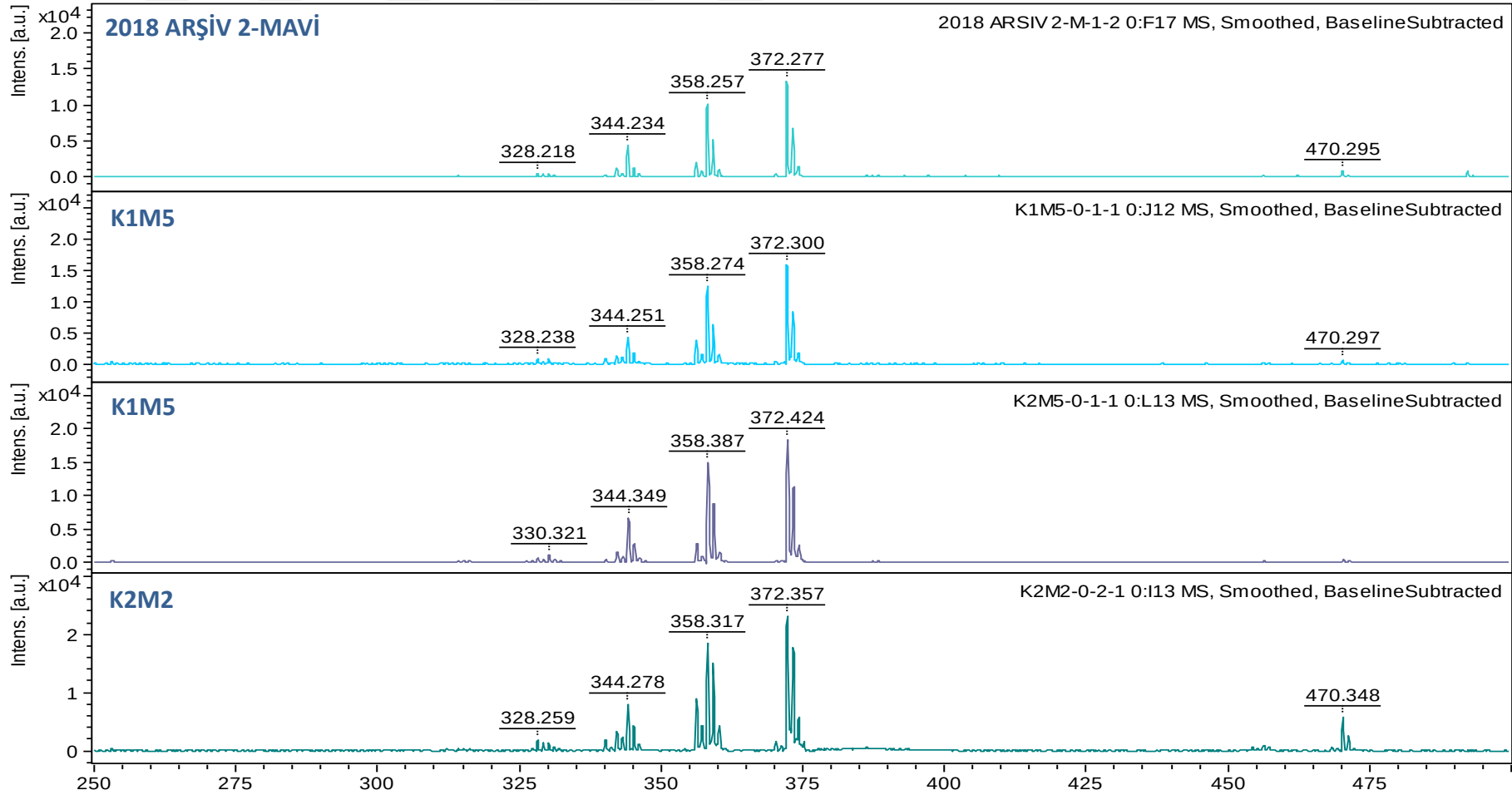
ÖRNEK	İYON ŞİDDETİ	STANDART SAPMA	%RSD
Arşiv 1-Siyah (2013)	1,42	0,16	11,19
Arşiv 2-Siyah (2013)	1,21	0,17	13,82
K1S1	0,89	0,14	15,31
K1S2	0,56	0,10	18,14
K1S3	1,48	0,30	20,17
K1S4	1,73	0,09	5,34
K1S5	1,78	0,34	19,21
K2S1	1,60	0,28	17,58
K2S2	1,34	0,17	12,36
K2S3	1,34	0,15	10,98
K2S4	1,62	0,28	17,25
K2S5	1,74	0,30	17,34



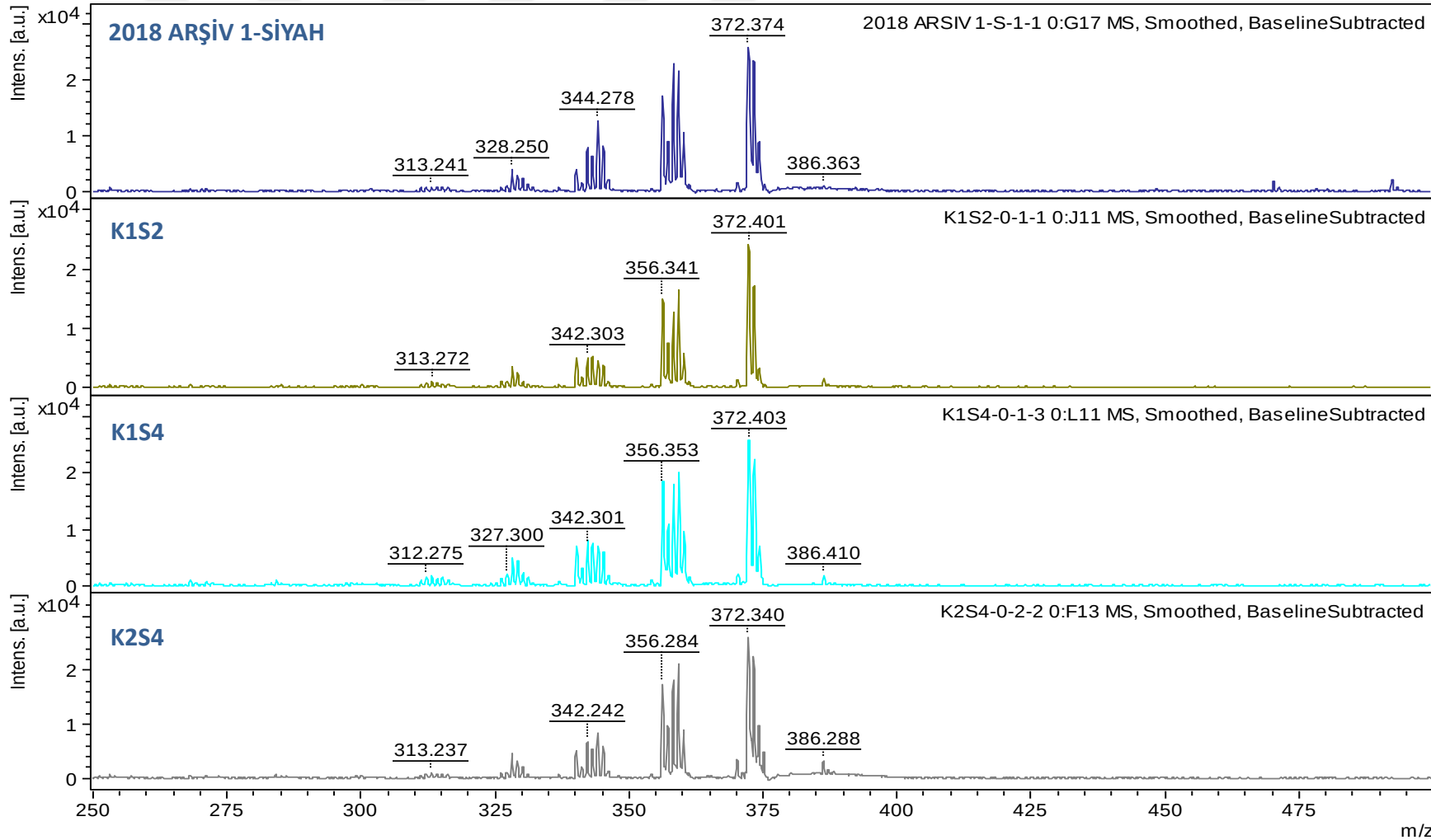
Şekil 4.86. 2013 yılına ait siyah tükenmez kalemle yazılmış arşiv örneklerinin 5 saat yapay soldurulan örneklerle kıyaslanması (1.S: 1. Arşiv Siyah Kalem, 2.S: 2. Arşiv Siyah Kalem, K1:80g/m², K2:100g/m² A4 fotokopi kağıdı, S1:Siyah Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm, S2:Siyah Faber Castell Speedx10 1.0 mm, S3:Siyah Art Ballpoint Pen 1.0 mm, S4:Siyah Schneider Slider Edge XB, S5:Siyah Bigpoint 930)



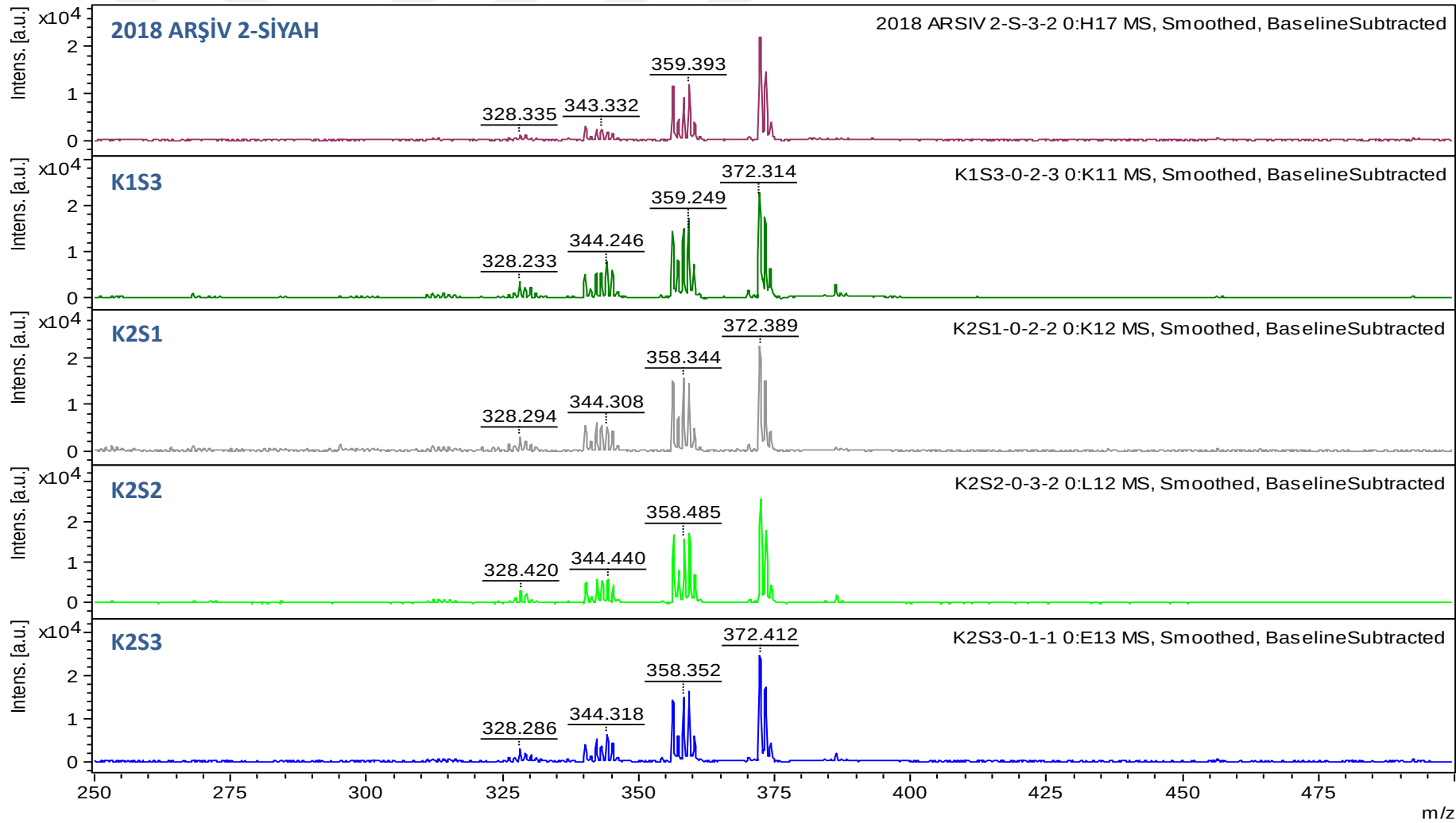
Şekil 4.87. Arşiv 1’den alınan 0. yıldıki mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (2018 ARSIV 1-M) 80 g/m² (K1) ve 100 g/m² (K2) A4 fotokopi kağıdına uygulanmış Noki wonder Ball (M4), Bigpoint 932 (M5), Schneider Slider Edge XB (M2) marka mavi renk tükenmez kalem mürekkeplerinin 0. saatteki spektrumu ile karşılaştırılması



Şekil 4.88. Arşiv 2'den alınan 0. yıldaki mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (2018 ARSIV 2-M) 80 g/m² (K1) ve 100 g/m² (K2) A4 fotokopi kağıdına uygulanmış *Schneider Slider Edge XB* (M2), *Bigpoint 932* (M5) marka mavi renk tükenmez kalem mürekkeplerinin 0. saatteki spektrumu ile karşılaştırılması



Şekil 4.89. Arşiv 1’den alınan 0. yıldaki siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (2018 ARSIV 1-S) 80 g/m² (K1) ve 100 g/m² (K2) A4 fotokopi kağıdına uygulanmış *Faber Castell Speedx10 1.0 mm* (S2), *Schneider Slider Edge XB* (S4) marka siyah renk tükenmez kalem mürekkeplerinin 0. saatteki spektrumu ile karşılaştırılması



Şekil 4.90. Arşiv 1'den alınan 0. yıldaki siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (2018 ARSIV 2-S) 80 g/m² (K1) ve 100 g/m² (K2) A4 fotokopi kağıdına uygulanmış Pensan MV-Pen Vision 1.0 mm (S1), Faber Castell Speedx10 1.0 mm (S2), Art Ballpoint Pen 1.0 mm (S3) marka siyah renk tükenmez kalem mürekkeplerinin 0. saatteki spektrumu ile karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Belge sahteciliği ile ilgili suçlar günümüzde yargı sistemini en çok meşgul eden suç türlerindendir. Hakim veya savcıların bilirkişiliğe başvurduğu konuların başında, belgeyi düzenleyen kim olduğu ya da belgedeki imzanın kime ait olduğu, aynı veya farklı belge üzerindeki mürekkeplerin tespiti ve ayrıştırılması, belge üzerine mürekkebin ne zaman tatbik edildiği ve bu mürekkebin bulunduğu ortamdan nasıl ve ne derece etkilendiği soruları gelmektedir. Bu soruların cevaplanmasında, belge inceleme uzmanlarının karşılaştıkları sorunları aydınlatabilmeye yönelik yaptığımız çalışmamızın bulgularının literatürle tartışıldığı bu kısmı çalışmanın bütünlüğüne uygun olarak; genetik inceleme, mikrobiyolojik inceleme ve tükenmez kalem mürekkebi içerisindeki boyar maddelerin moleküler dönüşümlerinin incelenmesi şeklinde üç alt başlık altında toplandı.

a) Genetik İnceleme Aşaması

Hakim veya savcıların bilirkişiliğe başvurduğu konuların başında; tehdit mektupları, fidye mektupları, anonim notlar gibi özel veya resmi bir belgeyi düzenleyen kim olduğu ya da belgedeki imzanın kime ait olduğu soruları gelmektedir. Bu sorular, el yazısıyla yazılmış veya imzalanmış belge yüzeyine, dokunma yolu ile transfer edilen epitel hücrelerden, DNA elde etmek ve adli belge üzerinde kimliklendirme yapabilmek suretiyle cevaplandırılabilir [8,107]. Temas sonucu yüzeye bırakılan epitel hücreler, DNA içeren diğer biyolojik deliller gibi bulunduğu nesne üzerinden uygun koşullarda alınıp delil teslim zinciri içerisinde analizi yapılacak laboratuvara ulaştırılarak, olay-suçlu arasında ilişki kurulması sağlanabilmektedir. Kötü çevresel koşullarda bekletilmiş veya aşırı derecede bozulmuş delillerden DNA'nın, farklı tipteki belge yüzeylerinden tiplendirilmesinde sorunlar yaşanmaktadır. Kişinin imzasının taklidinde kişi belgeyi hiç görmediğini belirttiğinde, belgeden DNA analizi bu belgeye kişinin dokunup dokunmadığı sorusunun cevabını verebilir. Aynı kalem ile aynı anda yazılmış şüpheli yazıların analizinde zaman farkı ve kalem farkı bulunmayacağından kişinin DNA analizi diğer bulgularla değerlendirilip konu aydınlatılabilir. Bu durum bizim çalışmamızın en önemli kısımlarındandır ve mukayeseye elverişli DNA'ya ulaşılabildiği durumlarda elde edilen başarı yadsınamayacak kadar fazladır. Konu ile ilgili çalışmalar yurt dışında uygulanmakta olup ülkemizde de çalışılmaya başlanmıştır.

Literatürde; cam, kumaş, ahşap, kağıt vb. gibi olay yerinde bulunabilecek farklı yüzeyler üzerindeki parmak izi örneklerinden DNA elde edilmesine dair çalışmalar

bulunmaktadır [199]. Bu çalışmalarda DNA transferinin, nesne ile ilk temas sırasında gerçekleştiği kaydedilmiştir [200]. Yüzeyin pürüzlü bir yapıya sahip olması, DNA'nın o bölgede daha fazla varlığını göstermesi anlamına gelmektedir. Parmak izinden ya da epitel hücreden özellikle pürüzlü yapıya sahip olmayan kağıt yüzey üzerinden DNA elde etme teknikleri, rutinde kullanılan tekniklerden daha farklı ve hassastır [201]. Çünkü belge üzerinden elde edilen DNA miktarı diğer rutin çalışmalara göre yok denebilecek kadar az olup, elde edilen DNA degradedir. Degrade ve eser miktarda DNA ile çalışılırken, DNA içeren örneğin toplanmasında, laboratuvarında analiz aşamasında ve sonuçların yorumlanmasında farklı stratejilerin kullanılması gerektiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [133].

Belge üzerine bırakılan el sürüntüsü örnekleri ile birlikte kontrol amaçlı mukayese yapabilmek ve çalışmanın başarı oranını belirleyebilmek için aynı kişiye ait ağız içi sürüntü örnekleri de kullanılmıştır. Belgeye temas süresinin, farklı yüzey tipindeki belgelerin ve belgenin saklandığı koşulun; teması gerçekleştiren kişinin cinsiyeti, yaşı, kullandığı kozmetik ürünler, epitelyum vericiliği, bireysel ve çevresel şartlar elde edilen DNA miktarını ve kalitesini etkilediği bilindiğinden analizler yapılırken bu parametreler de dikkate alınmıştır [202]. Yüzey yapısının, transfer edilen DNA'nın aktarılan yüzey üzerinde kalıcılığını etkilediği bilindiğinden çalışmamızda farklı tiplerde kağıt örneği kullanılmıştır ve hedef DNA kaynağımız epitel hücredir. Magazin kağıdı, çek tipi senet kağıdı, 80g/m² ve 100g/m² A4 fotokopi kağıdı olmak üzere 4 farklı kağıt yüzeyden; herhangi bir tahribat yapmadan normal swap, yeni nesil swap, mikroskop altında epitel hücre toplama yöntemleri ve bası izinin uygulandığı bölgenin 3 mm'lik panç yardımı ile kesilerek doğrudan izolasyonda kullanılması yöntemi olmak üzere 4 farklı yöntemle toplanan epitel hücrelerden saf ve miktarı fazla DNA elde edebilmek için silika temelli DNA izolasyon işlemi kullanıldı. Toplanan sürüntü ve kesit örneklerinden, izolasyon işlemi sonrasında elde edilen DNA izolasyonunun başarısını gözlemlemek için, izolatlar %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Çekitlenen DNA'lar saflaştırıldı ve insana özgü primerler içeren 3 farklı STR kiti kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. ABI 3130 kapiler elektroforez sisteminde analizlenen PCR ürünleri Genemapper IDx yazılım programı kullanılarak genotiplendirildi.

İlk deneysel çalışmalarda Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürü ile 3 mm çaplı kağıt kesidinin doğrudan izole edildiği örnekler hariç, beklenen kalitede (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) ve miktarda DNA elde edilemedi. Ölçülen DNA

miktarları PCR için gerekli konsantrasyondan düşük ($\min \geq 0.05 \text{ ng}/\mu\text{l}$ olmalı) ve çalışmadaki amacımız kağıda fiziksel bir zarar vermeden yöntem optimizasyonu sağlamak olduğundan kağıdın kesilmesi ile elde edilen DNA miktarları yok sayılarak izolasyon kiti prosedürü çalışmaya uygun olarak modifiye edildi. Modifikasyon işleminde degrade örneklerden DNA elde etmede başarı yüzdesini arttıran DDT ve PBS nin ayrı ayrı uygulanması ile elde edilen izolatlar içerisindeki DNA miktarları kıyaslandığında; DDT'nin kullanıldığı modifiye Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kit Prosedürünün uygulandığı örneklerden PBS'ye oranla miktarı daha yüksek DNA elde edildiği Tablo 4.2'de görülmektedir. DDT'nin kullanıldığı modifiye izolasyon prosedüründe elde edilen DNA miktarları $0.42\text{-}1.89 \text{ ng}/\mu\text{L}$ aralığında değişmektedir.

Kullanılan kağıt yüzeyleri açısından elde edilen DNA miktarlarının çokluğu kıyaslandığında sırası ile magazin kağıdı $>100 \text{ g}/\text{m}^2$ A4 fotokopi kağıdı $>80 \text{ g}/\text{m}^2$ A4 fotokopi kağıdı $>$ çek tipi senet kağıdı şeklindedir. Bulgularımız literatürle uyum göstermektedir [9]. Yüzeyden hücreleri toplama yöntemleri ve kullanılan başlangıç materyali açısından kıyaslandığında ise DNA miktarları çokluğu, sırayla; basının uygulandığı bölgenin 3 mm kesilerek kullanılması $>$ yeni nesil svabla yüzeyden epitel hücre toplama $>$ mikroskop altında epitel hücre toplama $>$ normal svabla yüzeyden epitel hücre toplama şeklindedir. PCR öncesinde DNA'nın miktar ve kalitesini arttırmak için yapılan saflaştırma işlemi sonrasında Tablo 4.3'te görüldüğü gibi DNA miktarlarında ciddi bir artış tespit edildi. Saflaştırma öncesinde elde edilen DNA miktarı $0.42\text{-}2.17 \text{ ng}/\mu\text{l}$ aralığında değişmekte iken saflaştırma sonra bu miktarlar $0.59\text{-}3.28 \text{ ng}/\mu\text{l}$ aralığında seyretmiştir.

Geliştirilen izolasyon ve DNA saflaştırma yöntemine göre AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Kiti (Tablo 4.6), AmpFlSTR® IdentiFiler™ PCR Kiti (Tablo 4.7), AmpFlSTR® GlobalFiler™ PCR Kiti (Tablo 4.8) ile yapılan PCR analizlerinde magazin kağıdından alınan sürüntü örneğinde mukayeseye elverişli profil elde edilirken; çek tipi senet kağıdı, $80 \text{ g}/\text{m}^2$ A4 fotokopi kağıdı, $100 \text{ g}/\text{m}^2$ A4 fotokopi kağıdı örneklerinde mukayeseye elverişli olmayan kısmi profil elde edildiği gözlemlendi. Çalışmanın başından itibaren iç kontrol amacı ile kullanılan negatif kontrollerde herhangi bir çoğalma gözlemlenmedi. Pozitif kontroller ise kitlerde verilen genotipi bilinen profillerle karşılaştırılarak örneklerin analizi öncesinde doğrulandı.

Kullanılan PCR kitlerinin başarı yüzdesi her bir kit için her örnekte; [(güvenilir lokus sayısı/ kitte mevcut lokus sayısı) x 100] formülü kullanılarak hesaplandı (Tablo 4.9).

Kitlerin başarı yüzdelerinin ortalamaları MiniFiler %33,3; Identifiler %39,5; Globalfiler; %54,6 olarak belirlendi. Lokuslarda görülen alellere ait piklerde pik dengesizlikleri olan ve 30 RFU'dan küçük olan lokuslar güven aralığı dışında bırakılarak hesaplamaya dahil edilmedi.

Çalışmamızda araştırmacı dahil dört kişinin katıldığı ve madde 3.1.15-I' de belirtilen şekilde hazırlanan temas izlerinden alınan ve bekletilmeden taze olarak aynı gün içerisinde geliştirilen yöntemin uygulandığı analiz edilen örneklerle bakacak olursak; yüzey olarak magazin kağıdının kullanıldığı örneklerden DNA ve mukayeseye elverişli profil elde etmede başarı oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.10, Tablo 4.11 ve Tablo 4.12). Sewell, J. ve ark.'nın gazete, dergi ve filtre kağıdı gibi pürüzlü kağıt yüzeylerden "DNeasy Plant Mini Kit" DNA izolasyon kiti kullanarak yaptığı çalışmada, DNA'nın geri kazanımında A4 ofis kağıdına kıyasla daha başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir [107].

Genellikle çekmece içerisinde, karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiş araştırmacıya ait günlükten ve birden fazla kişinin imzası bulunan arşiv belgelerinden aynı gün içinde oluşturulmuş 1 günlük, 1 haftalık, 1 aylık, 3 aylık, 6 aylık, 1 senelik, 2 senelik, 5 senelik ve 10 senelik kağıt yüzeylerden alınan sürüntülere geliştirdiğimiz yöntem uygulandı. 1 günlük, 1 haftalık, 1 aylık ve 3 aylık günlüğe ait kağıt yüzeylerden alınan örneklerden DNA elde edilmiş olup 1 günlük örnekte mukayeseye elverişli profil saptanırken; 1 haftalık, 1 aylık ve 3 aylık örneklerden kısmi profil elde edilebilmiştir. Arşivden alınan örneklerin analizi sonucu ise 1 günlük örnekte mukayeseye elverişli miks profil elde edilirken; 1 haftalık, 1 aylık ve 3 aylık örneklerden kısmi miks profil elde edilebilmiştir. Genel olarak bulgulara bakıldığında sıklıkla 1 günlük örneklerde AmpFlSTR® GlobalFiler™ PCR Kiti lokusları, 1 haftalık örneklerde AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Kiti lokusları, 1 aylık örneklerde AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Kiti lokusları gözlenmektedir. Arşivden alınan örneklerde belge üzerinde imzası bulunan kişilerin referans örnek olarak profilleri elimizde olmadığından kısmi miks profil elde edilen sonuçlar mukayese edilememiştir.

Belge bütünlüğüne zarar veren bir yöntem olan kesme yöntemi ile örnek toplanan çalışmalar [108], kesilen bölgedeki hücrelerin tamamının izolasyon tüpüne aktarılabilmesi, svapla ise yüzeyde varolan tüm hücrelerin alınamamasından ötürü daha başarılı sonuçlar elde edildiğini göstermektedir. Belge yüzeyinde DNA incelemelerinde öncül amaç belgeye hasar vermemek olduğundan çalışmamızda geliştirdiğimiz yöntem, kesme yöntemiyle daha

fazla miktarda ve kalitede DNA elde etmemize rağmen, swap ile epitel hücre toplanmasını temel almaktadır.

Temas edilen yüzeyden epitel hücrenin ne şekilde toplandığı DNA analizini etkilemektedir [8,203]. Literatürde, belgeye zarar vermeden kağıt yüzey üzerinden selüloz liflerine tutunan epitel hücrelerin toplanma yöntemine dair yapışkan bantın, ıslak/kuru veya kuru/kuru çift swap tekniğinin kullanıldığı bir çok çalışma yapılmış olup başarılı sonuçlar elde edilmiştir. DNA örneğinin farklı yöntemlerle toplandığı çalışmalarda; distile su ile ıslatılmış swapla toplanan örneğin kuru swapla toplanan örnekten miktarda daha fazla olduğu ve profillemeye mukayeseye elverişli aleller tespit edildiği bildirilmiştir.

