

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

Danışman
Doç. Dr. Özlem Bülbül Ercan

Lucilia sericata LARVALARINDAN İNSAN SAÇ VE GÖZ RENGİNİN BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLER ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG EMRE DEYMENCİ
İSTANBUL – 2022

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

Danışman
Doç. Dr. Özlem Bülbül Ercan

Lucilia sericata LARVALARINDAN İNSAN SAÇ VE GÖZ RENGİNİN BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG EMRE DEYMENCİ
İSTANBUL – 2022



Bu tez İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 35843

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenim sürecinde, çalışmam için gerekli imkânları sağlayan İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın **Prof. Dr. Erdiñç ÖZTÜRK**'e ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı başkanı Sayın **Prof. Dr. Emel Hülya YÜKSELOĞLU**'na,

Öğrenciliğim ve tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar geçen süreçte, bilgi ve deneyimleri sayesinde çalışmamı yönlendiren, değerli vaktini, ilgisini, maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, çalışkanlığı ve akademik başarısı ile örnek teşkil eden, akademik geleceğimi şekillendirirken örnek alacağım değerli mentorum, değerli hocam, tez danışmanım **Doç. Dr. Özlem Bülbül ERCAN**'a

Çalışmalarım süresince anlayış ve hoşgörüsü, tutum ve davranışları ile moral ve destek olan değerli hocam **Doç. Dr. Gönül FİLOĞLU**'na,

Laboratuvar çalışmalarımda bilgi ve tecrübelerini paylaşan, bulgularım konusunda elinden gelen tüm desteğini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam İstanbul Gelişim Üniversitesi, Otopsi Yardımcılığı Bölümü'nden **Öğr. Gör. İlksen SARI O**'ya,

Tez çalışmalarım sürecinde, kendisinden entomoloji alanında çok şey öğrendiğim, tez araştırmalarım için gerekli laboratuvar şartlarını sağlayan değerli hocam **Doç. Dr. Erdal POLAT**'a,

Laboratuvar çalışmalarım süresince bilgi, tecrübe ve fikirlerini benimle paylaşan, tez sürecimde bana destek olan doktora öğrencisi **Sümeyye Zülal ŞİMŞEK**'e,

Tez çalışmam boyunca manevi desteklerini esirgemeyen **Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü'nün tüm personeline**, Bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan **tüm gönüllülere**,

Her zaman arkadaşlığı, sevgisi, ilgisi ve dostluğu ile yanımda olan desteğini esirgemeyen kıymetli eşim **Neslihan DEYMENCİ**' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Emre DEYMENCİ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ÖZET	viii
SUMMARY.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Adli Entomoloji.....	3
2.1.1. Adli entomolojinin tarihçesi	5
2.1.1.1. Türkiye’de adli entomolojinin tarihçesi.....	8
2.2. Ölüm ve Ölüm Sonrası (Postmortem) Değişiklikler	10
2.2.1. Çürüme (Dekompozisyon)	12
2.3. Adli Entomolojide Ölüm Zamanı Tespiti	14
2.3.1. Ölüm anında cesedin yerinin belirlenmesi	16
2.4. Adli Entomolojik Açıdan Sineklerin Önemi	16
2.4.1. Sineklerin biyolojisi	16
2.5. Taksonomide <i>Lucilia sericata</i> ’nın Yeri	18
2.5.1. Sinek larvalarından DNA analizleri	25
2.6. Adli Genetik	31
2.6.1. Adli bilimlerde kullanılan genetik markırlar	31
2.7. Adli Bilimlerde SNP Markırlarının Kullanımı	33
2.7.1. Kimliklendirme ile ilgili SNP markırlarının kullanımı.....	34
2.7.2. Nesep ile ilgili SNP markırları.....	35
2.7.3. Adli DNA fenotipleme (Forensic DNA Phenotyping, FDP)	35
2.7.3.1. Adli bilimlerde kullanılan fenotip ile ilgili SNP markırları ile ilgili çalışmalar.....	35
2.7.3.2. Göz rengi tahmini	36
2.7.3.3. Saç rengi tahmini.....	39
2.7.3.4. Diğer fenotip markırları	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Çalışmada Kullanılacak Numunelerin Toplanması	47

3.2. Laboratuvar Aşaması	49
3.2.1. Larva diseksiyonu	49
3.2.2. DNA izolasyonu	51
3.2.3. DNA miktarının belirlenmesi	51
3.2.4. PCR	52
3.2.5. PCR ürünlerinin saflaştırılması	52
3.2.6. SNaPshot reaksiyonu	53
3.2.7. SNaPshot reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması	54
3.2.8. SNaPshot reaksiyon ürünlerinin elektroforeze hazırlanması	54
3.2.9. SNaPshot reaksiyon ürünlerinin ABI 310 ile elektroforezi ve sonuçların değerlendirilmesi	55
3.2.10. Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi	55
4. BULGULAR	57
4.1. Örneklerden Elde Edilen İnsana Ait DNA Miktarları	57
4.2. DNA Örneklerinden HIRISPLEX SNP Genotiplerinin Belirlenmesi	58
4.3. Elde Edilen HIRISPLEX Genotiplerinden Fenotip Belirlenmesi	72
4.4. Fenotip Tahminlerinin Başarı Oranları	80
4.4.1 Göz rengi tahmin başarı oranları	80
4.4.2. Saç rengi tahmin başarı oranları	82
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	85
6. KAYNAKLAR	99
EKLER	107
ÖZGEÇMİŞ	109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Erişkin <i>L. Sericata</i> sineklerinin karaciğer üzerindeki yumurtaları.....	19
Şekil 2: <i>L. Sericata</i> (Olympus SZX10) büyütülmüş yumurtaları	19
Şekil 3: <i>L. sericata</i> 'nın yaşam döngüsü. a. Erişkin <i>L.sericata</i> sinekleri b. Yumurta	
c. 1.evre larva d. 2. Evre larva e. 3. Evre ve kursağı dolu larva f. Post feeding larva g. Pupa	20
Şekil 4: <i>L.sericata</i> anterior spiracle ve cephaloskeleton.....	21
Şekil 5: <i>L sericata</i> larvası segmentleri üzerindeki mikro dikenler	21
Şekil 6: <i>L.sericata</i> 3. evre posterior görüntüsü	21
Şekil 7: 1. ve 2. evre <i>L.sericata</i> larvaları	21
Şekil 8: <i>L.sericata</i> pupası.....	22
Şekil 9: Pupa üzerindeki anterior spiracle	22
Şekil 10: Pupa posterior görüntüsü ve solunum yarıkları.....	22
Şekil 11: Pupadan yeni çıkmış gri renkli <i>L. sericata</i>	22
Şekil 12 : <i>L.sericata</i> ergin sinekleri	23
Şekil 13: <i>L. sericata</i> dorsal görünümü.....	24
Şekil 14: <i>L. sericata</i> Ventral – Lateral görüntüsü.....	24
Şekil 15: Kronolojik olarak adli bilimlerde biyolojik materyalin tiplendirilmesi için kullanılan sistemler (70).....	31
Şekil 16: SNP oluşum mekanizması (Şematik gösterimi)	33
Şekil 17: Walsh ve ark. göre kahverengi ve mavi göz renginin 6 SNP markırı ile belirlenmesi (98).	37
Şekil 18: Walsh ve ark. İnsan genom çeşitliliği hücre hattı paneli (HGDP-CEPH) ile 51 popülasyondan 945 kişi ile yaptıkları çalışmada oluşturulan HİrisPlex sistemi küresel saç rengi tahmin grafiği (8).	42
Şekil 19 : Chaitanya ve ark. HGDP-CEPH paneli ile 59 küresel popülasyondan 1539 birey ile oluşturulan HİrisPlex-S DNA test sistemi, küresel ten rengi tahmini tablosu (107).	45
Şekil 20: Gönüllülerden canlı olarak alınan larvalar, -20C saklama öncesi.	49
Şekil 21: %20'lik çamaşır suyu çözeltisi 2 saat bekletildikten sonra	49
Şekil 22: Distile su ile durulandıktan sonra larvaların havlu peçete ile kurulanması	50
Şekil 23: Larva kursak ve bağırsak içeriklerini ayırmak için kesilmesi gereken bölgeler.	50
Şekil 24: Tek kullanımlık steril neşter ve penset	50
Şekil 25: <i>L.sericata</i> larvaları (13mm) üçünü evre, boy ölçümü	50
Şekil 26: Larva kursak içeriği diseksiyonu	51

Şekil 27: Larva bağırsak içeriği diseksiyonu	51
Şekil 28: Göz ve saç rengi analizin görüntüsü (https://hirisplex.erasmusmc.nl/) internet sayfasından alınmıştır erişim tarihi: 24.02.2022	56
Şekil 29: Larva örneklerinde görülen Alel Drop-out durum tablosu.....	62
Şekil 30: Larva örneklerinde görülen Alel Drop- out durum tablosu yüzdelerik dağılım oranları.	62
Şekil 31: T21-XY-100 kodlu larva örneğinin ilk (A) ve eksik SNP bölgelerinin çalışıldığı (B) elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	64
Şekil 32: T21-XY-100 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	64
Şekil 33 : T21-XY-108 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	65
Şekil 34 : T21-XY-108 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	66
Şekil 35: T21-XY-110 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	66
Şekil 36: T21-XY-110 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	66
Şekil 37: T21-XY-112 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	67
Şekil 38: T21-XY-112 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	67
Şekil 39: T21-XX-118 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	68
Şekil 40: T21-XX-118 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	68
Şekil 41: T21-XY-123 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü	71
Şekil 42: T21-XY-123 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	71
Şekil 43: T21-XY-109 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.	72
Şekil 44: Larva örneklerinin tam profil, kısmi profil ve sonuçsuz genotip dağılımı ve fenotip tahminleri dağılımları	78
Şekil 45: Kan örneklerinden elde edilen HIrisPlex genotip ve fenotip sonuçlarının dağılımı	80
Şekil 46: Agaroz jel elektroforezi (A) Boş, (B) T21-XY-138L kodlu (70 ng DNA) örnek, (C) T21-XY-123L kodlu (19,5 ng DNA) örnek, (D) T21-XX-118L kodlu (97 ng DNA) örnek, (E) T21-XY-117L kodlu (69 ng DNA) örnek, (F) T21-XY-139L kodlu (50,8 ng DNA) örnek. ..	93

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I: Ölüm sonrası meydana gelen değişiklikler (26).....	11
Tablo II: HirisPlex sistemi 24 SNP bilgilendirme tablosu	41
Tablo III: Gönüllülerden toplanan larva miktarı ve fenotip bilgileri.....	48
Tablo IV: Multipleks PCR reaksiyon karışımının hazırlanması	52
Tablo V: SNaPshot reaksiyon karışımı	54
Tablo VI: Gönüllülerden toplanan larva ve kan örneklerinden elde edilen DNA miktarı.....	57
Tablo VII: Kan örneklerinden ve larva kursak ve bağırsak içeriklerinden elde edilen insana ait genotip tablosu	60
Tablo VIII: Larva ve kan örneklerinden elde edilen genotiplerle HirisPlex sistemi üzerinden hesaplanan göz ve saç fenotip tahmin sonuçları (p-değerleri)	74
Tablo IX: Larva ve kandan elde edilen genotip ve tahmin edilen ve bilinen fenotip karşılaştırması.....	76
Tablo X: Kan örneklerinin göz rengi tahmin başarıları	81
Tablo XI: Larva örneklerinin göz rengi tahmin başarıları	82
Tablo XII: Kan örneklerinin saç rengi tahmini başarıları.....	83
Tablo XIII: Larva örneklerinin saç rengi tahmin başarıları.....	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
AB	Applied Biosystems
AUC	Area Under the Curve
Ba	Baryum
bç	Baz Çifti
BOLD	Barcoding of Life Database
C	Sitozin
COI	Sitokrom oksidaz I
COII	Sitokrom oksidaz II
ddNTP	Dideoksinükleotit trifosfatlar
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	DNA nükleotid bazları
Ekzo I	Ekzonükleaz I
FDP	Forensic DNA Phenotyping
G	Guanin
g	Gram
GETAT	Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi
HERC2	Hect Domain and RCC-1 Like Domain Containing Protein 2
HGDP	İnsan Genom Çeşitliliği Hücre Hattı Paneli
InDel	Insertion/deletion
IRF4	Interferon regulatory factor 4
MC1R	Melanocortin 1 receptor
mtDNA	Mitokondriyal DNA
ng	Nanogram
OCA2	Oculocutaneous Albinism II
Pb	Kurşun
PCR	Polimerik Zincir Reaksiyonu
PMI	Post Mortem Interval
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
Sb	Antimon
SBE	Single Base Extension
SLC24A4	Çözünür Taşıyıcı Aile 24, Üye 4
SLC45A2	Çözünür Taşıyıcı Aile 45, Üye 2
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi
STR	Kısa Tekrar Dizinleri
T	Timin
TYR	Tirozinaz
Y-STR	Y-chromosome short tandem repeat
µl	Mikrolitre

ÖZET

Adli Entomoloji, ceset üzerine gelen böceklerin ve diğer eklembacaklıların ergin ve larvalarından ölüm zamanı ve yerinin tahmininde, ölüm nedenin belirlenmesinde ve kişilerin kimliklendirilmesinde faydalanan bir bilim dalıdır. Çürümeye başlayan bir cesedin kimliklendirilmesi için larva kursak ve bağırsak içeriklerinden genetik incelemeler yapılabilir. Ancak larva kursak içeriklerindeki güçlü sindirim enzimleri sebebiyle insan DNA'sında degradasyon meydana gelir. Degradasyona uğramış bu örneklerde, cesedin kimliğinin ve fenotipinin belirlenmesinde tek nükleotit polimorfizm (SNP, Single Nucleotide Polimorphism) analizleri yapılabilir. Bu çalışmada kronik diyabet yaralarının tedavisi için kullanılan *Lucilia sericata* larvalarının kursak ve bağırsak içeriklerinden izole edilen insana ait DNA örnekleri (N=30) kullanılarak, HirisPlex (24 SNP) paneli ile kişilerin saç ve göz rengi tahmini yapıldı. Aynı kişilerden kan örnekleri de alınarak genotipler ve tahmin edilen fenotipler karşılaştırıldı ve HirisPlex sisteminin tahmin başarısı belirlendi. Çalışmamızda 30 larva örneğinin 25'inde (%83,3) tam veya kısmi genotip sonucu alınarak fenotip tahmini yapıldı. Beş larva örneğinden ise genotip sonucu alınamadı. Tam veya kısmi profil içeren 25 larva örneğinde göz rengi için 17 (%68), saç rengi için 14 (%56) doğru tahmin yapıldı. 25 kan örneğinde göz rengi için 22 (%88) ve saç rengi için 18 (%72) örnekte fenotip tahmin sonuçları doğru olarak bulundu. Bu çalışmada, kan ve larva örnekleri arasında lokus kayıpları ve degradasyona bağlı alel farklılıkları olmasına rağmen larva örneklerinden insana ait güvenilir saç ve göz rengi tahmini yapıldı. Bu çalışma ileri derecede çürümüş ve kimliği belirlenemeyecek durumda olan veya yeri değiştirilen cesedin ilk olay yerinde bulunacak larvaların kursak ve bağırsak içeriklerinden elde edilen insana ait DNA örnekleri ile, kişilerin fenotipleri hakkında güvenilir bilgi edinilebilir.

Anahtar kelimeler: *Lucilia sericata*, Larva, Kursak, HirisPlex, Adli genetik, Adli entomoloji, SNP, Saç rengi, Göz rengi

SUMMARY

Forensic Entomology is a branch of science used to estimate the time and place of death by using the insects and their larvae found on the corpse, determine the cause, and identify the individuals. In order to identify a corpse, genetic analyzes can be made from the larval crop and intestinal contents. However, due to the strong digestive enzymes in the larval crops, degradation may occur in human DNA. In these degraded samples, single nucleotide polymorphism (SNP) analysis can be performed to determine the identity and phenotype of the corpse. In this study, human DNA samples (N=30) isolated from the crop and intestinal contents of *Lucilia sericata* larvae used for the treatment of chronic diabetes wounds were used to predict the hair and eye color of individuals with the HIrisPlex (24 SNP) panel. Genotypes and predicted phenotypes were compared by taking blood samples from the same individuals, and the prediction success of the HIrisPlex system was determined. In our study, full or partial genotype results were obtained from 25 (83.3%) of 30 larvae samples and phenotypes were estimated. Genotype results could not be obtained from five larvae samples. 17 (68%) correct predictions for eye color and 14 (56 %) correct predictions for hair color were made in 25 larval specimens with a full or partial profile. The phenotype prediction results were found to be correct in 22 (88%) of the 25 blood samples for eye color and 18 (72%) for hair color. In this study, although there were allelic drop-out and allelic differences between blood and larval samples, reliable and significant results were obtained for the determination of human hair and eye color from larval samples. With this study, reliable information can be obtained about the phenotypes of the person, with human DNA samples obtained from the crop and intestinal contents of the larvae to be found at the first crime scene of the highly decomposed and unidentified or displaced corpse.

Keywords: *Lucilia sericata*, Larva, Crop, HIrisPlex, Forensic genetics, Forensic entomology, SNP, Hair color, Eye color

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli Entomoloji, ölüm nedeni, yeri ve zamanının belirlenmesinde çeşitli böcekleri kullanarak adalete yardımcı olmaktadır. Adli entomologlar, cesetlere gelen nekrofaj böceklerin yaşam döngüleri, süksesyon sırası ve aşaması gibi entomolojik zaman çizelgesi bilgilerini kullanarak suçun aydınlatılmasına yardımcı olabilirler. Adli entomolojik çalışmalarda sıklıkla olay yerinden ya da cesetten böcekleri, larva, kurtçuk ve pupa gibi çeşitli dönemlerdeki evreleri toplanarak ölüm zamanı tahmini (Post Mortem Interval, PMI) yapılmaktadır (1–3).

PMI çalışmalarının yanı sıra larvalardan cesedin kimliğinin tespit etmek için genetik incelemeler de yapılabilir. Cesedin kimliği belirlenemeyecek kadar çürümüş ise cesette bulunan larvaların kursaklarından alınan örneklerde kişinin DNA profili belirlenebilir. Larva kursağında bulunan çeşitli sindirim enzimleri sebebiyle insan DNA'sında parçalanmalar meydana gelmiş olabilir. Bu durumda larvalardan elde edilen insan DNA'sında klasik, kısa tekrar dizileri (Short Tandem Repeat, STR) tiplemesi yapmak mümkün olmayabilir. Buna alternatif olarak genomda çok daha kısa olan ve parçalanmış DNA'da çalışmaya olanak sağlayan, tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) analizi kullanılabilir (4–6).

Adli DNA çalışmaları günümüzde delille şüphelinin DNA profilinin eşleşmesine dayalı olarak yapılmaktadır. Ancak şüpheli olmadığı durumlarda delilden elde edilen profilin bir rolü bulunmamaktadır. Adli DNA fenotiplemesi (Forensic DNA Phenotyping, FDP) DNA'dan kişinin fiziksel görünümüne ait özellikleri belirlemeyi amaçlamaktadır (7). Bu kapsama göz, saç ve ten renginin belirlenmesinde SNP markırları olarak güvenilir fenotipleme yapılabilir. Walsh ve ark. yürüttüğü çalışmalar sonucu geliştirilen 11 gen (MC1R, HERC2, OCA2, SLC24A4, SLC45A2, IRF4, EXOC2, TRYP1, TYR, KITLG, ve PIGU/ASIP) üzerinde bulunan 24 SNP lokusunu içeren HIrisPlex paneli ile insan saç ve göz rengi tahmini yapılabilir (8,9). Ülkemizde bu sistem laboratuvarımızda kullanılmakta olup, Türkiye toplumu için çalışmaları

yapılmıştır (10). Adli entomoloji alanında en çok araştırılan tür olan *Lucilia sericata* (Diptera, Calliphoridae) ölümden sonra cesede gelen sineklerden olduğu, yapılan çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (2). Ayrıca *L. sericata* ile ilgili genetik kimliklendirmeye yönelik STR ve SNP çalışmaları da bulunmaktadır (11,12).

Olay yerinden veya cesetten alınan larva örnekleri ile ilgili genetik kimliklendirme için birçok çalışma yapılmışken adli DNA fenotiplemesi ile ilgili literatürde bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı; *L. sericata* larvalarının kursak içeriğinden ölçülebilir ve analize yetecek kalitede insan DNA'sı elde edilmesi ve HirisPlex multipleks sistemi ile kişilerin saç ve göz renklerinin tahminin yapılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adli Entomoloji

Entomoloji, dünya üzerinde yaşayan tüm canlıları inceleyen bilim dalı olan biyolojinin önemli bir dalıdır. Böcekler dünya üzerinde insanın ulaşabildiği her habitatta yaşayan, milyonlarca çeşide sahip olup, ortam koşullarına en iyi uyum sağlayan ve ekosistemlerde kilit taşı rolü oynayan bir sınıftır. Böcekler dünya üzerinde hayvanların %90'a yakınıni oluştururlar ve hayvanlar âleminde tür bakımından en çok bireyi bulunan ve 32 takımı olan kalabalık bir sınıftır (13). Böcekler insanlarla çoğu zaman aynı ortamda bulunurlar, çeşitli hastalıklar için vektör, tarım ürünleri için zararlı ya da gerekli olabilirler. Bazı böcek türleri de ölü canlılar ve insanlar üzerine bir sonraki neslin devamını sağlamak için yumurtalarını bırakabilirler. Bu durum adli entomolojinin çalışma alanları arasındadır.

Adli entomoloji; böceklerin yaşam döngüsü, üreme ve beslenme alışkanlıkları gibi bilgileri adaletin hizmetine sunan adli bilimler alanıdır. Bazı adli vakalardaki (cinayet, tecavüz, intihar, suistimal, toplu ölümlerin yaşandığı felaketler vb.) insan ve hayvan cesetlerinde veya etrafında, sinekler, kurtçuklar, larvalar veya pupalar bulunabilir (14). Özellikle cesedin doğal vücut boşluklarında (gözlerde, ağızda, burunda ve yaraların etrafında bulunan) nekrofaj kurtçuklar çürümenin bir ögesi olarak kabul edilir. Böcekler hem karada hem de suda gerçekleşen olay yeri incelemesinde kullanılabilir (15). On dokuzuncu yüzyıldan günümüze kadar olan süreçte böcekler ile yapılan çalışmalar sadece ölüm zamanı tespiti ile ilgili olmuştur (16). Ancak nekrofaj böceklerin türleri, davranışları, ekolojileri ve hayat döngülerinin tespiti ile cesedin ölümün zamanını geriye dönük tahminin yanı sıra cesedin kimliği, ölüm nedeni, ölümün gerçekleştiği ortam hakkında ve toksikolojik bilgiler elde edilebilir (1,3,17). Örneğin, toprak üzerinde bırakılan ya da gömülü halde olan cesetlere gelen böcekler cesedin öldürüldüğü veya

taşındığı ortam hakkında çeşitli bilgiler verebilir. Adli toksikolojik analizlerde ise cesetle beslenen larvaların dokularında toksik ya da uyuşturucu madde tespit edilebilir (18,19).

Adli Entomoloji, üç alt bölümde incelenmektedir.

- **Kentsel entomoloji**, insanların yaşadığı çevrelerde, termitler, hamamböcekleri ve diğer böcek türleri sebebiyle ortaya çıkan bir takım problemleri inceler.

- **Depolanmış ürün entomolojisi**, arthropodlar (eklembacaklılar) ile arthropod parçalarının gıda ve diğer ürünlerde bulunması sonucu ortaya çıkan anlaşmazlıkları inceler. Kahvaltılık yiyeceklerde böcek kalıntıları veya fast-food restoranlardaki sandviçlerde bulunan sinek larvaları en sık görülen dava konularına örnek gösterilebilir. Narkotiklerde depolanmış ürünler içerisinde sayılabilir. Yasa dışı psikoaktif maddeler sıklıkla bir ülkede yapılıp başka bir ülkede satılırlar. Narkotiklerin beraberinde bulunan böceklerin türleri incelendiğinde bunların hangi coğrafyaya ait olduğu bulunabilir. Dolayısıyla da uyuşturucu maddenin menşeyinin tespitinde kullanılabilirler (20).

- **Medikolegal entomoloji veya adli medikal entomoloji** çoğunluğu şiddet suçları olmakla birlikte suçların çözümünde eklembacaklı (arthropod) delillerinin kullanımınıdır (21).

Adli olayların aydınlatılmasına katkı sağlaması bakımından incelenen böceklerin özellikle holometabol hayat döngüsüne sahip olanların, yumurtadan erişkin hale gelene kadar her bir birey önem arz eder (20). Adli bilimler için larva gelişimi ve erginlik dönemi açısından özellikle Diptera (sinekler) takımı ve ayrıca cesede geliş süreleri yani süksesyon bakımından Coleoptera (kın kanatlılar) ve Lepidoptera (pul kanatlılar) takımı adli tıp uzmanlarının ölüm zamanı tespiti üzerine yeterli delil elde edemediği zamanlarda kullanılabilir (14,22).

Böcekler kendi beslenme ve üreme alanlarına uygun iklim ve bitki örtüsünün bulunduğu habitatlarda yaşarlar. Farklı bölgelerde yaşayan sıcaklık, nem, yükseklik gibi parametrelerin

etkilediği alanlarda farklı böcek faunaları bulunur. Doğanın canlılığının ve ekolojik dengesinin devamı için doğada ölen canlıları geri dönüşümü zorunludur (14). Cesetler doğada birçok canlı için geçici ve değişken besin kaynağı olarak kullanılmıştır. Doğada böcekler sadece açıktaki cesetlere değil ayrıca toprak altında gömülen cesetlere de en büyük tahribatı yaparak cesedin doğaya geri dönüşümüne büyük katkıda bulunurlar.

Çürümenin şişme evresinde çevreye yapılan kokular nekrofaj böcekleri kendine çeker, ilk gelen böcekler arasında Diptera (çift kanatlılar, sinekler), Calliphoridae (Yapışkan sinekler), Sarcophagidae (Et sinekleri) familyalarına ait olan türler ve alt türler görülebilir. Cesetlerin doğal vücut boşlukları üzerinde türden türe değişmekle beraber yumurta görülmeyebilir. Bazı nekrofil türler ölüm sonrası ceset üzerine gelebilir fakat kolonize olmaları zaman alabilir ya da ceset üzerinde tespit edilen böcekler leşçil olmayan tesadüfen orada bulunan türlerdir. Sinek türlerinin bazıları yumurta yerine canlı larva bırakırlar. Böcekler çürümenin çeşitli evrelerinde dalgalar halinde ceset üzerine geldiği 1988 yılında Buckland ve Smith Adli entomoloji el kitabında açıklamıştır (23).

2.1.1. Adli entomolojinin tarihçesi

Tarihte adli entomoloji alanı ile ilgili kayıt altına alınmış ilk doküman 13. yüzyıla Çinli ölüm araştırmacısı ve avukat olan Sung Tzu'nun soruşturduğu bir cinayettir. Pirinç tarlasında boğazı orakla kesilerek öldürülen çiftçinin katili ortaya çıkmayınca, Sung Tzu yaptığı gözlem ve incelemeler sonucunda köydeki tüm çiftçilerin oraklarını bir araya toplamış, bir süre beklendikten sonra bir orak üzerinde Calliphoridae familyasına ait sineklerin toplandığı görülmüştür. Bu durum karşısında orak sahibi cinayete suçlanmış ve itirafın ardından infaz işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu araştırma Sung Tzu tarafından “Hsi Yuan Lu” adlı (The Washing Away of Wrongs) kitapta rapor edilmiştir (16).

Ortaçağda (15.yy) heykeltıraşlar ve ressamlar cesetlerin parçalanma ve ayrışma süreci üzerine yaptıkları araştırmaları “ölüm dansı” olarak adlandırdıkları resimlerde, nekrofaj sineklerin cesetler üzerinde bıraktıkları larvaları mübalağa ederek betimlemişlerdir. Benzer bir resimde 16. yüzyılda Tumba’nın iskeleti olarak isimlendirilmiştir ve bu resimde; tüm iskelet larvalar ile kaplıdır (16,24).

Orfila 1831’de yaptığı feth-i kabir incelemesinde larvaların cesedin bozulmasındaki önemini fark etmiştir. Bergeret 1850’de ölüm zamanının belirlenmesinde ilk Modern adli entomoloji vakasını rapor etmiş, böceklerin hayat döngüsü, beslenme ve çiftleşme alışkanlıkları hakkında birçok varsayımdan bahsetmiştir (16).

Fransız Adli Tıp Cemiyeti Başkanı Brouardel 1879’da yeni doğmuş bebek cesedi üzerinde elde ettiği sinek larvalarından ölüm zamanı tespiti ile ilgili bir rapor hazırlamıştır (16,25). Reinhard’ın 1881’deki ilk sistematik çalışması adli entomoloji tarihinde önemli bir role sahiptir. Megnin 1894’de insan cesetlerine gelen sekiz arthropod saldırı dalgasını ortaya koyan “Ceset Faunası- Entomolojinin Adli Tıpta Uygulanması“ (La Faune Des Cadavres- Application de l’entomologie a la Medicine Legale) isimli kitabı yayınlamıştır. Megnin, ceset üzerindeki böcekleri tanımlayarak, ölüm zamanının saptanabileceğini ifade etmiştir (16,26).