Parsons ve ark. (2016) yazı yazma sırasında kağıda en çok temas edilen bölgelerden, kağıt yüzeydeki hangi bölgede daha fazla miktarda DNA bulunduğunu ve belge inceleme uzmanlarının sıklıkla kullandığı ESDA (Electrostatic Detection Apparatus, Elektrostatik Tespit Cihazı), mürekkep veya kağıdın yapı farklılıklarının araştırıldığı VSC500 ve UV ışık altında inceleme tekniklerine tabi tutulan belgelerden elde edilen DNA' nın bu işlemlerden etkilenip etkilenmediğini araştırmak amacı ile belgelerden hangisinde DNA geri kazanımının fazla olduğu ile ilgili bir çalışma yapmışlardır [203]. Yapmış oldukları çalışmada kağıt yüzeyden DNA içeren hücreler ıslak/kuru çift swap yöntemi kullanılarak toplanmıştır. Alınan sürüntü örneklerinden DNA izolasyonu sağlık açısından riskli ve toksik etkisi olan fenol/kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonra Microcon Ultracel YM-100TM filtreler kullanılarak DNA saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatlar AmpF1STR SGM PlusTM Kit (Life TechnologiesTM) PCR kiti kullanılarak çoğaltılmış ve ABI 3130 Genetic Analizör (Life TechnologiesTM) cihazında genotiplendirilmiştir. Çalışma bulguları; kağıt yüzeyden çift swap yöntemiyle kağıdı kesmeye gerek kalmaksızın mukayeseye elverişli DNA profili elde edilebileceğini, yazı yazıldıktan sonra katlanan kağıtların katlama hatlarında daha fazla DNA içeren hücre depolandığını, katlamanın olmadığı düz belgelerde kenar boşluklarında ve kağıdın merkezinde daha fazla DNA biriktiğini, aynı kağıda aynı süre ile temas edilse bile bırakılan DNA miktarının kişiden kişiye farklılık gösterdiği ve kağıt-mürekkep inceleme çalışmalarında ESDA tekniğinin DNA geri kazanımını en az oranda etkilediğini göstermektedir.

Plaza ve ark.'nın 6 farklı kalitedeki kağıt (dergi, magazin, banknot, fotokopi, gazete, not defteri kağıdı) üzerine bası uygulanarak bırakılan parmak izlerinden 3 farklı yöntemle DNA örneği toplandığı (ESDA ile parmak izlerinin görünürleştirilmesi, kuru sürüntü çubuğu ile örnek toplanması, kağıdın bası uygulanan yerinin direk kesilmesi)

çalışmada izolasyon Qiagen EZ1 DNA Investigator Kit ile gerçekleştirilmiş olup ve Vivacon 500–30 K kolon ile, izole edilen DNA saflaştırılmıştır [9]. Bizimde çalışmamızın yöntem geliştirme aşamasında kullandığımız AmpFISTR Identifiler Plus PCR Kiti ile saflaştırılan DNA’lar amplifiye edilmiş ve ABI 3130 cihazında tiplendirilmiştir. Çalışma bulgularına göre belge yüzeyinden, kağıt veya mürekkep analizine ilişkin analitik veya optik yöntemlerle incelenmeden önce biyolojik delillerin kaybolmaması ve kontaminasyonu önlemek için öncelikle DNA örneklerinin toplanması gerekmektedir. ESDA yöntemi kullanılarak belge üzerindeki parmak izlerinin görünürleştirilip, yerinin belirlenmesi ve bunun akabinde swap ile DNA’ nın toplanması; referans profille mukayese edilebilir DNA profili elde edilmesini ve identifikasyonda başarı oranını arttırmaktadır. Bu çalışmada cihazda yürütme sonrası 50 RFU’nun üzerinde pik gösteren aleller değerlendirmeye alınırken, bizim çalışmamızda örnek hazırlama aşamasında parmak uçları ile bası uygulanmayıp, temas ederek yüzeye bırakılan tek bir epitel hücreden mukayeseye elverişli profil elde edilmeye çalışıldığından bu değer 30 RFU olarak kabul edilmiştir.

DNA analizinin adli genetik alanına uygulanması 80’li yıllarda başlamış olup, uzunluk polimorfizmine dayalı geliştirilen yöntemler kısa ardışık tekrarlı dizilerin (STR’lerin) keşfiyle bir başka boyuta taşınmıştır [204]. STR’lerin; polimorfizminin yüksek olması ve kapiller elektroforezin temeli olan otomasyon sistemine uygunluk göstermesi, geniş ölçekte kabul görmelerini sağlamıştır. Belge üzerinden elektroforeze uygun yeterli miktarda ve kalitede DNA elde etmek zordur [110]. Eser miktarda ve degrade olan DNA’ nın toplanması ve laboratuvardaki izolasyon işlemlerine tabi tutulması sırasında varolan DNA’ yı kaybetmemek adına çalışmamızda silika temelli izolasyon yöntemi tercih edilmiştir. İzole edilen DNA’lardan elde edilen profiller ile referans profillerin karşılaştırılmasında, tam ve güvenilir sonuçlar elde etmek için küçük ampikonları da çoğaltabilen Mini STR lokuslarını da bünyesinde bulunduran yeni Globalfiler PCR Kitinin kullanımı hem literatürde hem de tarafımızca önerilmektedir. Bogas ve ark.’nın eser miktarda ve degrade DNA içeren bozulmuş kan örneklerinden 3 farklı PCR kiti (AmpF_{STR}® IdentiFiler™, AmpF_{STR}® MiniFiler™ ve AmpF_{STR}® GlobalFiler® PCR kiti) kullanılarak amplifikasyon yaptığı çalışmada, 0.0049 ng/Ml ye kadar düşen DNA konsantrasyonu içeren örnekte dahi AmpF_{STR}® GlobalFiler® PCR amplifikasyon kiti ile tam bir genetik profil elde edildiği bildirilmiştir [205].

Çalışmada kullandığımız 24 STR bölgesinden (D7S820, D5S818, CSF1PO, D1S1656, D13S317, D2S441, D12S391, D10S1248, D18S51, FGA, D21S11, D8S1179, VWA, D16S539, TH01, D3S1358, AMEL, D2S1338, D19S433, DYS391, TPOX,

D22S1045, SE33,Y-indel) oluşan GlobalFiler™ Kiti ile diğer kitlere kıyasla daha verimli sonuçlar elde edilmiştir [156]. GlobalFiler™ PCR kitinin en önemli özelliklerinden biri, DYS391'in başarısız olabileceği degrade örneklerde, Amelogenin, Y-kromozomal DYS391 ve Y-indel kombinasyonunun kullanımı ile başarı oranı arttırılmıştır. Bunun dışında 120'den fazla farklı alele ve yüksek ayırım gücüne sahip olan SE33 lokusunun kit içeriğine dahil edilmesi yapılan çalışmaların kalitesini de arttırmıştır [206]. Diğer identifikasyon kitlerine oranla GlobalFiler™ Kiti daha kısa ampikon bölgelerini de içermekte ve degrade örneklerde daha başarılı sonuçlar vermektedir. Bu açıdan incelendiğinde sonuçlarımızın literatürde STR analizi ile elde edilen bulgular ile yeterince örtüşmemesi; çalışmamızda kullanılan AmpFI STR® GlobalFiler™ kitinin kısa ampikon bölgeler içermesi nedeniyle kimliklendirmedeki başarısı olarak değerlendirilmekte ve bu kit kullanılarak epitel hücreden mukayeseye elverişli profilin elde edildiği böyle bir çalışmanın henüz literatürde yapılmamış olmasından kaynaklanmaktadır.

b) Mikrobiyolojik İnceleme

Adli belge incelemelerinde mürekkep bileşimini oluşturan unsurların zamanla değişiminde boyar maddelerin solması, çözücülerin buharlaşması ve reçinelerin sertleşip polimerleşmesi olayları literatürde ayrıntılı olarak incelenmiştir [4,29,42]. Bu değişimlerin hangi yolları takip edeceğini ve değişimlerin gerçekleşme hızlarını, ortamda bulunan ışığın şiddeti ve dalgaboyu, sıcaklık, nem, radyasyon miktarı, sülfürdioksit ve azotoksit gibi kirlilikten gelen hava kontaminantları, oksijen, boyanın konsantrasyonu, yüzey özellikleri, kağıt-çözücü sisteminin adsorbsiyon/difüzyon özellikleri gibi birçok dış ve çevresel faktör etkilemektedir. Sterflinger K. (2010) tarafından yapılan bir incelemede, mantarların enzimatik etkileri ile arşiv/müze ortamında uzun süreli saklanan belgelerin kâğıt yüzeyleri üzerinde çürümeye sebep olduğu, bu nedenle bu ortamlarda gerekli kontrollerin yapılarak mikrobiyolojik izleme ile mantar bulaşmasının önlenmesi gerektiği bildirilmiştir [207]. Bunun haricinde belgelerin saklandığı arşiv ortamında bulunan biyolojik etkenlerin (mikroorganizmaların) mürekkep boyar maddelerindeki solmanın hızını ve hangi yolları takip edeceğini nasıl etkilediği üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürdeki bu boşluktan yararlanarak araştırmamızın bu aşamasında herhangi bir belgenin saklama koşullarında ortamda bulunabilecek olan küf, mantar ve bakterileri belirlemeye yönelik mikroorganizmalar açısından kültür araştırması yapıldı. Kozajda A. ve ark. tarafından

Polonya'nın Lodz şehrinde bulunan arşiv ve kütüphane alanlarından alınan 60 hava örneğinin incelendiği bir çalışmada *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, ve *Rhizopus* mikroorganizma türlerinin ortam havasında yaygın olduğu görülmüştür [189]. Literatürde yapılan çalışma bulguları ile uyumlu olarak bizimde öncü çalışmayla belirlediğimiz ve arşiv ortamında sıklıkla bulunduğu bildirilen mikroorganizmalardan [208] *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium lentiflavum* türlerinin standart suşlarına ulaşarak çalışmamıza dahil edildi. Bu mikrobiyolojik etkenler ile kontrollü bir şekilde kontamine edilmiş ve kurutularak oda ısısında 6. aya kadar bekletilmiş kağıt-mürekkep disk örnekleri aşama aşama kültürel ortamda gözle, mikroskopla ve MALDI-TOF-MS cihazı ile incelendi.

Bundan sonraki mikroorganizmaların mürekkep üzerine etkisinin araştırıldığı çalışma kısımlarında kullanılan, inkübe edilmiş petriler üzerindeki makro ve mikro görüntüler için genel olarak “inkbiyogram” sözcüğünün, mürekkep-mikroorganizma etkileşimine ilişkin bilimsel literatürde kullanımı önerilmektedir ve bu terim ilk defa bu çalışmada kullanılmıştır. Piyasadan rastgele seçilen tükenmez kalem mürekkeplerinde, mikrobiyal üremenin etkisinin incelenmesi amacıyla 1) çizilen çizgi üstte ve 2) altta kalacak şekilde, 3) 2 µL direk mürekkebin kendisi damlatılarak hazırlanan 5 mm çaplı kağıt parçaları ve bunlara ilişkin bir 4) negatif kontrol amaçlı boş kağıt, ayrı ayrı 3 farklı tip besi yerine (jelöz, malt ve kanlı agara) yerleştirildi (Tablo 4.18). İnkübasyon sonrası M1, M4, S1 ve S2 mürekkepleri ile muamele edilerek kanlı, jelöz ve malt besi yerlerine yerleştirilen ve inkübe edilen hiçbir örnekte herhangi bir üreme görülmezken; M2 mürekkebi ile oluşturulan örneklerden jelöz ve malt besi yerine yerleştirilip inkübe edilenlerin tümünde, doğrudan kağıda pipetlenmiş M3, S2 ve S4 mürekkeplerini içeren kağıt disklerin jelöz besiyerine yerleştirildiği petride, S3 mürekkebinin çizilen çizgi üstte kalacak şekilde ekildiği petrilere üreme görülmüştür. Negatif kontrol amaçlı ekim yapılmış fakat disk koyulmamış besiyerlerinde ve mürekkep ile muamele edilmeyen kör disklerin yerleştirildiği besiyerlerinde mikrobiyal etkenlerin üremediği, pozitif kontrol amaçlı saf olarak pasajlanan her bir mikroorganizmanın ekildiği besiyerlerinde beklenen şekilde üremenin gerçekleştiği gözlemlendi. Kanlı besiyeri agarında üreme olmaması ve jelöz besiyeri agarında çalışmamızın amacına hizmet eden mikroorganizmaların üreyebilmesi sebebi ile çalışmanın devamında kanlı besiyeri kullanılmadı.

İnkbiyogramların ekim işlemi ve uygun koşullarda inkübasyonu sonrası 0. ayda farklı tükenmez kalem mürekkeplerinin aynı tür ve koşullardaki mikroorganizmalara verdiği cevabın farklı olması disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çaplarında farklılık gözlenmesinden anlaşıldı (Tablo 4.19). Bu farklılığın; öncelikle mürekkep içerisindeki boyar maddelerin her mürekkep çeşidinde miktarının ve toplam hacim içerisindeki yüzdesinin farklı olmasından kaynaklanabileceği bilgisinden yola çıkarak Çevre Gıda Analiz Laboratuvarı'nda bulunan HPLC cihazında kurum içi geliştirilen metotla çalışmamızın bu aşamasında kullanılan mürekkeplerin yapı tayini yapıldı.

Farklı hacimlerde mürekkep içeren disklerin aynı miktardaki mikrobiyal etkene aynı tepkiyi verip vermediğinin belirlenmesi için; 0.5 McFarland konsantrasyonunda hazırlanan *S. aureus* ve *A. fumigatus* mikrobiyal etkenlerinin ayrı ayrı pasajlandığı besi yerlerinde farklı hacimlerde mürekkep içeren kağıt diskler (2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL ve 6 µL) ile yapılan inkbiyogramlar sonunda oluşan inhibisyon zonları büyüklükleri ölçülerek aynı konsantrasyondaki mikrobiyal etkene karşılık farklı miktarda mürekkeplerin verdiği tepkilerin hemen hemen aynı olduğu tespit edildi (Tablo 4.20).

Kağıda uygulandıktan sonra bekletilen mürekkep örneklerinin zamanla mikrobiyal etkenlere karşı nasıl bir tepki verdiğini gözlemlemek için yapılan çalışmada; 6 aya kadar güneş ışığına direk olarak maruz kalmaksızın oda koşullarında rastgele bekletilen mürekkep-kağıt disk örneklerinin 0. ayda, 3. ayda ve 6. ayda 0.5 McFarland konsantrasyonunda hazırlanan mikroorganizma süspansiyonlarının pasajlandığı uygun besiyerlerine ekilen ve uygun şartlarda inkübe edilen disklerin etrafında gözlenen inhibisyon zonlarının çapları Tablo 4.21' de ve zamana karşı karşılaştırma grafikleri Şekil 4.29'da görülmektedir.

Mikroorganizmalarla kontamine edilmiş kağıt-mürekkep disklerinin içerisindeki mürekkep boyar maddelerinin zamanla moleküler dönüşümüne mikrobiyal etkiyi incelemek amacıyla aynı şartlarda bekletilen kontamine edilmiş ve kontamine edilmemiş kağıt-mürekkep disklerinin 0., 3. ve 6. aydaki zamana karşı çizilen solma eğrilerine bakıldığında istatistiki olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Eğri çiziminde; her bir mürekkebin zamanla kağıt üzerinde bozunmasına ilişkin oluşan ve zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen fotodegradasyon ürünleri ile metil viyole (MV) iyon şiddeti toplamının kristal viyole (CV) iyon şiddetine oranı temel alındı (Şekil 4.30).

Sonuç olarak, mürekkepler içerisinde bulunan MV oranı toplam alan içerisinde yaklaşık aynı olmakla birlikte, mürekkep içerisinde mikrobiyal üremeye karşı eklenen diğer katkı maddelerinin yapısı ve miktarı üreticiden üreticiye değiştiği için inkbiyogramların aynı mikroorganizmaya karşı inhibisyon çapları arasında farklılıklar gözlemlendiği ve 0-6 aylık bir süreç içerisinde ortamda bulunabilecek mikroorganizmaların mürekkep boyar maddelerinin solması üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı. Daha detaylı bulgular elde edebilmek için daha uzun vadede arşiv veya oda ortamında kontrollü bekletilen örnekler üzerinde araştırmaların yapılması gerekmektedir.

c) Tükenmez Kalem Mürekkebi İçerisindeki Boyar Maddelerin Moleküler Dönüşümlerinin İncelenmesi

Weyermann ve ark.'nın (2008) zamana karşı mürekkebin solması ile ilgili yaptıkları bir araştırmada, mürekkep boyar maddelerin doğal veya yapay solmasının, içeriğindeki çözücülerin buharlaşmasından daha karmaşık reaksiyonları içerdiği tespit edilmiştir [68]. Piyasada yazı yazmak için sunulan kağıtların kalitelerinin ve üretim aşamasında kullanılan maddelerin farklı olması üzerlerinde bulunan özellikle tükenmez kalem mürekkeplerinin solmalarına ilişkin süreci karmaşık hale getirmektedir. Kağıt-mürekkep matriks etkileşimlerinde kağıdın kalınlığı, ağırlığı, gözenekli yapısı, liflerin hizalanış şekli, kağıt ağartıcıların ve kaplama maddelerinin özellikleri vb. etkiler solma süreçlerinde etkin rol oynamaktadır. Kağıt yapısı dışında her bir mürekkep bileşiminin farklı olması, aynı fiziksel koşullara bırakılan farklı mürekkeplerdeki solma ve çözücüdeki buharlaşma hızının farklı olabileceğini göstermektedir. Örneğin bir arilmetan boya karışımındaki ek bir pigmentin varlığı, mürekkebe gelen fotonların emilmesinde pigmentlerin yarışa girmesine sebep olurken bu da solmayı yavaşlatmaktadır. Aynı şekilde, çözücülerin difüzyonu ve buharlaşması da bileşimindeki moleküllere bağlı bir süreçtir. Özellikle belgenin saklandığı ortamdaki ışığın, ısının ve nemin miktarı solma sürecini doğrudan etkilemektedir.

Gorshkova ve ark.'nın 2016 yılında yaptığı bir çalışmada mürekkebin fotodegradasyonu birkaç şekilde olabileceği belirtilmiştir [209]. Bunlar arasında en çok bilineni ve bizimde çalışmamızda temel prensip olarak ele aldığımız a) mürekkep muhteviyatındaki triarilmetan boyar maddelerin ışığa maruz kaldıklarında ardışık olarak bir metil grubunun hidrojen ile yer değiştirdiği N-demetilasyon, b) merkezi fenil bağının tekli oksijen aracılığı ile fotooksidatif kopma sonucunda benzofenon ve fenol oluşumu,

triarilmetan boyalarının fotolizinin yalnız çözeltilerde değil, kağıtta bile tekli oksijen oluşumuna yol açtığı ve birçok organik boyanın renksiz veya zayıf renkli indirgenmiş formlarına dönüştüğü, c) uyarılmış boya katyonunun renksiz formuna fotoredüksiyonu (uyarılmış boya katyonun foto-indirgenmesi bir elektronun veya bir boyanın fotokimyasal hidrojenasyonu). Zaman içerisinde çevresel koşulların da etkisiyle kristal viyolenin metil viyoleye, metil viyole de tetrametil pararosaniline dönüşmektedir [25,37,71]. Zamana bağlı bu dönüşümlerden hareketle yapılan oran hesaplarından kağıt üzerindeki mürekkebin yazım zamanı hakkında yorum yapılabileceği, viktorya mavisinin mürekkep muhteviyatındaki tayini ile belgedeki mürekkep yapıları arasında fark olup olmadığının tespitinde kullanılabileceği bilgisi, literatürde bir çok çalışma tarafından desteklenmiştir. Çalışmamızda piyasadan rastgele seçtiğimiz mavi tükenmez kalem mürekkeplerinin hepsinin içerisinde viktorya mavisini olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada CV, MV, PR ve VB' nin doymuş saf çözeltileri hazırlandı. İki farklı kalitedeki A4 kağıt üzerine bu çözeltilerle ve piyasadan rastgele seçilen 5'er adet mavi ve siyah tükenmez kalem mürekkebi ile çizgiler çizilerek 1760 Lux ışık altında yapay soldurmaya tabii tutuldu. Çalışmamızın yapay soldurma aşamasında emisyon spektrumu güneş ışığı spektrumuna yakın olan Xenon lamba tercih edildi. Çizgi çizildikten hemen sonra 0. zamanda ve hazırlanan numuneler yapay soldurmaya başladığı an itibari ile her saat başı olmak üzere 5 saat boyunca numune alınarak MALDI-TOF-MS'te analizlendi. Yapay soldurma sonrası MALDI-TOF-MS cihazında arşiv örnekleri ile birlikte analizler sonunda çizilen grafikler, her bir standardın zamanla kağıt üzerinde solmasına ilişkin oluşan ve zamana bağlı olarak artış göstermesi beklenen küçük piklerin iyon şiddeti toplamının CV iyon şiddetine oranı temel alınarak çizilmiştir. Söz konusu küçük pikler: TPR ve TPR-CH₃' tür. CV grafiği çizilirken ise, CV den küçük tüm piklere dahil olan MV iyon şiddeti de kullanılmıştır. VB için, bu standartların zamanla kağıt üzerinde solmasına ilişkin ortaya çıkan küçük piklerin temel piklerin iyon şiddetine oranı kullanılarak çizilmiştir. Pararosanilin (PR) için ise, pararosanilin standardı içerisinde bulunan az miktardaki monometil pararosanilinden pararosanilin ve diğer küçük moleküllerin oluşumuna ilişkin reaksiyon zinciri baz alınmıştır.

Kalın ve ince kağıt türleri üzerine uygulanan farklı mürekkep türlerinin yapay soldurma sonucu oluşan ürün piklerinin CV pikine oranında, iyon şiddetine bağlı olarak zamanla anlamlı bir artışın görülmektedir. Solma eğrilerine göre karşılaştırılmasına bakıldığında; siyah mürekkeplerde mavi mürekkeplere nazaran artışın daha anlamlı

olduğu, aynı mürekkebin 5 saatliğe tekabül eden sürecinde, bazı saatlerde mürekkebin içeriğindeki bileşenlerden ve kağıt kalınlığı dolayısıyla, farklı düzeylerde absorpsiyonlarından kaynaklanan sebeplerle, aynı mürekkebin farklı kağıt türlerindeki solma sonuçlarının farklılık arzedelediği görülmüştür.

İki farklı tip kağıt üzerinde gerçekleştirilen zamana karşı solma çalışmalarında, mavi tükenmez kalemle elde edilen solma eğrileri incelendiğinde, 5 saatliğe tekabül eden süre içerisinde zamana karşı solmanın genelde yavaş ve küçük değişimlerle seyrettiği görülmektedir. Mavi ve siyah kalemlerde gerçekleştirilen çalışmalarda, standart sapma değerleri y ekseninde kullanılan oranda ortalama 0,1-0,2 birim civarında olduğundan, ~0,2 birimden yüksek olan artışlar anlamlı bir artış olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.47-66).

İnce ve kalın kağıtlar üzerine çizilen çizgilerde solmayı incelemek için kullanılan oranda, kalın kağıtta M3 mürekkebinde 1. saatten, ince kağıtta M5 mürekkebinde 4,5. saatten itibaren, ince kağıtta M1 mürekkebinde 2,5. saatten itibaren, ince kağıtta M4 mürekkebinde ve kalın kağıtta M2 mürekkebinde 5. saatten itibaren anlamlı bir artış görülmektedir. Kalın kağıt üzerine çizilmiş olan M1 ve M4 mürekkebinde, ince kağıtta M2 ve M3 mürekkebinde ise ilk 5 saat içerisinde anlamlı bir artış bulunamamıştır. Kalın kağıtta M5 mürekkebinde ise 5. saatte çok az bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.67). K1M1-K2M1 örnek ve örnek çiftlerinde diğer ince kağıt-kalın kağıt farklarına göre aykırı sonuçlar görülmesinin sebebi yapay soldurma sırasında ışıktan yayılan foton yoğunluğunun örneklerin tamamı üzerine eşit dağılmamasına, ya da MALDI MS te kullanılan plakaya yansıtılan lazerin plakanın her noktasına eşit ulaşmamış olmasına bağlı olabilir.

Siyah kalemlerle çizilmiş örneklerde ise ince kağıda uygulanan S3 mürekkebinde 2. saatten itibaren ve ince kağıttaki S5 mürekkebinde ve kalın kağıttaki S5 mürekkebinde 1,5. saatten itibaren ciddi bir artış olduğu öngörülmektedir. İnce kağıda uygulanan S1 mürekkebinde 3. saatten itibaren, yine ince kağıttaki S4 mürekkebinde solmanın 2. saatten itibaren ve kalın kağıda uygulanan S1 ve S3 mürekkebinde 2,5. saatten itibaren, kalın kağıda uygulanan S2 mürekkebinde 3. saatten itibaren, kalın kağıda uygulanan S4 mürekkebinde 5. saatten itibaren anlamlı artış görülürken, ince kağıt üzerine çizilen S2 mürekkep örneğinde ise 5. saate tekabül eden sürede anlamlı bir solma gözlenememiştir (Şekil 4.68).

Mavi ve siyah tükenmez kalem mürekkeplerini oluşturan pigmentlerin zamana karşı solması tek tek gözlemlendiğinde (Şekil 4.69), ince ve kalın kağıt üzerindeki pararosanilin standardının yaklaşık 1,5. saatten itibaren solmaya başladığı gözlenmiştir. İnce kağıtlardaki kristal viyole standardı ile çizilen örneklerde de solma, 4. saatten itibaren, kalın kağıtlar üzerine tatbik edilmiş olan standardındaki solma ise yaklaşık 4.5 saatten itibaren görünür duruma gelebilmektedir. MV standardı ile kalın kağıda çizilen örneklerde 1. saatten, ince kağıda çizilen örneklerde ise 2. saatten itibaren anlamlı bir solma görülmeye başlanmıştır.

İnce ve kalın kağıttaki viktorya mavisi pigmentine ait örneklerde anlamlı bir düzeyde solma gerçekleşmemiştir (Şekil 4.70).

Aynı soldurma süreçlerine ilişkin mavi tükenmez kaleme ait çizim örneklerinin kağıt türü gözetmeksizin ANOVA ile karşılaştırmalarında (Tablo 4.30) bazı örnek çizimlerine ilişkin oranların birbirleriyle uyumlulukları incelenmiş; K1M1, K1M4, K1M5, K2M4, K2M5 ve K2M2 örneklerine ilişkin bulunan oranların, 3. ve 5. saatlerdeki K2M4 değerleri hariç, kendi aralarında uyumluluk gösterdiği, K1M3 ve K2M3 örneklerinin ise, bu gruptan anlamlı ölçüde farklı oranlar verdiği ancak kendi aralarında uyumlu oldukları görülmüştür. 5. saatte K1M3 ve K2M3, K2M1 ve K2M4 oranları kendi aralarında birbirine anlamlı düzeyde yakın bulunmuştur. 0. saatte K2M1, 1. saat verileri arasında da K1M2 oranları tüm diğer kalem örneklerinden istatistiki olarak anlamlı ölçüde farklı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. 0-5 saat zaman aralığında yapay soldurulan K1M1 ve K2M3 örneklerinin cihazda analizi sonucu elde edilen spektrumlar sırası ile Şekil 4.71 ve Şekil 4.72’de görülmektedir.