I. Dünya savaşı sonrası adli entomoloji alanında yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Aldrich 1916’da erişkin sineklerin genital organlarından faydalanarak, Sarcophagidae ailesine ait sinek türlerinin ayırımında kullanmıştır. Meixner, 1922’de çalıştığı enstitüde bulunan cesetlerin arthropodlar tarafından hızlı bir şekilde ayrıştırıldığını fark etmiş ve takip eden birkaç yıl içinde Hermann Merkel, Meixner’in inceleme raporlarını yayınlamıştır.

İtalya’da Bari Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Bianchini 1929’da “Cesetlere Gelen Böceklerin Faunasına Dair Çalışmaya Pratik ve Deneysel Katkıları” adlı bilimsel çalışmasını

yayımlamıştır. Kulak, kol, abdominal bölge ve bacaklarında lezyonlar görülen bir ceset ile ilgili savunduğu raporda, karıncaların 24 saatlik periyotta bu lezyonlara sebep olduğunu bildirmiştir.

Knipling 1936'da I. evre larva ve et sineklerinin türlerini tespit etmek için teşhis anahtarını yayınlamıştır (16,27).

Hubert Hamburg Müzesi ve Zooloji Enstitüsü'nden Caspers 1959'da cesetlere gelen sinek türlerini incelemekle başlamıştır (28,29).

Arutjuna 1962'de Azerbaycan'da yürüttüğü bir araştırmada içinde deniz suyu olduğu tespit edilen bir tankın içerisinde belirli oranda iskeletleşmiş ve büyük oranda dağılmış bir cesedi incelemiştir (25).

Burger 1965'de Sarcophaga cinsine ait sinek türlerinin cesede gelişinin aynı yıl içinde farklı mevsimlerde olduğunu tespit etmiştir (30).

Adli entomoloji alanında dava çözümüne odaklı olarak yapılan çalışmalar 1969-1980 yılları arasında, tıp doktoru olan Marcel Leclecq ve entomoloji Profesörü Pekka Nuorteva tarafından yürütülmüştür. Bundan sonra çalışmalar İngiltere, Hindistan, Rusya, Amerika, Kanada, Fransa ve Japonya gibi ülkelerde rutin olmaya başlamıştır (30).

Smith, 1986'da "A manuel of Forensic Entomology" isimli eserini yazmıştır (23).

Erzinçlioğlu, 1987'de yürüttüğü çalışmaya göre ete gelen adli öneme sahip 10 nekrofaj sinek türünü incelemiş ve larva aşamalarını gözlemlemiştir (26).

Grassberger ve ark. 2001 yılında *L. sericata*'nın sıcaklık değişimi etkilerini araştırmak için sineğin yumurta bırakma davranışları, larva aşamaları ve pupa süreçleri üzerine bir çalışma yürütmüştür. Karaciğer besiyerinden ve insan kadavraları üzerinden aldığı *L. sericata* yumurta, larva ve erişkin sinekleri %60'lık sabit nem ve 12:12 saatlik gündüz periyodunda kafesler içerisinde tutmuştur. 10 farklı sıcaklıkta (15, 17, 19, 20, 21, 22, 25, 28, 30 ve 34°C) sineklerin

beslenme ve yumurtlama davranışlarını incelemiştir. Ciğerler üzerine bırakılan yumurtalardan, larva çıkışı, larvaların aktif olarak beslendiği dönem, beslenme sonrası dönem ve erişkin sinek olmadan önceki son aşama olan pupa dönemine ilişkin sıcaklık ve zaman verileri almıştır. Çalışma sonuçlarına göre, sıcaklık ve gelişim birbirleri ile ters orantılıdır. 15°C'lik sıcaklıkta erişkin sinek elde edilmediği için sineğin yaşam döngüsünde bu sıcaklık verimsiz olarak kabul edilmektedir. Pupa süreci dâhil olmak üzere 17°C (842 saat) ve çalışmanın en üst sıcaklık derecesi 34°C (259 saat) deki verilere bakıldığında toplam zamanın yaklaşık %70 oranında azaldığı görülmektedir. Bu durum PMI tahmin çalışmalarında sıcaklığın ve sineğin morfolojik yapısının ne kadar iyi bilinmesi gerektiğinin kanıtıdır (31).

2.1.1.1. Türkiye’de adli entomolojinin tarihçesi

Ülkemizde adli entomoloji ile ilgili yapılan çalışmalar yeni sayılabilir.

2007’de Tüzün ve ark. "Postmortem İnterval'in Saptanmasında Adli Entomoloji" başlıklı yayımladıkları derlemede, adi öneme sahip çeşitli böcek türlerinin erişkin, larva ve pupa aşamalarından bahsetmiştir. Böceklerin ölüm zamanı tahmini için kullanım şekillerinden, örnek olgu ve tablolar yardımı ile ayrıntılı olarak anlatılmıştır (24).

2008’de Özdemir ve ark. Ankara Beştepe’de 12 domuz karkasının parçalanma süreçlerini bir yıl süreyle inceleyerek Staphylinidae, Histeridae, Dermestidae, Silphidae, Nitidulidae ve Cleridae familyalarına ait 40 Coleoptera türü toplanmıştır (32).

2009’da Kondakçı ve ark. yürüttüğü çalışmada *L. sericata* larvalarının bağırsak içreklerinden elde edilen insan DNA’sından STR ve SNP analizi yapmış, insana ait DNA profilleri elde etmiştir (33).

2011’de Altınsoy ve ark. Talyumun *L.sericata* larvalarıyla ilgili ölüm zamanı tahmini üzerine etkilerini araştırmış, talyum’u 0,12; 0,25; 0,50; 1 ve 2 µg/g derişik ölçülerde uygulamış ve

larvaların kontrol grubuna göre gelişim eksiklikleri ve gecikmeleri olduğunu tespit etmiştir (34).

2012’de Bana ve ark. domuz leşi ve büyük baş hayvan iç organları ile yürüttükleri çürüme ve çürüme aşamasındaki dokulara gelen sineklerin süksesyon çalışmasında, Coleoptera takımından, Dermestidae, Histeridae, Silphidae, Staphylinidae, Cleridae, Nitidulidae ve Scarabaeidae familyalarına ait 11 türün ve 3 cins böceğin dokuları ziyaret ettiği gözlemlenmiştir (35).

2014’de Polat ve ark. çalışmalarını köpek leşine gelen ve adli entomolojik açıdan önemli sineklerin süksesyon sıraları ile mevsimler arası farklılıklar ve değişkenler üzerinden değerlendirme yapmışlardır (36).

2016’da Kökdener, “Adli bilimlerde entomolojinin uygulanması” başlıklı derlemesinde, böceklerin adli bilimlere katkılarından, ölüm zamanı tahmini ve süksesyon durumundan bahsetmiştir (21).

2018’de Karataş ve ark. yürüttüğü çalışmada sucul ortamda cesetler üzerine gelen adli entomoloji açısından önemli türleri araştırmışlardır. Çalışmada Aksaray ilinde domuz leşleri drenaj kanalları içine yerleştirilerek 36 gün boyunca gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; Diptera takımından, Calliphoridae, Muscidae, Fanniidae, Chironomidae, Ephydriidae familyalarına ait türler, Coleoptera takımından, Dytiscidae, Histeridae, Nitidulidae, Staphylinidae, Helophoridae familyalarına ait türler, Hemiptera takımından, Gerridae, Corixidae familyalarına ait türler ve son olarak Odonata takımından, Libellulidae familyasına ait olan türde böceklerin leşlere geldiği tespit edilmiştir (15).

2021’de Kökdener, nane, karabiber, karanfil, çam terebentin gibi bitkisel kökenli esansiyel yağların, 6 farklı yoğunlukta *L. sericata* larvalarına uygulanması, larvaların yaşam döngüleri ve gelişim evreleri üzerine etkilerini incelemiştir (37).

Yine 2021’de Kökdener ver ark. ateşli silah atış artıkları olarak bilinen kurşun(Pb), baryum(Ba) ve antimon(Sb) ağır metalleri farklı konsantrasyon miktarlarında (0.25 µg/g, 0.50 µg/g, 1 µg/g ve 2 µg/g) ve ayrı olacak şekilde tavuk karaciğeri ile karıştırılarak larvalara verilerek larvalarının yaşam döngüleri ve gelişim evreleri üzerine etkileri incelenmiştir (38).

2.2. Ölüm ve Ölüm Sonrası (Postmortem) Değişiklikler

Ölüm, somatik ve hücrel ölüm olmak üzere ikiye ayrılır. Günümüzde, Dünya Hekimler Birliği ve Uluslararası hukuk; solunum, dolaşım ve santral sinir sistemi işlevlerinin geri dönüşümsüz olarak yitilmesi halini ‘somatik ölüm’ olarak ifade etmektedir. Somatik ölümden, ölen canlı bilinçsizdir, hiçbir şeyin farkında değildir. Hücrel ölümden ise; hücre solunum ve metabolizma faaliyetlerini durdurmuştur. Tüm hücreler öldüğünde vücut da ölür. Fakat bütün hücreler aynı zamanda ölmezler (nükleer patlama dışında). Farklı hücre tipleri, kalp durduktan sonra, farklı zamanlarda ölürler. Sinir hücreleri ise oksijen yokluğunda 3-7 dakika içerisinde ölürler.

Canlılığın sona ermesi ile birlikte ceset üzerinde çeşitli değişiklikler gözlemlenir. Ölüm sonrası değişikliklerin biliniyor olması, ölüm kararı ve ölüm sonrası zamanın doğruya yakın tespit edilmesinde çok önemli rol oynamaktadır. Ölümden sonra, vücudun sıcaklığı düşmeye başlar. İnsan vücut sıcaklığı (37°C kabul edilir) ile cesedin bulunduğu ortamın sıcaklığı kıyaslanarak ölüm zamanına ulaşılabilir. Vücut sıcaklık düşüşü ölümden sonra yaklaşık 2 saat sonra başlar. Ölümden yaklaşık olarak 2 gün sonra (çürümenin başlamasından sonra) bakteri

ve diğer çürükçül organizmaların metabolik aktivitelerinden dolayı vücut sıcaklığı tekrar artar (Tablo I) (39).

Tablo I: Ölüm sonrası meydana gelen değişiklikler (26).

Ölüm Zamanı	Ölüm Sonrası Değişiklikler	Değiştiren Durumlar	Kategori
0 dakika	Dolaşım ve solunumun durması Solgunluk Erken morluk Kasların gevşemesi	Sıcaklık Nemlilik İç/ Dış mekanda bulunma Suya batma	Erken değişiklikler
2 saat	Göz damarlarında değişiklik Rigor mortis başlar Algor mortis başlar Morluklar oluşur		Geç Değişiklikler
4-5 saat	Kanın pıhtılaşması Morluk fiksasyonu		
24 saat	Kornea'nın kuruması Kanın yeniden sıvılaşması		Kokuşma Doku değişiklikleri
48 saat	Rigor mortis kaybolur İntrovasküler hemoliz		
72 saat	Saç ve tırnakların kaybı		
96 saat	Cilt gevşemesi ve Bulla oluşumu Bakterilerin aşırı çoğalması	Böcek aktivitesi Hayvan aktivitesi	Şişme
Günler - Aylar	Renk değişikliği Şişkinlik Gazların salınması İç organların sıvılaşması Yumuşak dokuların kaybı Kısmi iskeletleşme Tam iskeletleşme	Mumyalaşma	Ayrışma İskeletleşme

2.2.1. Çürüme (Dekompozisyon)

Dekompozisyon doğal bir süreçtir. Ekolojik döngü gereği organik yapı içeren bitki, hayvan ya da insan yaşamı sona erdikten sonra organik materyal, bakterilerin ürettikleri, çeşitli dokuların parçalanmasında rol oynayan proteolitik enzimler ve nekrofaj böcekler yardımı ile temel yapıtaşlarına kadar ayrıştırılır (3,24,30,39,40).

Ölüm gerçekleştiği andan itibaren ceset üzerinde henüz bozulma, kokuşma ve şişme evreleri olmadan önceki aşama başlangıç aşaması olarak tanımlanır. Başlangıç aşasında ceset üzerinde Muscidae, Sarcophagidae ve Calliphoridae ailelerinden nekrofaj böcekler gözlenir (24,39,41). Ölüm gerçekleştikten sonraki 2 ila 6 günlük dönemde; bakteriyel üreme ve parçalanma sebebiyle ortaya çıkan gazların sebep olduğu özellikle karın bölgesinde meydana gelen şişme, ölü solunumun sebep olduğu vücut boşlularından kana benzer yapıda koyu renkli sıvı çıkışı ve çürümeye özgü keskin koku oluşur. Şişme evresinde ceset üzerine Calliphoridae ailesine ait sinekler görülmesi beklenmektedir (24,39,41).

Ölüm sonrası 7 ile 12 gün arası süreç vücut bütünlüğünün bozulma evresi olan **aktif çürüme dönemi**dir. Bu dönemde mikrobiyal üreme ve nekrofaj böceklerin ceset üzerinde beslenmesi, çeşitli böceklerin bıraktıkları larvalar sebebiyle ve bunlara ek olarak ortam sıcaklığı ve nem parametrelerinin de etkisi ile parçalanmaya bağlı şiddetli koku duyulur.

Cesedin pozisyonu, ölüm sebebi ve gömülü olup olmama durumuna bağlı olarak vücut üzerinde çeşitli yerlerde siyahlaşmalar görülür. Cesette bu süreçte Muscidae, Coleoptera ve Calliphoridae ailelerine ait sinekler görülür (24,39,41).

Ölümden sonraki 12 ile 52 günlük süreç cesedin **ileri çürüme evresi**dir. Bu dönemde nekrofaj böceklerin beslenmesini tamamlamasına bağlı olarak koku ciddi oranda azalır ve ceset üzerinde Coleoptera ailesinde ait kitin ile beslenen böcekler görülür (24,39,41).

Ölüm anından itibaren 52 ila 207 günlük süreç ***kuruma sürecidir***. Bu dönemde sadece kemik, saç ve kabuklaşmış deri kalıntıları görülür, cesette bu dönemde koku duyulmaz. Kuruma evresinin bu aşamasında Dermestidae ve Hymenoptera ailelerine ait böcek türleri görülmektedir (24,35,39,41).

Çürüme evresi, otoliz ve pütrefaksiyon olmak üzere iki aşamadan oluşur (39,40,42) Otolizin kelime anlamı hücrenin kendi kendini yok etmesidir. Otoliz dolaşımın sona ermesi ve vücut hücrelerinin ölmesi ile birlikte, lizozomların, proteolitik enzimleri hücreyi ve bulunduğu dokuyu yok etme sürecidir. Otoliz en hızlı karaciğer ve pankreas gibi enzim aktivitelerinin yüksek olduğu yerlerdir (39).

Ölüm sonrası otoliz sürecinden sonra, dokuların yapı taşları sıvı, gaz ve tuzlara kadar ayrılması olayı pütrefekasyon (kokuşma) aşamasıdır. Septisemi gibi vakalarda, kan patojen bakterilerin hızlı çoğalması için uygun ortam sunmakta ve kokuşma sürecini hızlandırmaktadır. Kokuşmanın ana kaynağı vücut floramızda özellikle solunum ve barsak sistemlerimizde faydalı ya da saprofit olarak tanımladığımız sporlu oksijensiz solunum yapan bakterilerdir (24,39,41). Doku ve organ türlerine göre kokuşma ve kokuşma süreleri farklılık gösterebilmektedir. Çeşitli enzimlere sahip olan göz, karaciğer, bağırsaklar ve mide gibi organlar; kas ve yağ dokusu içeren kalp, böbrek, uterus ve mesane, gibi organlara kıyasla çok daha hızlı çürümektedir. Kokuşma sürecine etki eden diğer faktörleri şu şekilde sıralayabiliriz:

1. *Sıcaklık ve nem*: Sıcaklığın yükselmesi ve nemin artmasına bağlı olarak bakteri aktivasyonu da lineer olarak artacaktır, ortam sıcaklığının 12°C'nin altında olduğu koşullarda ise kokuşma sürecinde yavaşlama görülecektir.
2. *Dokunun su içeriği*: Canlılığın devamı için su gereklidir benzer şekilde ölüm sonrası süreçte cesetteki su oranı bakteriyel aktiviteyi de etkilemektedir. Sıcaklığa bağlı olarak dehidrate olan cesetlerde kokuşma süreci de yavaş gelişmektedir.

3. *Kişinin yaşı ve sağlık durumu:* Su ve beslenme durumu bakımından yetersiz sayılabilecek yeni doğanlarda, bir yetişkin kadar yeterli solunum ve bağırsak florasına sahip olmadığı için kokuşma süreci yavaş ilerlemektedir. Zayıf kişiler, şişmanlara ve yetişkin bireyler de çocuklara kıyasla daha yavaş oranda kokuşma gerçekleşir.
4. *Ölüm Sebebi:* Ölüm sebepleri arasında sepsis gibi tüm dolaşım sistemini dolayısıyla tüm vücudu etkilemesi durumunda kokuşma süreci diğer birçok duruma göre hızlı olduğu görülmektedir.
5. *Cesedin bulunduğu ortam:* Açık alanda bulunan ya da gömülen cesetler arasında belirgin bir şekilde kokuşma sürecinde fark olduğu gibi cesedin su içeren bir ortamda olması tuzlu veya tatlı su ortamında bulunması da kokuşma sürecini etkilemektedir. Gömülen cesetlerde olduğu gibi tuzlu suda bulunan cesetlerde de belirgin şekilde kokuşma sürecinin yavaşladığı bilinmektedir (3,24).

2.3. Adli Entomolojide Ölüm Zamanı Tespiti

Ölüm zamanının doğru tespiti için olay yerinin doğru incelenmesi gerekmektedir. Olay yerinde herhangi bir görgü tanığı olmadığı durumlarda ölüm zamanını tespit etmek için birçok bilimsel yöntem kullanılabilir. Bu yöntemlerden biri olan entomolojik araştırmalarda ölüm zamanı tespiti için kullanılan iki geçerli yaklaşım vardır. Bunlardan ilki böceklerin süksesyonu, yani ceset üzerine beslenmek için böceklerin geliş sıralarıdır. Böcek süksesyon verileri ölüm zamanı tahmini için hem minimum hem de maksimum zamanın tespiti için uygulanabilir. Nekrofaj böcekler beslenme tercihlerine göre cesede geldiği için süksesyon süreci önemlidir. Ancak bazen ceset üzerinde olmaması gereken tesadüfi türler de görülebilir (43). Böceklerin süksesyon verileri ölüm zamanı tahmini için bir aydan bir yıla kadar kullanılabilir (21,44).

İkinci entomolojik yaklaşım ise minimum ölüm zamanını tespiti için cesetle beslenen böceklerin büyüme oranlarının hesaplanmasıdır. Bu yöntem ise ölüm zamanının bir aydan daha az olduğu zamanlar için kullanılması uygundur. Çünkü arthropodlar ölümden sonra dakikalar içinde cesede yumurta bırakırlar. Böcek cesede ulaştıktan sonra ceset üzerinde bulunan en yaşlı larva, sineğin cesede ilk ne zaman ulaştığını gösterir (21,44). Adli öneme sahip böcekler ölüm gerçekleştikten sonra ceset üzerine gelen nekrofaj böcekler arasından sinekler yumurta ya da larvalarını cesedin doğal vücut boşlukları olan ağız, burun delikleri, gözler ve cinsel organlara bırakırlar (13,26,44,45).

Ateşli silah, kesici-delici alet yaraları veya künt yaralanmalarla gerçekleşen ölümlerde, sinekler yumurta veya larvalarını doğal vücut boşluklarının bulunduğu bölgelere de bırakmaktadır (13,14). Hatta çürüme aşamaları sebebiyle vücudun kararmasına bağlı olarak ölüme sebep olan yaralar tespit edilemeyebilir, fakat sineklerin bu yaralar üzerine ya da içine yumurta veya larva bırakmaları, o bölgedeki larva aktivitesi ile vücut üzerindeki tüm sonradan oluşan yaraların bulunduğu bölgeler, tespit edilebilir. Larvaların doğal vücut boşlukları dışındaki kolonizasyonu cesedin ölümden önce kendini savunup savunmadığı, ölüm öncesi ihmal veya suistimal durumlarının olup olmadığı hakkında bilgi verebilmektedir (14,30). Nem ve sıcaklık parametrelerine bağlı olarak ceset üzerinden elde edilecek nekrofaj böceklerin, larva ve erginlerinin gelişim evreleri, cesedin ölüm zamanı hakkında doğruya yakın bilgi vermektedir (13). Adli entomoloji çalışmaları için böcek aktivitesi ilkbahar ve yaz ayları önemlidir. Sonbahar ve kış aylarında böceklerin aktivitesinin azalması sebebiyle bu mevsimler kısıtlayıcıdır (21,30). Türkiye'nin ılıman kuşakta yer alması ve dört mevsimi belirgin şekilde yaşaması, böcekler için uygun hayat koşulları sağlamaktadır.

Ölümden sonra bakteriyel aktiviteye bağlı şişme ve kokuşma evresinde ortaya çıkan ve yayılan keskin çürüme kokusu Diptera sınıfına ait türleri cesede çeker. Ölüm zamanı tahmini ile de

ilişkilendirilen Calliphoridae ve Sarcophagidae ailelerine ait türler cesede ilk gelen türler olarak bilinmektedir (13). Ortam şartlarına bağlı olarak ceset üzerine gelen sinekler her zaman kolonize olamayabilir, iklim şartları veya havanın yağışlı olması, gündüz ve gece sıcaklık farkının yüksek olması sebebiyle yumurtlar çatlamayabilir veya geç çatlayabilir. Süksesyon'a bağlı olarak ceset üzerindeki böcek ve aktivitesi farklılık gösterebilir (14,23).

2.3.1. Ölüm anında cesedin yerinin belirlenmesi

Şüpheli ölüm ya da gömülü bulunan ceset vakalarında ilk olay yerini gizlemek için ceset, cinayet yerinden taşınmış olabilir. Entomolojik çalışmalara cesedin etrafındaki lokal fauna ve ceset üzerindeki böcek faunası belirlenip, karşılaştırma yapılarak cesedin ilk öldürüldüğü yerden hareket edilip edilmediği konusunda bilgi edinilebilir. Sıcaklık ve yükselti değişimi böcek faunasını etkiler. Bu sebeple belirli bölgelerde yaşayan adli öneme sahip böceklerin ceset üzerinde ve habitat tercihi olmaması gereken bir bölgede tespiti, cesedin taşınıp taşınmadığı hakkında bilgi sağlar (13,14,46). Bu yüzden her ülkenin ve her bölgesinde hakim böcek faunasının araştırılması için önemlidir.

2.4. Adli Entomolojik Açıdan Sineklerin Önemi

2.4.1. Sineklerin biyolojisi

Her jeolojik devirde belirli bir hayvan grubu yaygın hale geçer ve tür sayısı bakımından büyük bir yükseliş gösterirler. Eklembacaklılar dünya üzerinde en iyi adaptasyon sağlayan ve egemen türdür. Günümüzde yaşadığı tahmin edilen 2.000.000 hayvandan 1.200.000'i eklembacaklılara aittir. Eklembacaklılar, karasal yaşama en iyi uyum sağlamış omurgasızlar olmalarının yanında atmosferin belirli katmanlarından deniz tabanının çeşitli bölümlerine kadar yayılmışlardır (13). Eklembacaklılar grubunun yeryüzünde yaygın olma sebepleri aşağıda belirtilmiştir:

- Dış iskelete sahip olmaları: Dış iskeletlerinin kitin yapısında olması, kırılma durumunda bu yapının tekrar üretilmesini ve su kayıplarını minimum seviyelere indirmeye yarayan bir özelliktir.

- Eklemli üyelere sahip olmaları: Kitin yapısındaki dış iskeletin altında rahat hareket edebilmelerini sağlamaktadır.

- Solunum için trake sistemine sahip olmaları: Dolaşım sistemleri bulunmadığından, oksijenin verimli kullanımı için doğrudan dokulara iletilir.

- Duyu sistemleri ve organları iyi gelişmiştir: Kara yaşamına adaptasyon ve predatör türlerden korunmak veya kaçmak için bu özellikleri iyi gelişmiştir.

- Çeşitli davranış modelleri görülmektedir: Avlanma, saklanma, eşleşme, koloni yaşamı ve savunma çeşitleri ve modelleri gelişmiştir. Bu özellikler de böcek grubunun her ortama ve iklime rahatlıkla adaptasyon göstermelerini sağlamaktadır.

- Metamorfoz (Başkalaşım) geçirmeleri: Beslenme ve barınmada tür içi rekabetin engellenmesine sebep olmaktadır.

Eklembacaklılar; bitkileri, ağaçları, ölmüş bitki ve omurgalıları yerler. Ölmüş insanların ve hayvanların vücutları ile beslenirler. Bu özellikleri ile adli entomolojinin ilgilendiği ve vakaları çözmede faydalandığı gruptur (47). Ekosistem içinde organik maddeleri tekrar kullanışlı hale getirirler. Besin zincirinin önemli halkasını oluştururlar. Adli entomolojide en önemli eklem bacaklı grubu sineklerdir.

Sinekler bütün dünyada yaygın olup yaklaşık olarak 128 familya ve 150.000 tanımlanan türü bulunmakta ve sayılamayacak kadar çok yeni tür keşfedilmeyi beklemektedir (18). Bu takımın en önemli özelliği, bir çift zar kanada sahip olmasıdır. Sinekler gündüz aktif olan canlılardır ve

cesetlerin ayrışmasında aktif rol oynarlar. Sinekler tam başkalaşım geçirmeleri sebebiyle besin üzerine yumurta veya larvalar bırakırlar. Kitin içermeyen bu larvaların görünüşleri ve beslenme şekilleri ergin bireylerden farklıdır (48).

2.5. Taksonomide *Lucilia sericata*'nın Yeri

Şube: Arthropoda (Eklembacaklılar)

Sınıf: Insecta (Böcekler)

Takım: Diptera (Çift Kanatlılar-Sinekler)

Alt takım: Brachycera

Aratakim: Muscomorpha

Familya (Aile): Calliphoridae

Cins: Lucilia sp.

Tür: *Lucilia sericata* (*L.sericata*) (Meigen1826)

L. sericata 'nın yumurtaları, boyları yaklaşık 1mm çapında olup uzun uçlarına doğru oval şekil alan ve çoğunlukla sarı renktedirler (Şekil 1-2). Sinekler yumurtalarını genellikle doku üzerine kümeler halinde bırakırlar. *L. sericata* larvaları üç evre geçirir (Şekil 3), larvanın hangi evrede olduğunu anlamak için posteriorlerinde bulunan solunum yarıklarının sayısı ve rengine göre belirlenir. Ayrıca kapalı yapıdaki peritemi ve cephalaseklotum yanında bulunan anterior spiracle'ın çıkıntılarının sayısında tür tayini için kullanılır (Şekil 4-6). Larvalar her biri mikro dikenlerle kaplı 12 segment ten oluşurlar (Şekil 5). Diğer türlere kıyasla en son posterior segmentin kenarına bakılarak da ayırt edilirler. Segmentin dış kenarında bulunan çıkıntıya tüberkül adı verilir. İki iç tüberkül arasındaki mesafe, iç ve dış tüberkül arasındaki mesafeden küçük ise bu türün *L. sericata* olduğu söylenebilir. Bu özellik 3. evre larvalar için

karakteristiktir (Şekil 6). Beslenme evresini tamamlayan 3. evre larvalar pupa aşaması için uygun ortam aradığı gezinme evresine geçmektedir (Şekil 3-f). Larva, boyunun kısalıp kalınlaştığı, dış kısmının sert bir tabaka haline geldiği kahverengi ve şeklinin fıçıya benzediği pupa haline geçtiği görülmektedir. *L. sericata* doğa koşullarında sıcaklık ve nem parametrelerine bağlı olarak 15-22 gün arasında hayat döngüsünü tamamlar (Şekil 3). Laboratuvar koşullarında yumurtalar (Şekil 1-2) 8 -16 saat içinde hem birinci hem de ikinci evrede bulunan larvalar bir arada gözlemlenebilir (Şekil 7). Bu durumu takiben 72 saat içinde beslenme aşamasını tamamlayan 3. evre larvalar pupa aşaması için bulundukları besi ortamından göç ederler (Şekil 5). Pupa aşamasında (Şekil 8-10) uygun koşullarda 7-9 gün içinde erişkin sinekler çıkar. Pupadan çıkan sinekler gri renkte olup daha çok hareketsiz durumdadır ve kanatları henüz açılmamıştır (Şekil 11) (2,13,22,25,31,49-52).

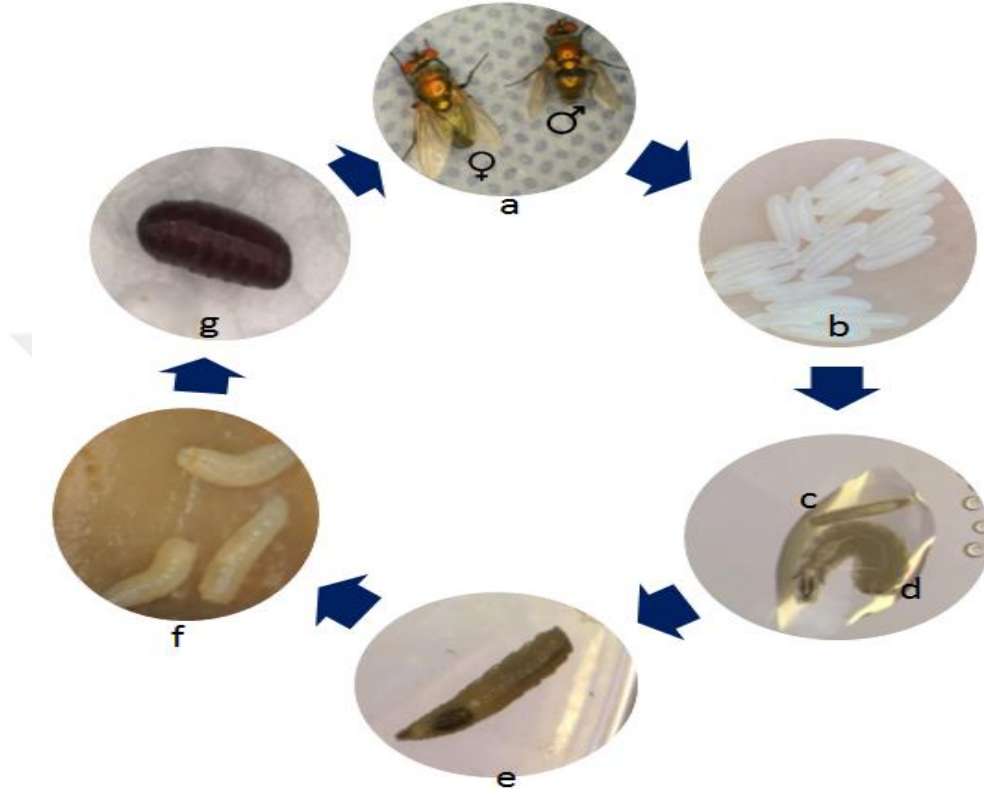
Lucilia türleri, diğer Calliphoridae ailesi üyelerinden squama yukarısında bombesinin oluşu (suprasquamal bombe) ile ayırt edilir. Mesotoraksında üç sıra kıl görülür (Şekil 14). Arista, uç noktasına kadar kıllıdır. *L. sericata*'nın dorsali dışbükeydir. Toraks üzerinde beyaz tozumsu yapılar gözlenir (44,48).



Şekil 1: Erişkin *L. Sericata* sineklerinin karaciğer üzerindeki yumurtaları



Şekil 2: *L. Sericata* (Olympus SZX10) büyütülmüş yumurtaları



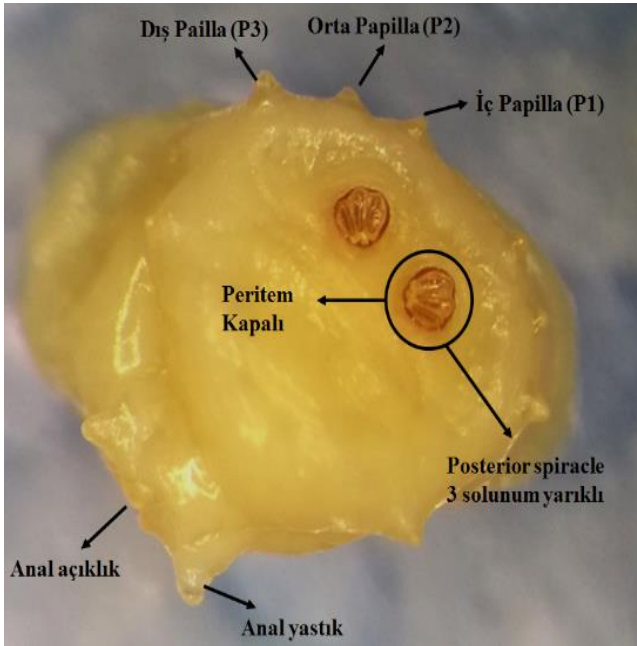
Şekil 3: *L. sericata*'nın yaşam döngüsü. **a.** Erişkin *L.sericata* sinekleri **b.**Yumurta **c.** 1.evre larva **d.** 2. Evre larva **e.** 3. Evre ve kursağı dolu larva **f.** Post feeding larva **g.** Pupa



Şekil 4: *L.sericata* anterior spiracle ve cephaloskeleton



Şekil 5: *L. sericata* larvası segmentleri üzerindeki mikro dikenler



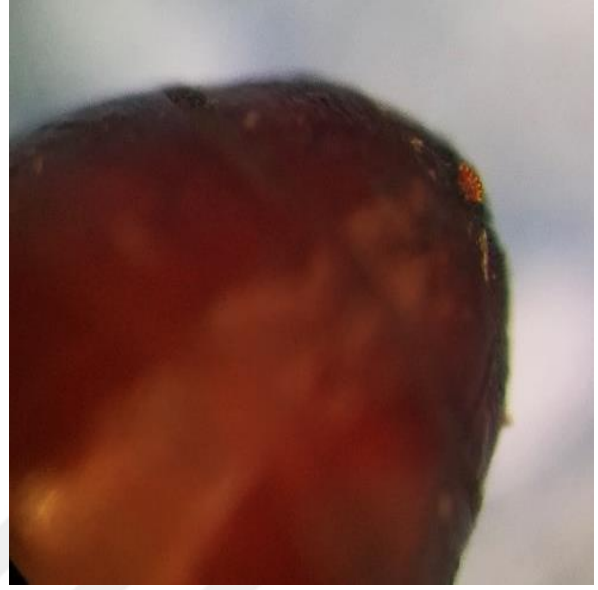
Şekil 6: *L.sericata* 3. evre posterior görüntüsü



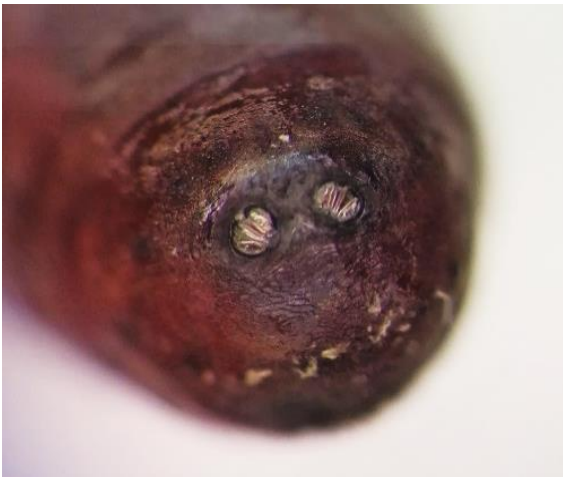
Şekil 7: 1. ve 2. evre *L.sericata* larvaları



Şekil 8: *L.sericata* pupası



Şekil 9: Pupa üzerindeki anterior spiracle



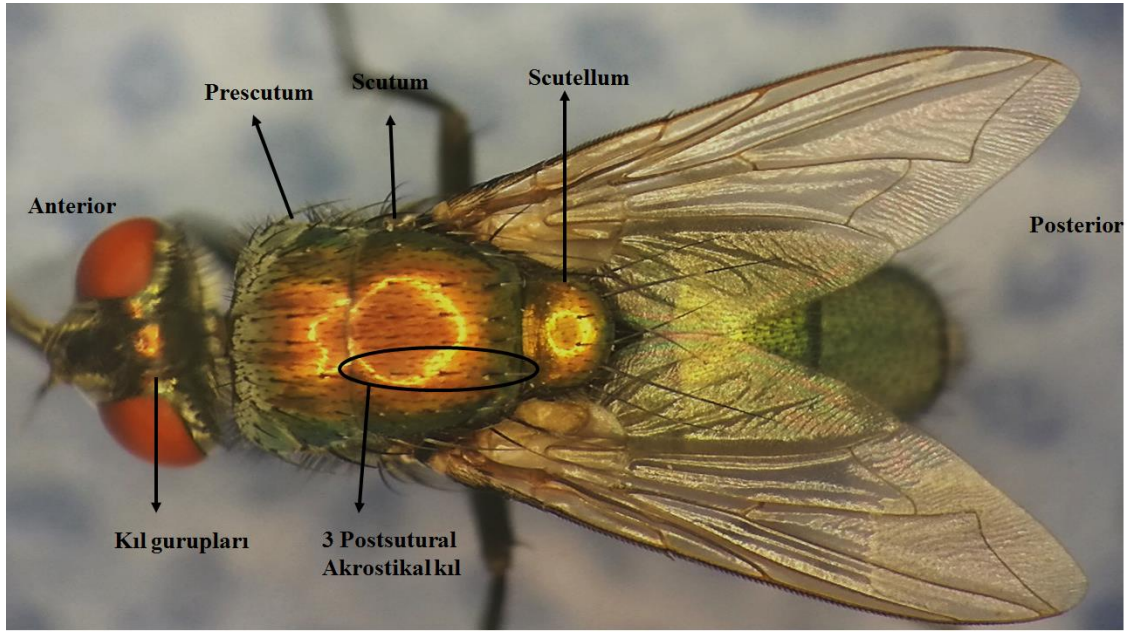
Şekil 10: Pupa posterior görüntüsü ve solunum yarıkları



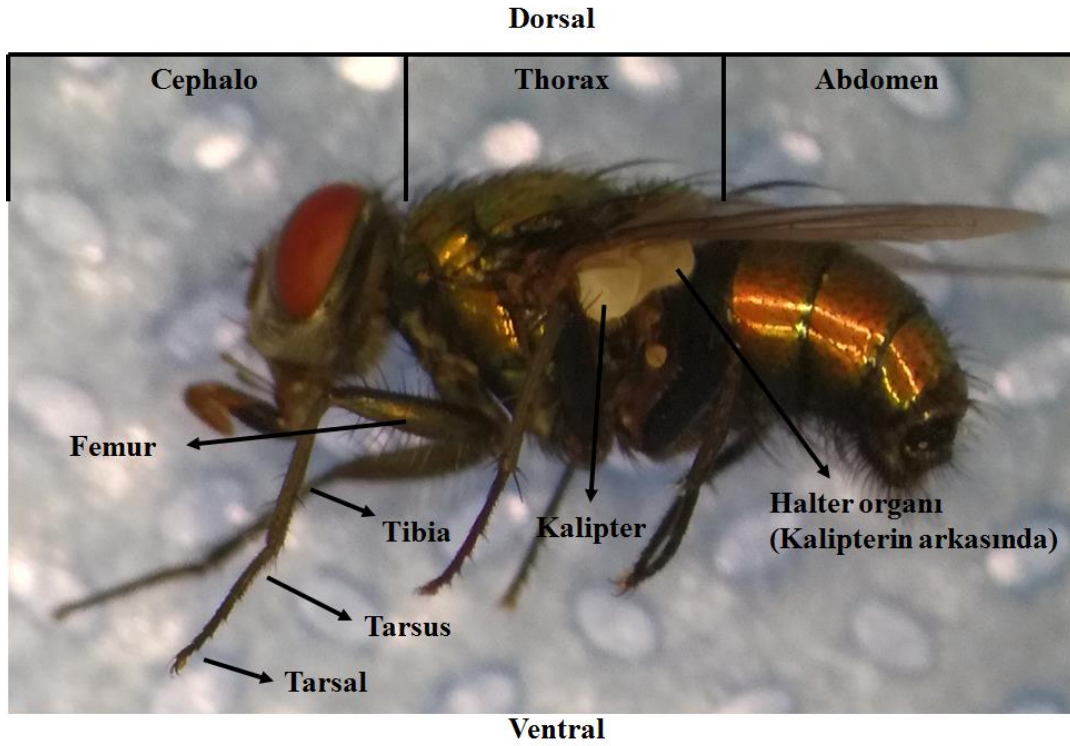
Şekil 11: Pupadan yeni çıkmış gri renkli *L. sericata*



Şekil 12 : *L.sericata* ergin sinekleri



Şekil 13: *L. sericata* dorsal görünümü



Şekil 14: *L. sericata* Ventral – Lateral görüntüsü

2.5.1. Sinek larvalarından DNA analizleri

Adli bilimlerde olayın aydınlatılmasında önemli konulardan biri de ölüm zamanı tahminidir. Adli entomoloji uygulamalarında ölüm zamanının tahmininde nekrofaj türlerin tespiti ve teşhisinin doğru bir şekilde yapılması gereklidir. Ancak nekrofaj türü yumurta ve larvaların morfolojik özellikleri açısından kıyaslamak ve doğru tür tahmininde bulunmak her zaman mümkün değildir. Bunun için böceklerin ergin hallerini beklemeden, ceset üzerinden elde edilen larva ve pupalardan tespiti için DNA analiz yöntemleri kullanılabilir. Böylece larva erişkin hale gelmeden önce bulunduğu yaş aralığı hesaplanabilir (12,14,30,53,54). Ayrıca böcekler mide ve bağırsak içerikleri ve hatta boş pupa kabukları da incelenerek böcek veya beslendiği kaynak belirlenebilir (12).

Larvalardan DNA analizleri ile Sinek Türünün belirlenmesi:

Adli entomologlar dış görünüş özellikleri ve aynı familyada bulunmaları bakımından birbirlerine yakın türlerin ayırt edilmesi ve tanımlanması için teşhis anahtarlarının yanında böceklerin teşhisi amaçlı moleküler metotlar üzerinde de çalışmalar yürütmüşlerdir. Böceklerin moleküler tanısında genellikle mtDNA (mitokondriyal DNA) üzerinde çalışmalarda sitokrom oksidaz I (COI) ve sitokrom oksidaz II (COII) incelenir (55). Örneğin İngiltere’de sıklıkla bulunan ve görsel açıdan birbirine benzeyen sinek türlerinden adli öneme sahip olan *Calliphora vicina* (Robineau Desvoidy) ve *Calliphora vomitoria* (Linnaeus) (Diptera: Calliphoridae) moleküler tanı için COI kullanılmıştır (56,57). Diğer bir çalışmada ise adli entomolojik açıdan önemli türlerden biri olan *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) cinsinin dokuz farklı türünün tanısında klasik mtDNA analizi dışında hem mt DNA hem de otozomal DNA lokuslarından oluşan kombinasyonlar kullanılmıştır (58).

Meiklejohn ve ark. yapmış olduğu çalışmada ise adli entomoloji için önemli tür olan *Sarcophaga impatiens*’ın bütün larva ve pupa aşamalarında COI’nin bütün alt basamakları

analiz edilmiştir. Elde edilen tüm DNA sekansları Barcoding of Life Database (BOLD) veri tabanında kıyaslanmış ve %99,95 oranında doğrulanmıştır. Son gelişmelere göre böceğin DNA kalıntılarının tüm hayat aşamalarında aynı kalması tür teşhisi için bir DNA barkodlama aracı olarak kullanılabilir (59).

Larvalardan DNA analizleri ile insanların kimliklendirilmesi:

Larvalar her aşamada cesetle temas halindeler bu sebeple mide ve bağırsak içeriklerinin adli DNA analizi ile incelenmesi mümkündür. Elde edilen veriler, PMI belirlenmesinde, cesedin kimliğinin tespitinde ve kurbanla olay yeri arasındaki bağın kurulmasında kullanılabilir (60).

Di Luise ve ark. tarafından yapılan çalışmada adli öneme sahip *Calliphora vicina* larva kursak ve bağırsak içeriklerinden STR profili elde etmek amacı ile farklı saklama ve ekstraksiyon yöntemleri kıyaslanarak DNA izole edilmesi amaçlanmış PCR ürünleri ve kalitesi için Real-Time PCR metodu tercih edilmiştir. Her bir çalışma grubu için ise 8 -10 adet larva %70'lik etanol içerisinde ve kaynatma işlemi sonrası -20°C dondurucuda muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyon için üç farklı kit (Chelex™, DNA IQ™ system ve Qiagen™ DNA MicroKit) ile çalışılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre etanol ile korunan numunelerde insana ait DNA miktarının ciddi oranda azaldığı ve doğrudan dondurularak saklanması durumunda ise daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür (55). Bu çalışmada en iyi ve en yüksek sonuç veren ekstraksiyon yöntemi, Qiagen™ DNA Micro Kit olduğu bildirilmiştir. DNA IQ™ system ise numuneler arasında büyük ölçüde varyasyon görülmesine sebep olmuştur. Başlangıç DNA miktarları ve set kalibrasyonunun değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir. Fakat Chelex™ yöntemi ve ardından filtre aşaması sonucunda, sadece kuru koşullarda muhafaza edilen örneklerden 6 otozomal ve 7 Y kromozom profili elde edilebilmiş ve verimlik bakımından diğer kit ve yöntemlere kıyasla zayıf kalmıştır. Kaynatarak saklamanın insan DNA kalıntılarının bozulmasını arttırdığı görülmüştür (55).

Njau ve ark. yürüttükleri çalışmada *Protophormia terraenovae* türü sineklerin üçüncü evre larvalarını, çürüyen üç farklı insan cesetlerinden toplamışlardır. Her cesetten 10'ar adet larva örneği alınmıştır. Toplanan örnekler analiz öncesi kaynatılarak öldürülmüş ve diseksiyon sürecine kadar %70'lik etanolde saklanmıştır. Larvadan sadece kursak ve bağırsak içeriklerinden elde edilebilecek DNA kalitesi değil, diseksiyon işlemi sonrası degradesyan süreci de araştırılmıştır. Larva kursak içerikleri için kontrol numunesi olarak cesede ait doku parçaları alınmıştır. Ayrıca insana ait DNA analiz kalitesini araştırmak için larvaların açlık stresi ve farklı besi ortamı kontaminasyonu ile kıyaslamak üzere 10'ar larvadan oluşan 12 grup numune toplanmıştır. 6 grup aç bırakılmış ve diğer 6 grup da sığır kıyması ile beslenmiştir. Her bir çalışma grubundan 2, 4, 6, 8 ve 10 gün sonra diseksiyon için larvalar kaynar suda öldürülüp diseksiyon öncesi korumak için %70 etanol içinde bekletilmiştir. Diseksiyon işlemi öncesi dış kontaminasyonu önlemek amacıyla 1ml %20'lik çamaşır suyu içince 20 dakika kadar bekletilmiş ardından 1 ml distile su ile durulanmıştır. Cesetlerden alınan numuneler QIamp DNA Investigator Kit ve larvalar ise Zymo Kit kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon sonucu Real-Time PCR işlemleri ile DNA miktarı ve kalitesine bakılmıştır. AmpFlSTR™ Identifiler Plus™ PCR Amplifikasyon Kiti kullanılarak DNA verileri elde edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, cesetlerden alınan ve kaynatılarak diseksiyon işlemine kadar saklanan numuneler ile aç kalan ve sığır kıyması ile beslenen gruplarla kıyaslandığında ikinci gruptaki numunelerden elde edilen insana ait DNA'nın birinci gruptakilere göre azaldığı fakat profil eşleşmelerinin olduğu görülmüştür (61).

Powers ve ark. yürüttüğü çalışmada morfolojik olarak birbirlerine benzeyen *Calliphora augur* ve *Calliphora stygia*'nın erişkin sineklerinin, insan semeni ile beslenmesi, semene yumurta bırakıp bırakmama durumu, larvaların semenle beslenme davranışları ve beslenme sonrası farklı aşamadaki larvalardan insana ait DNA analiz çalışması yapılmıştır. Buna ek olarak pupa aşamasına geçen larvalardan insana ait DNA kalıntılarının tespit edilip edilememe durumu

araştırılmıştır. Sinekler kontrollü deney ortamında sabit sıcaklık nem ve 12:12 gece/gündüz periyodunda tutulmuşlardır. Çalışmada, *Calliphora augur* 42 adet örnek ve *Calliphora stygia*'dan 57 adet örnek çalışılmıştır. Yetişkin, genç sinekler ve çeşitli larva evrelerindeki örnekler hem sığır ciğeri ile hem de semen örnekleri ile beslenmiştir. İnsandan alınan örneklerin ekstraksiyonu için DNA IQ System, miktar tayini için Quantifiler Trio DNA Quantification Kit, PCR aşaması için PowePlex 21 System ve profillemeye için GeneMapper ID-X1.5 kullanılmıştır. *C. stygia* larva aşamaları ve pupa örneklerinde 0,002–0,008 ng/μl insana ait DNA örnekleri tespit edilmiştir ve ayrıca *C. stygia*'ya ait tüm örneklerden toplamda 28 STR lokusu elde edilmiştir. *C. augur*'dan ise erişkin numunelerde insan DNA'sı elde edilememiş, ikinci ve üçüncü evre larva örneklerinin bazılarının kursak ve bağırsak içeriklerinde az miktarda degrade olmuş insana ait DNA saptanmıştır. Fakat pupa aşamasında DNA elde edilememiştir ancak gezici evredeki larvalarda 0,001 ng/μl den daha az DNA saptanabilmiştir (62).

Mukherjee ve ark. laboratuvar sineği olarak da bilinen ve toprağı kazması sayesinde gömülü cesetler üzerindeki aktivitesi ile de tabut sineği (45,63) olarak literatüre geçmiş olan *Megaselia scalaris* (Diptera, Phoridae) üzerine üçüncü evre larvaların kursak ve bağırsak içeriklerinden STR profili elde etmek amacıyla çalışma yürütmüşlerdir (50). Larvalar üçünü evreye gelene kadar, domuz ve sığır dokuları ile beslenmiştir. Diseksiyon sonrası minimum kaç adet larvadan verimli DNA elde edilebileceğı de ayrıca incelenmiştir. Bu amaçla 1, 3 ve 5 larva olacak şekilde mide ve bağırsak içerikleri ayrılıp ekstrakte edilmiştir. DNA ekstraksiyonu için QIAamp® DNA investigator kit, miktar tayini için ise dsDNA-High Sensitivity kit kullanılarak Invitrogen™ Qubit® 3.0 cihazında florometrik yöntemle ölçülmüştür. Domuz için Sus scrofa animaltype biotype STR kit (12 lokus) (Biotype®) ve sığır için Bos taurus Bovine panel 1.2 STR kit (12 lokus) (Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Real Time PCR ile elde edilen lokuslar çoğaltılmış, yürütme işlemleri AB 3130 genetik analiz cihazında yapılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre en etkili iki koruma tekniğı olarak -20°C de dondurarak ve % 98 etanol

içerisinde bekletmenin uygun olduğu görülmüştür. Bu yöntemlerin moleküler analizler için uygun olduğu ve diseksiyon sürecini kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca kullanılan larva miktarının artması DNA miktarı ve analiz edilebilen alel oranlarını da büyük ölçüde arttırmıştır, minimum veri elde edilebilecek larva sayısının ise 3 adet olarak belirlenmiştir (50).

Sanavio ve ark. İtalya'nın Padova kentinde bulunan kimliği belirsiz mumyalanmış bir insan cesedi üzerinden elde edilen entomolojik delillerden mummyaya ait DNA elde edilmesi ile ilgili çalışma yürütmüşlerdir. Ceset üzerinde ve etrafında çok sayıda morfolojik olarak Diptera ve Hymenoptera aileleri ile uyumlu olduğu düşünülen numuneler toplanmış ve -20°C ye kaldırılmıştır. Larva kalıntıları ve pupa kabuklarından insana ait DNA elde etmek için farklı yöntem kullanılmıştır (64). Bu yöntemlerden ilki Marchetti ve ark. boş pupalardan DNA elde etmek için Chelex1-100 ve PrepFiler Kit® kullanmışlardır (12). Skowronek ve ark. larva kursak ve bağırsak içeriklerini analiz etmek için Qiagen™ DNA MicroKit yumuşak doku protokolü, DNA IQ™ ve Chelex™ kit yöntemlerini kullanmışlardır (65). Ekstraksiyon işlemi sonrası tüm DNA örnekleri NanoDrop One protokolüne göre ve elde edilen 2 ng'lık DNA'da Identifiler Plus Kiti kullanılarak çoğaltılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre kullanılan iki yöntemle uygun bir DNA profili elde edilememiş, larva ve pupadan insan DNA'sı ile eşleşecek herhangi bir veri alınamamıştır. Sanavio ve ark. göre sonuçların negatif çıkmasının temel sebebi, cesedin bozunması ve doku bozulmalarına bağlı olarak larvaların ceset üzerinde beslenecek kadar uygun doku bulamamasıdır (64).

Chamoun ve ark. cesedin çürüme aşamaları ve bu aşamalarda *Chrysomya albiceps* (Calliphoridae) ait larvaların kursak ve bağırsak içeriklerinden elde edilecek insana ait Y-STR lokuslarının bir cinsel suç simülasyonu üzerine iki çalışma yürütmüşlerdir. İlk çalışma 200g sığır kıyması ile 1 ml semen karıştırılmış olacak şekilde ve üç tekrarlı olarak laboratuvar koşullarında yetiştirilen *C. albiceps* türü sineklerin bu örnekler üzerinde yumurtladığı günden

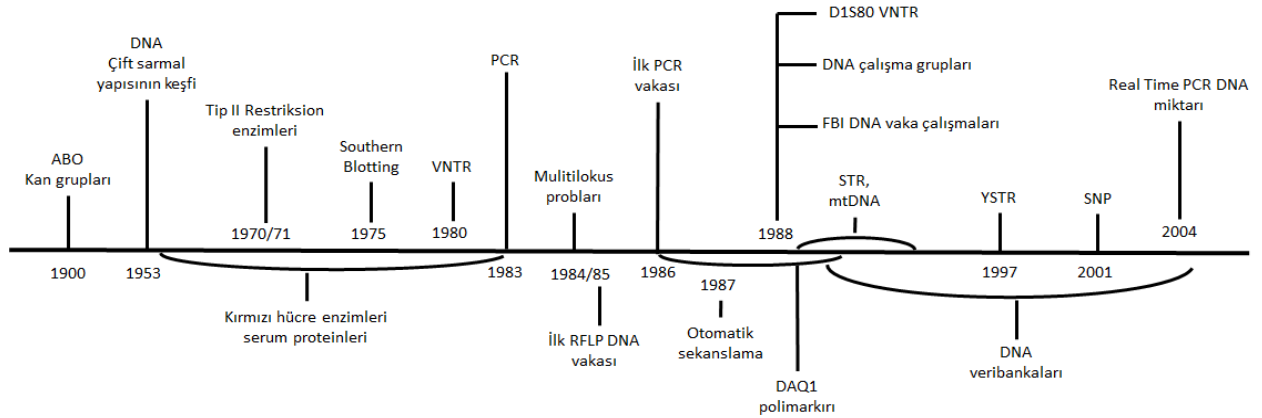
itibaren 8 gün toplamda 192 saat süresince takip edilerek yapılmıştır (66). 24 saat aralıklarla toplamda 81 larva ve 15 pupa numuneleri alınmış ve çalışma sonuna kadar %70'lik etanol içinde diseksiyon işlemine kadar bekletilmiştir. Semen örnekleri Chelex 100® reçinesi ile diseksiyon işlemi sonrası mide ve bağırsak içerikleri alınan larva ve pupa numuneleri ise doku protokolünü takiben bir fenol kloroform metodu ile izole edilmiştir. Elde edilen DNA örneklerinde Y kromozomu üzerinden bulunan 16 lokus çalışılmıştır. Elektroforegram verilerine göre numuneler bireysel olarak değerlendirildiğinde insana ait olduğu tespit edilen 5 ile 11 lokusluk sonuçlar görülmüştür. 96'ncı ve 168'nci saatlerde alınan numunelerden sonuç alınamamıştır (66). İkinci çalışmada ise bir tecavüz ve cinayet modeli üzerine durulmuş ve dişi bir domuz kullanılmıştır. Gönüllülerden sperm örnekleri (3 ml) alınarak, domuzun anal ve vajinal bölgelerine 1,5ml olacak şekilde şırınga ile uygulanmıştır. İlk çalışmaya kıyasla çürüme süreci 14 gün ve toplamda 336 saat süresince takip edilmiştir. Larva numuneleri ilk çalışmadaki gibi toplanmıştır, toplamda 289 larva ve 157 pupa örneği çalışılmıştır (66). Gönüllülerden alınan oral sıvı ve semen örnekleri Chelex 100® ile diseksiyon yapılan larva ve pupa örnekleri ise yumuşak doku protokolü ile fenol-kloroform-izoamil alkol yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Semen ve sıvı örnekleri Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit ile 7500 Real Time PCR System kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. DNA analizleri için AmpFSTR® Yfiler kiti ile çalışılmıştır. Elektroforegram sonuçlarına göre çürümenin ilk 6'ncı ve 14'ncü gününe kadar (144-336 saat) yüksek degradasyon olmasına rağmen 1 ile 3 lokus elde edildiği görülmüştür. Çalışmada 6 ve 14'üncü günler arasında elde edilen tüm verilerin birleştirilmesiyle, referans örneklerle kıyaslanacak minimum 7 lokus edilebildiği gösterilmiştir. Çalışma tecavüz sonrası cinayet ile deliller ortadan kaldırılmak istense bile iki haftalık çürüme süreci içerisinde özellikle ikinci haftada insana ait Y-STR lokusları elde edilebildiği olduğu gösterilmiştir (67).