Aynı soldurma süreçlerine ilişkin siyah tükenmez kaleme ait çizim örneklerinin kağıt türü gözetmeksizin ANOVA ile karşılaştırmalarında (Tablo 4.31) bazı örnek çizimlerine ilişkin oranların birbirleriyle uyumlulukları incelenmiş; K1S1, K1S3, K1S4, K2S2, K2S3, K2S1, K2S2, K2S3, K2S5 örneklerine ilişkin bulunan oranların 0. saatte K2S4 ve 3. saatte K2S5 değeri hariç kendi aralarında uyumluluk gösterdiği; 0. saatte K2S4 ile K1S2’nin, 2. saatte K2S1 ile K1S1’in ve 3. saatte K1S1, K2S1 ile K2S5 örneklerinin ise, bu gruptan anlamlı ölçüde farklı oranlar verdiği ancak kendi içlerinde uyumlu oldukları ve birbirlerine anlamlı düzeyde yakın olduğu gözlenmiştir. 0. saatte K1S5, 1. saatte K1S1, K2S1 ve K1S2, 4. saatte K2S1 ve 5. saat verileri arasında da K1S1, K1S2 ve K2S1 oranları tüm diğer kalem örneklerinden istatistiki olarak anlamlı ölçüde farklı

sonuçlar vermiştir. 0-5 saat zaman aralığında yapay soldurulan K1S4 ve K2S5 rneklerinin cihazda analizi sonucu elde edilen spektrumlar sırası ile şekil 4.73 ve şekil 4.74'te görülmektedir.

Aynı soldurma süreçlerine ilişkin İNCE kağıt (K1) zerindeki mavi tükenmez kaleme ait çizim rneklerinin ANOVA ile zaman bazında karşılaştırmalarında (Tablo 4.32) bazı örnek çizimlerine ilişkin oranların birbirleriyle uyumlulukları incelenmiş; K1M1, K1M2, K1M4 ve K1M5 örneklerine ilişkin bulunan oranların kendi aralarında uyumluluk gösterdiği, yine K1M3 oranının ise tüm diğer kalem örneklerinden istatistiki olarak anlamlı ölçüde farklı sonuç verdiği bulunmuştur. Aynı soldurma süreçlerine ilişkin KALIN kağıt (K2) zerindeki mavi tükenmez kaleme ait çizim rneklerinin ANOVA ile karşılaştırmalarında (Tablo 4.33) bazı örnek çizimlerine ilişkin oranların birbirleriyle uyumlulukları incelenmiş; K2M1, K2M2 ve K2M5 örneklerine ilişkin bulunan oranların tüm saatlerde kendi aralarında uyumluluk gösterdiği; 0., 1. ve 3. saatlerde K2M4 oranının da bu gruba dahil olduğu, 2., 4. ve 5. saatlerdeki K2M4 oranı ile tüm saatlerdeki K2M3 oranının ise tüm diğer kalem örneklerinden istatistiki olarak anlamlı ölçüde farklı sonuçlar verdiği görüldü. Gruplar kıyaslandığında, farklılıkların sıklıkla M3 mürekkebinde karşımıza çıktığını görmekteyiz.

Aynı soldurma süreçlerine ilişkin İNCE kağıt (K1) zerindeki siyah tükenmez kaleme ait çizim rneklerinin ANOVA ile karşılaştırmalarında (Tablo 4.34) rnek çizimlerine ilişkin oranların birbirleriyle uyumlulukları incelenmiş; 0. saatte K1S1, K1S2, K1S3, K1S4 oranlarının birbiriyle uyumlu olduğu, 1., 2. ve 3. saatlerdeki K1S2, K1S3, K1S4, K1S5 örneklerine ilişkin bulunan oranların kendi aralarında uyumluluk gösterdiği; 4. saatte bu gruba K1S1 oranının da katıldığı; 5. saatte ise K1S3, K1S4 ve K1S5 in aralarında uyumlu çıktığı bulundu. 0. saatteki K1S5 ve 1., 2., 3., ve 5. saatlerdeki K1S1 ve yine 5. saatteki K1S2 oranlarının ise tüm diğer kalem örneklerinden istatistiki olarak anlamlı ölçüde farklı sonuçlar verdiği görüldü. Aynı soldurma süreçlerine ilişkin KALIN kağıt (K2) zerindeki siyah tükenmez kaleme ait çizim rneklerinin ANOVA ile karşılaştırmalarında (Tablo 4.35) bazı örnek çizimlerine ilişkin oranların birbirleriyle uyumlulukları incelenmiş; 1, 2, 3 ve 4 saatlik süreçte K2S2, K2S3, K2S4 ve K2S5 örneklerine ilişkin bulunan oranların kendi aralarında uyumluluk gösterdiği; 4. saatte bu gruba K2S1 oranının da dahil olduğu; 0. saatte K2S1, K2S2, K2S3, K2S5 in aralarında uyumlu olup, K2S4'n farklı sonuç verdiği ve 1., 2., 3., ve 5. saatlerdeki K2S1 ve yine 5.

saatteki K2S5 oranlarının ise tüm diğer kalem örneklerinden istatistiki olarak anlamlı ölçüde farklı sonuçlar verdiği görüldü.

Zamana karşı solmadaki farklılıkların, mürekkep yapısına ilişkin formüllerdeki farklılıklardan kaynaklandığı öngörülmektedir. Bu farklılıkların; reçine, yüzey aktif madde, kayganlaştırıcı gibi mürekkep muhteviyatında bulunan diğer katkı maddelerinin nitelik ve/veya oranlarındaki değişikliklerin solma üzerine farklı etkileriyle açıklanabilir. Işık yokluğunda, tükenmez kalem mürekkebi boyar maddelerinin boyaların solmasına ilişkin literatürde farklı sonuçlar bildirilmiştir [7,43,210]. Bu farklı gözlemler ancak, mürekkep muhteviyatı hakkında daha spesifik bilgilerin üreticilerden elde edilememesi, değişen arşivleme koşulları (sıcaklık, nem), çalışmaların yapıldığı farklı zaman dilimleri ve farklı analitik yöntemler ile açıklanabilir.

Aynı mürekkebin solma hızının farklı kalınlıktaki kağıtlarda değişmesi ise, kalın kağıdın mürekkebi daha çok absorbe etmesi sonucu mürekkebin daha büyük bir kısmının kağıda hapsolmasından dolayı, yüzeyde kalan kısmının daha az olmasından kaynaklanıyor olabilir. İnce kağıtlarda ise mürekkebin çoğu yüzeyde kalacağından, gün ışığıyla temas eden mürekkep miktarının daha fazla olacağı ve solmanın daha hızlı gerçekleşeceği öngörülmektedir. Arşivlerden alınan gerçek örneklerle ilişkin oran değerleri, zaman bazında çizim örneklerine ilişkin oranlarla standart sapmalar da göz önüne alınarak karşılaştırıldığında;

Mavi Kalemler İçin:

0. yıla tekabül eden 1. arşiv örneğinin, M2, M4 ve M5 mürekkeplerine yakın çıktığı (Şekil 4.87), 2. arşiv örneğinin ise M2 ve M5 mürekkeplerine yakın çıktığı (Şekil 4.88) gözlemlenmiştir (Tablo 4.36, Şekil 4.75).

1. yıla tekabül eden 1. arşiv örneğinde Pensan marka mürekkep kullanılmış olabileceği bilinmektedir. Bu örnekteki çizim, M3 kalemlerine yakın çıkmakla birlikte M3 kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapma aralığında sonuç vermiştir. 2. arşiv örneği ise M2, M4 ve M5 çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapma aralığında sonuç vermekte, M2 ve M5 mürekkeplerine yakın çıkmaktadır (Tablo 4.38 ve Şekil 4.77).

2. yıla tekabül eden 1. arşiv örneğinin, M1 ve M5 mürekkebiyle uyumlu olduğu, 2. arşiv örneğindeki çizim, M3 kalemlerine yakın çıkmakla birlikte M3 kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapmanın dahi üzerine çıkan bir değer vermektedir. Bu da örneğin bir süre güneş ışınına veya yüksek neme maruz kaldığını düşündürmektedir (Tablo 4.40 ve Şekil 4.79).

3. yıla tekabül eden 1. arşiv örneği, M1, M2 ve M3 mürekkepleri ile uyumlu olmakla birlikte, M3 mürekkebi ile birebir uyumlu olduğu, 2. arşiv örneğindeki çizimin ise M1, M2, M4 ve M5 çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapma aralığında sonuç verdiği ve M4, M5 mürekkeplerine yakın çıktığı tespit edildi (Tablo 4.42 ve Şekil 4.81).

4. yıla tekabül eden 1. arşiv örneğinden elde edilen verilerin, M1, M2, M3, M4 ve M5 mürekkepleri ile uyumlu olmakla birlikte, M2 mürekkebi ile birebir uyumlu olduğu ve M3 mürekkebine yakın çıktığı, 2. arşiv örneğindeki çizimin ise M2 ve M3 çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapma aralığında sonuç vermekte ve M3 mürekkebi ile birebir örtüşmektedir (Tablo 4.44 ve Şekil 4.83).

5. yıla tekabül eden 1. arşiv örneğinden elde edilen verilerin M1, M2, M4 ve M5 mürekkepleri ile uyumlu olduğu; 2. arşiv örneğindeki çizimde ise Pensan marka mürekkep kullanılmış olabileceği bilinmektedir. Bu örnekteki çizim, en yüksek orana sahip M3 kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapmanın dahi üzerine çıkan bir değer vermektedir. Bu da örneğin güneş ışınına veya yüksek neme [90] maruz kalmış olabileceğini düşündürmektedir (Tablo 4.46 ve Şekil 4.85).

Siyah Kalemler İçin:

0. yıla tekabül eden 1. arşiv örneğinden elde edilen verilerin S2 ve S4 mürekkepleri ile uyumlu olduğu (Şekil 4.89); 2. arşiv örneğindeki çizimin ise S1, S2 ve S3 mürekkepleri ile uyumlu olmakla birlikte S5 mürekkebinden elde edilen bulgulara daha yakın (Şekil 4.90) olduğu görüldü (Tablo 4.37, Şekil 4.76).

1. yıla tekabül eden 1. ve 2. arşiv örneklerinden elde edilen verilerin, S1, S2, S3 ve S4 mürekkepleri ile uyumlu olduğu gözlenmekle birlikte S5 mürekkebine daha yakın analiz sonucu verdikleri tespit edildi (Tablo 4.39 ve Şekil 4.78).

2. yıla ait siyah tükenmez kalemle yazılmış gerçek örnek temin edilemediğinden, bu yıla ait siyah mürekkep çizimlerine ait kıyaslama yapılamadı (Tablo 4.41 ve Şekil 4.80).

3. yıla tekabül eden 1. arşiv örneğinden elde edilen verilerin, S2, S3 ve S4 mürekkepleri ile uyumlu olduğu gözlenmekle birlikte S1 ve S5 mürekkebine daha yakın analiz sonucu verdiği görüldü. 2. arşiv örneğindeki çizim, tüm siyah kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapmalarının dahi üzerine çıkan bir değer vermektedir. Bu da örneğin bir süre güneş ışınına veya yüksek neme maruz kaldığını düşündürmektedir (Tablo 4.43 ve Şekil 4.82).

4. yıla tekabül eden 1. arşiv örneğinden elde edilen verilerin, S1, S3 ve S5 mürekkepleri ile uyumlu olduğu gözlenmekle birlikte S2 ve S4 mürekkebine daha yakın analiz sonucu verdiği görüldü. 2. arşiv örneğindeki çizim, 4. saate ilişkin tüm siyah kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapmalarının dahi üzerine çıkan bir değer vermektedir. Bu da örneğin bir süre güneş ışınına veya yüksek neme maruz kaldığını akla getirmektedir (Tablo 4.45 ve Şekil 4.84).

5. yıla tekabül eden 1. arşiv örneğinin, S1, S4 ve S5 mürekkepleri ile uyumlu olduğu, S2 ve S3 mürekkeplerine yakın çıktığı, 2. arşiv örneğinin ise S1 ve S4 mürekkepleri ile uyumlu, S2 ve S3 kalemlerinin çizgilerinin analizlerine ilişkin standart sapma aralığında sonuç verdiği ve bu kalem mürekkeplerine daha yakın olduğu gözlemlendi (Tablo 4.47 ve Şekil 4.86).

Karslı'nın 2005 yılında yaptığı bir çalışmada [80], piyasadan rastgele seçilmiş aynı cins kağıt yapısına sahip olan 300 adet senet ve 100 adet mavi tükenmez kalem kullanmış, senetler üç guruba ayrılarak ve bu üç gruptan birinci grup laboratuvar ortamında karanlıkta, ikinci grup oda ışığında bekletilmiş ve 3. grup ise doğrudan güneş ışığına maruz bırakılmıştır. Örnekler doküman inceleme cihazı Raman Spektrometresi ve İnce Tabaka Kromatografisinde incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre; mürekkeplerin güneş ışığı altında renk değiştirebildiği ve güneş ışığının mürekkebin kimyasal yapısını bozması sebebiyle bu tür mürekkeplerden incelemelerde sonuca ulaşamayacağı tespit edilmiştir. Floresans özellik gösteren mürekkeplerde Raman Spektrometresi ile sonuç alınamayacağı belirlenmiş ve daha ayırıcı ve gelişmiş analitik yöntemlere yönelinmesi tavsiye edilmiştir. Bu analitik yöntemler LDI, MALDI, DART-MS vb. sistemler olup özellikle MALDI-TOF-MS yöntemi ile aynı belge üzerindeki farklı mürekkepler belirlenebilmekte veya farklılandırılabilmektedir.

Weyermann ve ark. [4,90], kağıt yüzeyine tatbik edilmiş tükenmez kalem mürekkeplerinden metil viyole ve etil viyole moleküllerinin farklı ışık, ısı, nem ve dalga boyunlarında zamanla fotodegradasyonun LDI-MS ve MALDI-MS sistemlerinde incelemişlerdir. Kağıt yüzeye tükenmez kalem mürekkepleri tatbik edildikten sonra örnekler 100 ° C sıcaklığa, 17 cm mesafeden 6 saat boyunca ksenon lambaya, farklı dalga boylarındaki bozunmayı incelemek amacıyla 475 nm ve 650 nm dalga boyuna ve neme tabi tutulmuştur. Çalışmada analitin çözücü ile ekstraksiyonunun istenmeyen etkilere neden olabileceği gözlenmiştir. Bu nedenle, mürekkep çizgilerinin analizinin doğrudan kağıttan yapılması gerektiğine karar verilmiştir. Bunun için 5-8 mm'lik küçük parçalar kesilmiş, bir karbon bant ile metalik bir numune tutucusuna yapıştırılmış ve MS analizi gerçekleştirilmiştir. Mürekkep örnekleri DHB matriksinin kullanıldığı MALDI-MS sisteminde doğrudan kağıt yüzeyden analiz edilmiştir. Söz konusu çalışmada dezorpsiyon ve iyonizasyon, pulslu azot lazeri ile gerçekleştirilmiş, katyonik boyaların analizine izin veren pozitif iyon modunda gecikmeli ekstraksiyon kullanılmıştır. Kütle spektrumları, 100 ardışık lazer puls spektrumunun ortalaması alınarak kaydedilmiş, kağıt yüzeyi üzerinde en az 2 ya da 3 bölgeden örnek alınarak çalışılmıştır. Analiz sonucu hiçbir işleme tabi tutulmayan örneklerde metil viyole pigmentinde 372 ve 358 iyonları, etilviyole pigmentinde 456, 428, 372 iyonları; 6 saat boyunca ışığa tabi tutulan bu pigmentlerden MV' de 372, 358, 344, 330, 316, 302 iyonları ve etil viyole pigmentinde 456, 442, 428, 414, 400, 386, 372, 358, 344, 330, 316 ve 288 iyonları gözlenmiştir. Bu pigmentlerin, değişken çevre şartlarına bağlı olarak zamanla nasıl solduğu ve solma hızı bağlı pik alanının hesaplanması ile belirlenmiştir. Bağlı pik alanı; moleküler iyon alan değerinin moleküler iyon ve degradasyon ürünlerinin alan değerlerinin toplamına oranlanması ile tespit edilmiştir. Analizler sonunda elde ettikleri eğrilerde, solmanın, kuru bir atmosferle karşılaştırıldığında nemli bir ortamda daha güçlü olduğunu göstermektedir. Bu çalışmadan da elde edilen bilgilerden yol çıkarak çalışmamızda; 2. arşivden alınan 2016 ve 2013 yılına ait mavi mürekkep örnekleri ile yine 2. arşivden alınan 2015 ve 2014 yıllarına ait siyah mürekkep örneklerinin beklenenden yüksek çıkmasının sebebinin, saklandığı ortamdaki yüksek nemden ya da uzun sayılabilecek bir süre güneş ışınına maruziyetten kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde çoğu çalışmada MALDI sisteminde analiz yapılırken matriks kullanılmıştır. İlk zamanlarda 5-metoksisalisilik asit ve sperminin [211] amonyum tuzları [212] ve halojenürlerinin [213], 2,3,4-trihidroksiasetofenon ve 2,4,6-trihidroksi asetofenonun [214], matriks olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Mürekkep boyar

maddelerinin MALDI-TOF-MS ile analizlendiği çalışmalarda da örneklerin iyonlaşmasına yardımcı olan bazı matriksler kullanılmıştır. Kullanılan ve analite (mürekkep pigmentleri 10kDa'dan daha küçüktür) uygun seçilen 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB) [90], α -siyano-4-hidroksisinamik asit (α -CHCA) [215,216], 2-(4-hidroksifenilazo) benzoik asit (HABA), diamonyum hidrojen sitrat (DAHC) [217] gibi matrikslerin, verilen lazer dalga boyunu absorblayarak örneğin fazla parçalanmasını engelleyerek tekniğin duyarlılığını geliştirdiği belirtilmiştir. Çalışmamızda analizini yaptığımız kristal viyole pigmenti matriks etkisi göstererek iyonlaştırmayı kolaylaştırdığından hata payını ve maliyeti arttırıcı, tekrarlanabilirliği olumsuz etkileyen ve MALDI-TOF-MS cihazının numune yükleme plakasının (target) temizlenmesini güçleştiren ekstra bir matriks kullanımına gerek duyulmamıştır. MALDI ile yapılan analizlerde aynı koşullarda analiz tekrarlanırsa bile birebir aynı yoğunlukta spektrumlar elde edilemeyebilmektedir. Bu farklılıklar, kullanılan matriks solüsyonu, tükenmez kalemın bilye ucundan mürekkebin bırakılma şekli, kullanılan kağıdın yüzeyi gibi birçok parametre elde edilen spektrumların birebir aynı olmasını etkileyebilmektedir. Geliştirdiğimiz yöntemde mürekkep içerisinde olan kristal viyolenin lazer ışınını absorblayarak iyonlaştırmaya etkisi olduğundan matriks kullanımına gerek duyulmamış ve matriksten gelebilecek hata payı önlenmiştir.

Dunn ve Allison' un 2007 yılında [217] mürekkeplerde kullanılan boyar maddelerin yapılarının, bizimde çalışmamızın mürekkep boyar maddelerinin moleküler değişimlerinin incelenmesinde aşamasında tercih ettiğimiz, MALDI sistemini kullanarak belirlendiği ve görünür ışık kullanılarak yapay soldurulan belgelerin analizine yönelik yöntemlerin araştırıldığı çalışmalarında, bu sistemin mürekkep boyar maddelerindeki zamana bağlı fotokimyasal değişimlerin de tespit edilmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Örnek hazırlama aşamasında kağıt üzerindeki mürekkebin tatbik edildiği alana matriks olarak kullanılan 24-mg/mL derişimdeki benzoik asit (HABA)' ten 2 μ L damlatılmıştır. Matriks kristalleşene kadar kurumaya bırakılan kağıt numuneleri 4 mm² boyutunda kesilip plaka üzerine çift taraflı bantla sabitleştirilmiştir. Analiz sonrasında elde edilen verilere göre kağıt yüzeyin, matriks-analit kristal yapısının beklenen düzeyde oluşmasını engellediği ve yanıltıcı sonuçlar verdiği, mürekkep boyar maddelerinin cihaz örnek yükleme plakası (target) üzerine doğrudan damlatılması ve matriks ile kristal yapı oluşturmaya sonucu yapılan analiz spektrumlarının beklenen şekilde olduğu bulunmuştur. Bu ve benzeri çalışmalarda çift taraflı bant kullanımında bantın plakaya yapışarak çıkmaması durumunda hem plaka temizliğinde hemde örneklerin plakaya yerleştirilmesi sırasında analistin

zorlanmasına sebebiyet verebileceği, her çalışmada maliyeti fazla olan yeni bir plaka kullanılması gerekebileceği, örneklerin çift taraflı bantla sağlam bir şekilde yapıştırılmadığı takdirde yüksek vakum altında numunelerin cihazın içerisine savrularak arızaya sebebiyet verebileceği, kullanılan bant kalınlığının tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesini olumsuz etkilediği, gözönüne alınarak; yöntem geliştirme aşamasında çalışmamızda çift taraflı bant yerine Pritt marka su bazlı yapıştırıcı tercih edilerek ve matriks kullanımına gerek duyulmaması ile yöntemin daha kolay, hızlı ve güvenilir olması sağlanmıştır.

Grim, D.M. ve arkadaşlarının 2001 yılında LDI sistemini kullanarak saf CV' nin su ve etanol içinde çözünmesi ile hazırlanan çözeltilerinin solmasını incelediği çalışmada, fotodegradasyon sonucu N-demetilasyonla oluşan ürünler incelenmiştir [43]. Örneklerin soldurulması ksenon lamba aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon/iyonizasyon, 337 nm dalgaboyunda, 3 ns pulslu bir azot lazer ile uygulanmıştır. Bu çalışmada FAB-MS ve LD-MS, kağıt üzerindeki mürekkeplerin analizi için cazip araçlar olarak ortaya konulmuştur. Çünkü hızlı hareket eden parçacıklarla bombardıman veya yüksek güçlü lazer ışınması kullanarak, düzlemsel hedeflerde enerji aktarımıyla iyonlar doğrudan üretilebilmektedir. UV hızlandırılmış yaşlandırma çalışmalarında, örnek 254 nm dalgaboyunda 760 mikrowatts / cm² bir UV lambası kullanılarak ışığa maruz bırakılmış ve 12 saat arayla analiz edilmiştir. Mürekkep kâğıdı numunesi, çift taraflı bant kullanılarak prob ucuna yapıştırılmıştır. LD'nin oluşturduğu pozitif (negatif) iyonların analizi için, numune plakası 20.000 V (15,000 V) voltajda tutuldu, lazer ışınımı ve iyon ivmesi arasında 150 ns lik bir gecikme süresi uygulanmıştır. Çalışmada 12 saat veya daha fazla ışınlanan örneklerin içindeki solmanın metil gruplarının ardışık kaybı ile yeni küçük piklerin oluşumu şeklinde net olarak görüldüğü bildirilmektedir.

Siegel ve ark.'nın 2005 yılında [56] bir belgenin oluşturulma zamanının yazının yazıldığı mürekkebin kimyasal değişimlerinin incelenerek tespit edilebileceği savından hareketle yayımladığı ve LDI-MS sistemini kullanarak 0, 12 ve 24 saate kadar kağıt yüzeyine tatbik edilen mavi ve siyah tükenmez kalem örneklerine yapay soldurmanın yapılarak gerçek örneklerle kıyaslandığı çalışmada; mürekkep boyar madde pigmentlerine ait ve zamanla CV' nin bir metil grubu (-CH₂) kaybederek solması ile ortaya çıkan solma ürünlerinin (MV ve diğer moleküllere) yapay soldurmada hızla ortaya çıktığı görülürken arşiv örneklerine ait doğal solmanın gerçekleştiği örneklerde ise daha geç sürede ortaya çıktığı ve ortamdaki oksijenin varlığı CV'den fotokimyasal solma ürünlerinin oluşmasını

doğru orantılı olarak etkilediği tespit edilmiştir. Küçük kesilmiş kağıt örnekleri, örnek plakası üzerine bantla yapıştırıldıktan sonra LDI ile analizlenmiştir. Çalışmada 337 nm de, 3Hz lik, 3 ns pulslu azot lazeri kullanılmış, 50 lazer atış ve lazer ışınlama ile iyon hızlandırma arasında 150 ns geciktirme uygulanmıştır. LDI-MS sisteminin sadece mürekkep boyar madde pigmentlerinin yapılarını aydınlatmakla kalmayıp zamanla değişiminin de gözlemlenebileceği ideal analitik bir sistem olduğu bu çalışmada vurgulanmıştır. Yapay soldurma bulgularına göre 0. zamanda analizlenen örnekte CV (372 molekülüne ait pik) iyon şiddeti fazla iken MV (358 molekülüne ait pik)' ye ait pik kendini henüz göstermeye başlamıştır. 12 saat boyunca ksenon lamba altında bekletirilerek soldurulan mürekkeplerden analizlenen örneklerde ise görülen pikler iyon şiddetlerine göre 372>344>330>358>316>302>288 şeklinde kıyaslanmaktadır. 24 saat sonunda ise pikler iyon şiddetlerine göre 344>330>358>316>372>302>288 şeklinde değiştiği bulunmuştur. 2005 yılında yapılan bu çalışmada, 1996 yılına ait arşiv örneğinde CV (372 molekülüne ait pik) iyon şiddeti fazla iken MV (358 molekülüne ait pik)' ye ait pik kendini henüz göstermeye başlamıştır. 1974 yılına ait arşiv örneğinde görünen piklerin iyon şiddetlerine göre kıyaslanması ise 372>358>344>330, 1961 yılına ait arşiv örneğinde ise pikler iyon şiddetleri 358>344>372>330>316 şeklinde kıyaslanabilir. Şunu söyleyebiliriz ki bu çalışmada kullanılan yöntem ile arşiv örneklerinde belgenin saklandığı ortam koşulları da baz alınarak ancak 12 yıllık bir zaman aralığında 330 molekülünden sonraki 316 molekülü görülebilmektedir. Bizim geliştirdiğimiz yöntemde ise ilk 5 yıllık yapay soldurulan ve doğal solmanın gerçekleştiği arşiv örneklerinde CV'den elde edilen solma ürünleri görülebilmektedir. Çalışmamızda bulduğumuz ve çok ufak değişiklikleri bile ortaya koyabilen “küçük piklerin iyon şiddetlerinin toplamının CV iyon şiddetine oranı” bu literatürde dahil başka hiçbir literatürde kullanılmamış ve solmanın varlığını gösteren solma ürünü piklerin ilk 5 yılda tespit edilebileceğine dair bir bulguya rastlanmamıştır. Bu hassasiyet farkının sistemin optimizasyon ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Çalışmanın deneysel aşamasında; cihaz kalibrasyonu için canlı sağlığı açısından tehlike ihtiva eden, kanserojen etkisi ve temini zor olan sezyum iyodür (CsI) kimyasal maddesi tercih edilmişken, geliştirdiğimiz yöntemde sağlığa zararı bulunmayan polipropilen glikol (PPG) maddesi MALDI-MS sistemi kalibrasyonu için kullanılmıştır.

Arşivden aldığımız bazı gerçek örneklerin analiz sonuçları göstermektedir ki; ışığın mürekkebin kimyasal yapısını değiştirmesinden dolayı, farklı fiziksel koşullara maruz kalan aynı cins mürekkeplerin benzerliği ortaya konulamamaktadır. Piyasada yazı yazmak

için sunulan kağıtlar güneş ışığı altında bekletildiği takdirde ultraviyole ışığı soğurmaktadır ve bu sebeple de mürekkeplerin bulundukları farklı fiziksel koşullar inceleme sonuçlarını değiştirmektedir. Karanlık, oda ışığı ve güneş ışığı gibi aydınlatmanın farklı olduğu ortamlarda saklanan aynı cins mürekkeplerin bile farklı soğurma dalga boyları göstermelerine neden olmaktadır [43]. Bu sebeple belge inceleme uzmanı, mürekkep karşılaştırması yaparken belgenin bulunmuş olabileceği farklı fiziksel koşulları değerlendirerek inceleme yapmalıdır.

Ülkemizde genellikle ithal mürekkeplerin kullanılması ve üretilen mürekkeplerin belli bir standardının olmaması mürekkebin zamana karşı solması ile ilgili çalışmaları sınırlamaktadır.”Herhangi bir itiraz durumunda belgenin ilk haline geri dönülemeyeceğinden, belge inceleme uzmanı tarafından incelemenin delil niteliğindeki belgeye zarar vermeden yapılması gerekmektedir [218,219]. Bu sebeple özel optik yöntemler kullanılarak belgeye zarar vermeden yapılan analizlerde, günümüzde kullanılan mürekkeplerin hemen hemen benzer optik özelliklere sahip olmaları nedeniyle optik yöntemin yetersiz kaldığı durumlarda analitik ayırım tekniklerine başvurulmaktadır. Tatminkar bir sonuca ulaşamadığı durumlarda, mürekkepler üzerinde kimyasal inceleme yapılması belgeye az da olsa zarar verdiği için, taraflar bu hususta inceleme öncesinde bilgilendirilmelidir.