2.6. Adli Genetik

2.6.1. Adli bilimlerde kullanılan genetik markırlar

Locard'ın “Her temas bir iz bırakır” prensibine göre iz olay yerinde elde edilecek delil olarak tanımlanabilir. Bir şahsın başka bir şahısla veya olay yerindeki herhangi bir materyalle temas halinde bulunmasıyla deliller oluşmaktadır. Bu delilleri biyolojik, kimyasal, fiziksel, görüntü delilleri ve dijital-bilişim delilleri olarak ayrılabilir. Biyolojik delillerden en sık gözlenen kan, tükürük ve semen lekeleridir. Bu biyolojik deliller tek başına veya olay yerindeki materyaller üzerinde (duvara sıçramış kan lekesi, bıçak üzerindeki ter ve kan izi gibi) bulunabilirler (68,69).

Adli bilimlerde biyolojik delillerin kimliklendirilmesinde kullanılan biyolojik ve genetik sistemler Şekil 15’de kronolojik olarak özetlenmiştir. Biyolojik örneklerin adli bilimlerde kullanılması 1900’lü yıllarda ABO kan grupları incelenmesiyle başlamıştır. Fakat bu sistemlerin ayırım güçleri çok düşüktür. Ayrıca bu sistemler çevresel etkilere ve bozulmalara karşı çok duyarlıdır. Genetik biliminin gelişmesiyle beraber DNA’da yer alan polimorfik bölgeler, kısıtlı bilgi veren bu sistemlerin yerini almıştır (69–71).



Şekil 15: Kronolojik olarak adli bilimlerde biyolojik materyalin tiplendirilmesi için kullanılan sistemler (70)

Kısa ardışık tekrar dizileri (STR) 1990'lı yıllarda olay yerinden elde edilen biyolojik materyallerde insanların kimliklendirilmesi amacı ile kullanılmaya başlanmıştır. Diğer genetik varyasyonlara kıyasla mutasyon oranları yüksektir ve yaklaşık olarak 400bç (baz çifti) den oluşmaktadır. DNA da kodlama yapmayan bölgelerde bulunmaktadır. Her lokusda çalışmak için fazla sayıda alel olması sebebiyle ayırım gücü yüksektir (4,72,73). STR'ler 2 ile 6 nükleotid tekrarı içeren birçok alele sahip polimorfik lokuslardır. PCR ürünlerinin boyutları 75 ile 400 bç arasında değişmektedir. Mutasyon oranları, kuşak geçişlerinde 1000 alel geçişinde 1 -3 şeklindedir. 20 marker ve üzeri multipleks çalışmaları için uygundur, kapiller elektroforez ve yeni nesil dizileme kullanılarak analiz edilebilirler. STR'ler popülasyon çalışmasından, genetik hastalık tanısına, antropolojik araştırmalardan biyocoğrafik soy tayinine kadar birçok alanda kullanılmaktadır fakat buna karşılık olarak fenotipik bilgi bakımından zayıf ya da hiç bilgi vermemektedir. Adli bilimlerde kullanışlılık bakımından en büyük avantajı ise karışık halde elde edilen delillerden birçok alelin tespiti ve saptanmasında yüksek başarıya sahip olmasıdır (72,74). STR markırları adli bilimler için tercih edilen sistemler olmasına karşı az miktardaki ve degrade DNA örneklerinde, her zaman istenilen sonuca ulaşamamaktadır. Bu problemin çözümü için alternatif markırlar araştırılmıştır (75,76). Bu alternatif markırlardan biride de SNP varyasyonlarıdır (68,69,76).

SNP genomda tek bir nükleotid değiştiğinde veya tek bir insersiyon ya da delesyon oluştuğunda ortaya çıkan yeni DNA dizi varyasyonlarıdır (Şekil 16). SNP'ler, insan genomundaki en yaygın doğal genetik varyasyonlardır (yaklaşık %90) ve fenotipik değişkenliğin temel genetik kaynağı olarak kabul edilir (77). DNA üzerinde kodlama yapan ve yapmayan bölgelerde bulunan SNP'ler protein dizileri üzerine yaptıkları değişim etkileri bakımından ikiye ayrılır. Kodlama yapan bölgede eş anlamlı olan SNP'ler protein üzerine etki etmezken, eş anlamlı olmayanlar protein zinciri üzerinde değişikliğe neden olur. Bu değişiklik yanlış ya da anlamsız ifadeler şeklinde olabilmektedir (76,78).

SNP'ler mutasyon oranları 100 milyonda 1 şeklinde olup bu oran STR'lerin mutasyon oranlarına göre çok düşüktür. Ancak markır çeşitliliği açısından altı olasılığa sahip çoğunlukla bi-alelik belirteçleri mevcuttur (A/G, C/T, A/T, C/G, T/G, A/C) ve bu ayrım bir SNP markırının bir STR markırına göre ayrım gücünün düşük olduğunu gösterir. Sekanslama, mikroçip hibridizasyonu, kapiller elektroforez yöntemi gibi birçok yöntemle analiz edebilirler. Amplikon boyutları çoğunlukla 100 bp'den daha küçüktür (70,72). Son araştırmalara göre SNP'ler biyocografik soydan fenotipik özelliklerin belirlenmesine kadar birçok alanda analiz yöntemleri geliştirilmiş ve çeşitli popülasyon çalışmalarında kullanılmıştır (10,79,80). SNP'lerin adli bilimler için önemli olmasının sebebi ise zamana ve ortam koşullarına bağlı olarak bozulan DNA örneklerinin analizinde yüksek başarı oranlarına sahip olmasıdır.

Bunun dışında düşük mutasyon oranları sebebiyle akrabalık analizlerinde ve adli bilimlerde yeni çalışmaların yürütüldüğü adli fenotipleme için önemlidir (72,79).



Şekil 16: SNP oluşum mekanizması
(Şematik gösterimi)

2.7. Adli Bilimlerde SNP Markırlarının Kullanımı

Olay yerinden insana ait birçok biyolojik deliller bulunabilir. Örneğin olay yerinde bulunan insan kalıntılarından (kemik, diş gibi) elde edilecek DNA verisi, kayıp kişilerin kimliklendirilmesinden babalık testlerine, miras konularından toplu felaketlere kadar birçok alanda kullanılabilir. Adli genetik rutin uygulamalarda kullanılan STR lokuslarının yanı sıra diğer genetik markırlar da (SNP, InDel, mtDNA gibi) kullanılır (74).

SNP'ler düşük mutasyon oranları sayesinde kimliklendirme çalışmaları için güvenilirlerdir. SNP'ler multipleks çalışmaları için daha uygundur ve stutter piklerin görülme şansı düşüktür (81). Ayrıca bi-alelik yapılarından dolayı, iskelet kalıntıları gibi degrede olma ihtimali yüksek olan DNA'larda genetik profil elde etmek için de kullanılabilir. İlk SNP çalışmaları, kimliklendirme amaçlı geliştirilmiştir. Sonrasında bu çalışmalara fenotip ve soy çalışmaları da eklenmiştir ve bu araştırmalar devam etmektedir (82).

Adli genetik analizler için kullanılan SNP markırları dört kategoride değerlendirilebilir;

1. *Kimliklendirme ile ilgili SNP markırları*
2. *Soy testi, aile rekonstrüksiyonu*
3. *Biyocoğrafik soy ile ilgili SNP markırları*
4. *Fenotipik SNP markırları*

2.7.1. Kimliklendirme ile ilgili SNP markırlarının kullanımı

Adli kimliklendirme araştırmaları ve akrabalık çalışmalarında yaygın olarak kullanılan, floresan boyalar ile etiketlenen ve kapiller elektroforez cihazında yürütülen yüksek ayırım güne sahip (STR) markırlardır (83). STR lokuslarının büyük (300-400 bp) PCR ürünlerine sahip olması sebebiyle olay yerinde toplanan degrede örneklerin (<150 bp) PCR de çoğaltılması zordur. Bu gibi durumlarda verimli bir genotiplleme yapılamayabilir (74,83).

SNP markırları STR'lere kıyasla daha kısa ürünlere sahip olduğu için (<150 bp), az miktarda veya degrede DNA örneklerinde tam profil elde edilebilmektedir (83,84). Borsting ve ark. biri göçmenlik olmak üzere beş babalık vakasında 15 otozomal STR ve 49 otozomal SNP lokusu ile karşılaştırmalı bir çalışma yapmıştır. Çalışmada STR'leri tiplendirmek için AmpFISTR Identifiler Amplification Kit, SNP'leri tiplendirmek için SNPforID multipleks kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre SNP'ler altı vakanın tamamında da STR'lara kıyasla daha fazla bilgilendirici olduğu gösterilmiştir (84).

2.7.2. Nesep ile ilgili SNP markırları

Y-SNP'ler soy, antropoloji ve evrimsel süreçle ilgili çalışmalarda tercih edilmektedir (85). Yakın aralıklı otozomal SNP'lerde sonraki nesile geçiş sırasında aktarılan genlerde rekombinasyonun meydana gelmediği ve birbirleri ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Bu bağlantılı SNP'lerin tüm nesil geçişleri boyunca haploit bloğu olarak hareket edebilmektedir. Haploit bloklar X kromozomu, Y kromozomu ve mtDNA'da da oluşmaktadır. Haploit bloklar, çok alelli oldukları için adli analizlerde çok avantajlı olmaktadır (72,86,87). Rekombinasyonun olmaması ve düşük mutasyon oranları nedeniyle SNP'ler akrabalık analizleri ve evrimsel çalışmaları için uygundur (87).

2.7.3. Adli DNA fenotipleme (Forensic DNA Phenotyping, FDP)

2.7.3.1. *Adli bilimlerde kullanılan fenotip ile ilgili SNP markırları ile ilgili çalışmalar*

DNA'dan kişinin dış görünüş özelliklerinin tahmin edilmesi üzerine çalışmalar 2000li yıllarda başlamıştır. Fenotipik özelliklerin DNA tabanlı tahminin yapılabilmesi adli genetik alanın genişlemesine olanak sağlamıştır (88). Suç mahallinden toplanabilecek insana ait DNA'dan bireylerin fenotiplerinin tahmin edilmesi "adli DNA fenotipleme" (Forensic DNA Phenotyping, FDP) olarak adlandırılmaktadır. Fenotipik özelliklerden göz ve saç rengi genellikle bir kişiyi tanımlamak için kullanılan belirgin gözle görünür özelliklerdendir. Bu özellikler kalıtsaldır ve nispeten az sayıda gen ile ilişkilidir. Bu da onları adli fenotip tahmini için uyguna hale getirir (89). Günümüzde fenotip çalışmaları arasında insan ten, göz ve saç rengi çalışmaları öne çıkmaktadır (90).

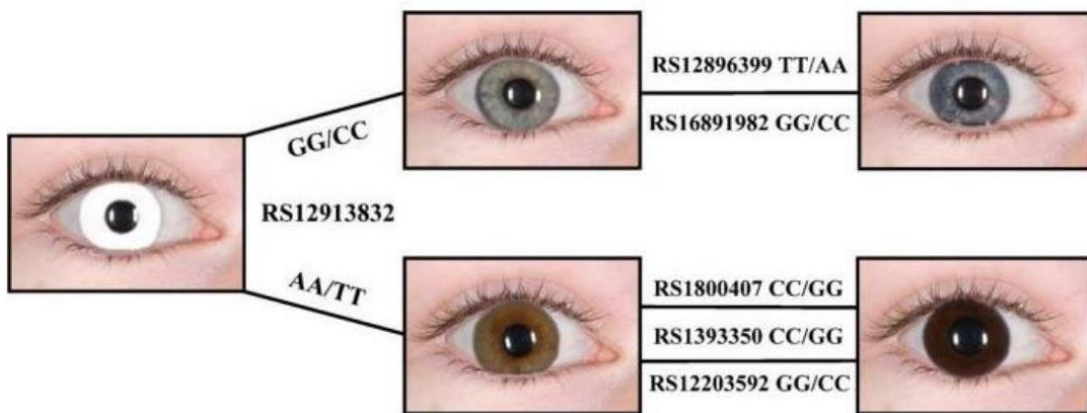
2.7.3.2. Göz rengi tahmini

İnsan pigmentasyonu melanin üretimi ile ilişkilidir. Melanin üretimi ise ömelanin ve feomelanin arasındaki orana bağlıdır. Ömelanin/ feomelanin oranı renklerin koyu ya da açık olması ile ilişkilendirilir. Göz rengi üzerinde etkili olan genlerin ise daha çok HERC2 ve OCA2 olduğu ifade edilmiştir (91). DNA tabanlı göz rengi çalışmalardan ilki olarak 2007 yılında Frudakis ve ark. tarafından yürütülen OCA2 geni üzerinden 33 SNP kullanılarak 1000 örnekte göz renklerinin %8'ini sınıflandırmayı başarmışlardır (92). Aynı yıl Sulem var ark. Avrupa popülasyonunun saç, göz ve ten rengini saptamak üzere 6 genomik bölgeden 9 SNP (SLC24A4, KITLG, 6p25.3, TYR, OCA2–HERC2 ve MC1R) kullanmışlardır (93).

Mengel-From ve ark. yaptıkları çalışmada ikili göz rengi kategorisi (açık/koyu) rs12913832 (HERC2) için yüksek bir tahmin değeri bildirmişlerdir. Buna ek olarak OCA2 ve SLC45A2'de göz rengiyle ilişkili ek varyantları da rapor etmişlerdir (94,95). Göz rengi üzerine yapılan çalışmalar içinde ilk ve en kapsamlı olanı Liu ve ark. (96) tarafından yapılan çalışmadır. Bu çalışmada pigmentasyon ile ilgili 8 gen üzerinden 37 SNP seçilmiş ve 6000'den fazla Hollanda asıllı bireyle göz rengi tahmin modelleri oluşturulmuştur. Ayrıca 8 gen bölgesinde bulunan 24 SNP'ye dayalı göz rengi tahmin modeli olarak IrisPlex sistemi oluşturulmuş ve bu modeli 2300'den fazla örnek ile doğrulaması yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda 6 pigmentasyon geninde yer alan 6 SNP'den (HERC2 geninde rs12913832, OCA2 geninde rs1800407, SLC24A4 geninde rs12896399, SLC45A2 geninde rs16891982, TYR geninde rs1393350 ve IRF4 geninde rs12203592) oluşan göz rengi tahmini için minimal bir set olarak önerilmiştir (96) (Şekil 17) . Bu 6 SNP seti ile Hollandalı bireylerin göz renklerinin tahminleri için multinominal lojistik regresyona dayalı bir istatistiksel modelleme yapılmıştır. Model, göz rengini mavi, yeşil el gibi ara renkler (intermediate) ve kahverengi göz rengi olarak üç farklı

kategoride tahmin eder. Elde edilen verilere göre kahverengi için 0,93 mavi için 0,91 ve ara göz renkleri için 0,72 AUC (ROC eğrisinin altında kalan alan) değerlerine ulaşılmıştır (90,96).

2014 yılında, göz rengi için geliştirilmiş IrisPlex tahmin modeli, Avrupa'nın sekiz bölgesinden 9000'in üzerinde kişi ile çalışılmasının ardından, kahverengi için 0,95, mavi için 0,94 ve ara göz rengi için 0,74 AUC değerleri elde edilmiştir. Model oluşturma ve doğrulamaya dâhil olmayan yaklaşık 120 Polonyalıdan oluşan bireylere uygulandığında, IrisPlex model ortalamasının %84'ün üzerinde göz rengi tahmini doğruluğunda ulaştığı belirlenmiştir. Ara göz renkleri dâhil edilmediği durumda ise kahverengi ve mavi göz renklerinde doğruluk oranının %93'e ulaştığı bildirilmiştir. IrisPlex'in mavi ve kahverengi göz renkleri için doğruluk oranlarının iyi olmasına karşılık ara renkler için doğruluk oranının oldukça düşük olduğu diğer çalışmalarda da tespit edilmiştir (89,97,98). Bunun nedeni, modelin temel olarak mavi ve kahverengi renkli gözlerin tahmini için en önemli SNP olarak bilinen HERC2'deki SNP rs12913832'ye bağımlı olmasıdır. Bu duruma ek olarak modelin eşik değerinin 0,7 olması gerektiği ve altındaki değerlerin ise belirsiz olarak kabul edilmesi gerekliliği ifade edilmiştir (89,90).



Şekil 17: Walsh ve ark. göre kahverengi ve mavi göz renginin 6 SNP markırı ile belirlenmesi (98).

Ruiz ve ark. tarafından yapılan 37 SNP'ye dayalı insan göz, ten ve saç rengi çalışmalarında HERC2 de bulunan rs1129038 ve rs7183877 lokuslarının yeşil göz rengi ile ilişkilendirilmesi ile yeşil göz rengi tahmin oranını arttırdığı bildirilmiştir (99).

Bülbül ve ark. adli fenotiplemede göz rengi analizi için geliştirilen iki farklı yöntem üzerine araştırma yürütmüşlerdir. Çalışma 100 birey ile gerçekleştirilmiş olup multinominal lojistik regresyon analizi yöntemlerine dayalı IrisPlex ve Snipper7 (rs12913832, rs1129038, rs12203592, rs12896399, rs1393350, rs16891982, rs1800407) sistemlerinin kıyaslaması yapılmıştır. IrisPlex sistemi, 6 SNP den oluşan göz rengi araştırmaları için kullanılan minimal bir settir (96). Snipper7 sistemi ise, 7, 13 ve 23 SNP den oluşan ve göz rengi araştırmaları için kullanılmaktadır (100). Çalışma sonuçlarına göre kahverengi göz rengi tespitinde iki model yüksek doğruluk oranında doğru tahminde bulunmuştur. 0,7'lik eşik değeri ile IrisPlex sisteminde göre mavi göz rengi için doğruluk oranı % 100 iken kahverengi için bu oran %95.77 oranında kalmıştır. IrisPlex sisteminde 8 bireyin yeşil-ela göz rengi yanlış olarak tespit edilmiştir. Tahmini fenotip oranları ise %61,11 kahverengi, %11.11 mavi ve %27,78 belirsiz olarak bulunmuştur. Koyu fenotipli ara göz renkleri ise %71,43 oranında kahverengi olarak bulunduğu görülmüştür.

Snipper5+1 sistemi sonuçlarına göre, mavi göz rengi için %60, kahverengi için %64,29 ve yeşil-ela renk için ise %5,56 doğruluk oranında kalmıştır. Koyu fenotipli ara göz renkleri ise %42,86 oranında kahverengi olarak görülmüştür. Snipper7 sonuçlarına göre ise 33 doğru 10 yanlış ve 51 belirsiz olarak tespit edilmiştir. Mavi/ kahvenregi göz rengi doğruluk tahmin oranları kıyaslandığında IrisPlex sonuçları Snipper sistemine kıyasla daha yüksek doğrulukta olduğu fakat Snipper sistemi ile daha spesifik sonuçlar alındığı görülmüştür (10).

2.7.3.3. *Saç rengi tahmini*

Adli amaçlı saç rengi üzerine yapılan çalışmalar kızıl saçlı bireylerin gen diziliminin araştırılmasıyla başlamıştır. Grimes ve ark. MC1R gen bölgesinde bulunan SNP markırları çalışmışlardır. Örneklem grubundan kızıl saçlı bireylerin % 85'inin ya iki farklı kızıl saça neden olan varyant için heterozigot olduğunu ya da kızıl saça neden olan bir varyant için homozigot olduğu gösterilmiştir (101). Saç renginin genetik temeli, göz renginden daha karmaşıktır. rs12913832 saç rengiyle ilişkilendirilmesine rağmen bu ilişkinin göz renginden çok daha zayıf olduğu gösterilmiştir (55,89,99).

2007'de Branicki ve ark. 5 MC1R DNA varyantları ile ilgili kızıl saç tahmini yapmak için bir model geliştirmiştir. 36 sarışın-kızıl da dahil olmak üzere 40 kızıl saça sahip ve toplamda 108 bireyde gerçekleştirilen çalışmada MC1R geninin tamamı dizilenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MC1R geni üzerinde R151C ve R160W varyantları popülasyonda sıklıkla görülmesi kızıl saç rengi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca MC1R geni üzerinde bulunan D84E, R143H ve D295H varyantları, çalışılan popülasyonda az görülmesine rağmen saç rengi üzerine etkileri sebebiyle önemlidir (102).

İlk olarak tüm saç kategorileri için yapılan DNA tahmin çalışması 2007 yılından Sulem ve ark. tarafından yayınlanmıştır (90,93,102). Kızıl saç tahmini için MC1R SNP üzerinde bulunan rs1805008 ve rs1805007 lokusları kullanılmıştır. Saç rengi $x > 0,5$ kızıl olarak tahmin edilen bireylerin yaklaşık %70'inin gerçekten kızıl saçlı olduğu tespit edilmiştir. Kızıl saçlı bireyler hariç olarak yapılan sonraki yaklaşımlarda, 6 gen den SNPler ile ilişkili diğer saç rengi tahmini yapılmış fakat saç rengi kızıl olmayan kategoride yapılan tahminler beklenildiği gibi çıkmamış, doğruluk oranı düşük olarak saptanmıştır (90,93).

Valenzuela ve ark. çeşitli etnik gruptan 789 birey ve 24 gen üzerinden 75 SNP noktası ile yürüttükleri çalışmada, beş gen bölgesinden elde edilen SNP'lerin (rs1800401, rs1800402

(OCA2), rs1800407 (OCA2) , rs1426654 (SLC24A5), rs6058017 (ASIP)) çoklu doğrusal regresyon modellemesi ile pigmentasyon çeşitlerinin saç, göz ve ten rengi üzerine etki oranlarını araştırmışlardır. Elde ettikleri verilere göre saç rengi üzerine bu üç önemli SNP noktasının, SLC45A2 geninde rs16891982, SLC24A5 geninde rs1426654 ve HERC2 geninde rs12913832, oluşturdukları modele göre toplam saç melanin miktarının %76,3 lük bir oranda elde edildiğini gösteren bir grafik elde edilmiştir (103).

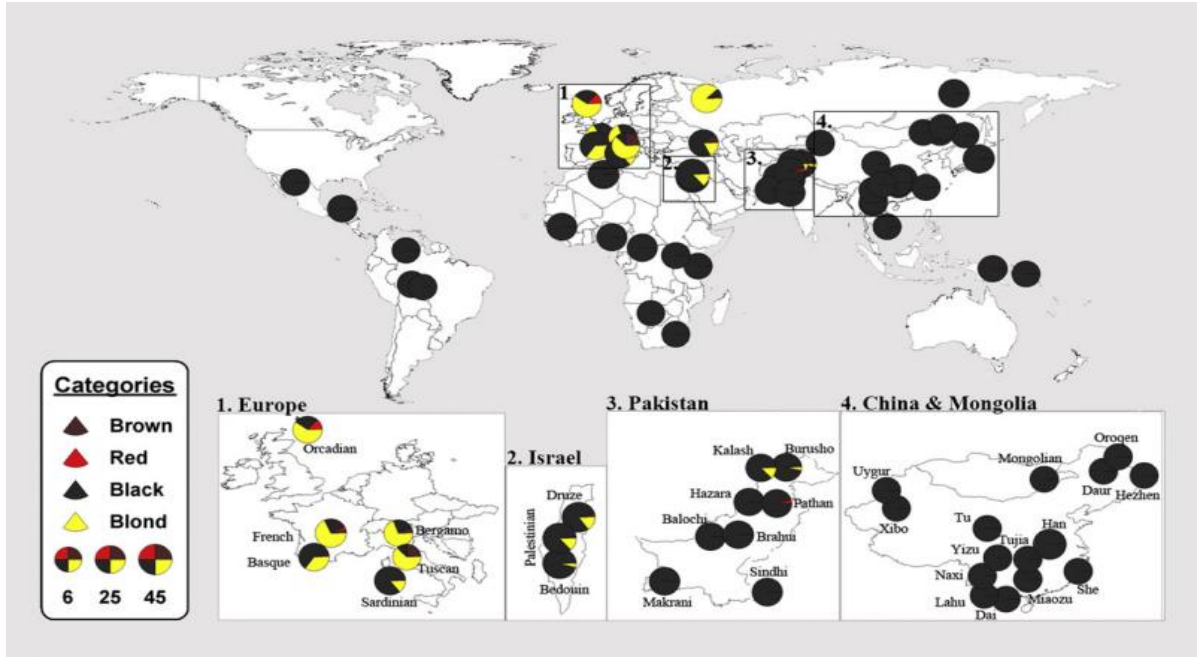
2011’de Branicki ve ark. saç rengi tahmin çalışmalarında, önceki yıllarda saç rengi ile ilişkilendirilen 13 gen bölgesinden 46 SNP ile Polonya’dan 385 Avrupalı üzerinde bu tahmin değerleri üzerine çalışmalar yürütmüştür. Çalışmaya göre saç renkleri 7 kategoride (Sarı, koyu sarı, kahverengi, kumral, sarı-kızıl, kızıl, siyah) toplanmıştır. Ayrıca araştırmacılar MC1R geni üzerindeki varyantları baskın ve çekinik olarak sınıflandırmışlardır. Bu duruma göre baskın olanları “R” olarak (Y152OCH, N29insA, D84E (rs1805006), R142H (rs11547464), R151C (rs1805007), R160W (rs1805008), D294H (rs1805009)), çekinik olanları ise “r” olarak (V60L (rs1805005), V92M (rs2228479), I155T (rs1110400), R163Q (rs885479) ifade etmişlerdir. MC1R ve HERC2 genleri üzerindeki SNP’lerin kızıl, sarı ve kahverengi saç renkleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunmuştur (104).

Adli bilimlerde saç rengi tahmini için geliştirilen ve göz ve saç rengini aynı anda tahmin edebilen HirisPlex sistemi, 23 SNP ve 1 insertion/deletion (INDEL) içerir (Tablo II). Bunlardan altısı (IrisPlex SNP’ler olarak adlandırılır) göz rengi tahmini için ve 22 SNP ise saç rengi tahmini için kullanılmaktadır. HirisPlex panelinde 24 SNP lokusu tek bir multipleks ile çalışmaktadır. Elde edilen genotiplerden göz ve saç renginin tahmini için araştırmacıların geliştirdikleri genotip ve fenotip veri tabanına (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) sahip istatistiksel tahmin modelleri kullanılır (9). Bu tahmin modelinde, göz ve saç rengi kategoriler halinde tahmin edilir. Göz rengi; mavi, yeşil ela gibi ara renkler (intermediate) ve kahverengi,

saç rengi ise sarı, kahverengi, siyah ve kırmızı olarak sınırlandırılır. Ayrıca saç rengi için açıklık ve koyuluk dereceleri de verilir. HirisPlex sisteminde elde edilen sonuçlara göre göz rengi için doğruluğu %84 (mavi ve kahverengi için %93) ve saç rengi için ortalama %73 olarak bulunmuştur (9).

Tablo II: HirisPlex sistemi 24 SNP bilgilendirme tablosu

SAYI	GEN	SNP	MAJOR ALEL	MİNOR ALEL	GÖZ	SAÇ
1	MC1R	N29insA	C	insA		*
2	MC1R	rs11547464	G	A		*
3	MC1R	rs885479	C	T		*
4	MC1R	rs1805008	C	T		*
5	MC1R	rs1805005	G	T		*
6	MC1R	rs1805006	C	A		*
7	MC1R	rs1805007	C	T		*
8	MC1R	rs1805009	G	C		*
9	MC1R	Y152OCH	C	A		*
10	MC1R	rs2228479	G	A		*
11	MC1R	rs1110400	T	C		*
12	SLC45A2	rs28777	A	C		*
13	SLC45A2	rs16891982	G	C	*	*
14	KITLG	rs12821256	A	G		*
15	EXOC2	rs4959270	C	A		*
16	IRF4	rs12203592	C	T	*	*
17	TYR	rs1042602	G	T		*
18	OCA2	rs1800407	G	A	*	*
19	SLC24A4	rs2402130	A	G		*
20	HERC2	rs12913832	C	T	*	*
21	ASIP/PIGU	rs2378249	T	C		*
22	SLC24A4	rs12896399	T	G	*	
23	TYR	rs1393350	C	T	*	
24	TYRP1	rs683	T	G		*



Şekil 18: Walsh ve ark. İnsan genom çeşitliliği hücre hattı paneli (HGDP-CEPH) ile 51 popülasyondan 945 kişi ile yaptıkları çalışmada oluşturulan HirisPlex sistemi küresel saç rengi tahmin grafiği (8).

Ülkemizde yapılan çalışmada, Tavacı ve ark. 6 gönüllü bireyden aldıkları ağız içi sürüntü örnekleri ve pozitif kontrol örnekleri ile toplamda 10 örnek için 24 SNP içeren HirisPlex panelinin optimizasyon ve validasyon çalışmalarını yürütmüşlerdir. SNP tespitinde minisekanslama yöntemi olarak SNaPshot kiti kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre göz rengi alt sınır değerleri için 1 örnek hariç diğer bütün örneklerde 0,9 ve üzeri görülmüştür. Saç rengi için bütün değerler 0,5 eşik değeri üzerinde görülmüştür. Hassasiyet çalışmasında veri elde edilebilecek minimum miktar 0,25-1,5 ng arası olarak belirlenmiştir. 0,125 ng ve altında kalan değerlerde ise yürütmeler sırasında alel kayıpları meydana geldiği tespit edilmiştir. Çalışmada verim alınabilecek minimum DNA miktarı 0,25ng olarak belirtilmiştir (105).

2.7.3.4. *Diğer fenotip markırları*

Son yıllarda FDP çalışmaları kapsamlı şekilde yürütülmektedir. Göz ve saç rengi çalışmaları yanında ten rengi, kellik ve yüz şekli gibi diğer gözle görülebilir fiziksel özelliklerin güvenilir tahmini için birçok araştırma yapılmaktadır (79,99).

Ten rengi: Ten rengi çeşitliliği insanın fenotipik çeşitliliğinin en iyi örneklerinden biridir. Ten rengi epidermis de bulunan ve melanositler tarafından üretilen melanin pigmenti tarafından belirlenir. Melanin, feomelanin (sarı-kızılımsı) ve ömelanin (kahverengi-siyah) olmak üzere iki formdan oluşur. Ten rengine etki eden diğer bir faktör de keratin miktarıdır. Dünya üzerinde açık ten renginden koyu ten rengine kadar çok çeşitlilik bulunmaktadır. Ten rengini etkileyen, genetik çeşitlilikten daha çok insanların yaşadıkları yer ve güneş ışını maruziyetidir (106,107).

Ten renginin genetik yapısı göz ve saç fenotiplerine göre daha karmaşıktır. Ten rengi oluşmasında genetik katılımın yanı sıra göçler ve evrim sırasında çevresel adaptasyonun da etkisi vardır.

Belirli bir bölgede yaşayan insanların gen havuzunda yaşanan coğrafyanın etkileri görülmektedir. Bu duruma örnek olarak Güney Asya popülasyonu ten rengi değişimi SLC24A5 genindeki SNP rs1426654 lokusu ve bu coğrafyadaki insanların gen havuzundaki dağılım durumu ve görülme sıklığı ile kısmen açıklanabilmektedir (91).

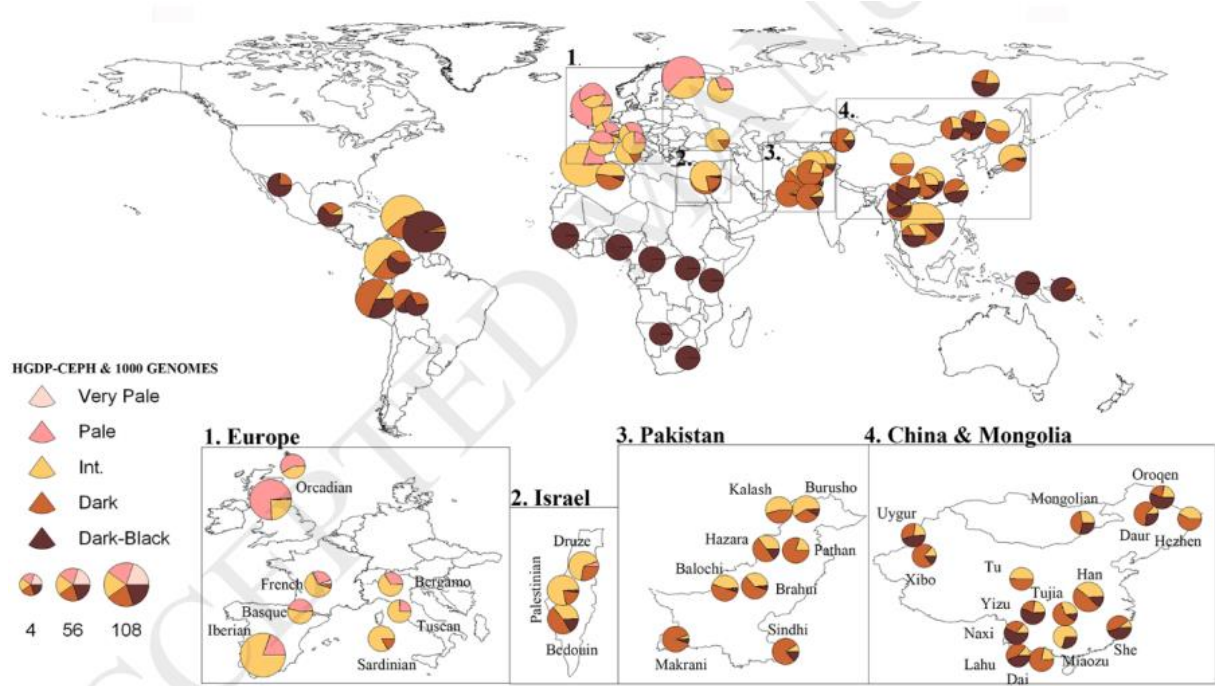
Stokowski ve ark. yaptıkları çalışmada SLC24A5, TYR ve SLC45A2 gen bölgeleri üzerindeki polimorfizmlerin, ten rengi üzerinde etkili olduğunu ve bu durumun Güney Asya popülasyonunda ten renginin doğal varyasyona sahip olduğunu göstermiştir (70,108).

Zaorska ve ark. Polonyalı bireyler üzerinde yaptıkları çalışmada rs12913832'nin (HERC2) ten rengi, bronzlaşma ve çillenme gibi ten pigmentasyon özelliğinin tümü ile ilişkisini doğrulamıştır. Bu duruma ek olarak ASIP üzerindeki iki varyantın, rs6058017 ve rs491141

güneşe maruz kalma durumuna bağlı ten hassasiyeti üzerine etkili olduğu görülmüştür. IRF4 de bulunan rs12203592 lokusunda ise ten de meydana gelen çillenme üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca rs4778241 ve rs4778138 OCA2 haplotip ve SLC45A2 de bulunan rs16891982 lokusunda ten rengi ve bronzlaşma yetenekleri üzerine etkili olduğu görülmüştür (79).

HIrisPlex sistemine ek olarak geliştirilen HIrisPlex-S panelinde ten rengi tahmini için 7 gen üzerindeki 17 SNP kullanılmaktadır (ANKRD11 rs3114908, OCA2 rs1800414, BNC2 rs10756819, HERC2 rs2238289, SLC24A4 rs17128291, HERC2 rs6497292, HERC2 rs1129038, HERC2 rs1667394, TYR rs1126809, OCA2 rs1470608, SLC24A5 rs1426654, ASIP rs6119471, OCA2 rs1545397, RALY rs6059655, OCA2 rs12441727, MC1R rs3212355, ve DEF8 rs8051733.). HIrisPlex-S sistemi 41 SNP, 2 multipleks genotipleme paneli ve 3 istatistiksel modelden oluşmaktadır. Bu sistemler olay yerinden sıklıkla degrade DNA ile çalışmak üzere tasarlanmıştır.

HIrisPlex ve HIrisPlex-S 63pg ve IrisPlex 31pg DNA miktarı ile tam genetik profil verebilmektedir. Ten rengi 5 kategoride sınıflandırılmıştır (Şekil 19). Ayrıca AUC performans değerleri de belirlenmiştir bunlar; çok açık (0,83), açık (0,76) , ara renk (0,78), koyu (0,98) ve koyudan siyaha (0,99) doğru olacak şekildedir (80,89,91,107). Göz, saç ve ten rengi için HIrisPlex-S sistemi kullanıldığında tahminlerin %19,16'sının tam doğru sonuçlar verildiği görülmüştür (109).



Şekil 19 : Chaitanya ve ark. HGDP-CEPH paneli ile 59 küresel popülasyondan 1539 birey ile oluşturulan HirisPlex-S DNA test sistemi, küresel ten rengi tahmini tablosu (107).

Yüz tahmini: Olay yerinden elde edilecek DNA kalıntısı ile fail ya da faillere ait yüz tahmini yapmak için çeşitli çalışmalar yürütülmektedir (110). Yapılan çalışmaların bazılarında belirli derecede güvenilirliğe sahip, kaşların genişliği, gözlerin birbirleri arasındaki mesafe ve yüz üzerindeki derinliği gibi temel yüz tahmin modelleri geliştirmiştir (91).

Yüz şekli üzerine yürütülen tüm modelleme çalışmaları basite indirgenmiş ve sadece keşif amaçlıdır, pratikte uygulamak için konu üzerine çok daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir. Parabon Nanolabs şirketi (<https://snapshot.parabon-nanolabs.com/>) yüz şekli biyocoğrafik soy, saç, göz ve ten rengini tahmininde kullanılmak üzere bir sistem geliştirmiştir fakat yapılan tahminleme ile ilgili bir algoritma veya bu konu üzerine bir doğrulama çalışması yayınlamamıştır (91).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında aydınlatılmış onam formunu dolduran ve DNA örneklerinin bilimsel çalışmalarda kullanılmasına rıza gösteren, aralarında kan bağı olmayan, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezine (GETAT) kronik diyabet yaralarının tedavisi için başvuran diyabet hastası 11'i kadın 19'u erkek olmak üzere toplamda 30 kişiden kan ve *L.sericata* larva örnekleri alındı (Ek 1). Ek olarak gönüllülerin saç ve göz renkleri hem kişi beyanlarında hem de Walsh ve ark. çalışmalarındaki tablolardan referans alınarak kaydedildi (89). Gönüllülerden toplanan kan numuneleri ve *L.sericata* larvaları laboratuvar çalışma aşamasına kadar -20°C de saklandı. Çalışmanın laboratuvar aşaması İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Genetik AR&GE Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmanın laboratuvar aşamaları tamamlandıktan sonra saç ve göz rengi ile ilgili istatistiksel değerlendirmeler multinominal regresyon analizi, (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) online Hirisplex yazılım programı ile yapıldı (Erişim Tarihi: 24.02.2022).

Çalışma, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik kurulunun 24.05.2021 tarihli E-59491012-604.01.02-96774 sayılı kararı ile uygun görüldü (Ek 2).

Araştırma 11 aşamadan oluşmaktadır.

1. Kan ve larvarların toplanması
2. Larvaların diseksiyonu
3. DNA izolasyonu
4. DNA miktarının belirlenmesi
5. PCR
6. PCR ürünlerinin saflaştırılması
7. SNaPshot Reaksiyonu

8. SNaPshot Reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması
9. SNaPshot Reaksiyon ürünlerinin elektroforeze hazırlanması
10. SNaPshot Reaksiyon ürünlerinin ABI 310 ile elektroforezi ve sonuçların değerlendirilmesi.
11. Elde edilen verilerde istatistiksel analizler

3.1. Çalışmada Kullanılacak Numunelerin Toplanması

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne kronik diyabet yaralarının tedavisi için başvuran 11'i kadın 19'u erkek olmak üzere toplamda 30 kişiden örnekler toplandı. Gönüllülerin 25'inden hem larva hem de kan numuneleri alındı. 5 kişiden ise sadece larva örneği alındı. Fenotip doğrulaması için gönüllülerin saç ve göz rengi Walsh ve ark. çalışmalarındaki tablolara göre kaydedildi (89).

L.sericata larvalar bu merkezde üretilmekte olup, steril hale getirilmiş 1. ve 2. evrede canlı olarak hastaların diyabete bağlı kronikleşmiş ve iyileşme güçlüğü gösteren açık yaraları üzerine tedavi amaçlı bırakılmaktadır. Uygulama sonrası *L.sericata* larvalarının yara üzerine yaklaşık 72. saatin içinde üçüncü evre ve kursak içerikleri dolu olanları, 1,5 ml hacim'e sahip eppendorf tüpler içerisine en az 8'er adet olacak şekilde, steril dişli pensetler yardımı ile toplanmıştır. Toplanan numuneler akabinde -20°C de dondurularak uygun numune sayısına ulaşan kadar saklandı. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, ARGE Laboratuvarına soğuk zincir yolu ile numune saklama kutularında transfer edildi. Bu çalışmada yer alan gönüllülerin, toplanan larva sayısı, fenotip gibi bilgiler Tablo III'de verilmiştir.

Tablo III: Gönüllülerden toplanan larva miktarı ve fenotip bilgileri

NO	Referans numarası	Larva-adet	Saç rengi	Göz rengi
1	T21-XX-99	20	Siyah	Kahverengi
2	T21-XY-100	20	Kahverengi	Kahverengi
3	T21-XY-104	15	Siyah	Kahverengi
4	T21-XY-105	25	Siyah	Kahverengi
5	T21-XY-106	15	Sarı	Mavi
6	T21-XY-107	45	Kahverengi	Kahverengi
7	T21-XY-108	15	Kahverengi	Kahverengi
8	T21-XY-109	10	Siyah	Kahverengi
9	T21-XY-110	15	Kahverengi	Kahverengi
10	T21-XY-111	26	Siyah	Yeşil (ara renk)
11	T21-XY-112	20	Sarı	Mavi
12	T21-XX-113	11	Sarı	Yeşil (ara renk)
13	T21-XY-114	26	Kahverengi	Kahverengi
14	T21-XY-115	20	Kahverengi	Kahverengi
15	T21-XX-116	70	Siyah	Kahverengi
16	T21-XY-117	14	Kahverengi	Kahverengi
17	T21-XX-118	12	Kahverengi	Kahverengi
18	T21-XX-119	41	Siyah	Kahverengi
19	T21-XX-120	17	Kahverengi	Kahverengi
20	T21-XY-121	35	Siyah	Kahverengi
21	T21-XY-122	10	Kahverengi	Kahverengi
22	T21-XY-123	14	Kahverengi	Yeşil (ara renk)
23	T21-XX-124	20	Kahverengi	Kahverengi
24	T21-XY-125	16	Kahverengi	Kahverengi
25	T21-XX-132	15	Kahverengi	Kahverengi
26	T21-XX-137	13	Sarı	Mavi
27	T21-XY-138	15	Kahverengi	Kahverengi
28	T21-XY-139	8	Siyah	Kahverengi
29	T21-XX-186	16	Sarı	Mavi
30	T21-XX-187	11	Kahverengi	Kahverengi

3.2. Laboratuvar Aşaması

3.2.1. Larva diseksiyonu

1,5ml lik eppendorf tüp içinde -20°C dondurulmuş halde olan üçünü evre *L.sericata* larvaları (Şekil 21) oda sıcaklığında çözündükten sonra % 20lik hazırlanan çamaşır suyu çözeltisi içerisinde 2 saat çevresel kontaminasyonu engellemek amacıyla dezenfekte edildi. Dezenfeksiyon işlemi sonrası steril distile su ile yıkanarak, ortamdan çamaşır suyunun uzaklaştırılması sağlandı. Numuneler havlu peçete ile kurulandı. Steril edilen larvalar Olympus SZX10 Stereo mikroskop altında, steril penset kullanılarak steril petri kabı içinde ve tek kullanımlık neşter yardımı ile larvalar kursak ve bağırsak içerikleri alınmak üzere teker teker kesilerek, kursak ve bağırsak içerikleri ayrıldı. Mikro pipet yardımı ile larvalardan kursak ve bağırsak içeriği 1,5 ml’lik eppendorf tüpler içerisinde toplandı (Şekil 22-27).



Şekil 20: Gönüllülerden canlı olarak alınan larvalar, -20C saklama öncesi.



Şekil 21: %20’lik çamaşır suyu çözeltisi 2 saat bekletildikten sonra



Şekil 22: Distile su ile durulandıktan sonra larvaların havlu peçete ile kurulanması



Şekil 23: Larva kursak ve bağırsak içeriklerini ayırmak için kesilmesi gereken bölgeler.



Şekil 24: Tek kullanımlık steril neşter ve penset



Şekil 25: *L. sericata* larvaları (13mm) üçünü evre, boy ölçümü



Şekil 26: Larva kursak içeriği diseksiyonu



Şekil 27: Larva bağırsak içeriği diseksiyonu

3.2.2. DNA izolasyonu

Gönüllülerden alınan larva örneklerinin diseksiyon sonrası DNA izolasyon protokolü:

Larva örneklerinin mide ve bağırsak içreklerinin izolasyonu için **QIAamp® DNA Investigator Kit** (Qiagen) üreticisinin *yumuşak dokudan DNA izolasyonu* protokolü kullanılmıştır (111).

Kan örneklerinden DNA izolasyon protokolü:

Gönüllülerden alınan kan örnekleri için **QIAamp® Mini Kit** (Qiagen) üreticisinin *kan örneklerinden DNA izolasyonu* protokolü uygulanmıştır (112) .

3.2.3. DNA miktarının belirlenmesi

DNA miktarları florometrik yöntem ile Qubit® Florometre (Invitrogen) cihazında Quant-iT™ dsDNA HS (High Sensitive) kit kullanılarak belirlendi. Kan örneklerinden elde edilen izolatlar, PCR reaksiyonları için 0,1-10 ng DNA miktar aralığı olacak şekilde seyreltilerek kullanıldı. Larva örneklerinden elde edilen izolatları doğrudan PCR reaksiyonları için kullanıldı.

DNA miktarı çok olup genotipi elde edilemeyen örnekler ayrıca DNA'daki degradasyonun izlenmesi için örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 46).

3.2.4. PCR

Bu çalışma için kullanılan Hirisplex SNP markırları (24pleks) multipleks PCR yapılarak çoğaltıldı. İlk PCR'de, hedef DNA bölgesinin çoğaltılması sağlandı. PCR karışımı Multipleks PCR karışım PCR tamponu (Qiagen, Master Mix) primer karışımı ve 0,5-1 ng/μl aralığında olan DNA örnekleri ile (Tablo IV) hazırlandı.

Tablo IV: Multipleks PCR reaksiyon karışımının hazırlanması

Bileşenler	X 1 (μl)
PCR tamponu	4 μl
Primer karışımı	3 μl
Su	1 μl
DNA	2 μl
Toplam PCR Hacmi	10 μl

PCR döngü sayısı ve süresi, 95°C'de 10 dakika denatürasyon, ardından 35 döngü 95°C 30 saniye, 60°C 50 saniye, 65°C 40 saniye ve son uzatma işlemi için 65C de 6 dakika, olacak şekilde programlanarak Veriti® Thermal Cyclers (Thermo Fischer Scientific) cihazında yapıldı. PCR sonrası elde edilen ürünler -20 °C'de saklandı.

3.2.5. PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR sonrası artık primer ve dNTP'lerin ortamdan temizlenmesi gerekir. Bunun için kimyasal saflaştırma yöntemi kullanılabilir. Bu yöntemde Ekzonükleaz I (Ekzo I) enzimi tek zincirli primeri 5 fosfat ucundan başlayarak sindirim işlemi yapar. Karides Alkalın Fosfataz (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) enzimi ise nükleotidleri defosforilize ederek bağlanmayan dNTP'leri uzaklaştırır. Bu iki enzim ticari ExoSAP-IT (Ekzonükleaz I ve SAP, Invitrogen, 5U/μl) kitte birleştirilmiştir.

Saflaştırma için; her 2,5 µl'lik PCR ürünü üzerine 1 µl ExoSAP-IT eklendi. Karışım hızlıca santrifüj edildikten sonra 37°C'de 45 dakikada enzim aktivasyonu için inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 85°C'de 15 dakika bekletilerek enzim inaktivasyonu sağlandı. Saflaştırılmış PCR ürünleri SNaPshot reaksiyonu öncesi buzdolabında -20°C'ye kaldırıldı.

3.2.6. SNaPshot reaksiyonu

SNaPshot™ Multipleks Kit'inin (Applied Biosystems) temel prensibi, minisekanslama olarak da bilinen tek baz uzaması reaksiyonuna (Single Base Extension-SBE) dayanır. Bu reaksiyonda; hedef DNA'ya komplementer (eş) ve SNP markırının komşu nükleotide bağlanan bir primer, DNA polimeraz ve floresans işaretli ddNTP'ler kullanılır. İşaretlenmemiş primer, DNA'nın 3' ucu ile SNP bölgesinin üst bölgesinde yer alır ve floresans işaretli tek ddNTP ile uzama sağlanır. Her bir ddNTP farklı bir floresans boya ile işaretlenmiştir. Floresans işaretli uzama ürünleri kapiler elektroforez ile görüntülenir. Böylece farklı SNP markırları renklerine ve boyutlarına göre ayrılır.

SNaPshot reaksiyonu için; kit (+4°C), primerler (-20°C) ve saflaştırılmış PCR ürünleri (-20°C) buzdolabından önceden çıkartılarak PCR ürünlerinin ve primerlerin çözülmesi sağlandı.

Çalışılacak örnek sayısına göre reaksiyon karışımı hazırlandı ve 0,2 ml'lik PCR tüplerine dağıtıldı (Tablo V). Üzerlerine saflaştırılmış PCR ürünü eklendi. Yapılan çalışmalarda herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığını ve kitin doğru bir şekilde çalıştığını kontrol etmek amacıyla çalışma boyunca negatif ve pozitif kontroller kullanıldı.

Tablo V: SNaPshot reaksiyon karışımı

SNaPshot Reaksiyon Bileşenleri	Örnek	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
	Hacim/Reaksiyon (µl)	Hacim/Reaksiyon (µl)	Hacim/Reaksiyon (µl)
SNaPshot Reaksiyon karışımı	2,5	2,5	2,5
SNaPshot Primer karışımı	1,5	0,5	0,5
Saflaştırılmış PCR ürünü /Kontrol DNA	1	1	-
H ₂ O	-	1	2
Toplam	5 µl	5 µl	5 µl

Hazırlanan SNaPshot PCR karışımı kısa süre santrifüj edildi ve önceden 25°C'ye getirilmiş olan Veriti® Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific) PCR cihazına yerleştirildi. 30 döngü, 96°C de 10 saniye, 55°C de 5 saniye 60°C de 30 saniye olacak şekilde minisekanslama reaksiyonu gerçekleştirildi. SNaPshot sonrası elde edilen ürünleri -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.7. SNaPshot reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması

SNaPshot reaksiyon sonrasında bağlanmayan floresan işaretli ddNTP'ler elektroforez sırasında ışıma yaparak örneklerin analizini zorlaştırır. Bu nedenle bu ddNTP'lerin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bunun için SAP enzimi ile ddNTP'lerin defosforilasyonu yapılır. Uygulamada; 2,5 µl SNaPshot ürünü üzerine 1µl SAP (1U/µl) eklendi. Örnekler kısa süre karıştırılarak santrifüj edildi. Karışım 37°C' de 80 dakika enzim aktivasyonu için inkübe edildi ve 85°C' de 15 dakika enzim inaktivasyonu yapıldı. Örnekler -20°C' ye kaldırıldı.

3.2.8. SNaPshot reaksiyon ürünlerinin elektroforeze hazırlanması

Yürütmeler ABI 310 cihazında yapıldı. Her reaksiyon için 9,5 µl HiDi Formamid (Thermo Fischer Scientific) ve 0,3 µl GeneScan™-120LIZ™ (internal size standart) (Thermo Fischer Scientific) karıştırılarak üzerine 1 µl saflaştırılmış SNaPshot ürünü eklendi. Karışım Genetik Analizör cihazına yüklendi. Her yürütme öncesinde Data Collection Software (Applied

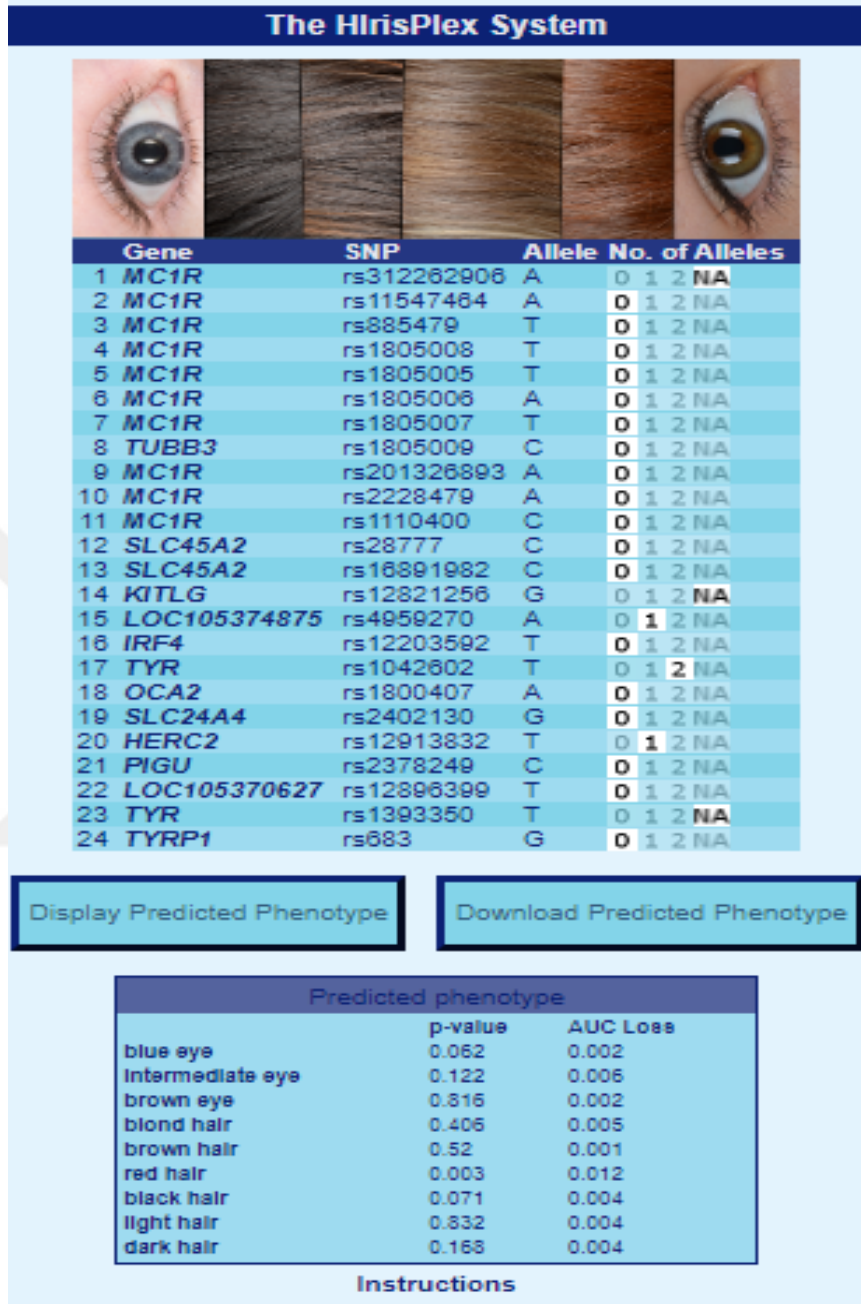
Biosystem) kullanılarak örnek listeleri hazırlandı. Örneklerin elektroforez aşamasında yürütme koşulları SNaPshot™ kit protokolüne göre yapıldı.

3.2.9. SNaPshot reaksiyon ürünlerinin ABI 310 ile elektroforezi ve sonuçların değerlendirilmesi

ABI PRISM® 310 Genetik Analizör (Applied Biosystem)'de yürütülen örneklerin okunması ve verilerin analizi için GeneScan Analysis software 3.1.2 (Applied Biosystem) programı kullanıldı. Tiplendirmede Tavacı ve ark. tarafından singleplekste belirlenen SNP markırlarının uzunlukları (size) kullanıldı (105).

3.2.10. Verilerin analizi ve sonuçların değerlendirilmesi

Saç ve göz rengi ile ilgili istatistiksel değerlendirmeler multinominal regresyon analizi ile HIrisPlex sistemi (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) üzerinden yürütüldü (Şekil 28).



Şekil 28: Göz ve saç rengi analizin görüntüsü (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) internet sayfasından alınmıştır erişim tarihi: 24.02.2022

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında bilgilendirilmiş onam formunu dolduran ve DNA örneklerinin bilimsel çalışmalarda kullanılmasına rıza gösteren Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı aralarında kan bağı olmayan İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa GETAT merkezine diyabetik yaralarının tedavisi için gelen rastgele seçilmiş 30 kişiden kan ve larva örneği alındı. Kan ve larvalardan insan DNA'sı elde edilerek HirisPlex sistemi (89) kullanılarak göz ve saç rengi tahmini ve fenotip doğrulaması yapıldı.

4.1. Örneklerden Elde Edilen İnsana Ait DNA Miktarları

DNA izolasyon yöntemi olarak *QIAamp® Mini Kit* üreticisinin *kan örneklerinden DNA izolasyonu* ve *QIAamp® DNA Investigator Kit* üreticisinin *yumuşak dokudan DNA izolasyonu* protokolü kullanıldı. DNA izolasyonu sonrası miktar tayini florometrik yöntem ile Qubit® Florometre (Invitrogen) cihazında Quant-iT™ dsDNA HS (High Sensitive) kit kullanılarak belirlendi. Miktar tayini sonuçlarına göre (Tablo VI) larvalardan elde edilen 0,1 ve 1,5 ng arasında kalan 10 örnek, ayrıca sonuç alınamayan 19 ve 97 ng arasında kalan 3 örnek, 50°C de etüv de 2 saat kadar bekletilerek DNA konsantrasyonu artırıldı (Tablo VI). Ayrıca DNA miktarlarında degradasyonun izlenmesi için örnekler agoroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 46).