6. SONUÇ

Geçmişten günümüze kadar adli olguların çözülmesinde Adli Moleküler Genetik çalışmaları daima en önemli alanlardan biri olmuş ve bu sebeple de sürekli çalışılan ve geliştirilen dinamik bir dal olmayı başarmıştır. Teknoloji ile birlikte DNA'yla ilgili daha detaylı bilgiler öğrenilmiş ve bu bilgiler ışığında DNA izolasyon ve kimliklendirme çalışmalarında da gelişmeler kaydedilmiştir. Ülkemizde belge üzerine bırakılan epitel hücrelerden DNA identifikasyonu ile ilgili bilimsel bir çalışma henüz yapılmış değildir. Bu bilimsel boşluk; kriminal laboratuvarların, içerdikleri DNA nedeni ile aynı zamanda değerli biyolojik delil olan adli belgelerde genetik incelemesi için standardize edilmiş yöntemler oluşturmalarına da engel olmaktadır. Dünya geneline bakıldığında ise bu konuyu hedefleyen çalışmaların az olduğu görülmektedir. Üstelik bu çalışmalar sistematik olmaktan uzaktır ve sundukları verilerden standardizasyona gidilmesi pek olası değildir. Adli belge üzerindeki epitel hücreler yukarıda da ifade edildiği gibi eser miktarda DNA içeren ve yüksek derecede tahribata uğramış biyolojik delillerdir. Dolayısı ile çalışmamızda belge yüzeyine transfer edilen DNA örneğinden STR tekniği ile DNA profili elde etmek ve bunun olabildiğince polis ve jandarma kriminal laboratuvarlarında rutin bir inceleme yöntemi olarak kullanılabilmesini sağlayacak standardizasyona gitmek amaçlanmıştır. Bu doğrultuda çalışmamızın genetik inceleme kısmında; hızlı, kolay, ucuz bir yöntem geliştirilmiş ve sistem validasyonuna yönelik daha sonra yapılacak bu alandaki tüm çalışmalar için referans ve yol gösterici temel adımlar atılmıştır. Geliştirdiğimiz bu yöntem literatürdeki benzer çalışmalarda da belirtildiği gibi [111] arşivlenmemiş adli belgelerden (gerek dermatolojik sebeplerle deri pullanmasının fazla görüldüğü gerekse epitel hücre döküntüsünün fazla olduğu bireylerin oluşturduğu) özellikle terlemenin fazla olduğu yaz aylarında alınan ve bekletilmeden taze olarak aynı gün içerisinde çalışılan örneklerden, kimliklendirme açısından yüksek oranda mukayeseye elverişli bir profil elde edebilmeyi olası kılmaktadır.

Çalışmanın mikrobiyolojik inceleme aşamasında; inkübasyon sonunda disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çaplarındaki değişimler, zonlarda oluşan genişleme veya daralmaların, çapları ile mürekkep içerisindeki boyar maddelerden olan antimikrobiyal koruyucu etkiye sahip MV' nin ve antimikrobiyal etkili olmasa da yine bir boyar özelliğe sahip CV'nin toplam piklere göre oranları karşılaştırıldığında, net bir korelasyon gözlenemedi (EK-3). İkincil olarak zon çaplarındaki farklılıkların kağıt disk üzerine mürekkep pipetlenmesi sırasında pipetleme hacminin çok düşük olmasından

kaynaklanabilecek tekrarlanabilirlikten sapmalardan kaynaklanabileceği de düşünülse de, Tablo 4.20’de görüldüğü gibi kağıt diskler üzerine aynı mürekkebin 1-3 uL arasında değişen artan hacimleri ilave edildikten sonra elde edilen inkbiyogramlardaki zon çaplarının tüm bu aralıktaki hacimlerde yaklaşık aynı genişlikte olduğu gözlemlenince bu farklılıkların başka bir sebebi olabileceği düşünüldü. Artan hacimlerdeki mürekkep içinde artan miktarda antimikrobiyal etkili MV olacağı, dolayısıyla MV miktarındaki artma ya da azalmanın da böyle bir etkiye sebep olamayacağı göz önüne alındığında; tüm bu denemelerin ışığında, boyanmış zon çaplarındaki farklılıklar, mürekkep formülasyonlarındaki farklılıklardan kaynaklanan sebeplerle agarın içine farklı miktarlarda ve çaplarda diffüze olmasına bağlandı. Bu bize göstermektedir ki; kağıt üzerindeki yazının mikroorganizmalarla etkileşiminde antimikrobiyal etkiye sahip MV molekülünün yanı sıra, bu molekülün kağıt yüzeyine ve derinine daha fazla ya da daha az diffüze olmasını sağlayan bir formülasyon da etkili olabilir. Sonuç olarak; 0-6 aylık bir süreç içerisinde ortamda bulunabilecek mikroorganizmaların mürekkep boyar maddelerinin solması üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı. Daha detaylı bulgular elde edebilmek için daha uzun vadede arşiv veya oda ortamında kontrollü bekletilen örnekler üzerinde araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Tükenmez kalem mürekkebi içerisindeki boyar maddelerin moleküler dönüşümlerinin incelendiği kısımdan elde edilen analiz bulguları sonucunda; MALDI-MS ile bilinmeyen örnek analizi gerçekleştirilmeden evvel kağıt cinsinin tartılarak tayin edilmesi gerekmektedir. Çünkü farklı kalınlıktaki kağıt tiplerinde zamana karşı gerçekleşen solmalar fark gösterebilmektedir. Tartım ile farklı kağıt tipleri elendikten sonra, tespit edilen kağıt tipine ilişkin örnek analizinden bulunan orana göre, ANOVA analizlerinde birbirine yakın bir oran verdiği saptanan mürekkep gruplarından hangisine girdiği MALDI-TOF-MS ile tayin edildikten sonra, örneğin spektrumu incelenerek bu grup içerisinde de hangi mürekkep tipine ve hangi solma zamanına yakın sonuç verdiği tespit edilebilir. Solma öncesi, mürekkepte tayin için kullanılan oranların kağıda çizilmeden önceki mürekkep ya da kalem türünün kompozisyonunun da bilinmesi gerekmektedir. Çalışmanın bu aşaması; kullandığı deneysel ve hesaplama yöntem itibarıyla MALDI-TOF-MS’te öncü bir çalışma olup, zamana karşı mürekkeplerin solma süreçlerinin daha uzun vadelerde incelenmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Ellen, D., Day, S., & Davies, C. (2018). *Scientific examination of documents: methods and techniques*. Fourth Edition, CRC Press
2. Ezcurra M., G3ngora, J. M. G., Maguregui, I., Alonso, R. (2010) Analytical methods for dating modern writing instrument inks on paper, *Forensic Science International*, 197(1-3): 1-20.
3. Brunelle R.L., Crawford K. R. (2003) *Advances in the Forensic Analysis and Dating of Writing Ink*, Charles C Thomas Publisher Ltd., Springfield, Illinois.
4. Weyermann C. (2005) *Mass Spectrometric Investigation of the Aging Processes of Ballpoint Ink for the Examination of Questioned Documents*, Inaugural dissertation for the Doctor degree, Justus-Liebig University, Giessen Germany
5. Egerton G. S. Morgan A. G. (1970) The Photochemistry of Dyes II – Some Aspects of the Fading Process, *Review, J Soc Dyers Colourists*, 86: 242-249.
6. Andrasko J. (2001) HPLC analysis of ballpoint pen inks stored at different light conditions, *J Forensic Sci* 46(1):21-30.
7. Andrasko J. (2001) Changes in composition of ballpoint pen inks on aging in darkness, *J. Forensic Sci* 47(2):324-327.
8. Parsons, L., Sharfe, G., & Vintiner, S. (2016) DNA analysis and document examination: the impact of each technique on respective analyses. *Journal of forensic sciences*, 61(1), 26-34.
9. Plaza, D. T., Mealy, J. L., Lane, J. N., Parsons, M. N., Bathrick, A. S., & Slack, D. P. (2015) ESDA®-Lite collection of DNA from latent fingerprints on Documents. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 8-12.
10. Gill P. (2001) Application of Low Copy Number DNA Profiling. *Croat Med J.* , 42(3), 229-232.]
11. L. Morenos, R.A.H. van Oorschot, F.D. Guarino, R.J Mitchell (2007) Evaluation of the use of freezer mill to improve DNA retrieval from dried cotton swabs
12. Cengiz S. (2013) *Adli Belge İncelemelerinde İmza ve Yazının Yaş Tayini*. Yargıtay Kararları. 111-145.
13. Aşıcıoğlu F.(2005) *Adli belge incelemesi* Beta yayınları 1. Basım s:34-45 ve 167-169.
14. Taşdemir K.(2013) *Belgelerde Sahtecilik Suçları* Haziran 2013 Ankara Ertem Basım Ltd. Şti.

15. Cengiz S., İşlek Salkım D., İşat E. (2017) Belgede Sahtecilik Tespitinde Mürekkep Yapı ve Yaş Tayini, Seçkin Hukuk, Editör Cengiz S. syf 17-23
16. Weyermann C. Margot P., Schiffer B., (2008) A Logical framework to ballpoint ink dating interpretation Sci&Justine (48):118-125.
17. Ainsworthá Mitchell, C. (1920) Estimation of the age of ink in writing. Analyst, 45(532), 247-258.
18. Ataç Y. (2010) Adli bilim (kriminalistik) alanında kâğıdın incelenmesi Polis Bilimleri Dergisi 12 (4)-37-50.
19. Levinson J. (2001) Questioned Documents – A Lawyer’s Handbook, Academic Press, London and California
20. Kağıtçı, M.A. (1977) Kağıdın gelişimi. Eczacıbaşı Dergisi. Sayı:4 . Ekim .s. 6-11 .
21. Bloom, M. J. (2003) Kâğıda İşlenen Uygarlık Kağıdın Tarihi ve İslam Dünyasına Etkisi, (Z. Kılıç, Çev.), İstanbul: Kitap Yayınevi.
22. Scott W. E., Abbott J. C., Tosset S. (1995) Properties of Paper: An Introduction, Tappi Press, Atlanta, Georgia, 1995.
23. Calcerrada, M., & García-Ruiz, C. (2015) Analysis of questioned documents: a review. Analytica chimica acta, 853, 143-166.
24. Bügler JH, Buchner H, Dalmayer A (2005) Characterization of ballpoint pen inks by thermal desorption and gas chromatography mass spectrometry J.Forensic Sci.50(5): 1209-1214
25. Hofer, R. (2004) Dating of ballpoint pen ink. Journal of Forensic Science, 49(6), JFS2004056-5.
26. <https://www.google.com.tr/imgres?imgurl> (Son Erişim Tarihi:20.08.2018)
27. <https://kids.britannica.com/students/assembly/view/183527>(Son Erişim Tarihi: 20.08.2018)
28. Purdy, D. C. (2006). Identification of handwriting. Scientific examination of questioned documents, 47-74.
29. Brunelle R., Reed R.W.(1985) Forensic examination of ink and paper, Charles C Thomas, USA
30. Hamzaoglu, N., Yavuz, F., & Çakır, İ. (2008) Obliterated writings examination by spectral and hyperspectral methods. Journal of Forensic Medicine, 22(3), 22-34.
31. Bugler J., Buchner H., (2008) Age Determination of Ballpoint ink by Thermal Desorption and gas Chromatography-mass Spectrometry, J.For.Sci. (53) 982-988.

32. Adam CD., Sherrat SL. , Zholobenko VL. (2008) Classification and individualisation of black ballpoint pen inks using principal component analysis of uv-vis absorption spectra J.Forensic Sci.174:16-25.
33. Vogt C.,Becker A., Vogt J.(1999) Investigation of ballpoint pen inks by capillary electrophoresis(ce) with uv/vis absorbance and laser induced fluorescence detection and particle induced X-ray emission(PIXE) J. Forensic Sci 44(4) :819-831
34. Stewart L. (1985) Ballpoint ink age determination by volatile component comparison – a preliminary study J.Forensic Sci. 30(2):405-411
35. Sakayanagi M., Komuro J., Konda Y., Watanabe K., Harigaya Y. (1999) Analysis of Ballpoint Pen Inks by Field Desorption Mass Spectrometry, Journal of Forensic Sciences, 44(6): 1204-1214.
36. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/> (Son Erişim Tarihi: 20.09.2018)
37. Wang X-F, Yu J.,Xie M-X, Yao Y-T, Han J (2008) Identification and dating of the fountain pen ink entries on documents by ion-pairing high- performance liquid chromatography Forensic Sci Int, 180:43-49.
38. Govindwar SP, Saratale RG, Saratale GD, Chang JS (2011) Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. J. of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 42(1):138-157.
39. Shih C-M., Liu J-T, Chen B-H, Lin C-H (2008) Separation of crystal violet dyes and its application to pen ink analysis using CZE and MEKC methods J.Sep.Sci 31:893-897
40. Neely W.C. , Hall T.D, Cravitt S., Delap J.H. (1975) Modification of a commercial spectro-fluorometer for rapid determination of near infrared emission Applied Spectroscopy 29(2) : 205-206
41. Bügler, J. H., Buchner, H., & Dallmayer, A. (2005) Characterization of ballpoint pen inks by thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Forensic Science, 50(5), JFS2004486-6.
42. Weyermann, C., Almog, J., Bügler, J., & Cantu, A. A. (2011) Minimum requirements for application of ink dating methods based on solvent analysis in casework. Forensic science international, 210(1-3), 52-62.
43. Grim D. M., Siegel J., Allison J. (2001) Evaluation of Desorption/Ionization Mass Spectrometric Methods in the Forensic Applications of the Analysis of Inks on Paper, Journal of Forensic Sciences, 46(6) :1411-1420.

44. Cantu A. A. (1995) A Sketch of Analytical Methods for Document Dating Part I. The Static Approach: Determining Age Independent Analytical Profiles, *International Journal of Forensic Documents Examiners*, 1 (1): 40-51.
45. Weyermann C. (2009) Dating a document, in: M.A.E. Jamieson (Ed.), *Encyclopedia of Forensic Sciences*, vol. III, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 684-692.
46. Li, X.; Liu, G.; Zhao J. (1999) Two Competitive primary Processes in the Photodegradation of Cationic Triarylmethane Dyes Under Visible Irradiation in TiO₂ Dispersions. *New J. Chem.* 23:1193–1196.
47. Brezová V., Pigošová J., Havlínová B., Dvoranová D., Durovic M. (2003) EPR Study of Photochemical Transformations of Triarylmethane Dyes, *Dyes and Pigments*, 61: 177-198.
48. İşlek D. Belgeden Mavi Renkli Tükenmez Kalem Mürekkeplerinin Yapı ve Yaş Tayini. Doktora Tezi. İstanbul : Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, 2015.
49. Islek, D. S., Isat, E., & Cengiz, S. (2017) Determining malpractice by ink aging method. *Medicine*, 6(1), 136-8.
50. Avcı, A., Can, M., & Etemoğlu, A. B. (2001) A theoretical approach to the drying process of thin film layers. *Applied thermal engineering*, 21(4), 465-479.
51. Cantú, A. A. (2012) A study of the evaporation of a solvent from a solution—application to writing ink aging. *Forensic science international*, 219(1-3), 119-128.
52. Kirsch, D. (2006) Explorative project to determine resins and their aging products in ballpoint inks by mass spectrometry. In 4th Conference of the European Document Expert Working Group, Netherlands (pp. 27-30).
53. Keheyan, Y., Eliazyan, G., Engel, P., & Rittmeier, B. (2009) Py/GC/MS characterisation of naturally and artificially aged inks and papers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 86(1), 192-199.
54. Şimşek Ö. Belge Üzerindeki Şüpheli Mürekkeplerin Reçinelerinin Termal Desorpsiyon Ve Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (TD-GC/MS) İle Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul: Adli Tıp Enstitüsü İstanbul Üniversitesi, 2017.
55. Aginsky, V. N. (1998) Measuring ink extractability as a function of age-why the relative aging approach is unreliable and why it is more correct to measure ink volatile components than dyes. *International Journal of Forensic Document Examiners*, 4, 214-230.

56. Siegel, J., Allison, J., Mohr, D., & Dunn, J. (2005) The use of laser desorption/ionization mass spectrometry in the analysis of inks in questioned documents. *Talanta*, 67(2), 425-429.
57. O'Connell, J., & Soderman, H. (1936) *Modern Criminal Investigation*, 1st ed., Literary Digest Books, Funk & Wagnalls Company, New York/London, p. 408.
58. Kikuchi, Y. (1959). Estimation of age of blue black ink writing (I). *Japanese Police Science Report*, 12(3), 379-386.
59. Kikuchi Y., (1960) Studies on the Age of Iron-Gallotannate Ink Writing (II) the Chromatic Study of Ink Stain, *Journal of Criminology* 26(2):39-59.
60. Kikuchi Y., (1963) Estimation of Age of Blue Black Ink Writing (III), *Japanese Police Science Report* 16(1):83-86.
61. Cantu A., (1988) Comments on the accelerated aging of ink *Journal of Forensic Sciences* 33 (3) 744-750
62. Brunelle R., Two multiple sequential approach to determining the relative age of writing inks, (1995) *International of Forensic Document Examiners* 1 (2) 94-98.
63. Brazeau, L., Gaudreau, M., (2000) The use of Solid Phase Micro-Extraction (SPME) in the development of a method to determine the ageing characteristics of inks, 58th meeting of the ASQDE in Ottawa
64. Gaudreau, M., & Brazeau, L. (2002) Ink dating using a solvent loss ratio method. In *Proceedings of the 60th Annual Conference of the American Society of Questioned Document Examiners* (pp.14-18). American Society of Questioned Document Examiners.
65. Andrasko, J. (2003) Ink dating using SPME and methanol extraction. In *3rd Meeting of the European Network of Forensic Science Institutes*, Istanbul.
66. LaPorte, G. M., Wilson, J. D., Cantu, A. A., Mancke, S. A., & Fortunato, S. L. (2003) The identification of 2-phenoxyethanol in ballpoint inks using gas chromatography/mass spectrometry—relevance to ink dating. *Journal of Forensic Science*, 49(1), 1-5.
67. Weyermann, C., Kirsch, D., Vera, C. C., & Spengler, B. (2007) A GC/MS study of the drying of ballpoint pen ink on paper. *Forensic science international*, 168(2-3), 119-127.
68. Weyermann, C., & Spengler, B. (2008) The potential of artificial aging for modelling of natural aging processes of ballpoint ink. *Forensic Science International*, 180(1), 23-31.

69. C. Neumann, R. Ramotowskib, T. Genessay (2011) Forensic examination of ink by high-performance thin layer chromatography. The United States Secret Service Digital Ink Library, J. Chromatogr. A 1218:2793–2811.
70. Aginsky V., (1993) Some for new ideas dating ballpoint inks—a feasibility study, Journal of Forensic Sciences 38 (5) 1134–1150
71. Liu, Y. Z., Yu, J., Xie, M. X., Chen, Y., Jiang, G. Y., & Gao, Y. (2006) Studies on the degradation of blue gel pen dyes by ion-pairing high performance liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. Journal of chromatography A, 1125(1), 95-103.
72. Senior, S., Hamed, E., Masoud, M., & Shehata, E. (2012) Characterization and dating of blue ballpoint pen inks using principal component analysis of UV–Vis absorption spectra, IR spectroscopy, and HPTLC. Journal of forensic sciences, 57(4), 1087-1093.
73. Kher AA, Green EV, Mulholland MI (2001) Evaluation of principal components analysis with high-performance liquid chromatography and photodiode array detection for the forensic differentiation of ballpoint pen inks J.Forensic Sci. 46(4):878-883
74. Güngör B., Siyah Tükenmez Kalem Mürekkeplerinin Fotokimyasal Dönüşümlerinin HPLC ile İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, 2013.
75. İrten A., İki Aya Kadar Işıktaki Bekletilmiş Olan Tükenmez Kalem Yazılarında HPLC Yöntemi İle Zamanın Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, 2013.
76. <http://okanongan.blogspot.com/2015/01/hplc-yuksek-performans-sivi.html>(Son Erişim Tarihi: 23.08.2018)
77. Brewer, J. D., Hagan, K. A., & Egan, J. M. (2005) Forensic analysis of blue ballpoint pen inks using capillary electrophoresis. Research and Technology, 7(3).
78. Tebbett, I. R., Chen, C., Fitzgerald, M., & Olson, L. (1992) The use of HPLC with multiwavelength detection for the differentiation of non ball pen inks. Journal of Forensic Science, 37(4), 1149-1157.
79. Türkmen Z., Mercan S., Cengiz S. (2008) Eroin, Morfin, Kokain ve MDMA'nın Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi ile Eş Zamanı Tayini, Adli Tıp Dergisi, 22(1): 13- 24.

80. Karşlı Ö., Farklı Fiziksel Koşullar Altında Kalan Belgeler Üzerindeki Mavi Tükenmez Kalem Mürekkeplerinin Spektroskopik Yöntemler Ve İnce Tabaka Kromatografisiyle Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2006.
81. Hosu, A., Pop, B., & Cimpoiu, C. (2015) The Forensic analysis of pigments from some inks by HPTLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(11), 1109-1112.
82. Aginsky, V. N. (1996) Dating and characterizing writing, stamp pad and jet printer inks by gas chromatography/mass spectrometry. *Int J Forensic Doc Examiners*, 2(2), 103-15.
83. <https://prezi.com/j9bkzyznkpt-w/gcms/> (Son Erişim Tarihi: 23.08.2018)
84. Tatlıcı, G., & Kibaroglu, A. (2006) Adli Bilimlerde Kapiler Elektroforez Uygulamalarında Son Gelişmeler. *Türkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences*, 3(2), 65-71
85. Lee, L. C., Othman, M. R., & Pua, H. (2012) Systematic Assessment of Attenuated Total Reflectance-Fourier Transforms Infrared Spectroscopy Coupled With Multivariate Analysis for Forensic Analysis of Black Ballpoint Pen Inks. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 16(3), 262-272
86. <http://rasyonalist.org/yazi/elektromanyetik-dalgalar-gorunur-bolge/> (Son Erişim Tarihi: 23.08.2018)
87. Anderman, T. (2001) Raman spectroscopy of ink on paper. *Prob. Forensic Sci*, 46, 335-344
88. Braz, A., López-López, M., & García-Ruiz, C. (2013) Raman spectroscopy for forensic analysis of inks in questioned documents. *Forensic science international*, 232(1-3), 206-212
89. Ziğba-Palus, J., & Kunicki, M. (2006) Application of the micro-FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy and XRF method examination of inks. *Forensic science international*, 158(2-3), 164-172.
90. Weyermann, C., Kirsch, D., Costa-Vera, C., & Spengler, B. (2006) Photofading of ballpoint dyes studied on paper by LDI and MALDI MS. *Journal of the american society for mass spectrometry*, 17(3), 297-306.
91. Emekli&Yiğitbaşı, Klinik Biyokimya, Medipol Üniversitesi, Nobel Tıp Kitabevleri Mart 2015, syf. 63-64, ISBN:978-605-84521-0-7.

92. Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., & Hillenkamp, F. (1987) Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *International journal of mass spectrometry and ion processes*, 78, 53-68.
93. Karas, M., Bahr, U., & Hillenkamp, F. (1989) UV laser matrix desorption/ionization mass spectrometry of proteins in the 100 000 dalton range. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 92, 231-242.
94. Wieser A., Schnedier L., Jung J. Schubert S.,(2012) MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review), *Appl Microbiol Biotechnol*, 93:965–974
95. Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 380-407.
96. Lottspeich, F. (1999) Proteome analysis: a pathway to the functional analysis of proteins. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(17), 2476-2492.
97. <https://www.slideshare.net/doctorrao/malдитof-in-clinical-microbiologyour-vision-to-future-technology> (Son Erişim Tarihi: 17.07.2018)
98. BİBEROĞLU, G. (2003) Kütle spektrometresi ve tıp alanında kullanımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 23(6), 491-498.
99. Caulfield, A. J., & Wengenack, N. L. (2016) Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 4, 33-43.
100. Yükseloğlu E.H.& Kara U. Kara, *Hukukçular ve Genetikçiler İçin Temel Adli Genetik*, Nobel Tıp Kitabevleri, Mayıs 2015, syf.134-144.
101. Weedn VW., Hicks JW. (1998) The Unrealized Potential Of DNA Testing, *National Institute of Justice, Research in Action*, USA, p: 1-8
102. Lawrence Kobilinsky, Thomas F. Liotti, Jamel Oeser-Sweat, 2005, *Forensic and Legal Applications*, Chapter 3: Biological Evidence—Science and Criminal Investigation (Pages: 25-44)
103. Jeffreys AJ. (1987) Highly Variable Minisatellites And DNA Fingerprints. *Biochemical Society Transactions*, 15: 309-317. Saferstein R. 2004. *Criminalistics: An Introduction To Forensic DNA Analyses*. 2. Edition Pearson Prentice Hall New Jersey.34-50
104. Alberts B., Jonson A., Lewis J. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, Fourth edition, Garland Science, New York.

105. Bender K., Fardan MJ., Schneider PM. (2004) Preparation of degraded human DNA under controlled conditions, *Forensic Science International*, 139: 135-140
106. Zamir A., Springer E., Glattstein B. (2000) Fingerprints and DNA: STR typing of DNA Extracted from adhesive tape after processing for fingerprints, *J Forensic Sci*, 45 : 687-688.]
107. Sewell J, Quinones I, Ames C, Multaney B, Curtis S, Seeboruth H, Moore S, Daniela B (2008) Recovery of DNA and fingerprints from touched documents. *Forensic Science International: Genetics*. 2(4): 281-285
108. Balogh MK, Burgera J, Bender K, Schneider PM, Alta KW (2003) STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. *Forensic Science International* 137: 188–95.
109. Deans J. (2006) Recovery of Fingerprints from Fire Scenes and Associated Evidence, *Science & Justice*, Volume 46 N0.3
110. Torres Y, Flores I, Prieto V, López-Soto M, Farfán MJ, Carracedo A, Sanz P (2003) DNA mixtures in forensic casework: a 4-year retrospective study. *Forensic Science International* 134 (2): 180-6
111. Schulz, M. M., & Reichert, W. (2002) Archived or directly swabbed latent fingerprints as a DNA source for STR typing. *Forensic science international*, 127(1-2), 128-130.
112. Gülekçi Y., Olay yerlerinde elde edilen patlama ve molotof kokteyli atma olaylarında kullanılan el yapımı yangın çıkarıcılar üzerinden vücut izi ve biyolojik bulguların araştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi / Adli Tıp Enstitüsü, 2017.
113. Cole, S. (2001) *Suspect Identities: A History Of Fingerprinting And Criminal Identification*, Cambridge, MA, Harvard University Press.]
114. Budowle B. and van Daal A. (2008) Forensically relevant SNP classes, *BioTechniques*, 44:603-610 (25th Anniversary Issue
115. Kalfoglu EA., Yükseloglu H. (2002) İnsan genomu, suç ve suçun önlenmesi, *DEU Tıp Fakültesi Dergisi*, 71-81
116. Sensabaugh, G. F. (1991) Genetic typing of biological evidence using the polymerase chain reaction. In *DNA—Technology and Its Forensic Application* (pp. 33-40). Springer, Berlin, Heidelberg.
117. https://whyfiles.org/126dna_forensic/3.html (Son Erişim Tarihi: 03.10.2018)
118. Ballantyne, J. (1997) Mass disaster genetics. *Nature genetics*, 15(4), 329-331.