Tablo VI: Gönüllülerden toplanan larva ve kan örneklerinden elde edilen DNA miktarı

SN	Referans numarası	Larva-Adet	Larva-ul/ng	Larva DNA Miktarı (2)*	Kan- ul/ng
1	T21-XX-99	20	4		39
2	T21-XY-100	20	0,108	0,51	98,2
3	T21-XY-104	15	14,8		YOK**
4	T21-XY-105	25	0,59	2,14	57
5	T21-XY-106	15	0,86		(1/10)17,9
6	T21-XY-107	45	0,18	0,71	63,6
7	T21-XY-108	15	11,1		60,6

8	T21-XY-109	10	0,88	1,18	YOK**
9	T21-XY-110	15	58,4		(1/10) 12,0
10	T21-XY-111	26	0,304		74
11	T21-XY-112	20	2,86		94,2
12	T21-XX-113	11	x>100		88,2
13	T21-XY-114	26	0,382	3,04	84
14	T21-XY-115	20	10,6		65,2
15	T21-XX-116	70	x>100		39
16	T21-XY-117	14	69	82,4	(1/10)11,4
17	T21-XX-118	12	97	106	(1/10)17,5
18	T21-XX-119	41	X<0,100	0,368	YOK**
19	T21-XX-120	17	0,752	2,02	61,4
20	T21-XY-121	35	x>100		51,6
21	T21-XY-122	10	29		31,8
22	T21-XY-123	14	19,5	73,6	77
23	T21-XX-124	20	8,16		57,4
24	T21-XY-125	16	0,17	0,68	34,4
25	T21-XX-132	15	6,94		46,2
26	T21-XX-137	13	37,8		72,4
27	T21-XY-138	15	70		51,6
28	T21-XY-139	8	50,8		(1/10)11,7
29	T21-XX-186	16	1,33	4,42	YOK**
30	T21-XX-187	11	0,344	1,57	YOK**

Larva DNA miktarı (2)* DNA miktarı çok düşük olan örnekler dehidrate edilerek DNA miktarları arttırılmıştır.

YOK** Kan örneği olmayan örnekler.

4.2. DNA Örneklerinden HİrisPlex SNP Genotiplerinin Belirlenmesi

Kişilerin kan örneklerinden ve larva diseksiyonu sonucu elde edilen insana ait örneklerden HİrisPlex SNP genotiplerinin belirlenmesi için SNaPshot™ (Applied Biosystems) kiti kullanıldı. Tablo VII’de çalışmamızda gönüllülerin kan örnekleri ve larva kursak ve bağırsak

içeriklerinden elde edilen insana ait örneklerin 24 SNP markırının genetik profilleri gösterilmektedir.



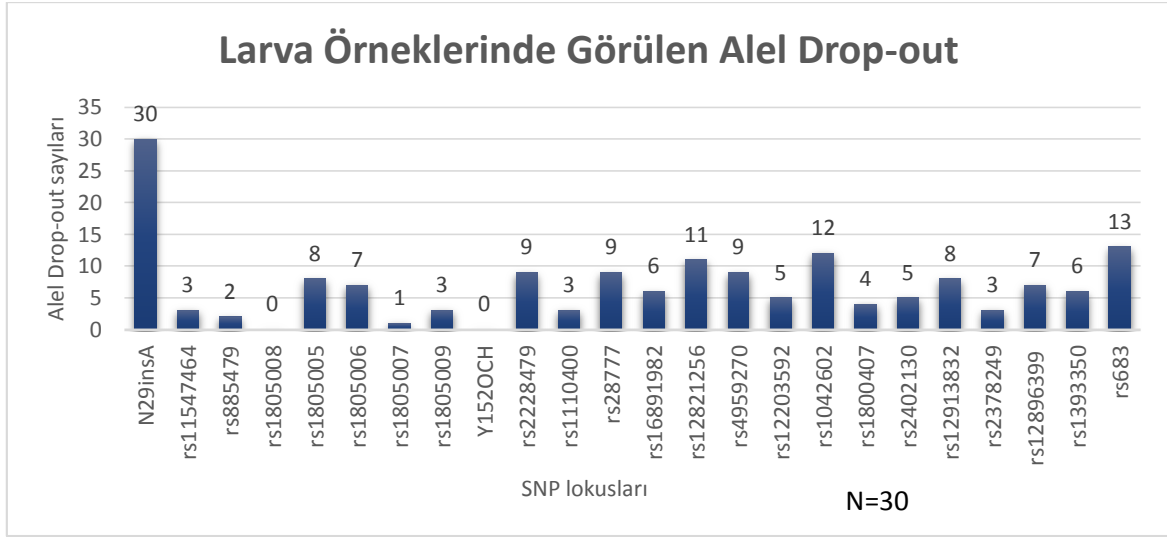
Tablo VII: Kan örneklerinden ve larva kursak ve bağırsak içeriklerinden elde edilen insana ait genotip tablosu

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24
	N29insA	rs11547464	rs885479	rs1805008	rs1805005	rs1805006	rs1805007	rs1805009	Y152OCH	rs2228479	rs1110400	rs28777	rs16891982	rs12821256	rs4959270	rs12203592	rs1042602	rs1800407	rs2402130	rs12913832	rs2378249	rs12896399	rs1393350	rs683
9974A	CC	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	CA	CT	GG	GG	AA	CC	CT	TT	TT	TT
T21-XX-99K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AC	GC	GA	CC	CC	GT	GG	AA	TT	TT	GG	TT	GT
T21-XX-99L	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	CA	GC	AA	CC	CC	GT	GG	AA	TT	TT	GG	CT	GT
T21-XY-100K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	*	CA	CT	GG	GG	AA	TT	TT	GT	*	GG
T21-XY-100L	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	*	CC	GT	GG	AA	CT	TT	GT	*	GG
T21-XY-104L	*	GG	CC	*	*	CC	*	CC	CT	*	*	*	*	*	CA	TT	GG	*	AA	*	*	GG	*	*
T21-XY-105K	*	GA	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	CT	CC	CC	AA	CC	CC	GG	GG	AA	TT	TT	GG	*	GG
T21-XY-105L	*	GA	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	*	AA	*	CC	*	GG	*	*	*	*	*	*
T21-XY-106K	*	GG	CT	CC	GT	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AG	CA	CC	GT	GG	GG	CC	TT	GG	CC	GT
T21-XY-106L	*	GG	CC	CC	*	*	CC	GG	CC	*	TT	*	GG	AA	CC	*	*	GG	*	*	TT	GG	*	GG
T21-XY-107K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AC	GC	AA	CA	CC	GT	GG	AA	TT	CC	GG	*	GG
T21-XY-107L	*	GG	CC	CC	*	*	CC	*	CC	AA	GG	*	*	CC	*	*	GG	*	*	*	*	*	*	*
T21-XY-108K	*	GG	CC	CT	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	CC	CC	GG	GG	AA	TT	TT	GG	CT	GT
T21-XY-108L	*	GA	CC	CT	*	*	CC	*	CC	*	TT	AA	GG	AA	CC	CC	*	*	AA	TT	TT	GG	CC	*
T21-XY-109L	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	*	*	AA	CC	*	*	*	AA	TT	TT	*	CC	*
T21-XY-110K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	CC	CC	TT	GG	AA	CT	TT	GT	*	TT
T21-XY-110L	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	*	TT	AA	GG	AA	CC	CC	TT	GG	AA	CT	TT	TT	*	*
T21-XY-111K	*	GG	CC	CC	GT	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GC	AA	CA	CC	GG	GG	AA	*	TT	CT	GT	GG
T21-XY-111L	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T21-XY-112K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GA	TT	AA	GG	GA	AA	CC	GT	GG	AA	CC	TT	GG	CC	TT
T21-XY-112L	*	GG	CC	CC	*	*	CC	GG	CC	**	TT	*	GG	GA	AA	CC	GG	GG	*	*	TT	GG	CC	*
T21-XX-113K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	CC	CC	TT	GG	AA	CT	TT	GG	*	GT
T21-XX-113L	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T21-XY-114K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GC	AA	CA	CC	TT	GA	AA	TT	TT	GT	*	TT
T21-XY-114L	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T21-XY-115K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	GA	CC	CC	TT	GG	AA	TT	TT	GG	*	GG
T21-XY-115L	*	GG	CC	CC	GT	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	CC	CC	TT	GG	AA	TT	TT	GG	*	GG
T21-XX-116K	*	GG	CT	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AG	CC	CC	GT	GA	AA	TT	TT	TT	*	GT
T21-XX-116L	*	GG	CC	CC	*	*	CC	GG	CC	*	TT	AA	CC	AA	*	CC	GG	GG	AA	TT	TT	GG	CC	*
T21-XY-117K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GC	*	CC	CC	GG	GG	AA	CT	CT	*	GT	GG
T21-XY-117L	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T21-XX-118K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC	AA	CC	CC	GT	GG	AA	TT	CC	GT	*	GG
T21-XX-118L	*	GA	CC	CC	*	*	CC	GG	CC	*	TT	*	GG	*	CC	*	*	GG	AA	*	CC	GG	*	*
T21-XX-119L	*	GG	CC	CT	*	AA	CC	GG	CC	AA	TT	*	GG	AA	*	CC	GG	GG	AA	*	TT	GG	*	GG
T21-XX-120K	*	GA	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AC	CC	AA	AA	CC	GT	GG	AA	TT	TT	GT	*	GG
T21-XX-120L	*	GA	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	CT	*	CC	AA	AA	CC	TT	GG	AA	TT	TT	TT	CT	GG
T21-XY-121K	*	GG	*	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GC	AA	AC	CC	GT	GG	AA	CT	TT	GG	*	TT

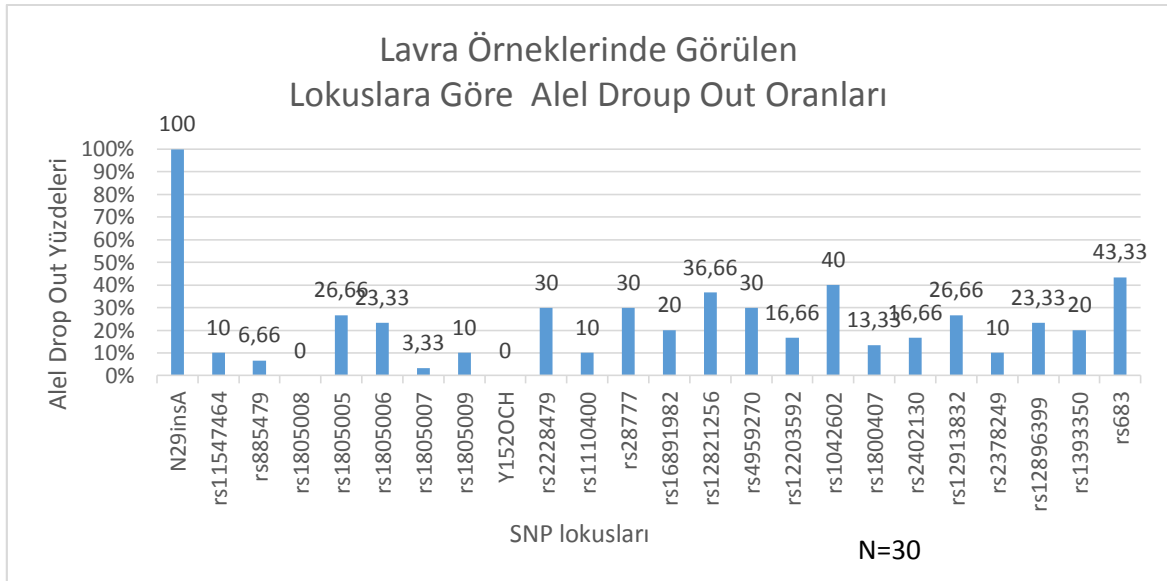
T21-XY-121L	*	GG	*	CC	*	*	GG	CC	CC	*	TT	AA	GG	AA	*	CC	GG	GG	AA	*	TT	GG	CC	TT
T21-XY-122K	*	GG	CT	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	AC	CC	GG	GG	AA	CT	TT	GT	*	GT
T21-XY-122L	*	GG	CT	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	*	GG	AA	AC	CC	GG	GG	GA	CT	TT	GT	*	GG
T21-XY-123K	*	GA	CC	CT	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	CC	CC	GG	GG	AA	CT	TT	GG	*	GT
T21-XY-123L	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
T21-XX-124K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GA	TT	AA	GG	AG	CC	CT	GG	GG	AA	*	TT	GG	CT	GT
T21-XX-124L	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	*	GG	AA	*	CT	GG	*	AA	*	TT	GG	CT	*
T21-XY-125K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	*	CA	CC	TT	GG	AA	CT	TT	GG	*	TT
T21-XY-125L	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	*	*	*	GG	AA	*	TT	*	*	*
T21-XX-132K	*	GG	CC	CC	GT	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	CC	CT	GT	GG	AA	TT	TT	GG	CC	GT
T21-XX-132L	*	GG	CC	CC	GT	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	CC	CT	GT	GG	AA	TT	TT	GG	CC	GT
T21-XX-137K	*	GA	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	AA	CC	GG	GG	AA	CC	TT	GT	*	TT
T21-XX-137L	*	GA	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	AA	CC	GG	GG	AA	CC	TT	GT	*	TT
T21-XY-138K	*	GA	CC	CC	GT	CA	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	CA	CC	GG	GG	AA	CT	CT	GG	*	GT
T21-XY-138L	*	GG	CC	CC	AG	CA	CC	GG	CC	GG	TT	*	CC	*	AA	CC	GT	GG	AA	TT	*	GG	*	*
T21-XY-139K	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	AA	CC	GT	GG	AA	TT	TT	GT	*	GT
T21-XY-139L	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	AA	GG	AA	AA	CC	GT	GG	AA	TT	TT	GT	*	GG
T21-XX-186L	*	*	CC	CC	AA	AA	CC	GG	CC	*	TT	*	CC	*	*	CC	*	*	*	*	TT	*	*	*
T21-XX-187L	*	GG	CC	CC	GG	CC	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC	AA	CC	CC	GT	GG	AA	TT	TT	TT	*	TT

K kan örneklerini, *L* ise larva örneklerini göstermektedir.

Çalışılan tüm larva örneklerinde 24 HirisPlex SNP lokuslarından gözlenen alel düşmeleri (alel drop-out) aşağıda özetlenmiştir. Bu çalışmada N29insA InDel lokusu hiçbir örnekte gözlemlenmemiştir. Bu yüzden değerlendirmeler 23 SNP bölgesi üzerinden yapılmıştır. rs18005008 ve Y152OCH SNP lokusları tüm örneklerde görülmüştür.



Şekil 29: Larva örneklerinde görülen Alel Drop-out durum tablosu

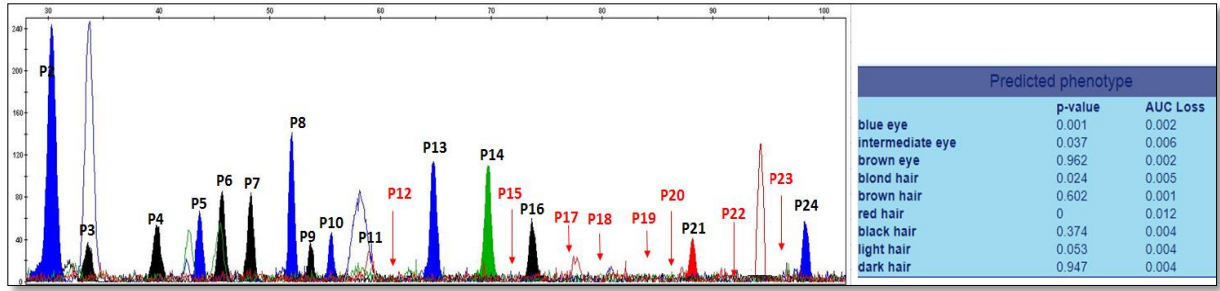


Şekil 30: Larva örneklerinde görülen Alel Drop-out durum tablosu yüzdelik dağılım oranları.

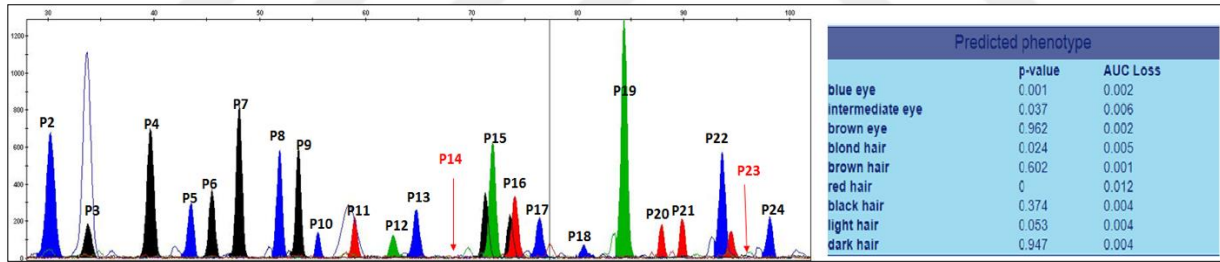
Larva ve kan örneklerinden elde edilen genotip sonuçlarına ait detaylı elektroforegram görselleri ve sonuçlar sırasıyla aşağıda gösterilmiştir. Elektroforegram görselleri sırasıyla larva ve kan numunelerinin karşılaştırılması şeklinde gösterilmiştir. Elektroforegram görselleri üzerinde her bir pik noktasına karşılık gelen lokuslar işaretlenmiştir.

T21-XX-99 kodlu kan ve larva örneğinden 23 SNP elde edilebilmiştir. Ancak larva örneğinde kandan farklı olarak rs12821256 (GA>AA) ve rs1393350 (TT>CT) lokuslarında alel değişikliği olduğu görülmüştür (Tablo VII). Kan ve larvadan örneklerinden doğru göz rengi tahmini (kahverengi) yapılmıştır. Saç rengi tahmininde kişinin bilinen saç rengi siyah iken, kan ve larva örneğinde ise kahverengi saç rengi tahmini yapılmıştır. Ancak p-değerleri karşılaştırıldığında kahverengi ve siyah p-değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Tablo VIII).

T21-XY-100 kodlu kan örneğinde 21 SNP gözlenmiştir. Larva örneğinde başlangıçta 9 SNP noktasında alel drop-out görülmüştür. Larva örneğinde alel kayıpları sebebiyle DNA yoğunlaştırılarak, hedef bölgelere yönelik küçük bir SNP-plex çalışılmıştır (Şekil 31B). Sonuçta kayıp aleller yeniden elde edilebilmiştir (Şekil 31). Ayrıca larva örneğinde kan örneğinden farklı olarak rs12203592 (CT>CC), rs1042602 (GG>GT) ve rs12913832 (TT>CT) lokuslarında alel drop-out ve alel drop-in olarak alel değişiklikleri görülmüştür (Tablo VII-VIII) (Şekil 31 A-B, 32). Kan ve larva genotiplerinden fenotip tahmini yapıldığında kişinin göz ve saç rengi kahverengi olarak tahmin edilmiştir. Her ne kadar üç alelde genotip farklılığın görülse de kan ve larva genotiplerinden fenotip tahmini yapıldığında ise doğru fenotip elde edildiği görülmüştür. Larva ve kan genotiplerindeki farklılıkların fenotip tahmininde belirgin bir etkisi olmamıştır (Tablo VII-VIII).



Şekil 31: T21-XY-100 kodlu larva örneğinin ilk (A) ve eksik SNP bölgelerinin çalışıldığı (B) elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.



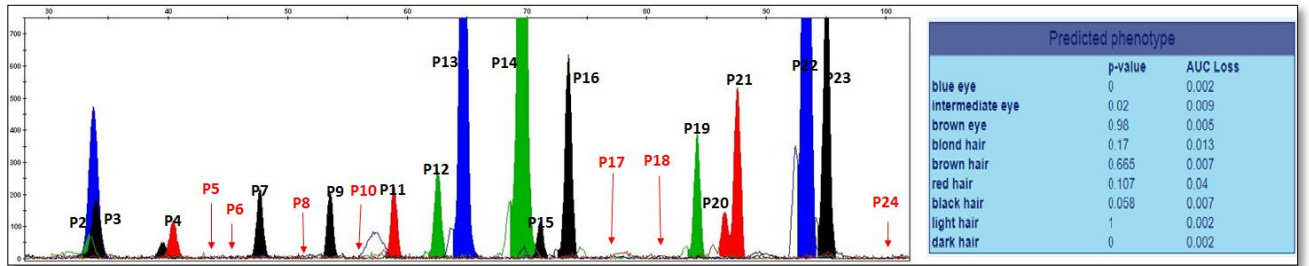
Şekil 32: T21-XY-100 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.

T21-XY-105 kodlu kan örneğinde 21 SNP, larvadan ise 14 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs1110400 (CT>TT) ve rs28777 (CC>AA) lokuslarında alel değişiklikleri olduğu görülmüştür. Kan örneğinde doğru saç (siyah) ve göz rengi (kahverengi) tahmin sonuçları alınmıştır. Larva örneğinde ise rs12913832 aleli eksik olması sebebiyle göz rengi elde edilememiştir ve saç rengi ise alel drop-outlar sebebiyle yanlış tahmin edilmiştir (Tablo VII-VIII).

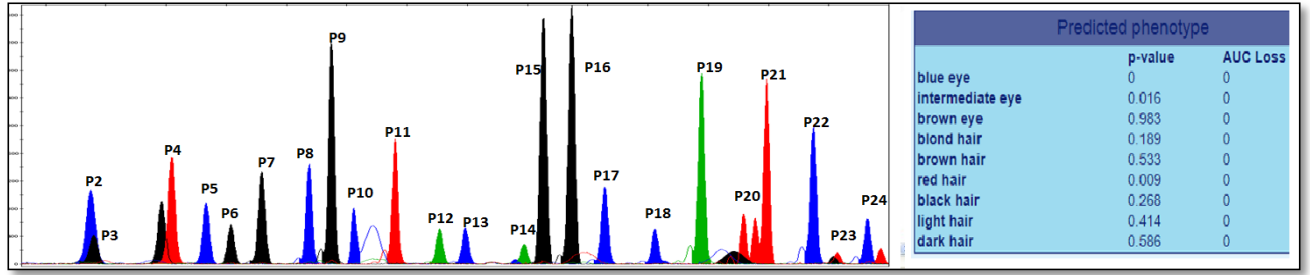
T21-XY-106 kodlu kan örneğinde 23 SNP, larvadan ise 15 SNP elde edilebilmiştir. Larva örneğinde kandan farklı olarak rs1110400 (CT>TT) ve rs28777 (CC>AA) lokuslarında alel değişiklikleri olduğu görülmüştür. Larvada kayıp lokuslar olmasına rağmen kan ile uyumlu olarak doğru saç ve göz rengi profili elde edilebildiği görülmüştür. (Tablo VII-VIII).

T21-XY-107 kodlu kan örneğinde 22 SNP, larvadan ise 9 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs2228479 (GG>AA), rs1110400 (TT>GG), rs12821256 (AA>CC) ve rs1042602 (GT>GG) lokuslarında alel değişiklikleri olduğu görülmüştür. Kandan elde edilen sonuçlara göre saç ve göz rengi doğru olarak tespit edilmiştir. Larvada yetersiz alel sebebiyle saç ve göz fenotip oranları hesaplanamamıştır (Tablo VII-VIII).

T21-XY-108 kodlu kan örneğinde 23 SNP, larvadan ise 16 SNP elde edilebilmiştir. Larva örneğinde kandan farklı olarak rs11547464 (GG>GA) ve rs1393350 (CT>CC) lokuslarında alel değişiklikleri olduğu görülmüştür. Larvada kayıp lokuslar olmasına rağmen kan ile uyumlu olarak doğru saç ve göz rengi profili elde edilebildiği görülmüştür (Tablo VII-VIII) (Şekil 33,34).

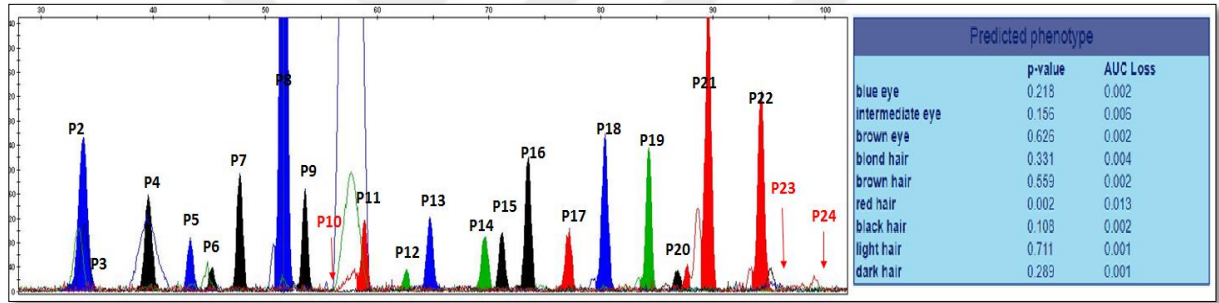


Şekil 33 : T21-XY-108 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.

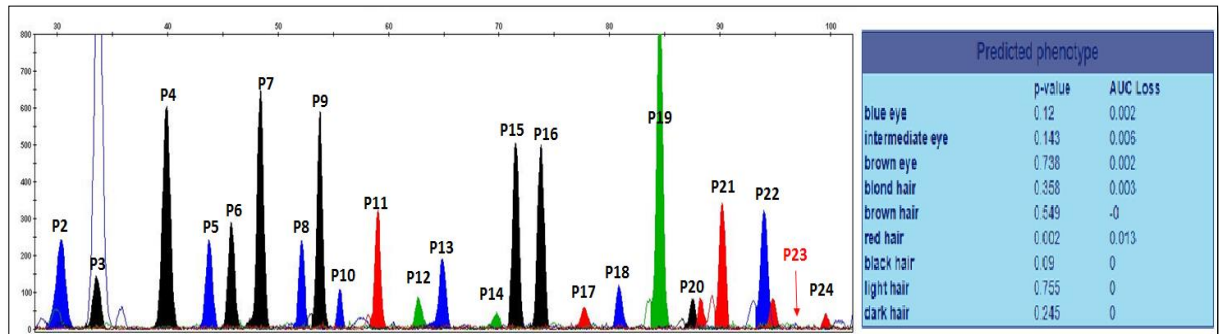


Şekil 34 : T21-XY-108 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.

T21-XY-110 kodlu kan örneğinde 22 SNP, larvadan ise 20 SNP elde edilebilmiştir. Larva örneğinde kandan farklı olarak rs12896399 (GT>TT) lokusunda alel değişikliği olduğu görülmüştür. Larvada kayıp lokuslar olmasına rağmen kısmi fakat kan ile uyumlu olarak doğru saç ve göz rengi profili elde edilebildiği görülmüştür (Tablo VII-VIII) (Şekil 35,36).



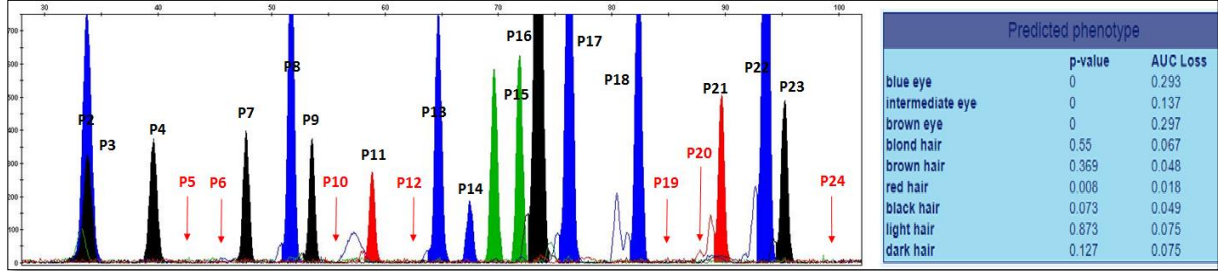
Şekil 35: T21-XY-110 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.



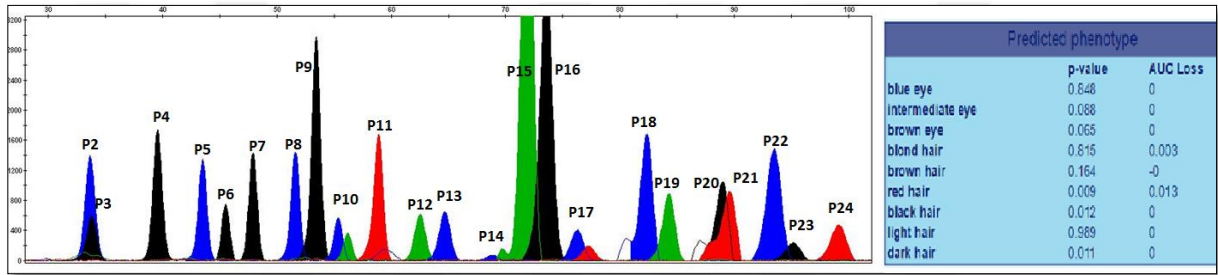
Şekil 36: T21-XY-110 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.

T21-XY-112 kan örneğinde 23 SNP, larvadan ise 16 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs1042602 (GT>GG) lokusunda alel değişikliği olduğu görülmüştür (Şekil 37,38). Larvada kayıp lokuslar olmasına rağmen kan ile uyumlu olarak saç

rengi doğru tespit edilmiştir. rs12913832 aleli eksik olması nedeniyle göz rengi hesaplanamamıştır (Tablo VII-VIII).



Şekil 37: T21-XY-112 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.



Şekil 38: T21-XY-112 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.

T21-XY-114 kodlu kan örneğinde 22 SNP elde edilebilmiştir. Larvadan ise sonuç alınamamıştır. Kandan doğru saç ve göz rengi tahmini yapılmıştır (Tablo VII-VIII).

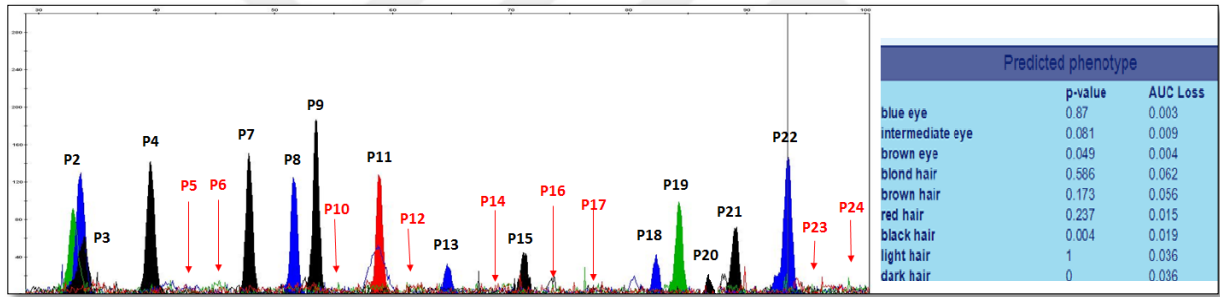
T21-XY-115 kodlu kan ve larva örneklerinde 22 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs1805005 (GG>GT) ve rs12821256 (GA>AA) lokusunda alel değişikliği olduğu görülmüştür. Kan ve larvadan doğru saç ve göz rengi tahmini yapılmıştır. (Tablo VII-VIII).

T21-XX-116 kodlu kan örneğinde 22 SNP, larvadan ise 18 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs885479 (CT>CC), rs16891982 (GG>CC), rs12821256 (AG>AA), rs1042602 (GT>GG), rs1800407 (GA>GG) ve rs12896399 (TT>GG) lokuslarında alel değişiklikleri görülmüştür. Kan ve larva örneklerinden elde edilen fenotip profillerinde göz

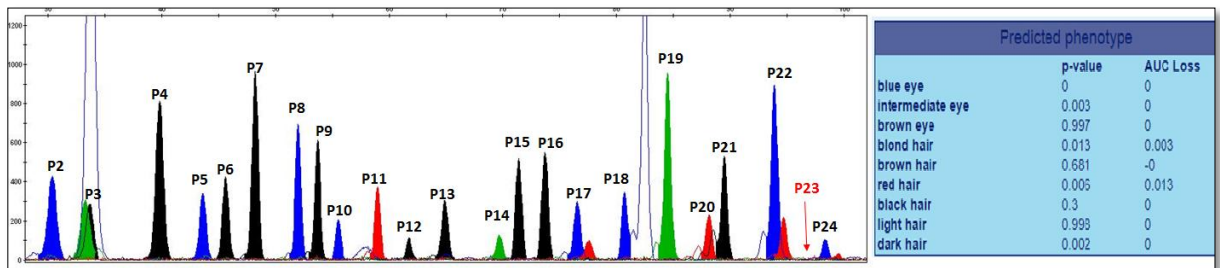
rengi doğru tahmin edilmiştir. Saç rengi fenotipi larva örneğinden doğru tahmin edilmesine rağmen kanda siyah yerine kahverengi sonuç verdiği görülmüştür (Tablo VII-VIII).

T21-XY-117 kodlu kan örneğinde 21 SNP gözlenmiştir. Larvadan ise sonuç alınamamıştır. Kandan doğru saç ve göz rengi tahmini yapılmıştır (Tablo VII-VIII).

T21-XX-118 kodlu kan örneğinde 22 SNP, larvadan ise 14 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs11547464 (GG>GA), rs16891982(CC>GG), rs12913832 (TT>CC) ve rs12896399 (GT>GG) lokusunda alel değişikliği olduğu görülmüştür (Şekil 39, 40). Larvada kayıp lokuslar ve genotipteki farklılıklarla beraber saç ve göz rengi tahmini de kişinin bilinen fenotipinden farklı çıkmıştır (Tablo VII-VIII).



Şekil 39: T21-XX-118 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.



Şekil 40: T21-XX-118 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.

T21-XX-120 kodlu kan ve larva örneğinden 22 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs1110400 (TT>CT), rs1042602 (GT>TT) ve rs12896399 (GT>TT)

lokusunda alel değişikliği olduğu görülmüştür. Larvadaki alel değişikliklerine rağmen hem kanda ve hem de larvadan doğru saç ve göz rengi tahmini yapılmıştır (Tablo VII-VIII).

T21-XY-122 kodlu kan örneğinde 22 SNP, larvadan ise 21 SNP elde edilebilmiştir. Ancak larva örneğinde kandan farklı olarak rs2402130 (AA>GA) ve rs683 (GT>GG) lokusunda alel değişikliği olduğu görülmüştür. Larvada kayıp lokuslar olmasına rağmen kan ile uyumlu olarak saç ve göz rengi doğru tespit edilmiştir (Tablo VII-VIII).

T21-XX-124 kodlu kan örneğinde 23 SNP, larvadan ise 19 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs2228479 (GA>GG) ve rs12821256 (GA>AA) lokusunda alel değişiklikleri görülmüştür. Larvada kayıp lokuslar olmasına rağmen kan ile uyumlu olarak saç ve göz rengi doğru tespit edilmiştir. (Tablo VII-VIII).

T21-XY-125 kodlu kan örneğinde 21, larvadan ise 17 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs12913832 (CT>TT) lokusunda alel değişikliği olduğu görülmüştür. Larvada kayıp lokuslar olmasına rağmen kan ile uyumlu olarak saç ve göz rengi doğru tespit edilmiştir (Tablo VII-VIII).

T21-XX-132 kodlu kan ve larva örneklerinde 23 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs12821256 (AG>AA) lokusunda alel değişikliği olduğu görülmüştür. Kan ve larvadan doğru saç ve göz rengi tespit edilmiştir (Tablo VII-VIII).

T21-XX-137 kodlu kan ve larva örneğinden 22 SNP elde edilebilmiştir. Kan ve larvadan doğru saç ve göz rengi tahmin edilmiştir (Tablo VII-VIII).

T21-XY-138 kodlu kan örneğinde 22 SNP, larvada ise 18 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs11547464(GA>GG), rs1805005 (GT>GA), rs16891982 (GG>CC), rs4959270 (CA>AA), rs1042602 (GG>GT) ve rs12913832 (CT>TT) lokuslarında

alel değişiklikleri olduğu görölmüştür. Larvada kayıp lokuslar olmasına rağmen kan ile uyumlu olarak saç ve göz rengi doğru tespit edilmiştir (Tablo VII-VIII).

T21-XY-111 kodlu kan örneğinde 22 SNP elde edilebilmiştir. Larvadan ise sonuç alınamamıştır. Kandan elde edilen genotipten fenotip tahmini yapıldığında yeşil gözlü kişi HirisPlex sisteminde ara göz tahmini yapılmadığından kahverengi gözlü olarak tahmin edilmiştir. Siyah olduğu bilinen kişinin saç rengi ise kahverengi olarak tahmin edilmiş olup kahverengi ve siyah p-değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Tablo VII-VIII).

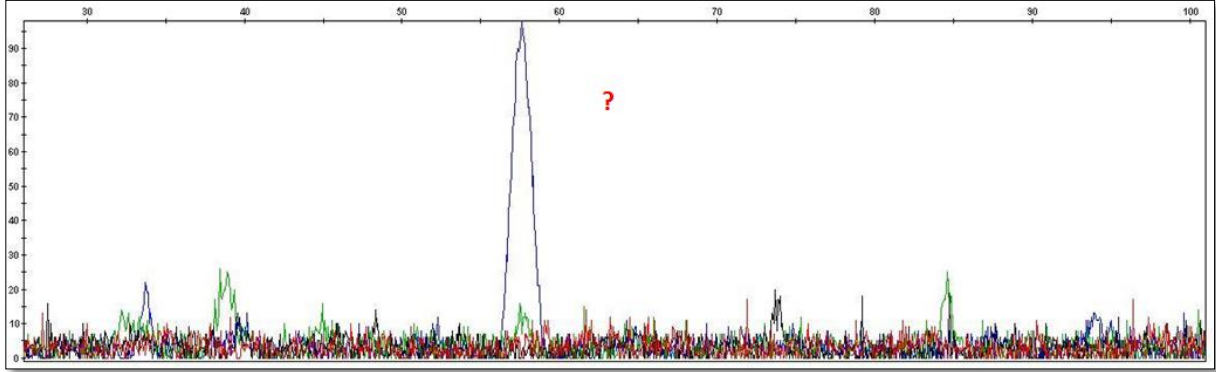
T21-XX-113 kodlu kan örneğinde 22 SNP elde edilebilmiştir. Larvadan ise sonuç alınamamıştır. Fenotip tahmininde ise yeşil gözlü kişi HirisPlex sisteminde ara göz tahmini yapılmadığından kahverengi gözlü olarak tahmin edilmiştir. Aynı kişinin saç rengi ise kahverengi olarak tahmin edilmiştir (Tablo VII-VIII).

T21-XX-119 (kanı bulunmayan örnek) kodlu larva örneklerinden 6 SNP noktasında alel drop out görölmüştür ve 18 SNP elde edilebilmiştir. rs12913832 lokusu görülemediği için göz rengi tespit edilememiştir. Saç rengi için kısmi profil elde edilse de fenotip ile uyumlu olmadığı, sonucun yanlış tahmin edildiği görölmüştür (Tablo VII-VIII).

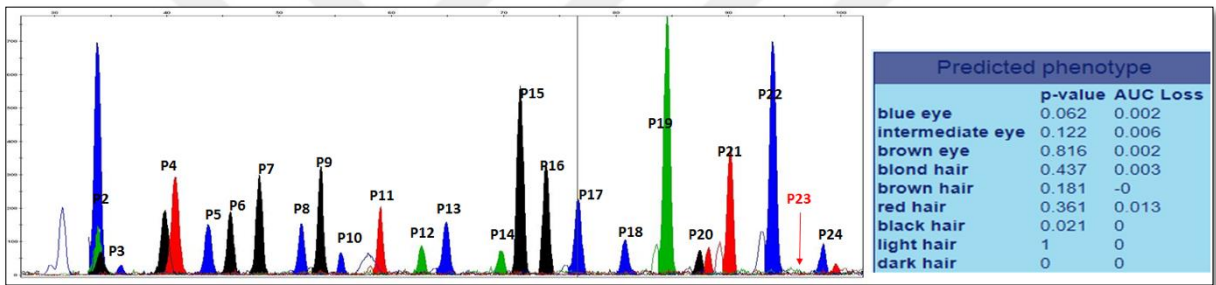
T21-XY-121 kodlu kan örneğinde 21, larvada ise 17 SNP elde edilebilmiştir. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs1805007(CC>GG), rs1805009(GG>CC), rs16891982(GC>GG) ve rs1042602(GT>GG) lokuslarında alel değişiklikleri olduğu görölmüştür. Kan örneğinde göz rengi doğru tespit edilmesine rağmen saç rengi profili kahverengi olarak tahmin edilmiştir. (Tablo VII-VIII).

T21-XY-123 kodlu kan örneğinde 22 SNP elde edilebilmiştir. Larvadan ise sonuç alınamamıştır. Fenotip tahmininde ise yeşil gözlü kişi HirisPlex sisteminde ara göz tahmini

yapılmadığından kahverengi gözlü olarak tahmin edilmiştir. Aynı kişinin saç rengi ise sarı olarak tahmin edilmiştir (Tablo VII-VIII) (Şekil 41,42).



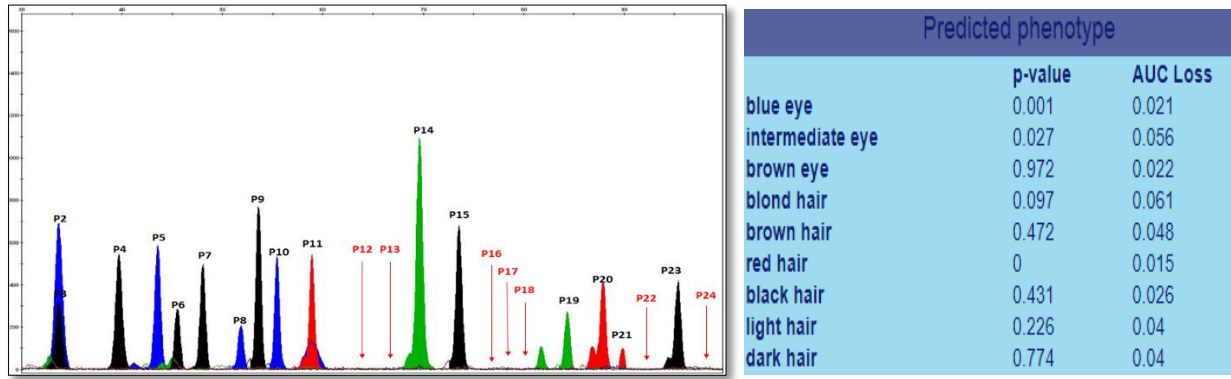
Şekil 41: T21-XY-123 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü



Şekil 42: T21-XY-123 kodlu kan örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.

T21-XY-139 kodlu kan ve larva örneğinden 22 SNP elde edilebilmiştir. Kan ve larvadan doğru göz rengi tahmini yapılmıştır. Ayrıca larva örneğinde kandan farklı olarak rs683 (GT>GG) lokusunda alel değişikliği olduğu görülmüştür. Saç rengi tahmininde siyah saçlı kişi kahverengi olarak tahmin edilmiştir (Tablo VII-VIII).

T21-XY-109 (kanı bulunmayan örnek) kodlu larva örneğinden 16 SNP elde edilebilmiştir. Göz rengi tahmini kahverengi olarak doğru tespit edilmiştir. Saçı siyah olduğu bilinen kişinin larva örneğinden kahverengi saç rengi tahmini yapılmıştır (Tablo VII-VIII). Ancak siyah ve kahverengi p-değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Şekil 43).



Şekil 43: T21-XY-109 kodlu larva örneği elektroforegram görüntüsü ve fenotip sonucu.

T21-XX-186 (kanı bulunmayan) kodlu larva örneğinden 13 SNP noktasında alel drop out görülmüştür. Sadece 11 SNP elde edilebilmiştir. rs12913832 lokusu görülemediği için göz rengi tespit edilememiştir. Saç rengi için kısmi profil elde edilse de fenotip ile uyumlu olmadığı görülmüştür (Tablo VII-VIII).

T21-XX-187 (kanı bulunmayan) kodlu larva örneğinden 22 SNP elde edilebilmiştir. Göz rengi fenotip ile uyumlu olup kahverengi tahmin edilmiştir. Saçı kahverengi olduğu bilinen kişinin larva örneğinden siyah saç rengi tahmini yapılmıştır (Tablo VII-VIII). Ancak siyah ve kahverengi p-değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlenmiştir (Tablo VII-VIII).

T21-XY-104 (kanı bulunmayan) kodlu larva örneğinden 14 SNP noktasında alel drop out görülmüştür ve sadece 10 SNP elde edilebilmiştir. rs12913832 lokusu görülemediği için göz rengi tespit edilememiştir. Elde edilen lokus sayısı yetersiz olması nedeniyle fenotip hesaplaması yapılamamıştır (Tablo VII-VIII).

4.3. Elde Edilen HIRISPLEX Genotiplerinden Fenotip Belirlenmesi

Saç ve göz rengi tahmini Walsh ve ark. tarafından geliştirilen, multinominal regresyon modeline dayalı saç ve göz rengi tahmini yöntemi online HIRISPLEX yazılımı

(<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) kullanılarak sonuçlar elde edildi ve değerlendirildi (Erişim tarihi 24.02.22). Larva ve kan örneklerinden elde edilen genotiplerle HirisPlex (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) web sitesinde hesaplanan fenotip sonuçları (p-değerleri) Tablo VIII’de verilmiştir. Bu genotip ve fenotip sonuçları ise Tablo IX’da özetlenmiştir.



Tablo VIII: Larva ve kan örneklerinden elde edilen genotiplerle HirisPlex sistemi üzerinden hesaplanan göz ve saç fenotip tahmin sonuçları (p-değerleri)

Örnek no		Göz rengi				Saç rengi						
		Gözlemlenen			Beklenen	Gözlemlenen				Beklenen		
		Mavi	Ara renk	Kahverengi	Beklenen renk	Sarı	Kahverengi	Kızıl	Siyah	Açık	Koyu	Beklenen Renk
1	T21-XX-99K	0	0,008	0,992	Kahverengi	0,04	0,651	0	0,309	0,089	0,911	Siyah
2	T21-XX-99L	0	0,007	0,993	Kahverengi	0,023	0,512	0	0,465	0,036	0,964	Siyah
3	T21-XY-100K	0,001	0,037	0,962	Kahverengi	0,024	0,602	0	0,374	0,053	0,947	Kahverengi
4	T21-XY-100L	0,001	0,037	0,962	Kahverengi	0,023	0,526	0	0,45	0,048	0,952	Kahverengi
5	T21-XY-104L	0	0	0	Kahverengi	0	0	0	0	0	0	Siyah
6	T21-XY-105K	0	0,002	0,998	Kahverengi	0,012	0,321	0,005	0,661	0,999	0,001	Siyah
7	T21-XY-105L	0	0	0	Kahverengi	0,482	0,269	0,239	0,01	1	0	Siyah
8	T21-XY-106K	0,848	0,088	0,065	Mavi	0,642	0,33	0,006	0,022	0,981	0,019	Sarı
9	T21-XY-106L	0,87	0,081	0,049	Mavi	0,55	0,383	0,004	0,062	0,881	0,119	Sarı
10	T21-XY-107K	0	0,006	0,994	Kahverengi	0,023	0,645	0,001	0,331	0,025	0,975	Kahverengi
11	T21-XY-107L	0	0	0	Kahverengi	0	0	0	0	0	0	Kahverengi
12	T21-XY-108K	0	0,16	0,983	Kahverengi	0,189	0,533	0,009	0,268	0,414	0,586	Kahverengi
13	T21-XY-108L	0	0,02	0,98	Kahverengi	0,17	0,665	0,107	0,058	1	0	Kahverengi
14	T21-XY-109L	0,001	0,027	0,972	Kahverengi	0,097	0,472	0	0,431	0,226	0,774	Siyah
15	T21-XY-110K	0,12	0,143	0,738	Kahverengi	0,358	0,549	0,002	0,09	0,755	0,245	Kahverengi
16	T21-XY-110L	0,218	0,156	0,626	Kahverengi	0,331	0,559	0,002	0,108	0,711	0,289	Kahverengi
17	T21-XY-111K	0	0,008	0,992	Yeşil (ara renk)	0,02	0,539	0	0,44	0,078	0,922	Siyah
18	T21-XY-111L	0	0	0	Yeşil (ara renk)	0	0	0	0	0	0	Siyah
19	T21-XY-112K	0,848	0,088	0,065	Mavi	0,815	0,164	0,009	0,012	0,989	0,011	Sarı
20	T21-XY-112L	0	0	0	Mavi	0,55	0,369	0,008	0,073	0,873	0,127	Sarı
21	T21-XX-113K	0,062	0,122	0,816	Yeşil (ara renk)	0,317	0,578	0,002	0,103	0,699	0,301	Sarı
22	T21-XX-113L	0	0	0	Yeşil (ara renk)	0	0	0	0	0	0	Sarı
23	T21-XY-114K	0,001	0,02	0,98	Kahverengi	0,053	0,588	0	0,359	0,218	0,782	Kahverengi
24	T21-XY-114L	0	0	0	Kahverengi	0	0	0	0	0	0	Kahverengi
25	T21-XY-115K	0	0,013	0,986	Kahverengi	0,132	0,717	0	0,15	0,391	0,606	Kahverengi
26	T21-XY-115L	0	0,013	0,986	Kahverengi	0,073	0,731	0,001	0,196	0,247	0,753	Kahverengi
27	T21-XX-116K	0,005	0,056	0,936	Kahverengi	0,222	0,637	0,001	0,14	0,576	0,424	Siyah
28	T21-XX-116L	0	0,003	0,997	Kahverengi	0,003	0,199	0	0,798	0,026	0,974	Siyah
29	T21-XY-117K	0,019	0,061	0,921	Kahverengi	0,089	0,562	0	0,348	0,315	0,685	Kahverengi
30	T21-XY-117L	0	0	0	Kahverengi	0	0	0	0	0	0	Kahverengi

31	T21-XX-118K	0	0,009	0,997	Kahverengi	0,011	0,667	0,004	0,319	0,998	0,002	Kahverengi
32	T21-XX-118L	0,87	0,081	0,049	Kahverengi	0,586	0,173	0,237	0,004	1	0	Kahverengi
33	T21-XX-119L	0	0	0	Kahverengi	0,004	0,033	0,962	0,001	0,755	0,245	Siyah
34	T21-XX-120K	0,001	0,02	0,979	Kahverengi	0,213	0,645	0,038	0,104	1	0	Kahverengi
35	T21-XX-120L	0	0,003	0,997	Kahverengi	0,014	0,515	0,002	0,469	1	0	Kahverengi
36	T21-XY-121K	0,015	0,054	0,931	Kahverengi	0,135	0,576	0,001	0,289	0,493	0,507	Siyah
37	T21-XY-121L	0	0	0	Kahverengi	0,011	0,015	0,973	0	0,978	0,022	Siyah
38	T21-XY-122K	0,12	0,143	0,738	Kahverengi	0,291	0,457	0,001	0,25	0,647	0,353	Kahverengi
39	T21-XY-122L	0,12	0,143	0,738	Kahverengi	0,241	0,498	0,001	0,26	0,567	0,433	Kahverengi
40	T21-XY-123K	0,062	0,122	0,816	Yeşil (ara renk)	0,437	0,181	0,361	0,021	1	0	Kahverengi
41	T21-XY-123L	0	0	0	Yeşil (ara renk)	0	0	0	0	0	0	Kahverengi
42	T21-XX-124K	0,001	0,031	0,968	Kahverengi	0,037	0,541	0	0,422	0,092	0,908	Kahverengi
43	T21-XX-124L	0,007	0,044	0,955	Kahverengi	0,035	0,554	0	0,411	0,081	0,919	Kahverengi
44	T21-XY-125K	0,062	0,122	0,816	Kahverengi	0,397	0,522	0,004	0,077	0,819	0,181	Kahverengi
45	T21-XY-125L	0,001	0,023	0,975	Kahverengi	0,12	0,591	0,001	0,288	0,253	0,747	Kahverengi
46	T21-XX-132K	0,001	0,025	0,974	Kahverengi	0,023	0,584	0	0,393	0,045	0,955	Kahverengi
47	T21-XX-132L	0,001	0,025	0,974	Kahverengi	0,02	0,677	0	0,303	0,061	0,939	Kahverengi
48	T21-XX-137K	0,921	0,052	0,027	Mavi	0,794	0,112	0,087	0,006	1	0	Sarı
49	T21-XX-137L	0,948	0,038	0,014	Mavi	0,794	0,112	0,087	0,006	1	0	Sarı
50	T21-XY-138K	0	0,015	0,985	Kahverengi	0,025	0,613	0,336	0,026	1	0	Kahverengi
51	T21-XY-138L	0	0,006	0,994	Kahverengi	0,007	0,83	0,003	0,16	0,039	0,961	Kahverengi
52	T21-XY-139K	0,001	0,019	0,98	Kahverengi	0,139	0,607	0,001	0,253	0,351	0,649	Siyah
53	T21-XY-139L	0,001	0,026	0,973	Kahverengi	0,139	0,607	0,001	0,253	0,351	0,649	Siyah
54	T21-XX-186L	0	0	0	Mavi	0,001	0,897	0,019	0,083	0,018	0,982	Sarı
55	T21-XX-187L	0	0,004	0,996	Kahverengi	0,005	0,397	0	0,597	0,006	0,994	Kahverengi

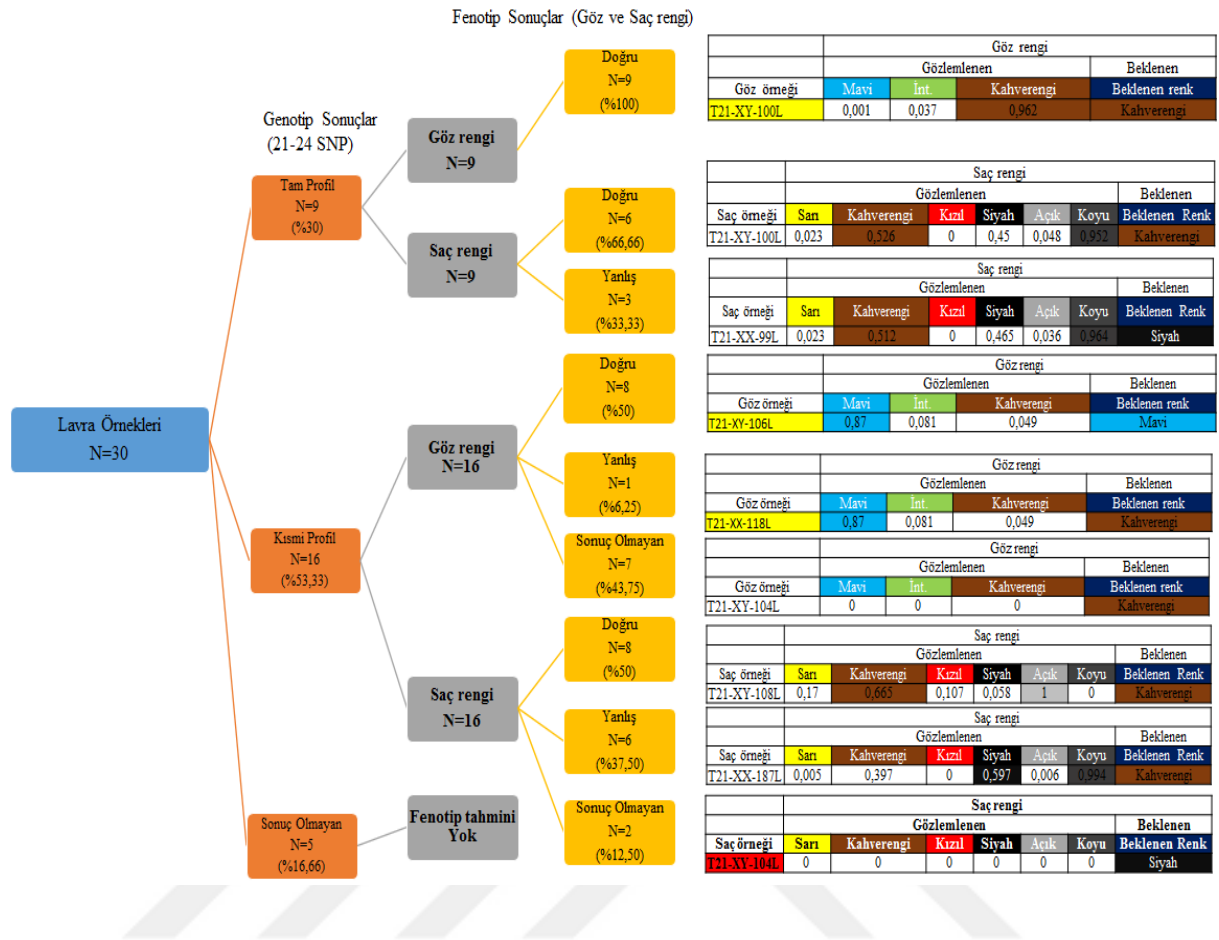
Tablo IX: Larva ve kandan elde edilen genotip ve tahmin edilen ve bilinen fenotip karşılaştırması