119. Collins PJ, Hennessy LK, Leibel CS, Roby RK, Reeder DJ and Foxall PA. (2004) Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS loci, D2S1338, D19S433, and amelogenin: the AmpFlSTR® Identifiler® PCR amplification kit, *J. Forensic Sci*, 49:1265-1277
120. Kido, A., Hara, M., Yamamoto, Y., Kameyama, H., Susukida, R., Saito, K., ... & Oya, M. (2003) Nine short tandem repeat loci analysis in aged semen stains using the AmpFLSTR Profiler Kit and description of a new vWA variant allele. *Legal Medicine*, 5(2), 93-96.
121. Buckleton J, Triggs CM, Walsh SJ, *Forensic DNA Evidence Interpretation*, CRC Press, 2005.
122. Butler JM, (2005) *Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers*, 2nd Edition, vol:1, pp 1-17, Elsevier Academic Press, London, UK.
123. Coble, M. D., & Butler, J. M. (2005) Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *Journal of Forensic Science*, 50(1), JFS2004216-11.
124. Wilson, M. R., DiZinno, J. A., Polanskey, D., Replogle, J., & Budowle, B. (1995) Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *International journal of legal medicine*, 108(2), 68-74.
125. Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill, P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B. (1997) DNA recommendations: Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J. Legal Med.*, 110:175-176.
126. Gill P, Buckleton J (2009) Low copy number typing—Where next? *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2 (1): 553-.5
127. Kanitakis J. (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin, *European Journal of Dermatology*, Volume 12, Number 4, 390-401.
128. Arlian LG., Marjorie SM. (2003) Biology, ecology, and prevalence of dust mites, *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 23: 443- 468.
129. Darnell, JE, Lodish HF, Baltimore D. (1986) *Cell biology*. Scientific American, New York, 137
130. Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P. (2002) The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Sci Int*, 129:25–34.
131. Phipps M, Petricevic S. (2007) The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. *Forensic Sci Int*, 168:162–168.

- 132.Djuric M, Varljen T, Stanojevic A, Stojkovic O. (2008) DNA typing from handled items. *Forensic Sci Int Genet*, 1:411–412.
- 133.Van Oorschot R.A.H., Ballantye K.N., Mitchell R.J. (2010) Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetics*. 1,14.
- 134.Kamphausen, T., Schadendorf, D., von Wurmb-Schwark, N., Bajanowski, T., & Poetsch, M. (2012) Good shedder or bad shedder—the influence of skin diseases on forensic DNA analysis from epithelial abrasions. *International journal of legal medicine*, 126(1), 179-183.
- 135.Pesaresi M, Buscemi L, Alessandrini F, Cecati M. Tagliabracci A (2003) Qualitative and quantitative analysis of DNA recovered from fingerprints. *International Congress Series* 1239: 947-51
- 136.Goray M, Eken E, Mitchell RJ, van Oorschot R.A.H. (2010) Secondary DNA transfer of biological substances under varying test conditions. *Forensic Sci Genet*, 4:62–67
- 137.Raymond JJ, van Oorschot RAH, Gunn PR, Walsh SJ, Roux C. (2009) Trace evidence characteristics of DNA: a preliminary investigation of the persistence of DNA at crime scenes. *Forensic Sci Int Genet*, 4:26–33
- 138.Petridis G., Parmak İzlerinden Elde Edilen DNA'nın Mini STR Tekniği İle İncelenmesi Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi/Adli Tıp Enstitüsü, 2011.
- 139.L. Morenos, R.A.H. van Oorschot, F.D. Guarino, R.J Mitchell (2007) Evaluation of the use of freezer mill to improve DNA retrieval from dried cotton swabs.
- 140.Van Oorschot, R. A. H., Phelan, D. G., Furlong, S., Scarfo, G. M., Holding, N. L., & Cummins, M. J. (2003) Are you collecting all the available DNA from touched objects?. In *International Congress Series* (Vol. 1239, pp. 803-807). Elsevier.
- 141.Alaeddini, R., Walsh, S. J., & Abbas, A. (2010) Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review. *Forensic science international: genetics*, 4(3), 148-157.
- 142.Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. (2000) An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci. Int.*, 112(1):17–40
- 143.Mulero JJ, Chang CW, Legace RE, Wang DY, Bas JL, McMahon TP, Hennessy LK. (2008) Development and Validation of the AmpFSTR MiniFiler™ PCR Amplification Kit: A MiniSTR Multiplex for the Analysis of Degraded and/or PCR Inhibited DNA. *J Forensic Sci.*, 53: 4

144. Bender K, Schneider PM, Rittner C. (2000) Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Sci Int*, 113(1–3):103–7.
145. Dixon LA, Dobbins AE, Pulker HK, Butler JM, Vallone PM, Coble MD, et al. (2006) Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs—results of a collaborative European (EDNAP) exercise. *Forensic Sci. Int.*, 164(1):33–44
146. Just RS, Irwin JA, O’Callaghan JE, Saunier JL, Coble MD, Vallone PM, et al. (2004) Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. *Forensic Sci. Int.*, 146:(Suppl):147–9.
147. Hill CR, Cline MC, Duewer DL, Butler JM. (2011) Concordance testing comparing STR multiplex kits with a standard data set. *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series 3*, e188–e189
148. Perlin, M.W., Szabady, B. (2001) Linear mixture analysis: a mathematical approach to resolving mixed DNA samples. *Journal of Forensic Sciences*, 46(6):1372–1378.
149. Clayton T.M. Whittaker J.P., Sparkes R., Gill P. (1998) Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling, *Forensic Sci. Int.* 91: 55–70.
150. Gill P.D., Brenner C.H., Buckleton J.S., Carracedo A., Krawczak M., Mayr W.R, Morling N., Prinz M., Schneider P.M., Weir B.S. (2006) DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Science International*, 160(2–3): 90–101.
151. Ricci U, Marchi C, Previdere C, Fattorini P. (2006) Quantification of human DNA by real-time PCR in forensic casework. *Elsevier International Congress Series*, 1288: 750–752
152. Kahya, S., Büyükcangaz, E., & Carlı, K. T. (2013) Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) optimizasyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32(1)
153. Butler JM, Shen Y, McCord BR (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci.* 48(5): 1054–64.
154. Biosystems, A. (2007) AmpFlSTR miniFiler™ PCR amplification kit user guide. Applied Biosystems, Foster City.
155. AmpFlSTR Identifiler, P. C. R. (2001) Amplification Kit user’s manual. Applied Biosystems, Foster City, CA.
156. Hares, D. R. (2012) Expanding the CODIS core loci in the United States. *Forensic Science International: Genetics*, 6(1), e52–e54.

- 157.Flores, S., Sun, J., King, J., & Budowle, B. (2014) Internal validation of the GlobalFiler™ Express PCR Amplification Kit for the direct amplification of reference DNA samples on a high-throughput automated workflow. *Forensic Science International: Genetics*, 10, 33-39.
- 158.Wang, D. Y., Gopinath, S., Lagacé, R. E., Norona, W., Hennessy, L. K., Short, M. L., & Mulero, J. J. (2015) Developmental validation of the GlobalFiler® Express PCR Amplification Kit: a 6-dye multiplex assay for the direct amplification of reference samples. *Forensic Science International: Genetics*, 19, 148-155.
- 159.Martín, P., de Simón, L. F., Luque, G., Farfán, M. J., & Alonso, A. (2014) Improving DNA data exchange: validation studies on a single 6 dye STR kit with 24 loci. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 68-78
- 160.Hennessy L. K., Mehendale N., Chear K., Jovanovich S., Williams S., Park C., Gangano S., (2014) Developmental validation of the GlobalFiler1 express kit, a 24-marker STR assay, on the RapidHIT1 System, *Forensic Sci. Int. Genet.*, 13:247–258
- 161.GlobalFiler® Express PCR. Amplification Kit User Guide. Available at: <http://tools.lifetechnologies.com/downloads/User-Guide-GlobalFiler-Express-PCR-Kit.pdf>. (Son Erişim Tarihi: 03.10.2018)
- 162.Yükseloğlu EH., Y Kromozomu STR Polimorfizminin Babalık Tayini ve Adli İdentifikasyonda Kullanımı. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, 2003.
- 163.Li SFY. *Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Applications*. Amsterdam: Elsevier 1994
- 164.Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *nature*, 362: 709-715.
- 165.Northrop DM, McCord BR, Butler JM. (1994) Forensic applications of capillary electrophoresis *Journal of Capillary Electrophoresis*,1:158-68.
- 166.Tagliaro, F., & Smith, F. P. (1996) Forensic capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15(10), 513-525.
- 167.Wenz, H. M., Robertson, J. M., Menchen, S., Oaks, F., Demorest, D. M., Scheibler, D., ... & Efcavitch, J. W. (1998) High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis. *Genome research*, 8(1), 69-80.
- 168.Butler JM, Li J, Shaler TA, Monforte JA, Becker CH. (1998) Reliable genotyping of short tandem repeat loci without an allelic ladder using time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Legal Med.*, 112:45-49.

- 169.Enteşe, S., Güllü, G., (2009) İç Ortam Havasında Biyoaerosol Düzeyleri 21-28 VIII. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi, 359-365
- 170.Binark, İ. (1988) Arşiv Malzemesini Tahrib Eden Unsurlar, Bunlara Karşı Korunma Metodları ve Arşiv Malzemesinin Restorasyonu., s.349
- 171.Pinniger, D. (2004) Pest management in museums, archives and historic houses, Archetype Publications.
- 172.Sequeira, E.J. Cabrita, M.F. Macedo,(2012) Antifungals on paper conservation: An overview International Biodeterioration & Biodegradation, No:74, 67-86.
- 173.Kuzucuoglu, A. H., Kiraz, M. N., Ünsalan, O., & Taşdemir, İ. (2015) Kütüphanelerdeki El Yazması Eserlere Yönelik Bir Belgeleme Önerisi: İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Nadir Eserler Kitaplığı Örneği. Bilgi Dünyası, 16(1).
- 174.Al-Doory, (1984), Airborne Fungi, In:Al- Doory Y, Domson JF, Eds. Mouldy Allergy,Philadelphia, Lea And Febiger,27-40.
- 175.Süleymaniye Yazma Eser Kütüphanesi Konservasyon Ve Araştırma Merkezi, (2015) Yazma Eserlerde Biyolojik Bozulmalar ve Entegre Zararlı Mücadelesi Programı.
- 176.Otlewska, J. Adamiak, B. Gutarowska, (2014) Application of molecular techniques for the assessment of microorganism diversity on cultural heritage objects Vol. 61, No 2
- 177.Övet, H., Ergin, Ç., Kaleli, İ., (2012) Okul Sınıflarının Hava Örneklerinde Küf Mantarlarının Araştırılması ve Öğrenci Serumlarında Allerjene Özgül İge Düzeylerinin Karşılaştırılması. Mikrobiyol. Bul. 46(2): 266-275 (Övet, 2012: 46 (2): 266-275).
- 178.Fischer, G., Dott W.,2003. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. Arch Mikrobiol., 179: 75-82
- 179.Fridkin, S. K., Jarvis, W. R. , 1996 Epidemiology of Nosocomial Fungal Infectionsclinical Microbiology Reviews, Oct., 499-511.
- 180.Pastuszka, S.J., Paw, U.K.T., LIS, D.O., Wlazlo, A., Ulf, K., (2000) Bacterial and fungal aerosol in indoor environment in Upper Silesia, Poland. Atmospheric Environ., 34: 3833-3842.
- 181.Pastuszka, S.J., Marchwinska-Wyrwal, E., Wlazlo, A., (2005) Bacterial Aerosol in Silesian Hospitals: Preliminary Results.Polish J. of Environ.Studies 14(6): 883-890.

- 182.Martins-Diniz, J. N., Silva, R. A. M. DA, Miranda, E. T., Mendes-Giannini, M. J.S., (2005) Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit.Revistade-Saúde-Pública, 39:398-405.
- 183.D.W.G.Clements-D.I.Thomas;Arşiv Belgelerinin Korunması Konusunda Temel Bilgiler-Bir Ramp Çalışması-Çev.:Necla Olsa. Ankara 1993.s.9.
- 184.Adanır, T. (1998) İstanbul Süleymaniye Kütüphanesi örneğinde el yazması eserlerin restorasyonu, Dokuz Eylül Üniversitesi Güzel Sanatlar Enstitüsü, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- 185.Gazi, S. (1987) Eserlerin bakım ve tamiri, Fırat Havzası Yazma Eserler Sempozyumu'86 Bildiriler (s.109-113). Elazığ: Fırat Üniversitesi.
- 186.Kolar, J., Šala, M., Strlič, M., & Šelih, V. S. (2005) Stabilisation of paper containing iron-gall ink with current aqueous processes. Restaurator, 26(3), 181-189.
- 187.Kolar, J., Štolfa, A., Strlič, M., Pompe, M., Pihlar, B., Budnar, M., ... & Reissland, B. (2006) Historical iron gall ink containing documents—properties affecting their condition. Analytica chimica acta, 555(1), 167-174.
- 188.Adcock, E. (1998) IFLA Principles for the care and handling of library material. International Federation of Library Associations and Institutions Core Programme on Preservation and Conservation and Council on Library and Information Resources..
- 189.Zielińska-Jankiewicz, K., Kozajda, A., Piotrowska, M., & Szadkowska-Stańczyk, I. (2008) Microbiological contamination with moulds in work environment in libraries and archive storage facilities. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 15(1).
- 190.Çetinkaya, E., & Ayhan, K. (2012) Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. Karaelmas Fen Ve Mühendislik Dergisi, 2(1), 53-62
- 191.Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik Tanı.Bariş Yayınları Fakülteler Kitabevi 2.baskı, 425-521, 1995
- 192.Unat, E.K.Temel mikrobiyoloji .Cerrahpaşa Tıp Fak.Yayınları, Doyuran Matbası 2.baskı, 47-175, 1993
- 193.Sarıgüzel, U. D. N. Direk Mikroskopi Teknikleri VE Değerlendirilmesi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun

- 194.Çoban, A. Y., Demirpek, U., Çiftçi, A., & Bozdoğan, B. (2014). *Staphylococcus aureus* metisilin direncinin hızlı saptanmasında nitrat redüktaz testi: bir sınır değer duyarlılık test yöntemi. *Mikrobiyol Bül*, 48(1), 40-7.
- 195.Arvidson ve ark. *Cultivation Media for Bacteria*. Michigan State Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ABD, 2012. Web. Nisan
- 196..<http://learn.chm.msu.edu/vibl/content/differential/index.html>. (Son Erişim Tarihi: 22.09.2018)
- 197.Qiagen QIAamp® DNA Micro Ticari Kiti El Kitapçığı
- 198.Qiagen QIAamp® DNA Mini Ticari Kiti El Kitapçığı
- 199.Daly, D. J., Murphy, C., & McDermott, S. D. (2012) The transfer of touch DNA from hands to glass, fabric and wood. *Forensic Science International: Genetics*, 6(1), 41-46.
- 200.Wickenheiser RA (2002) Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact. *J Forensic Sci*, 47: 442-450.
- 201.Raymond, J. J., & Du Pasquier, E. (2004) The Effect of Common Fingerprint Detection Techniques on the DNA Typing of Fingerprints Deposited on Different. *Journal of Forensic Identification*, 54(1), V23.
- 202.Van Oorschot R.A.H., Jones M.K. (1997) DNA fingerprints from fingerprints, *Nature*, 387,767.
- 203.Holt MJ. Sequencing ESDA_ Examinations with the recovery of trace DNA from questioned documents, Master's thesis. Canberra, ACT, Australia: University of Canberra, 2013. (<http://www.canberra.edu.au/researchrepository/items/08f6e96f-b6b1-8e2c-5145-4f899bcae1b0/1/>.)
- 204.Butler, J. M. (2011) *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Academic Press.
- 205.Bogas, V., Carvalho, M., Corte-Real, F., & Porto, M. J. (2015) Testing the behavior of GlobalFiler® PCR amplification kit with degraded and/or inhibited biological samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, e21-e23.
- 206.Schulz Butler JM, Hill CR, Kline MC, Duewer DL, Sprecher CJ, McLaren RS. (2009) The single most polymorphic STR Locus: SE33 performance in U.S. populations. *Forensic Science International: Genetic Supplement Series* 2, 23-24.
- 207.STERFLINGER, K., (2010) Fungi: Their Role In Deterioration Of Cultural Heritage, *The British Mycological Society, Fungal Biology Reviews*, 24 47-55.

208. Karbowska-Berent, J., Górny, R. L., Strzelczyk, A. B., & Wlazło, A. (2011) Airborne and dust borne microorganisms in selected Polish libraries and archives. *Building and Environment*, 46(10), 1872-1879.
209. Gorshkova, K. O., Tumkin, I. I., Myund, L. A., Tverjanovich, A. S., Mereshchenko, A. S., Panov, M. S., & Kochemirovsky, V. A. (2016) The investigation of dye aging dynamics in writing inks using Raman spectroscopy. *Dyes and Pigments*, 131, 239-245
210. Aginsky, V. N. A., (1995) Microspectrophotometric Method for Dating Ballpoint Inks—A Feasibility Study. *J. Forensic Sci.*, 40:475–478.
211. Distler AM, Allison J., (2001) 5-Methoxysalicylic acid and spermine: a new matrix for the matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry of oligonucleotides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 12:456–62.
212. Asara, J. M., & Allison, J. (1999) Enhanced detection of phosphopeptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ammonium salts. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 10(1), 35-44.
213. Cheng, S. W., & Chan, T. W. D. (1996) Use of ammonium halides as co-matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization studies of oligonucleotides. *Rapid communications in mass spectrometry*, 10(8), 907-910.
214. Zhu, Y. F., Chung, C. N., Taranenko, N. I., Allman, S. L., Martin, S. A., Haff, L., & Chen, C. H. (1996) The study of 2, 3, 4-trihydroxyacetophenone and 2, 4, 6-trihydroxyacetophenone as matrices for DNA detection in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 10(3), 383-388.
215. Chen, H. S. (2005) Analysis of four ball point pen inks and two dyes by thin layer chromatography with fluorescence detection and matrix assisted laser desorption time-of-flight and electrospray ionization mass spectrometry. *Forensic Sci J*, 4, 15-27.
216. Do Kim, Y., Kim, J. P., Kwon, O. S., & Cho, I. H. (2009) The synthesis and application of thermally stable dyes for ink-jet printed LCD color filters. *Dyes and pigments*, 81(1), 45-52.
217. Dunn, J. D., & Allison, J. (2007) The Detection of Multiply Charged Dyes Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for the Forensic Examination of Pen Ink Dyes Directly from Paper. *Journal of forensic sciences*, 52(5), 1205-1211.

218. Fabianska, E., & Trzcinska, B. M. (2001) Differentiation of ballpoint and liquid inks-a comparison of methods in use. *Problems of Forensic Sciences*, 46, 383-400.
219. Kunicki, M. (2002). Differentiating blue ballpoint pen inks. *Problems of Forensic Sciences*, 51, 56-70.



8. EKLER

Ek-1. Bilgilendirmiş Onam Formu Örneği

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü tarafından yürütülen ve aşağıda adı geçen araştırma projesinde kullanılmak üzere parmak izi ve ağız içi sürüntüsü vermek yoluyla katkıda bulunmanızı dileriz.

Çalışmanın Adı: Çeşitli Kalem Mürekkeplerinin Fiziksel, Kimyasal Ve Biyolojik Koşullarda Moleküler Dönüşümlerinin İncelenmesi

Gönüllü, istediği anda araştırmacıya haber vererek araştırmadan çekilmek isteyebilir. Bu durumda, katılımcının örnekleri derhal imha edilecektir. Başka bir amaç için kullanılmayacaktır. Ayrıca araştırmacı tarafından da gerek görüldüğünde katılımcının örnekleri araştırma dışı bırakılacağı bildirilebilir.

Gönüllü katılımcı, araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyecektir. Ayrıca kendisine bir ödeme yapılmayacaktır.

Gönüllü katılımcının kimlik bilgileri gizli tutulacak ve kimse ile paylaşılmayacaktır.

Araştırmacının İletişim Bilgileri: Fatma Çavuş / 05447257039

Yukarıda adı geçen çalışma için parmak izimi ve ağız içi sürüntü örneğimi vermeyi ve inceleme sonuçlarımı anonim bir şekilde bilimsel yayınlarında kullanılmasını kabul ediyorum.

Araştırmaya katılan kişinin;

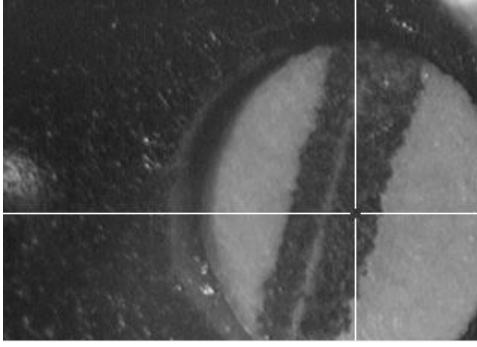
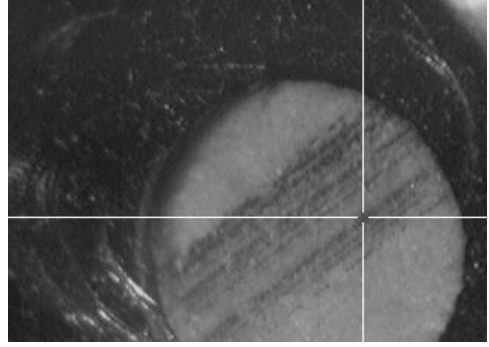
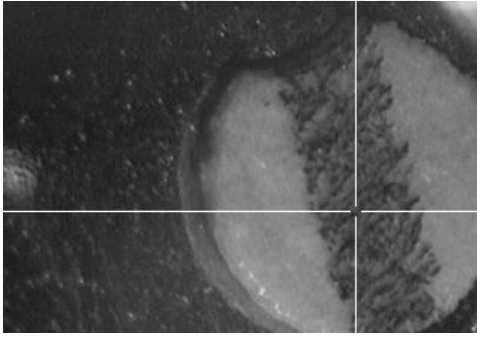
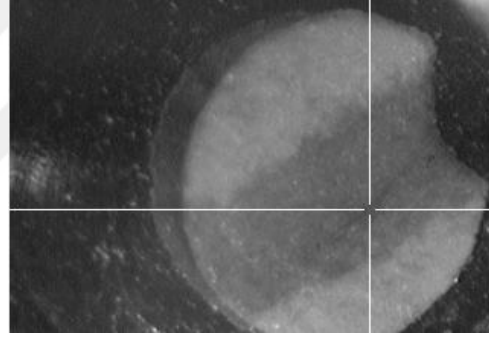
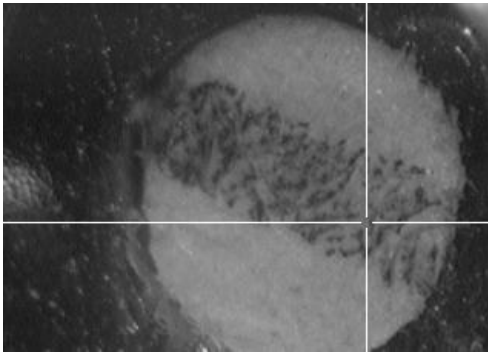
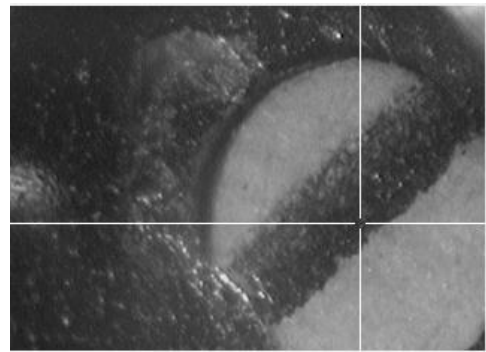
Araştırma Yapan:

Adı – Soyadı:

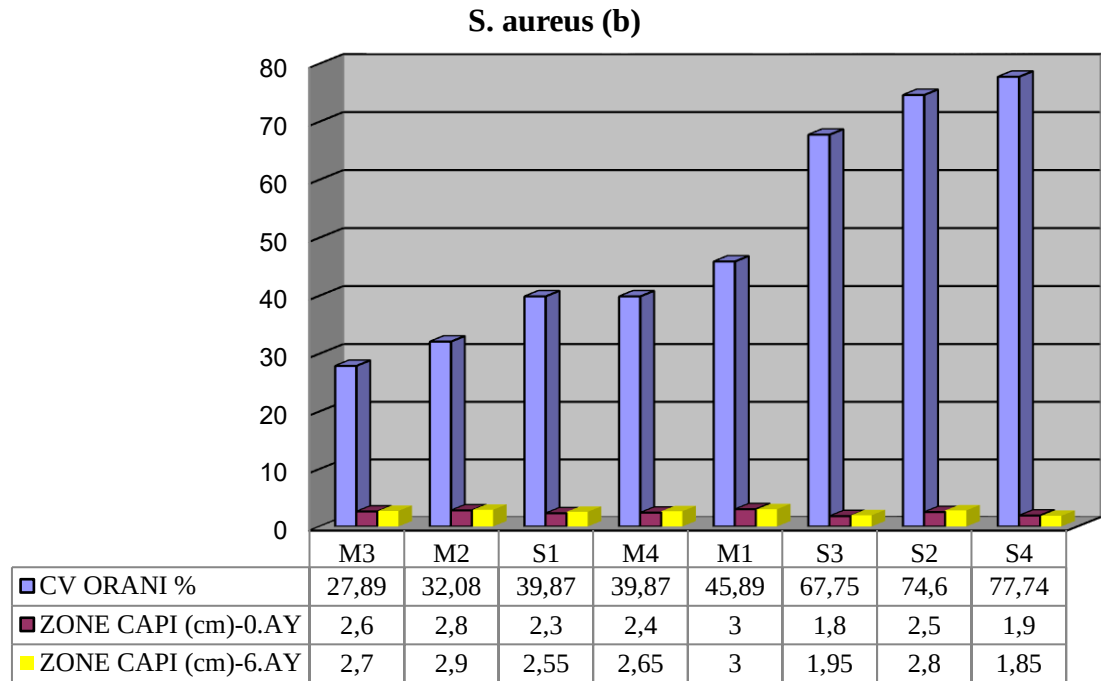
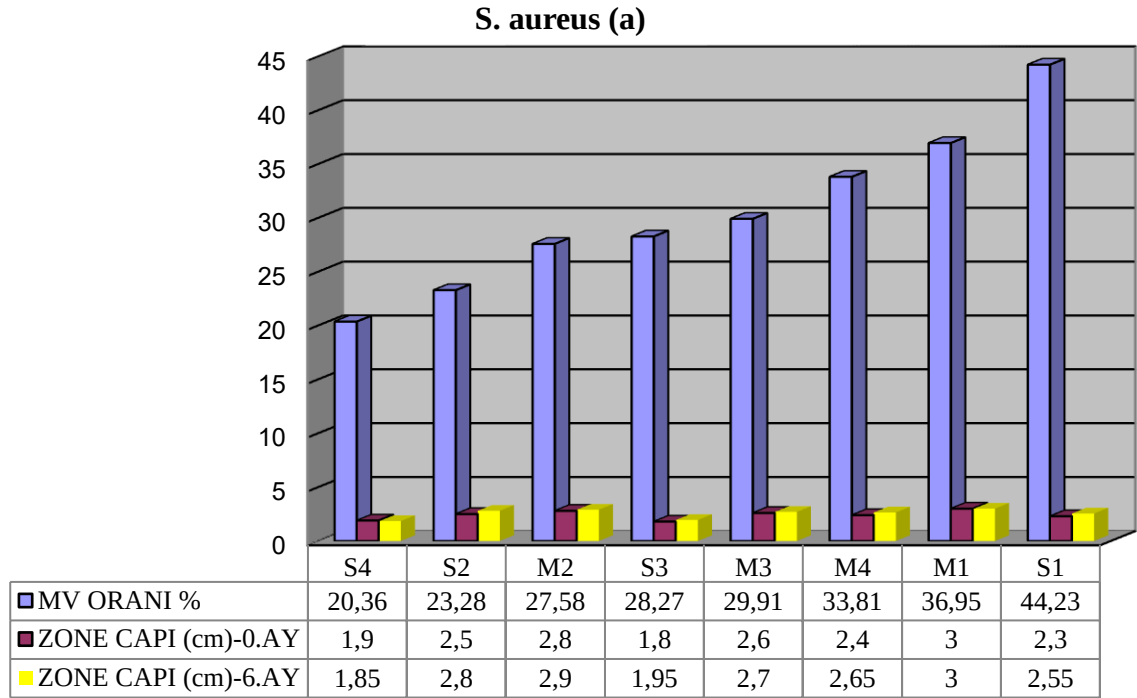
Tarih:

İmza:

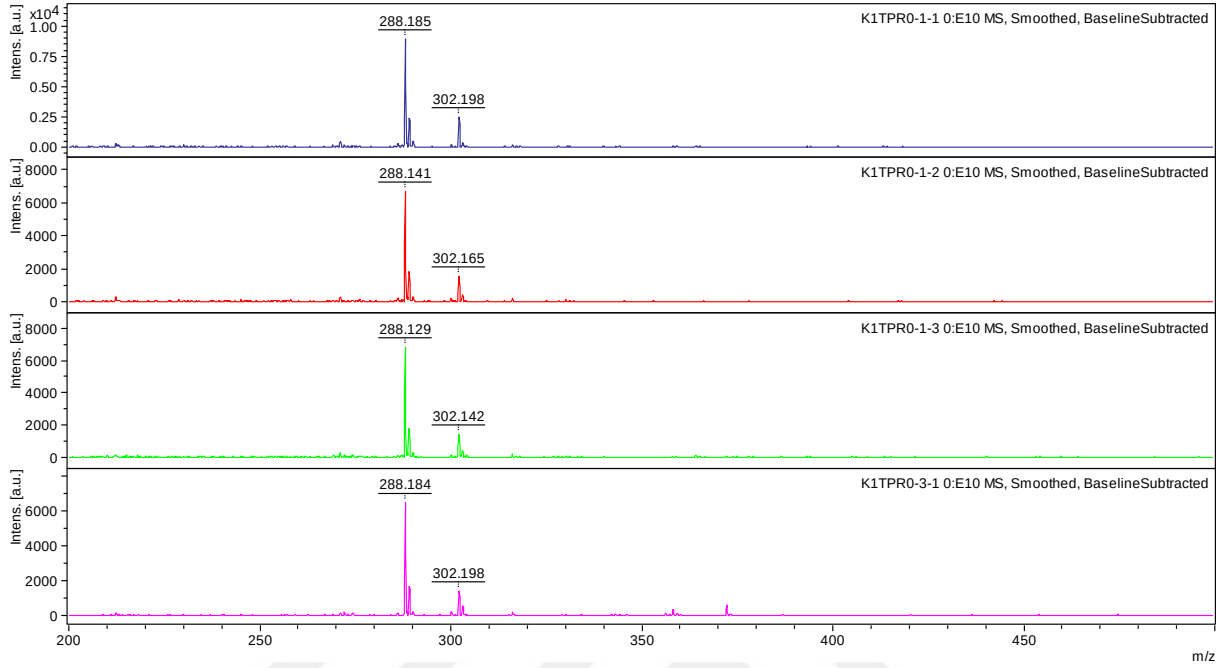
Ek-2. İnce (K1) ve Kalın (K2) A4 Kağıdı üzerindeki bazı mürekkep ve mürekkep pigmentlerinin MALDI-TOF-MS Cihazındaki Lazer Vuruşu Esnasındaki Analiz Görüntüsü

**K2M4****K1M3****K1S5****K2TPR****K1S3****K2MV**

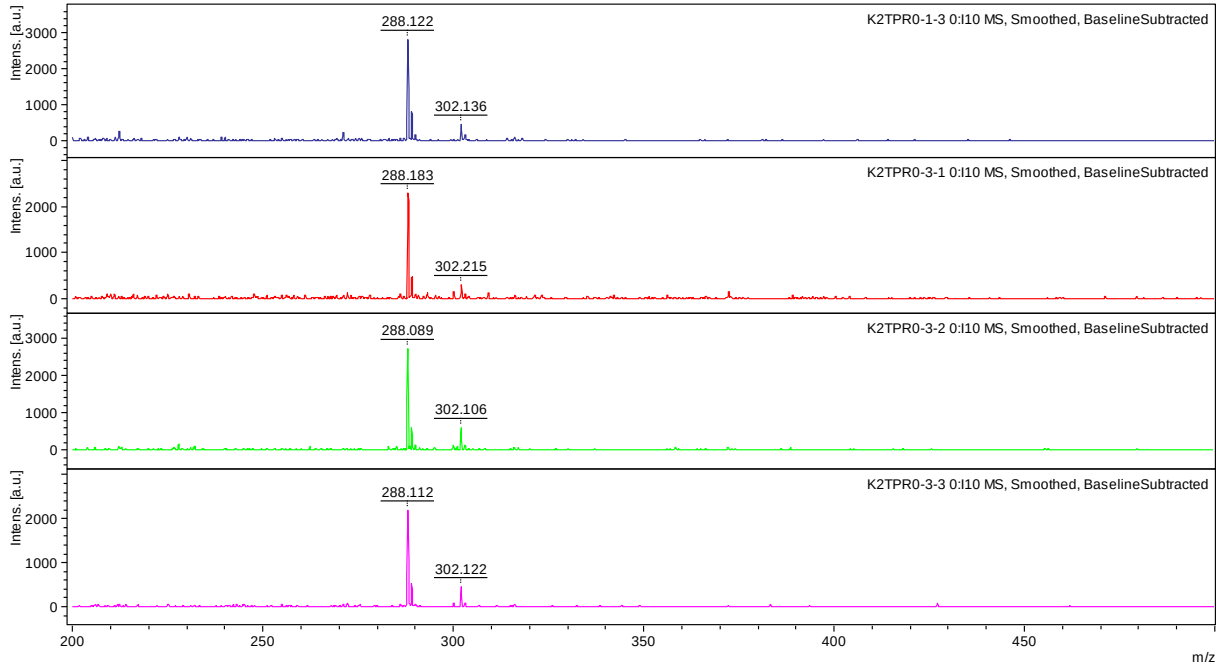
Ek-3. *S. aureus* ile kontamine edilerek 0 ve 6 ay bekletilmiş mürekkep örnekleri içerisindeki boyar maddelerden olan antimikrobiyal koruyucu etkiye sahip MV' nin (a) ve antimikrobiyal etkili olmasa da yine bir boyar özelliğe sahip CV'nin (b) toplam piklere göre oranlarının, ölçülen inhibisyon zon çapları ile karşılaştırılması (M1:Mavi Faber Castell FDx10 1.0 mm, M2:Mavi Schneider Slider Edge XB, M3:Mavi Pensan MV-Pen Vision , M4:Mavi Noki wonder Ball 1.0 mm, M5:Mavi Bigpoint 932)



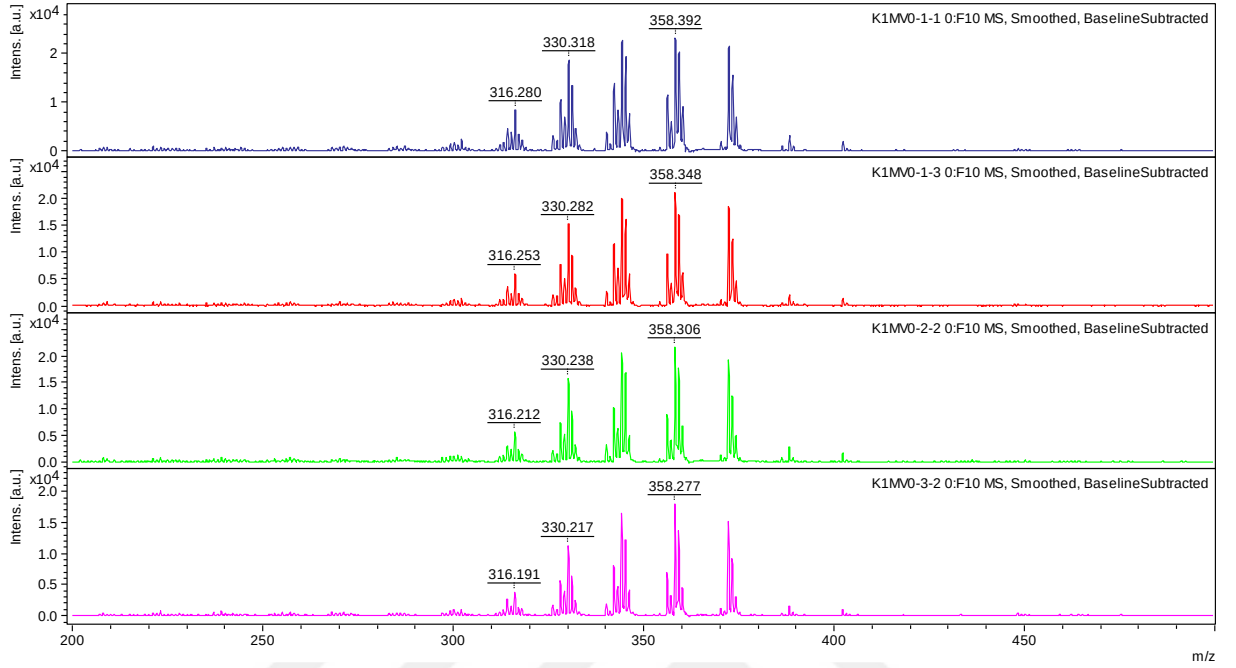
Ek-4. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış pararosanilin (PR) standardının 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örnek 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



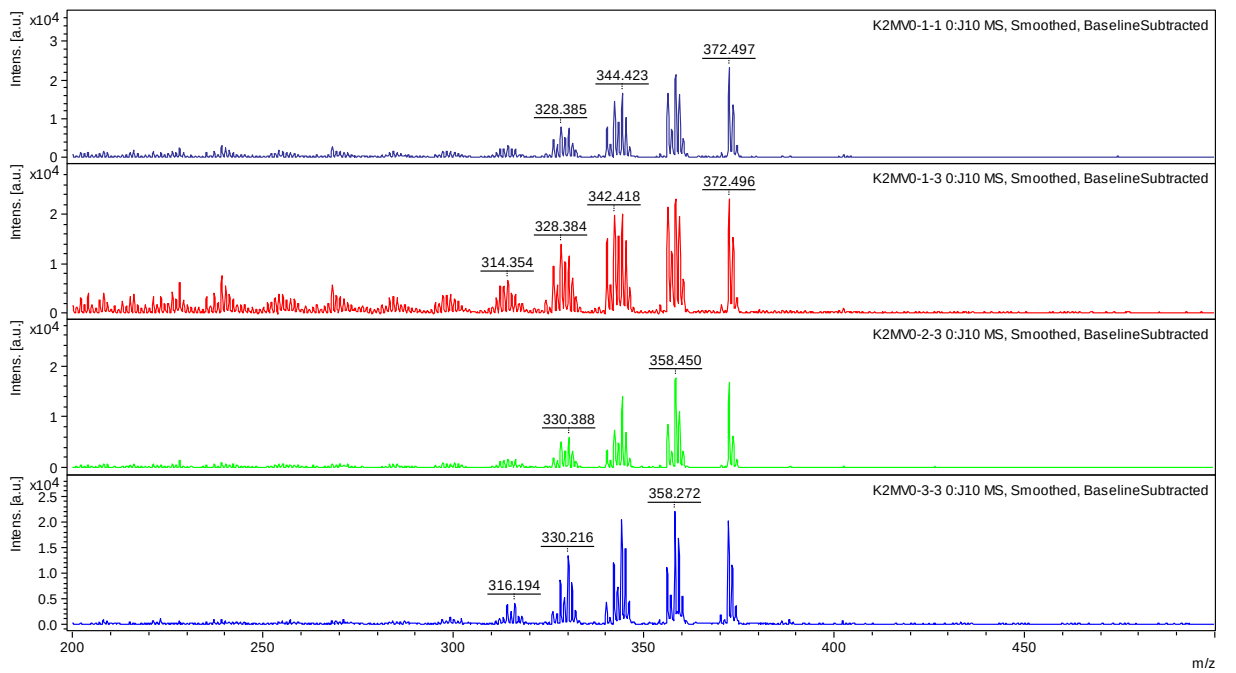
Ek-5. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış pararosanilin (PR) standardının 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örnek 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



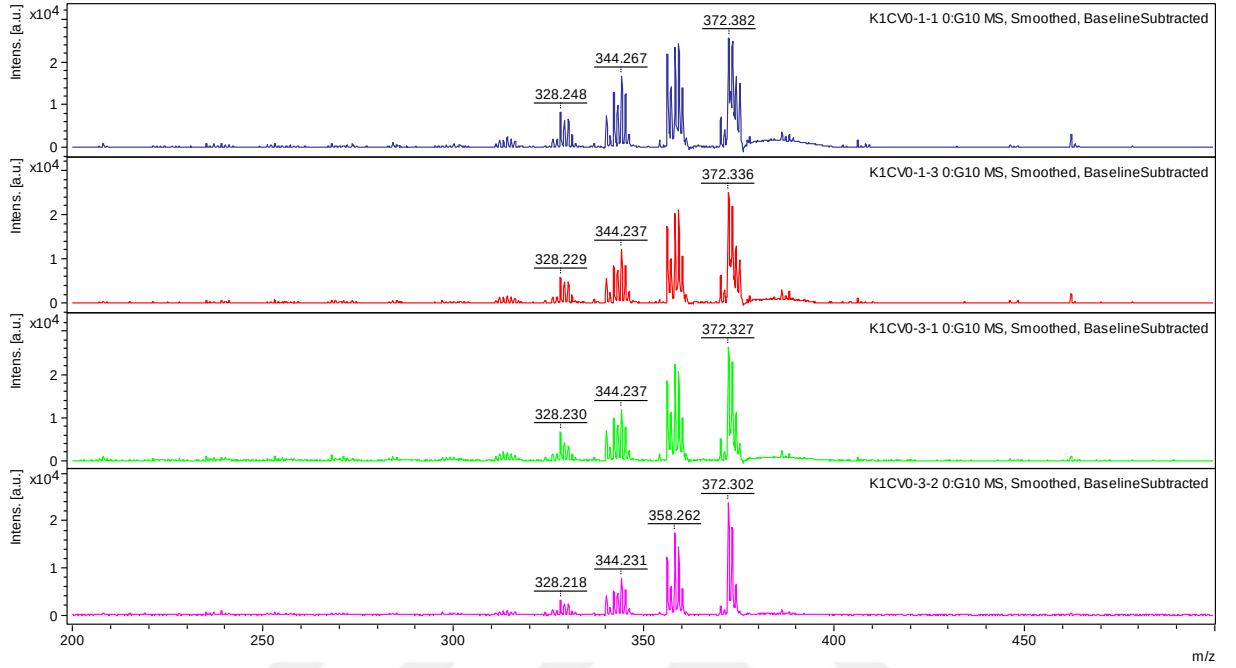
Ek-6. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış metil viyole (MV) standardının 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



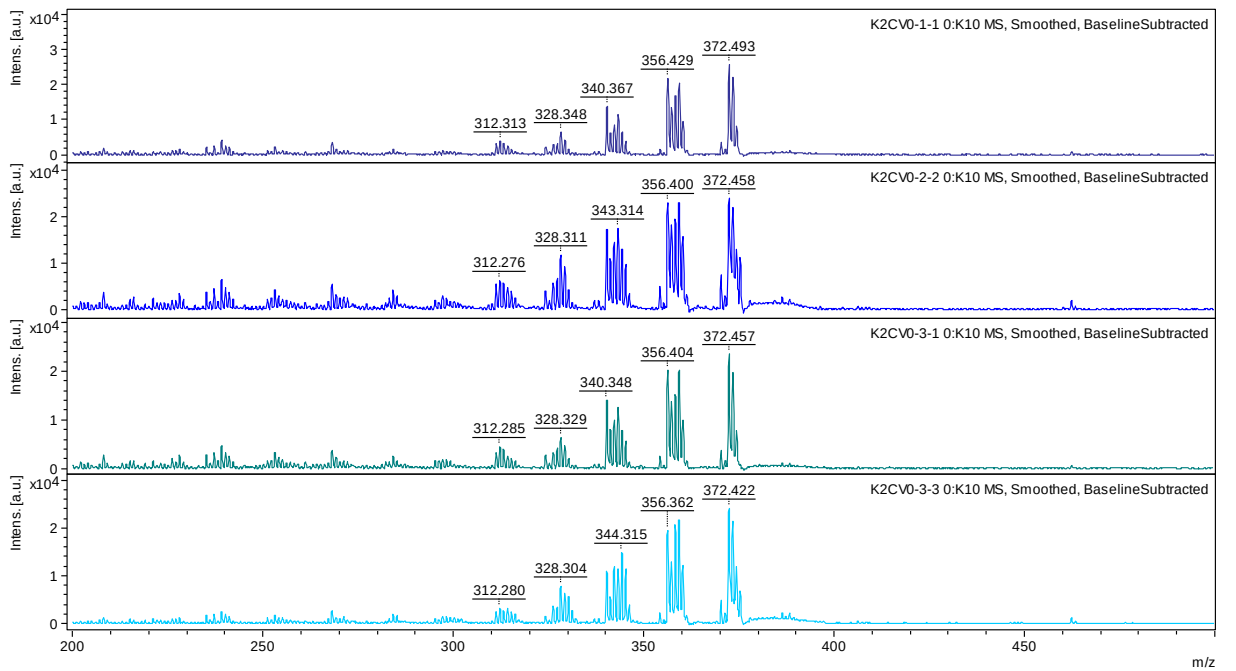
Ek-7. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış metil viyole (MV) standardının 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



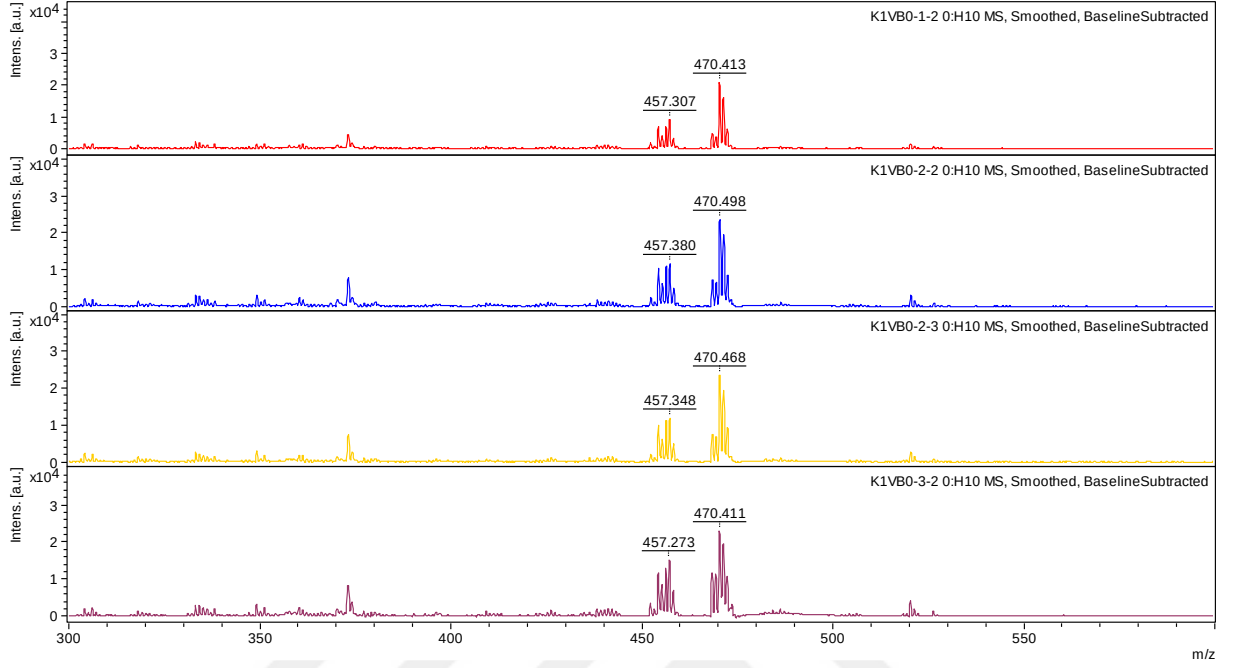
Ek-8. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış kristal viyole (CV) standardının 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



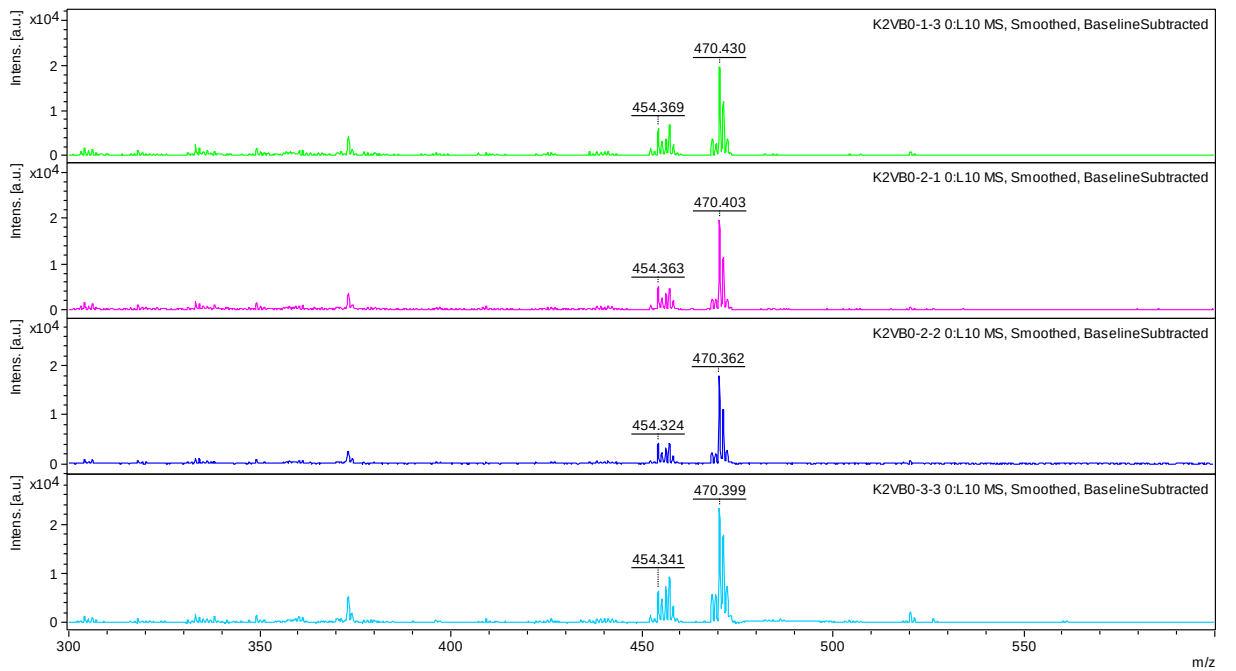
Ek-9. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış kristal viyole (CV) standardının 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



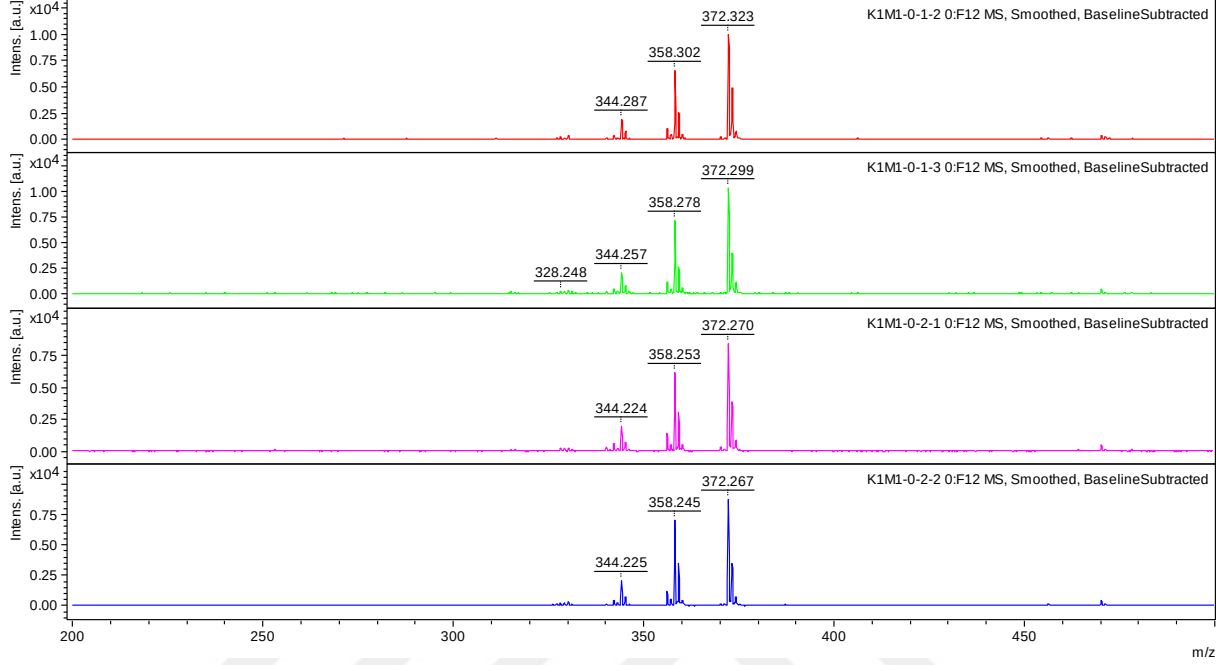
Ek-10. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış viktorya mavisi (VB) standardının 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



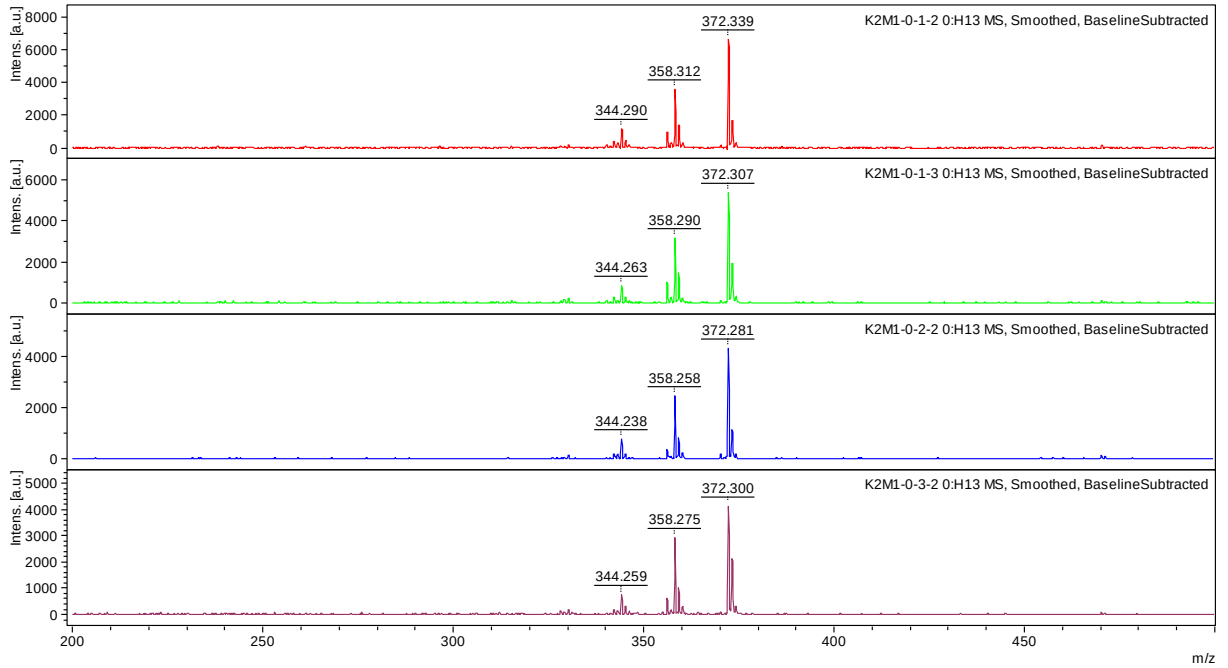
Ek-11. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış viktorya mavisi (VB) standardının 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



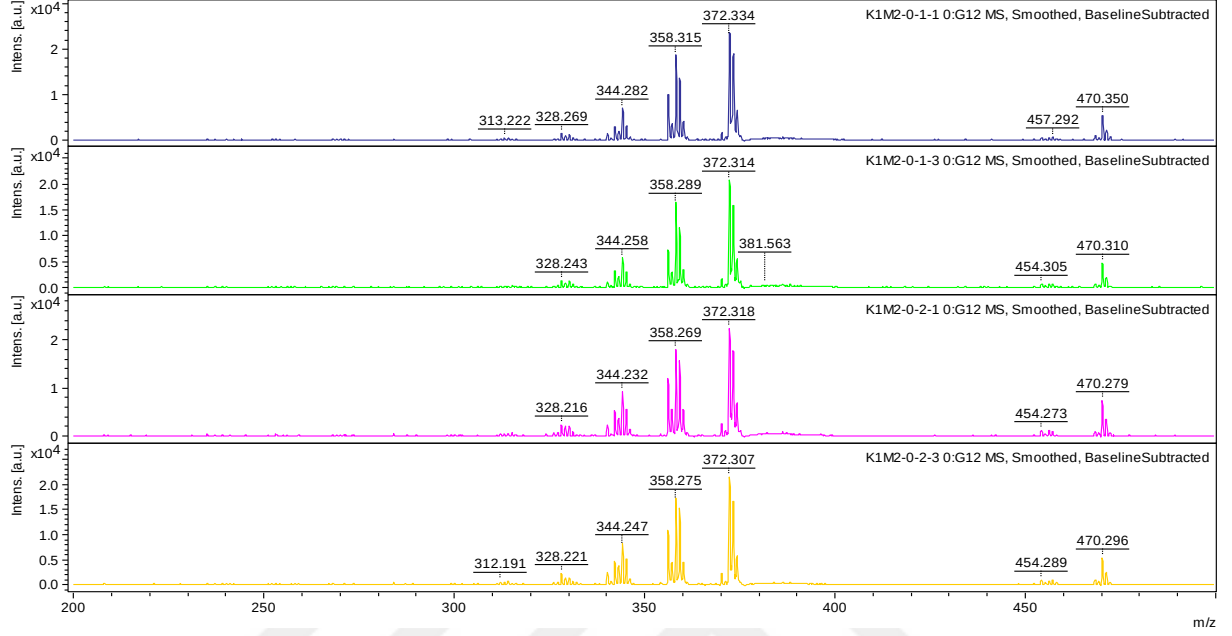
Ek-12. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Faber Castell FDx10* marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M1) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



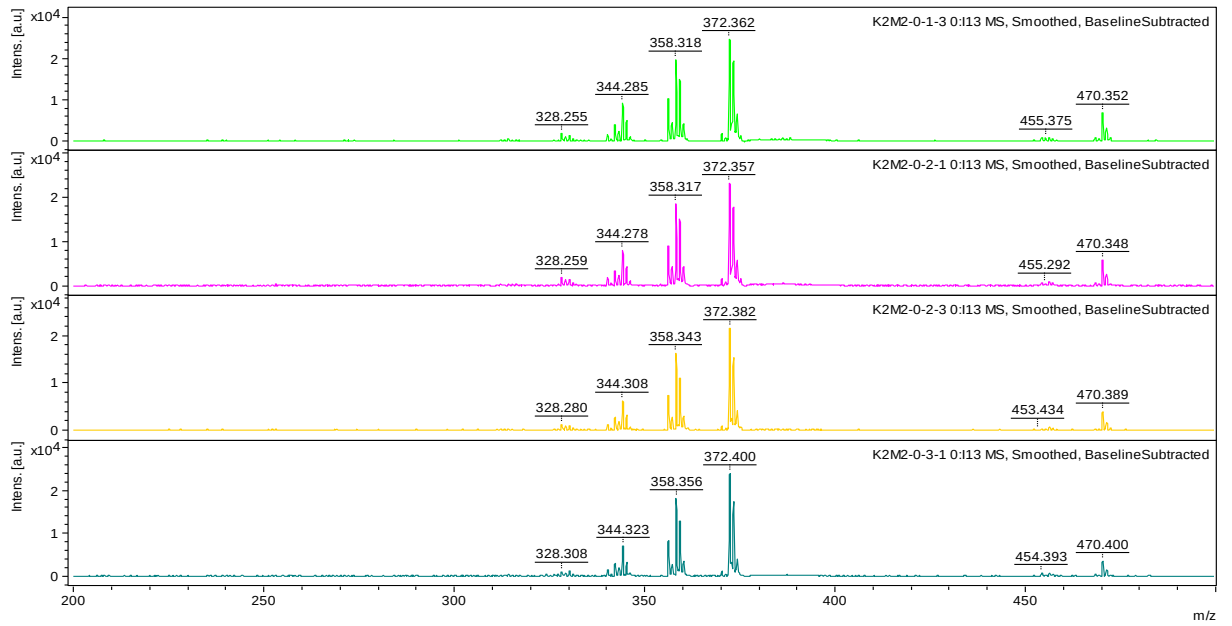
Ek-13. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış *Faber Castell FDx10* marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M1) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



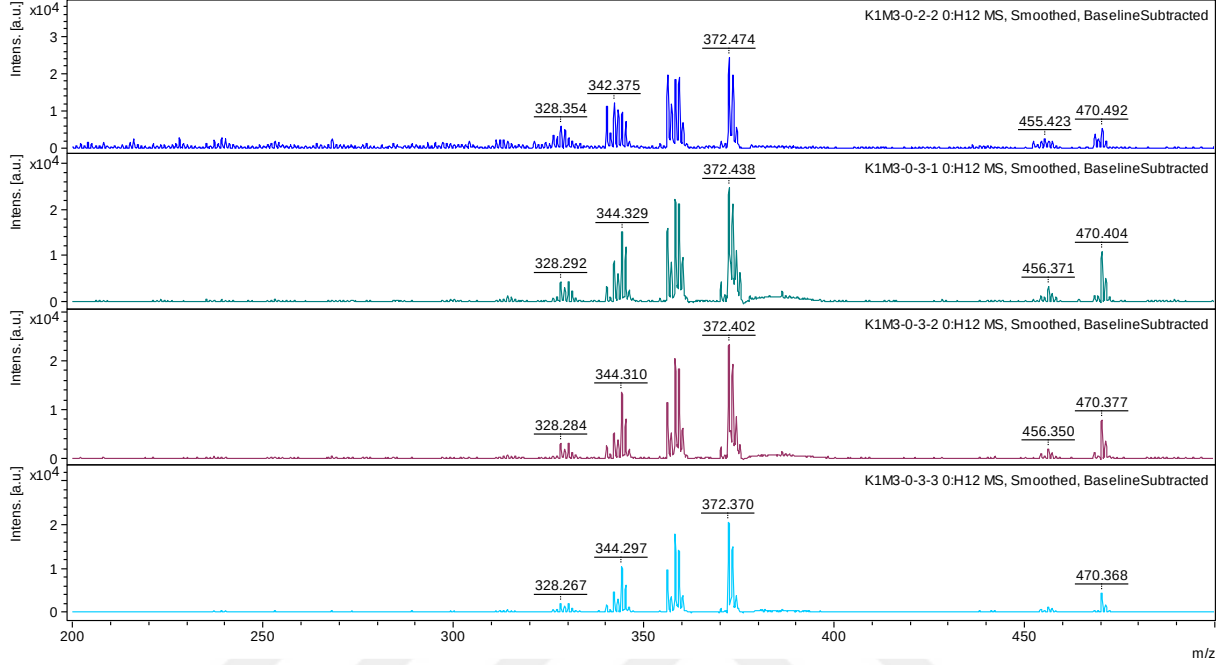
Ek-14. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Schneider Slider Edge XB* marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M2) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



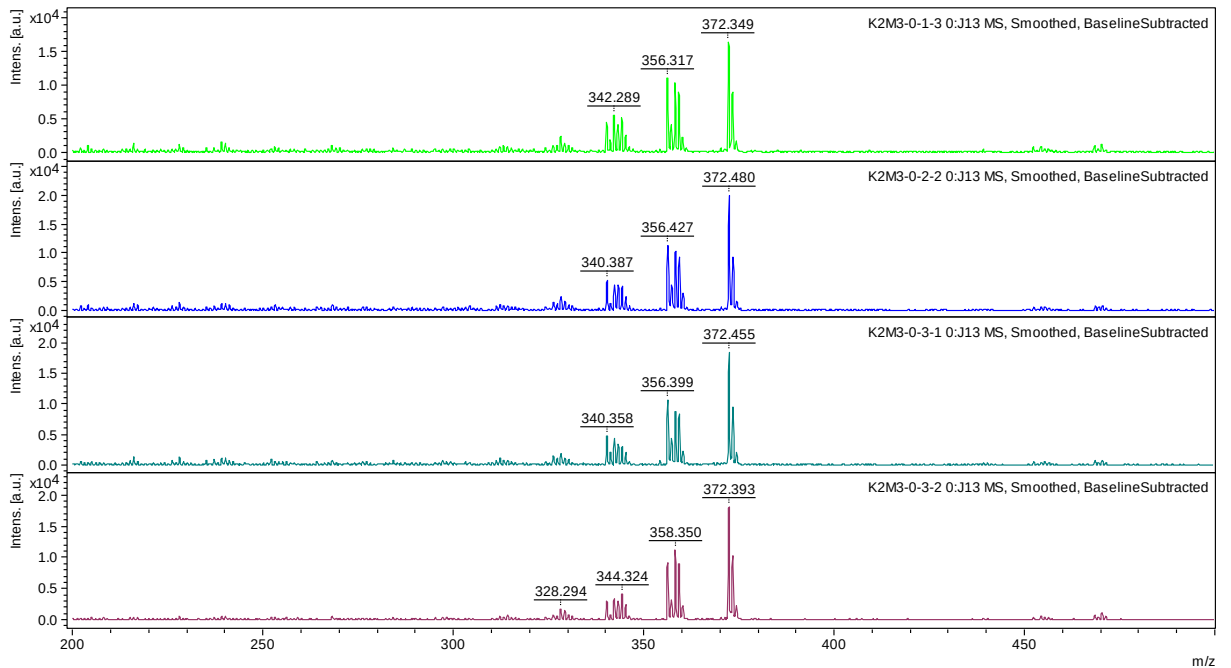
Ek-15. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış *Schneider Slider Edge XB* marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M2) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



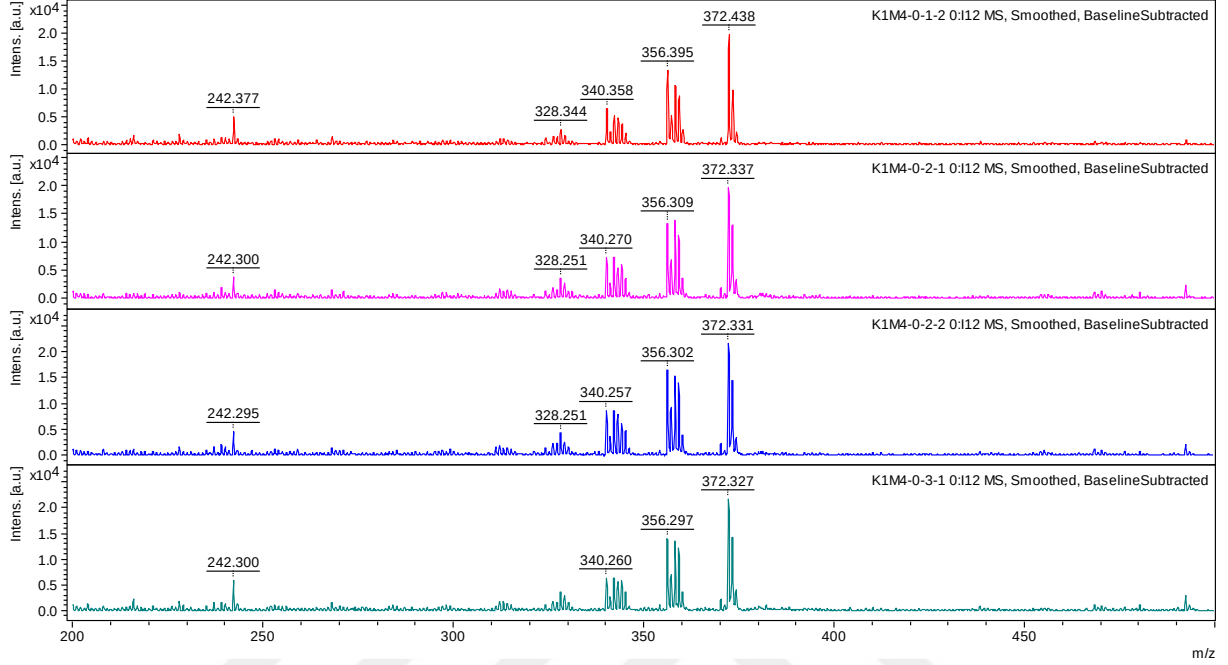
Ek-16. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış Pensan MV-Pen Vision marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M3) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



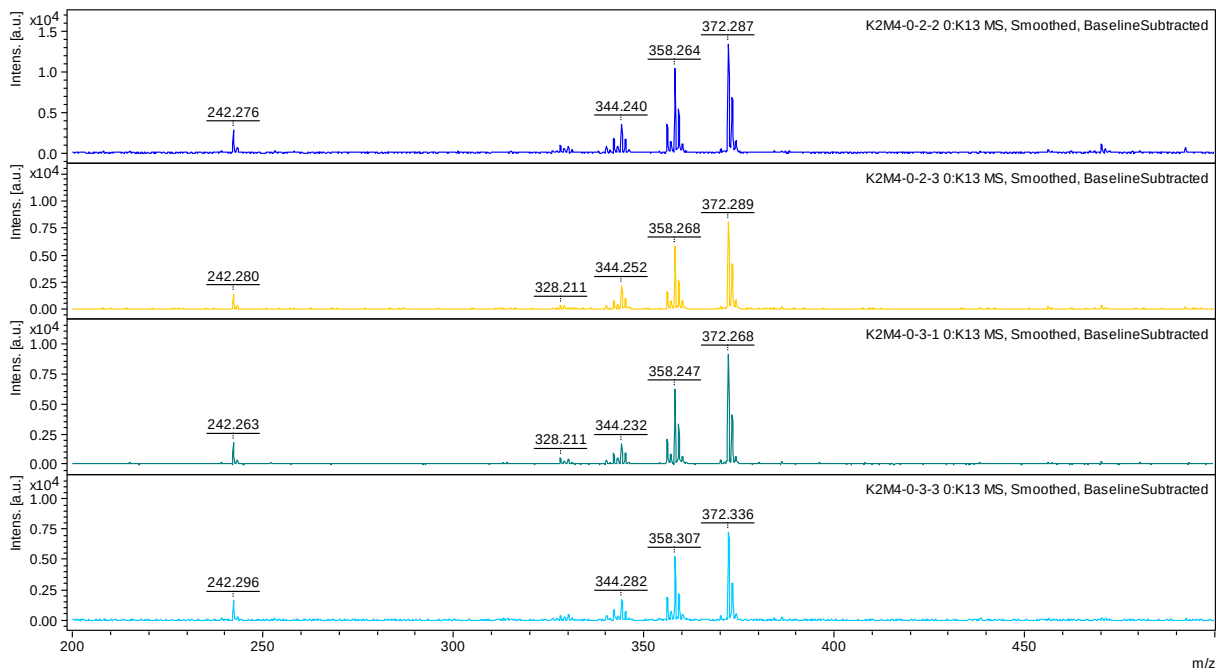
Ek-17. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış Pensan MV-Pen Vision marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M3) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



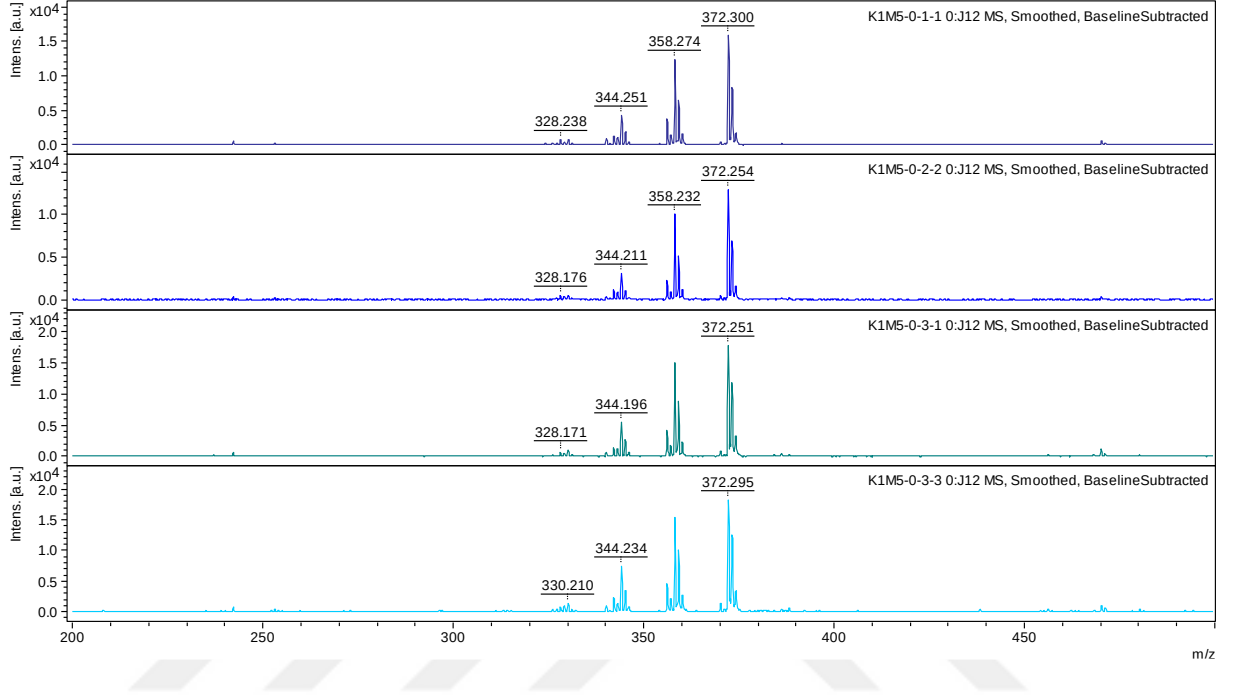
Ek-18. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Noki wonder Ball* marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M4) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



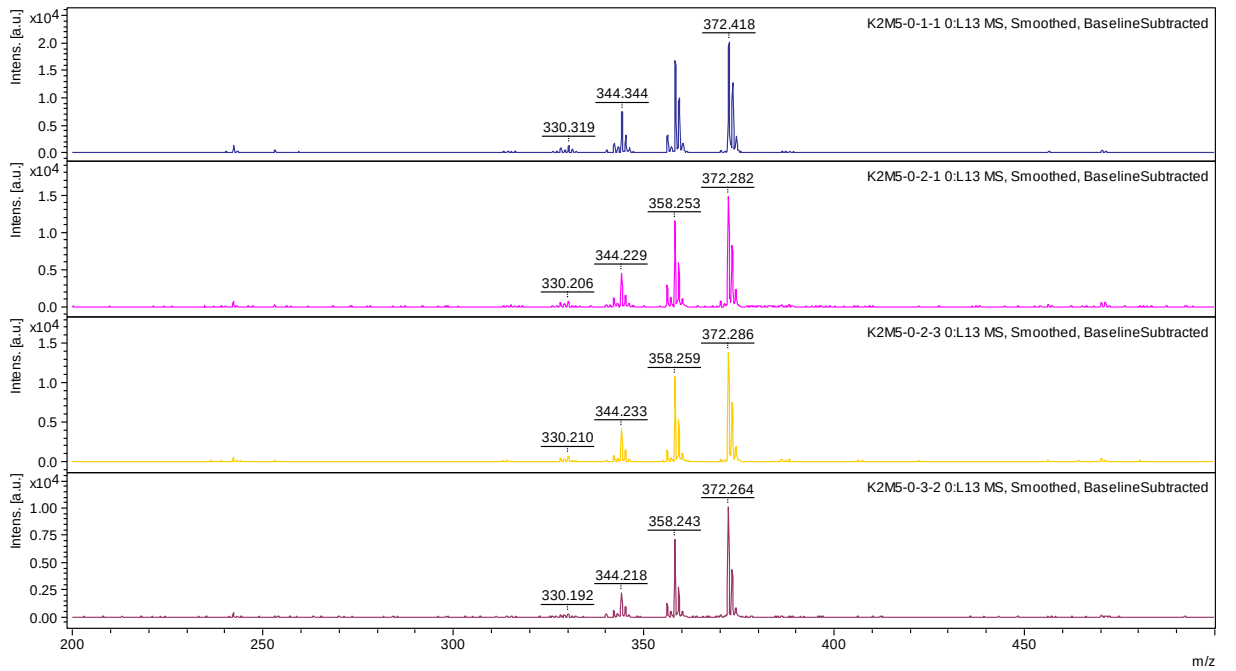
Ek-19. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış *Noki wonder Ball* marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M4) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



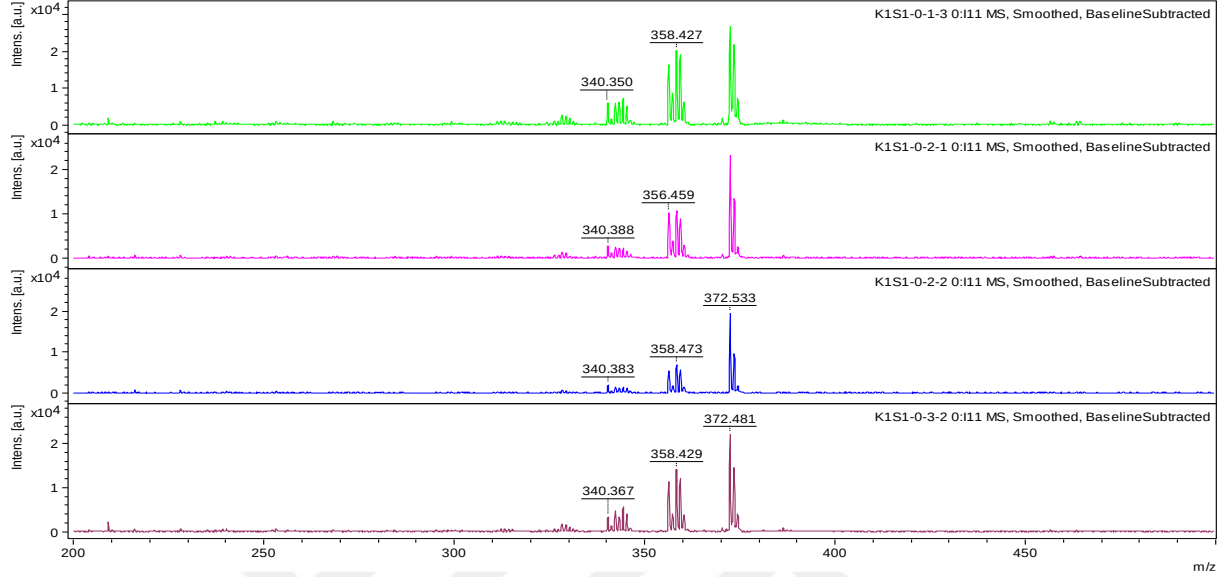
Ek-20. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Bigpoint* 932 marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M5) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



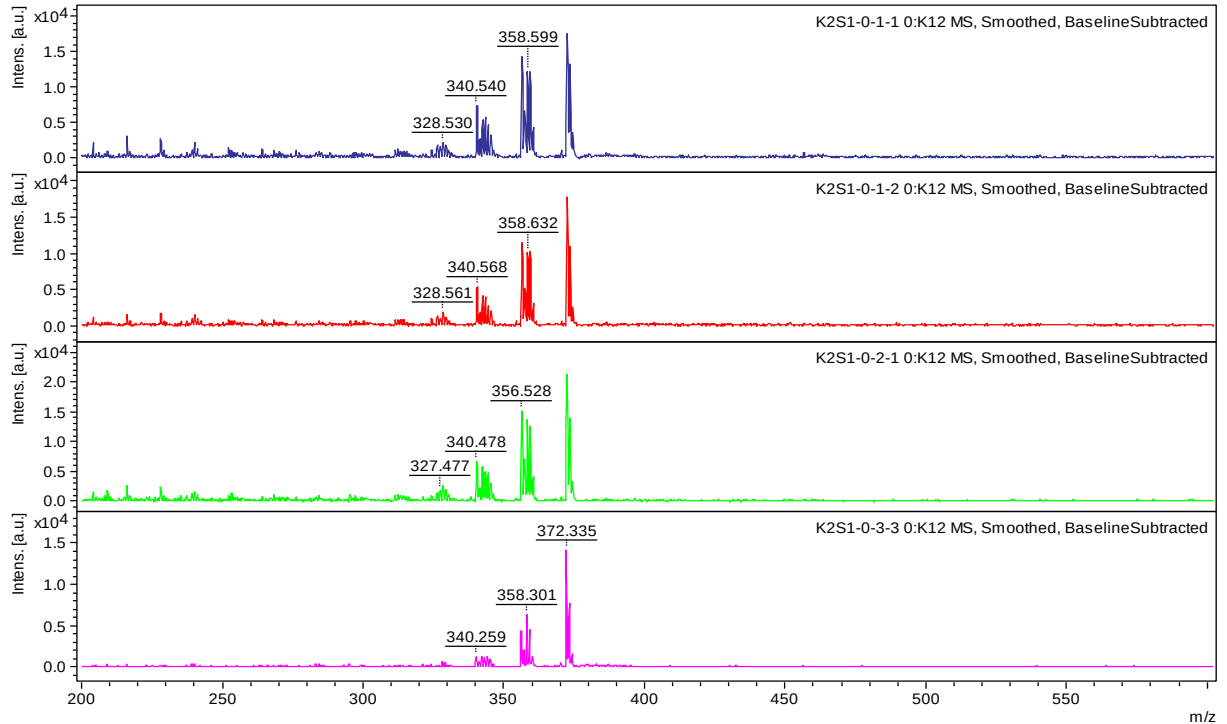
Ek-21. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış *Bigpoint* 932 marka mavi renk tükenmez kalem mürekkebinin (M5) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



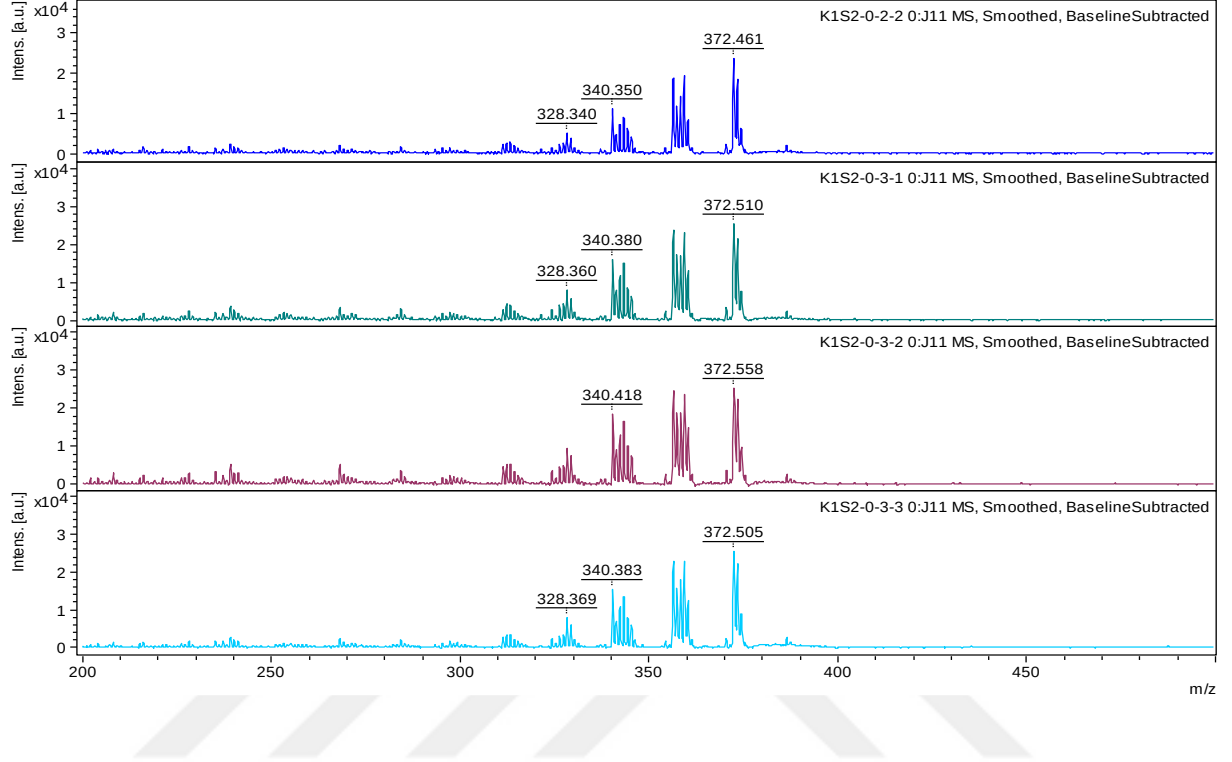
Ek-22. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Pensan MV-Pen Vision* marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S1) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



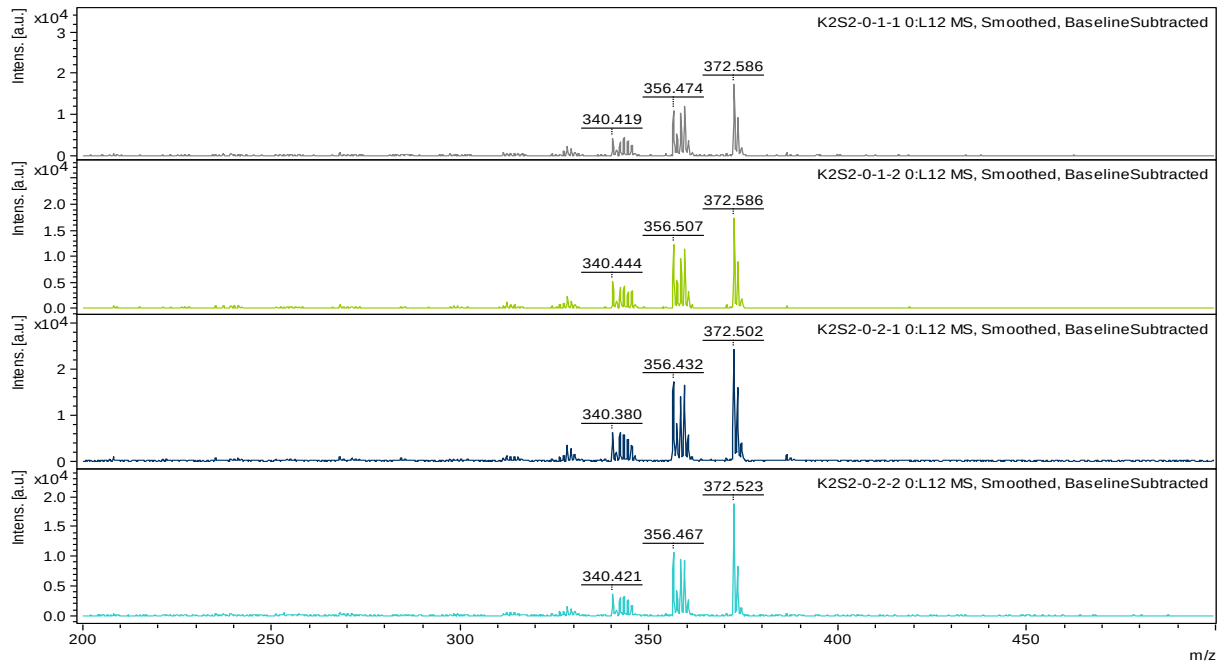
Ek-23. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış *Pensan MV-Pen Vision* marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S1) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



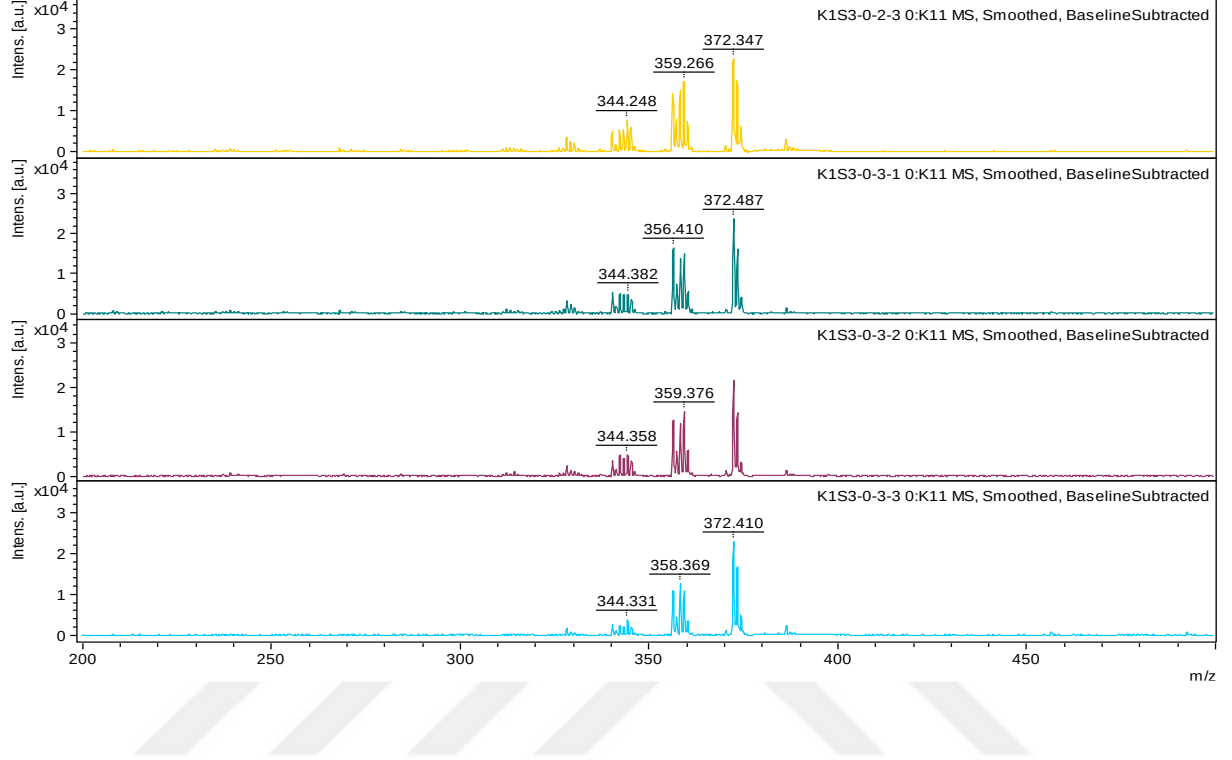
Ek-24. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Faber Castell Speedx10* marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S2) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



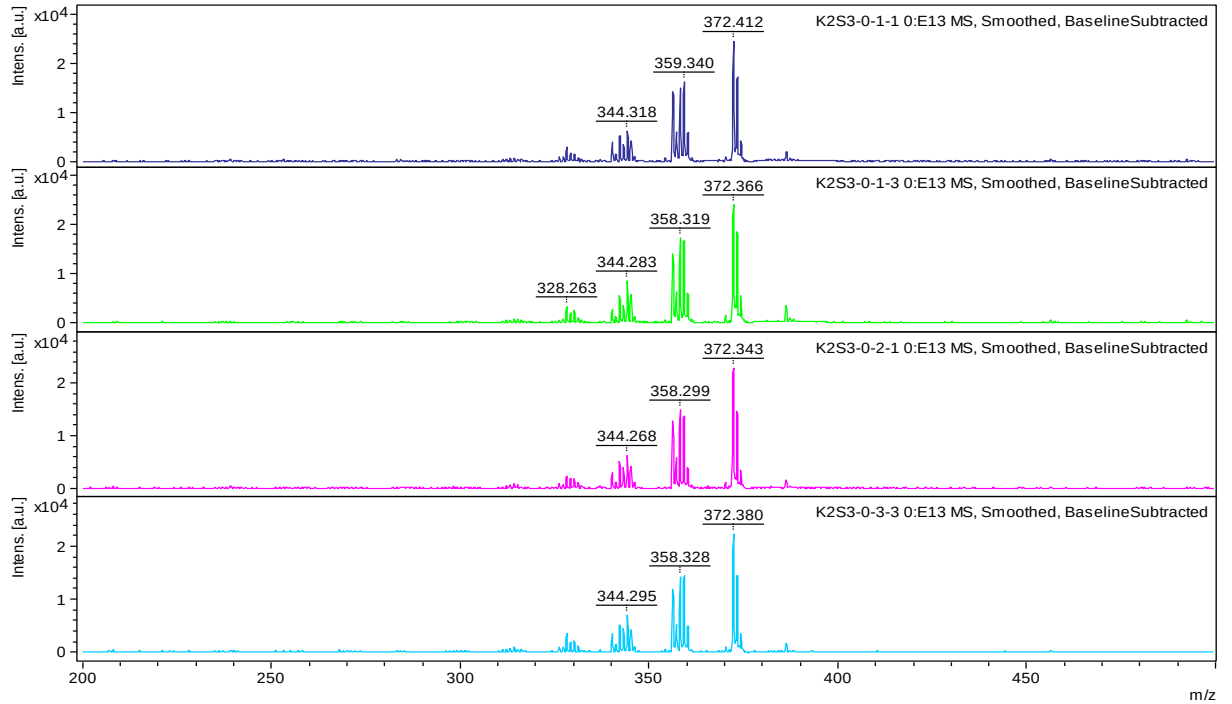
Ek-25. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış *Faber Castell Speedx10* marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S2) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



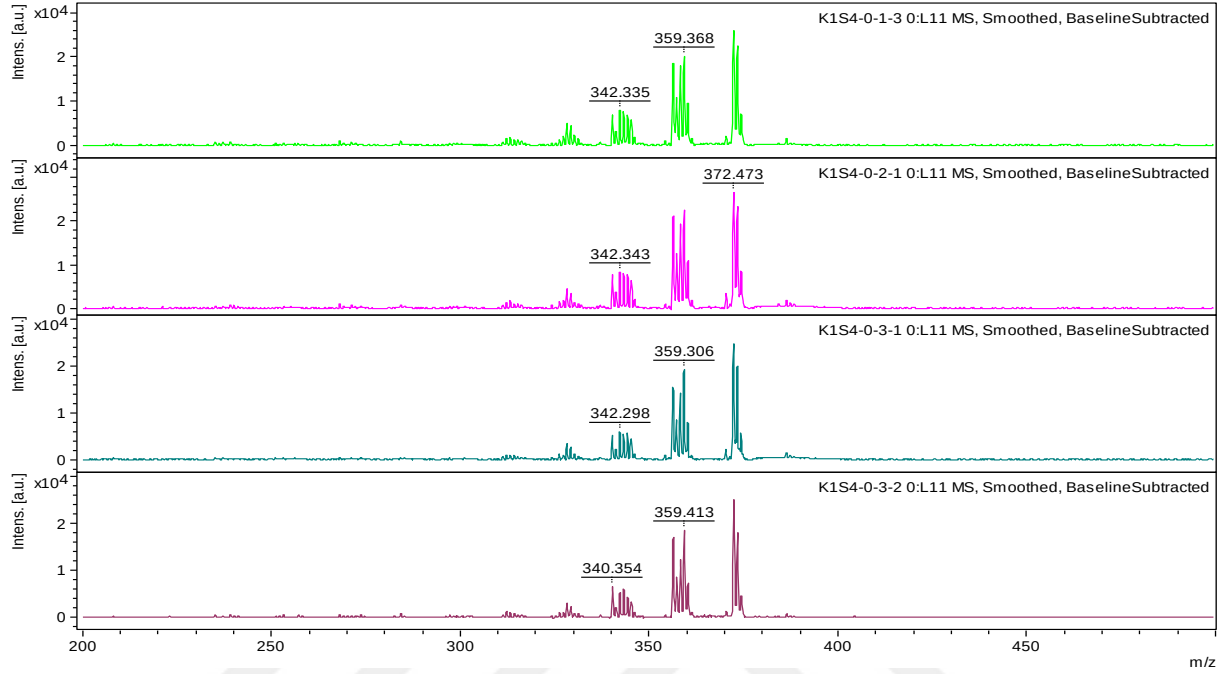
Ek-26. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Art Ballpoint Pen* marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S3) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



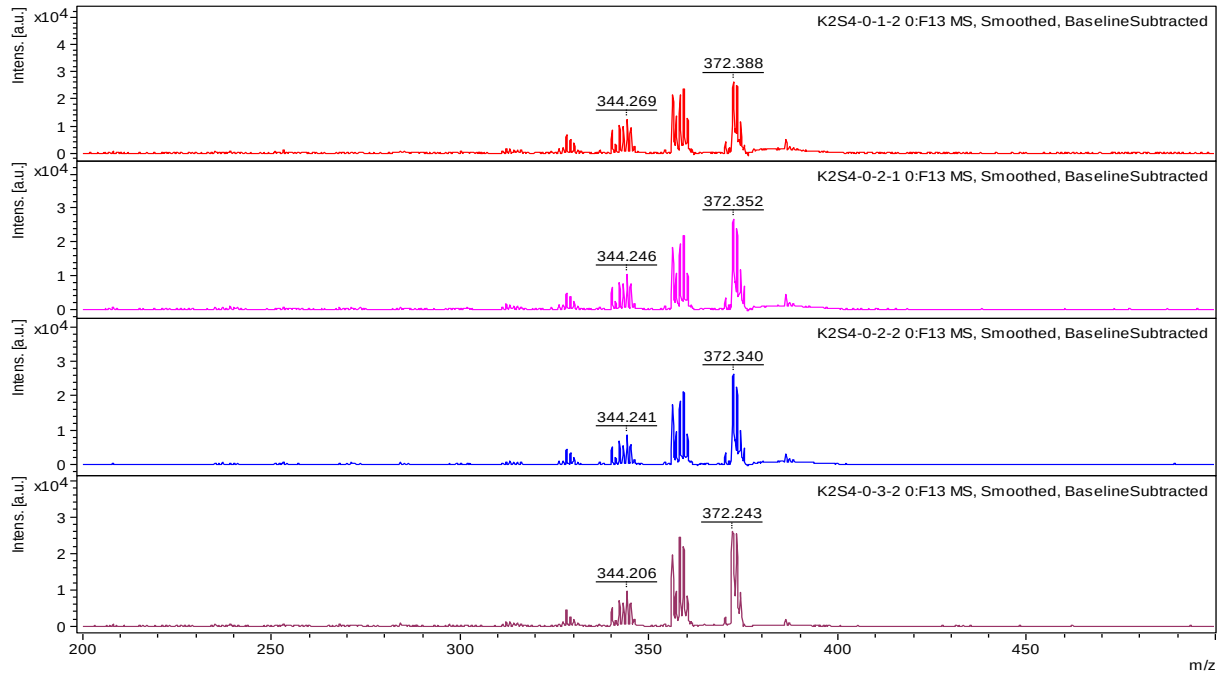
Ek-27. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış *Art Ballpoint Pen* marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S3) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



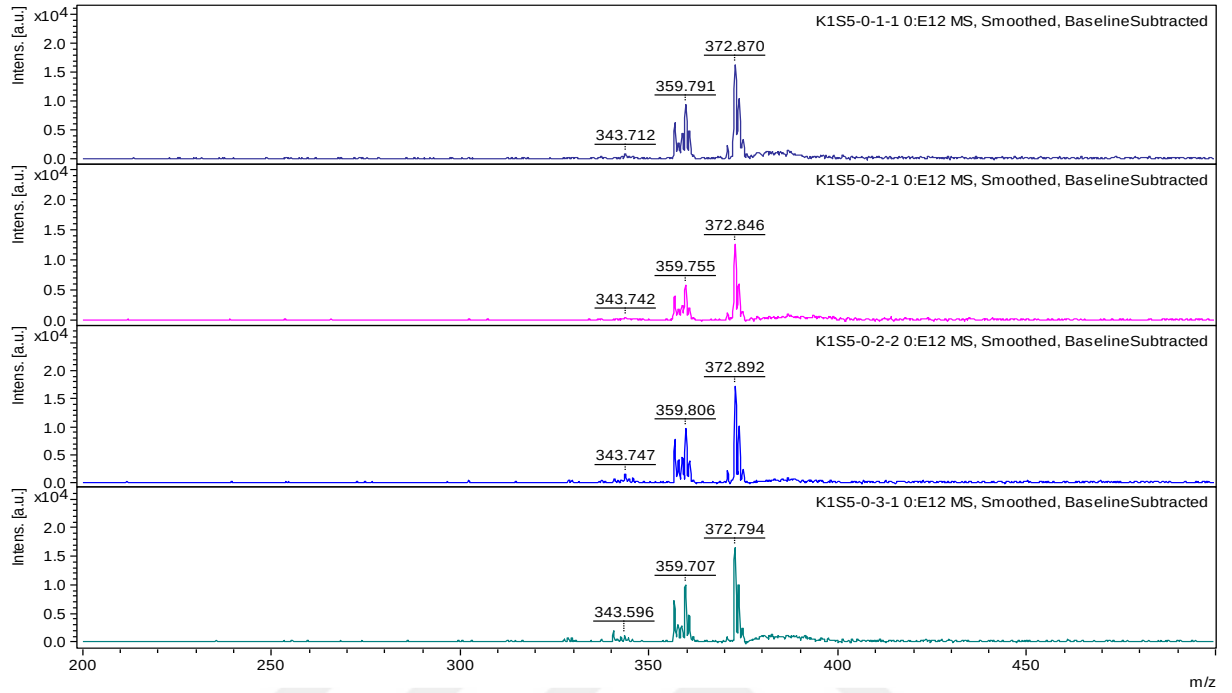
Ek-28. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Schneider Slider Edge XB* marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S4) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



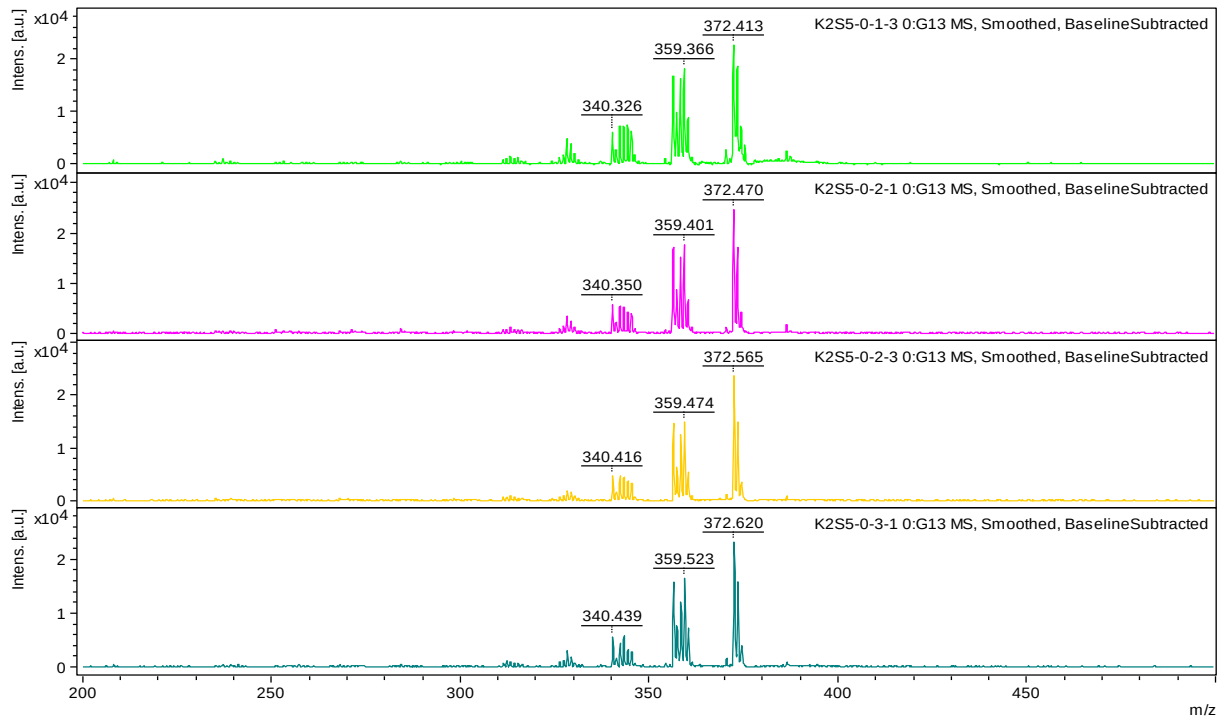
Ek-29. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış *Schneider Slider Edge XB* marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S4) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



Ek-30. 80 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K1) uygulanmış *Bigpoint 930* marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S5) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



Ek-31. 100 g/m² A4 fotokopi kağıdına (K2) uygulanmış *Bigpoint 930* marka siyah renk tükenmez kalem mürekkebinin (S5) 0. zamandaki spektrumu (Alınan 3 örneğin 3'er tekrarlı analizi yapıldı.)



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Fatma ÇAVUŞ YONAR
 Uyuğu : T.C.
 Doğum yeri, tarihi : İstanbul, 08.04.1986
 e-posta : fatma.cavus@istanbul.edu.tr
 Yabancı Dil : Almanca (ileri seviyede), İngilizce (orta düzey)
 Kullandığı programlar : MS Ofis 2009, SPSS 17.0



EĞİTİM DURUMU

Doktora : İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp Enstitüsü, 2012-2018
 Yüksek Lisans : İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, 2009-2012
 Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği
 Bölümü, 2009
 Lise : Gaziosmanpaşa Anadolu Lisesi, 2004

İŞ DENEYİMİ

1- İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Araştırma Görevlisi : 2011–2018
 2- Gaziosmanpaşa Anadolu Lisesi, Biyoloji Öğretmenliği : 2009–2011

BİLİMSEL FAALİYETLER

Kitap Bölüm Yazarlığı

- Anılanmert B., **Çavuş Yonar F.**, Çağlar Andaç S., "Chapter 16: NBOMe Derivatives of Phenylethylamines and Their Analysis", in: Chromatographic Techniques in the Forensic Analysis of Designer Drugs, Teresa Kowalska, Mieczyslaw Sajewicz, Joseph Sherma, Eds., CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, Florida, pp.305-328, 2018
- Anılanmert B., **Çavuş Yonar F.**, Özdemir A.A., "Chapter 15: 2C Derivatives of Phenylethylamines and Their Analysis", in: Chromatographic Techniques in the Forensic Analysis of Designer Drugs, Teresa Kowalska, Mieczyslaw Sajewicz, Joseph Sherma, Eds., CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, Florida, pp.277-304, 2018

Uluslar Arası Yayınlar

- Yukseloglu, E. H., Bayhan, E., Rayimoglu, G., **Cavus, F.**, Dastan, K., & Erkan, I., "Identification with mitochondrial DNA typing from one sperm cell isolated by micromanipulation", Medicine Science, 2018

- Anılanmert B., Sertler Ş., **Çavuş F.**, Cengiz S., "Validated method for occupational cyclophosphamide monitoring using LC-MS/MS and a Poroshell 120 column", CHEMICAL PAPERS, vol.69, pp.1395-1401, 2015
- Anılanmert B., **Çavuş F.**, Narin İ., Cengiz S., Sertler S., Özdemir A.A., et al., "Simultaneous analysis method for GHB, ketamine, norketamine, phenobarbital, thiopental, zolpidem, zopiclone and phenytoin in urine, using C18 poroshell column", Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences, vol.1022, pp.230-241, 2016

Ulusal Yayınlar

- Anılanmert B., **Çavuş F.**, Cengiz S., "17025 Laboratuvar Akreditasyonunda Adli Tıp Enstitüsü Adli Bilimler Laboratuvarı Örneği", TSE Standart Ekonomik ve Teknik Dergi, cilt.52, ss.36-45, 2013

Proje Görevleri

- **Fatma Çavuş**, "Fentanil Ve Metaboliti Norfentanilin İdrardan Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Sistemi İle Yan Yana Tayini" Yüksek Lisans Tez Projesi, İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği, Proje Numarası:16538, Proje Yürütücüsü, 15.09.2011-29.08.2012
- **Fatma Çavuş**, "Determination of Fentanyl and Norfentanyl in Urine with LC-MS/MS", İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Uluslararası Yayınlar Yönelik Destek Projesi No. UDP-25291, Yardımcı Araştırmacı, 08.06.2012-08.02.2013 (6th European Academy of Forensic Science-EAIFS Conference 20-24 Ağustos 2012).
- **Fatma Çavuş**, "Determination of Inter-Individually Variable Olanzapine Levels in Psychiatric Patients", İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Uluslararası Yayınlar Yönelik Destek Projesi No. UDP-25254, Yardımcı Araştırmacı, 08.06.2012-08.02.2013 (6th European Academy of Forensic Science-EAIFS Conference 20-24 Ağustos 2012).
- **Fatma Çavuş**, "Objelere Dokunma Yolu ile Transfer Olan DNA'nın LCN Tekniği Kullanılarak miniSTR ile Tiplendirilmesi", İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Yüksek Lisans BAP Projesi No. 26205, Araştırmacı, 07.09.2012-15.12.2015.
- **Fatma Çavuş**, "Mikromanipülasyon İle İzole Edilen Tek Sperm Hücresinden MtDNA Tiplendirmesi İle Kimliklendirme", İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Yüksek Lisans BAP Projesi No. 22885, Araştırmacı, 04.12.2012-04.12.2015.
- **Fatma Çavuş**, "Sertralin, Zolpidem ve Fentanilin İçeceklerden LC-MS/MS ile Yanyana Tayini", İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Normal BAP Projesi No. 47882, Araştırmacı, 19.11.2014-07.11.2016.
- **Fatma Çavuş**, "Bazı Date-Rape İlaçlar İçin LC-MS/MS Yöntemiyle Meyve Suyu ve Kolada Hızlı ve doğrudan Analiz Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu ", Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 1001 Projesi No. 114Z785, Bursiyer, 01.05.2015-30.11.2017

- **Fatma Çavuş**, “Ağız İçi Sürüntü Örneklerinin En son DNA Teknolojisi ile (24 STR DNA Lokusu) Kimliklendirilmesi: Bir Validasyon Çalışması”, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Normal BAP Projesi No. 56104, Araştırmacı, 02.10.2015-26.09.2017
- **Fatma Çavuş**, “Adli Bilimlerde Yüksek Isıya Maruz Bırakılmış İnsan Kemiklerinde Ve Diş Örneklerinde Organik Ve İnorganik Temelli DNA Çekitleme Tekniklerinin Karşılaştırılması ve DNA Profillemesindeki Önemi”, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Doktora BAP Projesi No. 48032, Araştırmacı, 30.09.2014-14.06.2017
- **Fatma Çavuş**, “Olay Yerlerinde Elde Edilen Patlama ve Molotof Kokteyli Atma Olaylarında Kullanılan El Yapımı Yangın Çıkarıcılar Üzerinden Vücut İzi ve Biyolojik Bulguların Araştırılması”, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Doktora BAP Projesi No. 56843, Araştırmacı, 15.12.2015-06.02.2017
- **Fatma Çavuş**, “On SNP Lokusunun Genetik Polimorfizminin Nikotin Bağımlılığı ile İlişkilendirilmesi”, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Yüksek Lisans BAP Projesi No. 26736, Araştırmacı, 05.04.2013-26.07.2017
- **Fatma Çavuş**, “Adli Bilimlerde Kullanılan 52 Otozomal SNP Lokusunun 23 Tanesinin Türk Populasyonu İçin Optimizasyonu”, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Yüksek Lisans BAP Projesi No. FYL-2016-22437, Araştırmacı, 11.08.2016-Devam Ediyor
- **Fatma Çavuş**, “Bulgaristan Göçmenlerinde Adli Kimliklendirme Amaçlı DNA Profili”, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Yüksek Lisans BAP Projesi No. FYL-2016-20229, Araştırmacı, 12.08.2016-26.09.2017
- **Fatma Çavuş**, “Zaleplon için QTOF-LCMS Yöntemiyle Kolada Hızlı Ve Doğrudan Analiz Yöntemi Geliştirilmesi”, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Dış Kaynaklı İçin Finans Projesi No. FDP-2017-23383, Araştırmacı, 06.01.2017-04.12.2017
- **Fatma Çavuş**, “Identification of Oral Swab Samples With The Latest DNA Technology 24 STR DNA Loci a Validation Study” , İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Bilimsel Etkinlik Projesi No. B E K-2017-25838, Araştırmacı, 20.06.2017-26.09.2017

Ödüller

- **Fatma Çavuş Yonar**, Alpen Ortuğ, Gülten Rayimoğlu, Ömer Karataş, Emel Hülya Yükseloğlu, “10 SNP Lokusunun Genetik Polimorfizminin Nikotin Bağımlılığı ile İlişkilendirilmesi”, II. TURAZ Uluslararası Adli Bilimler Adli Tıp ve Patoloji Kongresi, En İyi Araştırma İkincilik Ödülü (Sözlü Bildiri), Eylül 2018