No	Örnek Adı	Elde Edilen Genotip	Tahmin Edilen Fenotip		Bilinen Edilen Fenotip		Fenotip Tahmini	
			Göz Rengi	Saç Rengi	Göz Rengi	Saç Rengi	Göz Rengi	Saç Rengi
1	T21-XY-100K	21 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
2	T21-XY-100L	21 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
3	T21-XY-105K	22 SNP	Kahverengi	Siyah	Kahverengi	Siyah	Doğru	Doğru
4	T21-XY-105L	14 SNP	Sonuç Yok	Sarı	Kahverengi	Siyah	Sonuç Yok	Yanlış
5	T21-XY-106K	23 SNP	Mavi	Sarı	Mavi	Sarı	Doğru	Doğru
6	T21-XY-106L	15 SNP	Mavi	Sarı	Mavi	Sarı	Doğru	Doğru
7	T21-XY-107K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
8	T21-XY-107L	9 SNP	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Kahverengi	Kahverengi	Sonuç Yok	Sonuç Yok
9	T21-XY-108K	23 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
10	T21-XY-108L	16 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
11	T21-XY-110K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
12	T21-XY-110L	20 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
13	T21-XY-112K	23 SNP	Mavi	Sarı	Mavi	Sarı	Doğru	Doğru
14	T21-XY-112L	16 SNP	Sonuç Yok	Sarı	Mavi	Sarı	Sonuç Yok	Doğru
15	T21-XY-114K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
16	T21-XY-114L	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Kahverengi	Kahverengi	Sonuç Yok	Sonuç Yok
17	T21-XY-115K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
18	T21-XY-115L	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
19	T21-XX-116K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Siyah	Doğru	Yanlış
20	T21-XX-116L	18 SNP	Kahverengi	Siyah	Kahverengi	Siyah	Doğru	Doğru
21	T21-XY-117K	21 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
22	T21-XY-117L	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Kahverengi	Kahverengi	Sonuç Yok	Sonuç Yok
23	T21-XX-118K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
24	T21-XX-118L	14 SNP	Mavi	Sarı	Kahverengi	Kahverengi	Yanlış	Yanlış
25	T21-XX-120K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
26	T21-XX-120L	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
27	T21-XY-122K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
28	T21-XY-122L	21 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
29	T21-XX-124K	23 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
30	T21-XX-124L	19 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
31	T21-XY-125K	21 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
32	T21-XY-125L	17 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
33	T21-XX-132K	23 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
34	T21-XX-132L	23 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
35	T21-XX-137K	22 SNP	Mavi	Sarı	Mavi	Sarı	Doğru	Doğru
36	T21-XX-137L	22 SNP	Mavi	Sarı	Mavi	Sarı	Doğru	Doğru
37	T21-XY-138K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
38	T21-XY-138L	18 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Doğru
39	T21-XX-99K	23 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Siyah	Doğru	Yanlış

40	T21-XX-99L	23 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Siyah	Doğru	Yanlış
41	T21-XY-109L	16 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Siyah	Doğru	Yanlış
42	T21-XY-111K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Yeşil (Ara Renk)	Siyah	Yanlış	Yanlış
43	T21-XY-111L	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Yeşil (Ara Renk)	Siyah	Sonuç Yok	Sonuç Yok
44	T21-XX-113K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Yeşil (Ara Renk)	Sarı	Yanlış	Yanlış
45	T21-XX-113L	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Yeşil (Ara Renk)	Sarı	Sonuç Yok	Sonuç Yok
46	T21-XX-119L	18 SNP	Sonuç Yok	Kızıl	Kahverengi	Siyah	Sonuç Yok	Yanlış
47	T21-XY-121K	21 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Siyah	Doğru	Yanlış
48	T21-XY-121L	17 SNP	Sonuç Yok	Kızıl	Kahverengi	Siyah	Sonuç Yok	Yanlış
49	T21-XY-123K	22 SNP	Kahverengi	Sarı	Yeşil (Ara Renk)	Kahverengi	Yanlış	Yanlış
50	T21-XY-123L	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Yeşil (Ara Renk)	Kahverengi	Sonuç Yok	Sonuç Yok
51	T21-XY-139K	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Siyah	Doğru	Yanlış
52	T21-XY-139L	22 SNP	Kahverengi	Kahverengi	Kahverengi	Siyah	Doğru	Yanlış
53	T21-XX-186L	11 SNP	Sonuç Yok	Kahverengi	Mavi	Sarı	Sonuç Yok	Yanlış
54	T21-XX-187L	22 SNP	Kahverengi	Siyah	Kahverengi	Kahverengi	Doğru	Yanlış
55	T21-XY-104L	10 SNP	Sonuç Yok	Sonuç Yok	Kahverengi	Siyah	Sonuç Yok	Sonuç Yok

Tüm larva örneklerinde 24 SNP içeren HirisPlex paneli ile elde edilen genotiplerin fenotip değerlendirilmesinde genotip sonuçlarına göre tam profil, kısmi profil ve sonuçsuz olmak üzere üç kategoriye ayrılmıştır (Şekil 44). Genotipinde 21-24 SNP içeren ve fenotip bilgisi veren larva örnekleri **tam profil**, SNP genotipi gözlenen fakat üçten fazla alel drop-out gözlenen genotip profillere **kısmi profil** ve hiçbir genotip elde edilemeyen genotipler ise **sonuçsuz** olarak sınıflandırılmıştır. Örnek olarak; **Tam profil**: T21-XY-139 kodlu larva örneğinde 22 SNP gözlemiş ve fenotip sonucu alınmıştır. **Kısmi Profil**: T21-XY-105 kodlu larva 14 SNP gözlenmiş ve fenotip sonucu alınmıştır. **Sonuçsuz**: T21-XY-114 kodlu larva örneğinden genotip elde edilememiştir.

Çalışmamızda 30 larva örneğinden elde edilen bulgulara göre, 9 tam (% 30), 16 kısmi (% 53,33) ve 5 sonuçsuz (% 16,6) profil elde edilmiştir. Hiçbir genotip sonucu elde edilemeyen beş örnekte fenotip tahmini yapılmamıştır. Toplamda 30 larva örneğinin 25'inden (%83,3) tam veya kısmi genotip sonucu alınmış olup fenotip tahmini yapılmıştır (Şekil 44) (Tablo VIII).



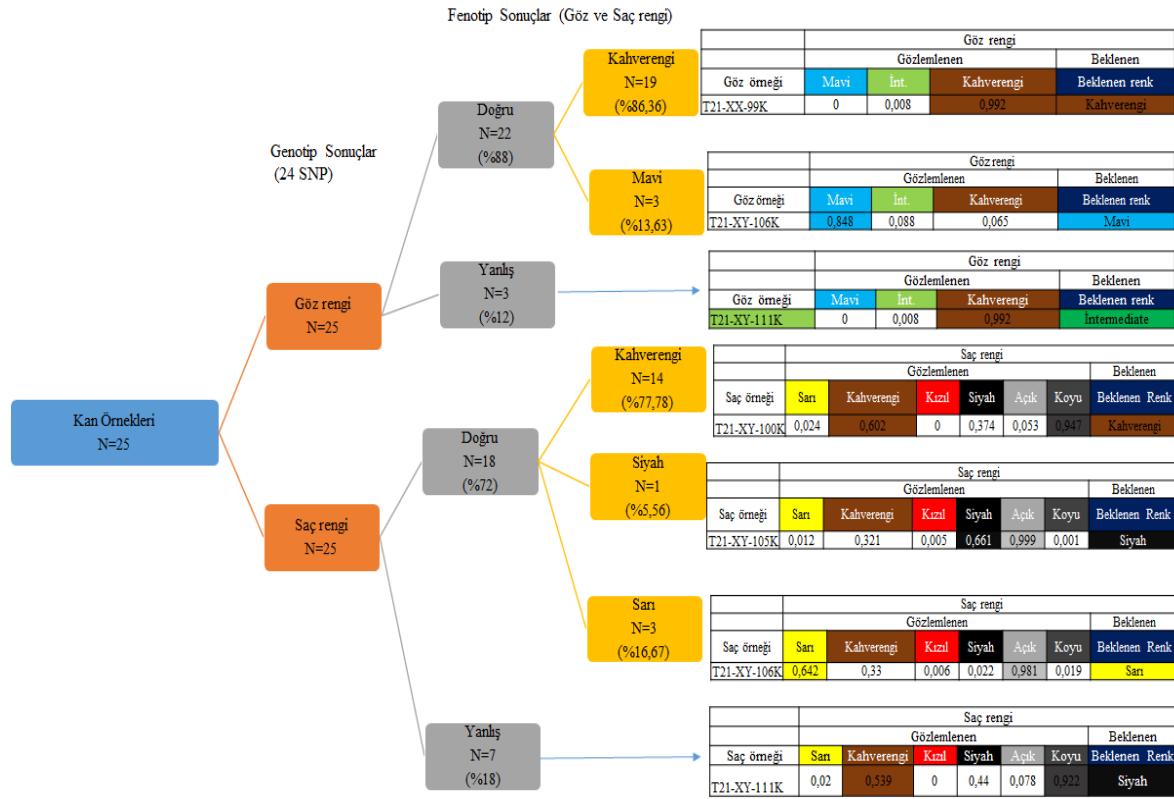
Şekil 44: Larva örneklerinin tam profil, kısmi profil ve sonuçsuz genotip dağılımı ve fenotip tahminleri dağılımları

Larva örneklerinden elde edilen göz rengi tahmin sonuçlarına göre; tam profil elde edilen örneklerin (N=9) tamamında (%100) doğru göz rengi tahmini yapıldığı görülmüştür. Kısmi profil (N=16) elde edilen örneklerde 8 doğru (%50) göz rengi tahmini yapıldığı gözlemlendi. Kısmi profil eldesinde sadece bir örnekte (T21-XX-118L) yanlış göz rengi tahmini yapıldı. Bu örnek incelendiğinde sadece 14 SNP gözlemlendiği ve göz rengi için en önemli olan SNP genotipinin rs12913832 (CC) olarak gözlemlendiği görüldü (Şekil 39-40). Kısmi profilde yedi örnekte (%43,75) ise yine göz rengi için en önemli olan rs12913832 genotipinin gözlenmediğinden fenotip tahmini yapılamadı. Toplamda tam veya kısmi profil içeren 25 örneğin 17'sinde (%68) doğru göz rengi tahmini yapıldı, 7'sinde (%28) bir fenotip sonuç vermedi ve sadece bir örnekte (%4) yanlış göz rengi tahmini gözlemlendi.

Larva örneklerinden elde edilen saç rengi tahmin sonuçlarına göre; tam profil (N=9) elde edilen örneklerin 6'sında (%66,6) doğru saç rengi tahmini yapıldı. İki örnekte (T21-XX-99L ve T21-XY-139L) siyah olan saç renkleri kahverengi olarak tahmin edildi. T21-XX-187L örneğinde ise kahverengi olduğu bilinen saç rengi siyah olarak gözlendi (Tablo VIII). Bu örnekler incelendiğinde siyah ve kahverengi p-değerlerinin yakın olduğu gözlendi. Kısmi profil (N=16) elde edilen larva örneklerinin 8'inde (%50) doğru saç rengi tahmini yapıldı. İki örneğin genotipinde (T21-XY-104L ve T21-XY-107L) 9 ve 10 SNP olup saç rengi tahmini için yeterli sayıda SNP elde edilememiştir. 6 örnekte (%37,5) ise yanlış saç rengi tahmini yapılmıştır. Toplamda tam veya kısmi profil içeren 25 örneğin 14'ünde (%56) doğru saç rengi tahmini yapıldı, 2'sinde (%8) bir fenotip sonucu verilmedi ve 9 bir örnekte (%36) yanlış saç rengi tahmini gözlendi.

Kan örneklerinden elde edilen göz rengi tahmin sonuçlarına göre; 25 örneğin 22'sinde (%88) göz rengi mavi veya kahverengi olarak tahmin edildi (Şekil 45). HIRISPLEX sistemi sadece mavi ve kahverengi göz tahmini yapmaktadır. Bu sebeple yeşil göz rengine sahip üç gönüllünün (T21-XY-111K, T21-XX-113K ve T21-XY-123K) göz rengi ise kahverengi olarak tahmin edildi.

Kan örneklerinden elde edilen saç rengi tahmin sonuçlarına göre; 18 örnekte (%72) doğru saç rengi tahmini yapıldı. 18 doğru tahmin yapılan örnek içinde saç rengi dağılımı; 14 kahverengi (%77,78), 1 siyah (%5,56) ve 3 sarı (%16,67) olarak bulundu (Şekil 45). Diğer 7 örneğin beşinde (T21-XX-99K, T21-XX-116K, T21-XY-139K, T21-XY-121K ve T21-XY-111K) kahverengi saçlı gönüllülerin saç renkleri siyah olarak tahmin edilmiş olup, bu örneklerdeki siyah ve kahverengi p-değerleri birbirine yakındır. Kahverengi saç renkli bir gönüllü (T21-XY-123K) sarı, sarı saçlı bir gönüllü (T21-XX-113K) ise de kahverengi olarak tahmin edildi.



Şekil 45: Kan örneklerinden elde edilen HirisPlex genotip ve fenotip sonuçlarının dağılımı

4.4. Fenotip Tahminlerinin Başarı Oranları

4.4.1 Göz rengi tahmin başarı oranları

Gönüllülerden alınan kan örneklerinin göz rengi tahmin başarısına bakıldığında, tüm örneklerde eşik değerinin ($p > 0.7$) üzerinde hesaplamalar yapıldığı mavi ve kahverengi göz renklerinin doğru tahmin edildiği görüldü (Tablo X). Tüm örneklerde alel kayıpları olmasına rağmen fenotipi kahverengi olarak bilinen 19 örnek içinden en düşük p-değerinin T21-XY-110K (0,738) kodlu örnekte ve en yüksek p-değerinin T21-XY-105K (0,998) kodlu örnekte olduğu görüldü. Fenotipi mavi olarak bilinen 3 örnekte ise en düşük p-değeri T21-XY-112K (0,844) kodlu örnekte ve en yüksek p-değeri T21-XX-137K (0,921) kodlu örnekte görüldü. Fenotipi yeşil (ara renk) olarak bilinen 3 örnek ise T21-XY-111K (0,992), T21-XY-123K (0,816) ve T21-XX-113K (0,816) kodlu örneklerde kahverengi olarak tespit edildi (Tablo VIII, Tablo X). Sonuç olarak mavi ve kahverengi göz rengine sahip kişilerin genotipten fenotip

tahmin başarısının %100 olduğu gözlemlendi (Tablo X). Yeşil göz rengi için ise bu sistemde tahmin edilememektedir.

Tablo X: Kan örneklerinin göz rengi tahmin başarısı

% tahmin edilen (koyu sayılar tahmin başarısını göstermektedir)				
HirisPleks (Göz rengi)	Mavi	Kahverengi	Yeşil	Toplam Örnek Sayısı
Mavi	100	0	BZ	3
Kahverengi	0	100	BZ	19
Yeşil	0	100	BZ*	3

***BZ:** Belirsiz

Larva örnekleri göz rengi tahmin başarı oranları ise şu şekildedir; fenotipi doğru olarak tahmin edilen 17 örneğin, kahverengi olarak bilinen 15'i içinde en düşük p-değerinin T21-XY-110L (0,626) kodlu örnekte ve en yüksek değerin T21-XX-120L (0,997) kodlu örnekte olduğu tespit edildi. Mavi olarak bilinen 2 örnekte ise en düşük p-değerinin T21-XY-106L (0,87) kodlu örnekte ve en yüksek değer ise T21-XX-137L (0,948) kodlu örnekte gözlemlendi. Ayrıca doğru olarak değerlendirilen larva örneklerinde elde edilen en düşük SNP lokusun, T21-XY-106L (15 SNP) kodlu örnekte, en yüksek T21-XX-132L (23 SNP) kodlu örnekte olduğu görüldü. Yanlış olarak bulunan tek örnek T21-XX-118L (14 SNP) kodlu örnekte kahverengi görülmesi beklenirken fenotipinin mavi (0,87) olarak tahmin edildi (Tablo VIII, Tablo X).

Sonuç alınamayan 12 örneğin 5'inde DNA tespit edilemedi, geriye kalan 7 örnekte ise en az T21-XY-107L (9 SNP) kodlu örnekte en fazla T21-XX-119L (18 SNP) kodlu örnekte değerlendirilecek kadar veri alınmasına rağmen rs12913832 lokusunda alel drop out görülmesi sebebiyle göz rengi için hesaplama yapılamadı. Göz renginin değerlendirilebilmesi için rs12913832 lokusunda alel drop out olmaması gerekmektedir.

Mavi ve kahverengi göz rengine sahip bireyler genotipten fenotip tahmini yapıldığında %66'nın üzerinde doğru tahmin yapılmıştır (Tablo XI). Sadece bir örnekte yanlış göz rengi tahmini yapılmıştır. Degredasyona bağlı alel kayıpları sebebiyle mavi gözlü bir, kahverengi gözlü beş ve yeşil gözlü üç kişinin göz rengi tahmini yapılamamıştır. Sonuç olarak, Hirisplex sisteminin degrede örneklerde mavi ve yeşil göz için yanlış sonuç verme oranının çok düşük olduğu görüldü.

Tablo XI: Larva örneklerinin göz rengi tahmin başarısı

% tahmin edilen (koyu sayılar tahmin başarısını göstermektedir)					
HirisPleks (Göz rengi)	Mavi	Kahverengi	Yeşil	Hesaplanamayan	Toplam Örnek Sayısı
Mavi	66,66	0	BZ	33,33	3
Kahverengi	5,26	68,42	BZ	26,31	19
Yeşil	0	0	BZ*	100	3

***BZ:** Belirsiz

4.4.2. Saç rengi tahmin başarı oranları

Kan örneklerinin saç rengi tahmin başarısı değerlendirildiğinde, 25 örneğin 18'inde doğru saç rengi tahmini yapılmıştır (Tablo XII). Fenotipi doğru olarak tahmin edilen 18 örneğin kahverengi olarak bilinen 14'ü içinde en düşük p-değeri T21-XY-122K (0,457) kodlu örnekte ve en yüksek değeri ise T21-XY-115K (0,717) kodlu örnekte görüldü. Fenotipi sarı olarak bilinen 3 örnekte en düşük p-değeri T21-XY-106K (0,642) kodlu örnekte ve en yüksek değeri T21-XY-112K (0,815) kodlu örnekte gözlemlendi (Tablo VIII). Saç rengi siyah olarak bilinen tek örneğin (T21-XY-105K) p-değeri ise 0,661 olduğu görüldü. Saç rengi siyah olarak bilinen 5 örnek, kahverengi, saç rengi sarı olarak bilinen 1 örnek, kahverengi ve saç rengi kahverengi olarak bilinen 1 örnek ise sarı olarak tahmin edildi (Tablo VIII, Tablo X).

Kan örneklerinden elde edilen genotiplerden fenotip tahmini yapıldığında kahverengi saç rengine sahip bireylerde %93, sarı saçlı bireylerde %75 ve siyah saçlı bireylerde %16 doğru

tahmin yapıldığı görüldü (Tablo XII). Saç rengi tahmininde siyah saçlı bireylerde kahverengi ve siyah p-değerlerinin birbirine yakın olduğu belirlendi.

Tablo XII: Kan örneklerinin saç rengi tahmini başarısı

% tahmin edilen (koyu sayılar tahmin başarısını göstermektedir)				
HirisPlex (Saç rengi)	Siyah	Kahverengi	Sarı	Toplam Örnek Sayısı
Siyah	16,66	83,33	0	6
Kahverengi	0	93,33	6,66	15
Sarı	0	25	75	4

Larva örnekleri saç rengi tahmin başarı oranları ise şu şekildedir; Fenotipi doğru olarak tahmin edilen 14 örneğin, kahverengi olarak bilinen 12'si, içinde en düşük p-değeri T21-XY-122L (0,498) kodlu örnekte ve en yüksek değeri T21-XY-138L (0,83) kodlu örnekte gözlendi. Sarı olarak bilinen 3 örnek içinde en düşük p-değeri T21-XY-106L (0,55) kodlu örnekte ve en yüksek T21-XX-137L (0,794) kodlu örnekte belirlendi. Siyah renkli olarak T21-XX-116L (0,798) kodlu tek örnek görülmüştür. Ayrıca fenotip tahminleri doğru olarak değerlendirilen örneklerinden elde edilen en düşük sayıda SNP lokusu (15 SNP) T21-XY-106L kodlu örnekte ve en yüksek sayıda SNP lokusun (23 SNP) T21-XX-132L kodlu örnekte olduğu tespit edildi (Tablo VIII, Tablo X).

Yanlış olarak tahmin edilen 9 örneğin 6'sı siyah görülmesi gerekirken 3 kahverengi, 2 kızıl, 1 sarı olarak tahmin edildiği, 2'sinin kahverengi görülmesi gerekirken 1 siyah, 1 sarı olarak tahmin edildiği, geriye kalan tek örneğin sarı olarak görülmesi gerekirken kahverengi olarak tahmin edildiği görüldü. Ayrıca fenotipleri yanlış olarak değerlendirilen örneklerden elde edilen en düşük sayıda SNP lokusu (11SNP) T21-XX-186L kodlu örnekte ve en yüksek (23 SNP) T21-XX-99L kodlu örnekte olduğu tespit edildi (Tablo VIII, Tablo X).

Sonuç alınamayan 7 örneğin 5'inde DNA tespit edilmedi, geriye kalan 2 örnekte ise en az (10 SNP) T21-XY-104L kodlu örnekte ve (9 SNP) T21-XY-107L kodlu örnekte değerlendirme yapmaya yetecek kadar lokus olmadığı görüldü (Tablo X). Saç renginin tam ve doğru değerlendirilebilmesi için MC1R geni üzerindeki 11 lokusun (N29insA, rs11547464, rs885479, rs1805008, rs1805005, rs1805006, rs1805007, rs1805009, Y152OCH, rs2228479, rs1110400) bulunması gerekmektedir.

Larvadan elde edilen genotiplerden fenotip tahmini yapıldığında kahverengi saç rengine sahip bireylerde %66, sarı saçlı bireylerde %75 ve siyah saçlı bireylerde %16 doğru tahmin yapıldığı görüldü (Tablo XIII). Saç rengi tahmininde siyah saçlı bireylerde kahverengi ve siyah p-değerlerinin birbirine yakın olduğu belirlendi. Kan örnekleri ile larva örnekleri arasında sadece kahverengi gözlü kişilerin tahmininde bir örnekte yanlış tahmin yapıldığı ve dört örnekte ise tahmin yapılamadığı görüldü (Tablo XII-XIII).

Tablo XIII: Larva örneklerinin saç rengi tahmin başarısı

HIrisPlex (Saç rengi)	% tahmin edilen (koyu sayılar tahmin başarısını göstermektedir)					Toplam Örnek Sayısı
	Siyah	Kahverengi	Sarı	Kızıl	Hesaplanamayan	
Siyah	16,66	33,33	16,66	16,66	16,66	6
Kahverengi	0	66,66	6,66	0	26,66	15
Sarı	0	0	75	0	25	4

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Adli bilimler disiplinler arası bir bilim dalıdır. Her branşın amacı temelde olay yerinden elde edilen delillerin ışığında olayla ilişkili kişilerin tespit edilmesidir. Olay yerinden elde edilecek her biyolojik delil devam eden soruşturmaların gidişatını etkileyebilmektedir. Adli amaçlı yapılan analizler ve geliştirilen çeşitli yöntemler adli DNA analizlerinden, adli entomolojik çalışmalara kadar uzanmaktadır (113). Adli entomoloji hakkında bilinen en eski kayıtlar 1300’lü yıllara (16) uzanmasına ve dünyada çeşitli çalışmalar yürütülmesine rağmen Türkiye’de adli entomoloji üzerine yürütülen çalışmalar yeni sayılmaktadır.

DNA üzerinde yer alan tek nükleotid değişimiyle meydana gelen polimorfik markırlardan biri olan SNP’ler üzerine yürütülen adli genetik amaçlı araştırmalar 2000’li yıllarda başlamış ve günümüze kadar birçok çalışma yapılmıştır. SNP’ler STR’ler ile kıyasla kısa PCR ürün uzunluklarına ve düşük mutasyon oranlarına sahip olduklarından adli genetik uygulamalarda özellikle de grede ve az DNA içeren biyolojik örneklerin analizinde tercih edilmektedirler (72,74). Son yıllarda SNP markırları kimliklendirilme amacı dışında, adli DNA fenotipleri kapsamında biyocografik soy ve fenotipik özelliklerin belirlenmesi araştırmaları oldukça önem kazanmıştır (10,79,80,85). Adli DNA fenotipleme çalışmalarında temel amaç; kişinin saç, göz ve ten rengi gibi dış görünüş özelliklerinin olay yerinden elde edilecek olan az miktarda DNA’dan kişinin kimliklendirilmesine yardımcı olmaktır.

Fenotip özelliklerinin tespiti için kullanılan SNP markırlarının adli amaçlı kullanılabilmesi için, güvenilir tahmin yöntemlerinin yanı sıra fenotipe etki eden SNP lokuslarının tam olarak biliniyor olması gereklidir. Günümüzde en çok çalışma yapılmış olan fenotip varyasyonları saç, göz ve ten rengi pigmentasyonu varyasyonlarıdır (10,96,97,100,105,107). Son yıllarda saç, göz ve ten rengini belirlenmesi ile ilgili genom

üzerinde belirli genler belirlenmiş ve bu genlerde oluşan polimorfizmlerle ilgi veri tabanları oluşturulup tahmin metotları geliştirilmiştir (85).

Adli bilimlerde uygulanması amacıyla Walsh ve ark. tarafından geliştirilen, multinominal regresyon modeline bağlı saç ve göz rengi tahmin yöntemi olan HIrisPlex sistemi 24 SNP'den oluşur (89). Bu 24 SNP'nin 6'sı (rs12913832, rs1800407, rs12896399, rs16891982, rs1393350 ve rs12203592) daha önceki çalışmalarda mavi ve kahverengi göz renginin tahmini için geliştirilen IrisPlex (8,95,96,98,102) panelinden gelmektedir. Kalan 18 SNP ise saç rengi ve renklerin açık/koyu tonları ile ilişkilendirilen bölgelerdir. Bu 18 DNA varyant ise MC1R üzerinde olan 11 SNP'den (N29insA-Indel, rs11547464, rs885479, rs1805008, rs1805005, rs1805006, rs1805007, rs1805009, Y152OCH, rs2228479 ve rs1110400) ve diğer gen bölgelerindeki 7 SNP'den (rs28777, rs12821256, rs4959270, rs1042602, rs2402130, rs2378249 ve rs683) oluşur (9,90,98). Bu 24 SNP markırı ile 63 pg'a kadar degrade olmuş ve düşük miktar DNA ile çalışıldığında tam DNA profilleri elde edilebilmiştir. Çalışma Avrupa'nın üç farklı bölgesinden 1551 kişi ile gerçekleştirmiştir. Doğruluk oranları ise sarı saç için %69,5, kahverengi için %78,5, kırmızı için %80 ve siyah için %87,5 olarak tespit edilmiştir (8). Çalışmada minimum eşik değerleri göz renkleri; mavi 0,8, kahverengi için 0,6 olarak alınmıştır. Saç renkleri; sarı 0,4, kahverengi 0,4, kırmızı 0,9 ve siyah için 0,5 olarak alınmıştır. Ayrıca saç renkleri açık ton için 0,4, koyu ton için 0,5 değerleri minimum eşik değeri olarak alınmıştır (8).

Diyabetik yaralar ve DNA degradasyonu

Diyabetik yaralarda özellikle de ayak parmakları ve topuklarda görülen ayak ülseri, nöropati ve damar yetmezliği gibi çeşitli sebeplerin neden olduğu yaygın komplikasyondur. Açık yaralar çeşitli mikroorganizmalar tarafından kolonize edilebilir. Diyabetik yaralarda sıklıkla aerob, anaerob bakteriler ve mantarlar görülür. İmmün yetmezliği ve dolaşım

bozukluğu bu duruma ortam hazırlar. Yaralarda polimikrobiyal topluluklar sıklıkla görülür. Yarada *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ve *Propionibacterium*, türlerine ait bakteriler görülebilir. Bunlarda en çok tespit edileni ise *Staphylococcus aureus* dur (114,115). Patojen bakteriler yara üzerinde biyofilm oluşturular, aerob olanlar dokuları yüzeyden tahrip ederken aneorob olan bakteriler ise daha derinlere kadar ilerleyebilir. *S. aureus* gibi proteaz, lipazlar, nükleazlar, hiyalüronidazlar, hemolizinler ve kolajenaz gibi enzimlerine sahip bakteriler dokuda enfeksiyonu ve nekrozu arttırır (115). Kan dolaşımı kesilmiş bu ölü dokular üzerindeki bakteriyel ve mantar enfeksiyonları sebebiyle bu bölgelerden elde edilecek DNA enfekte ve degrede olması beklenir. Bu durum DNA degradesyonu PCR sonuçlarında alel kayıplarına sebep olmaktadır.

Çalışmamızda şeker hastalığına bağlı olarak açık yaraların tedavisi amaçlı steril üretilen *L. sericata* larvaları kullanıldı. Yumurtadan yeni çıkmış olan 1. evre *L. sericata* larvaları, doğrudan nekrozlu ve iltihaplı bölgenin üzerine bırakıldı. Yaranın boyutu ve durumuna göre sayıları 100 ile 1000 arasında değişen oranlarda olabilir. Yapılan çeşitli çalışmalara göre en uygun larva adedi cm^2 için en az 8-10 adet larva olacak şekilde uygulanmasıdır (116). Larvalar ekstrakorporeal sindirim ile beslenirler (116). *L. sericata* sekresyonunda genel proteazlar, Tripsin, Lösin aminopeptidaz, Karboksi peptidaz A-B, Kazein ve Elastaz enzimleri bulunmaktadır (117). *L. sericata* yara dokusunu ve üzerinde bulunan bakterilerin oluşturduğu biyofilm tabakayı güçlü proteaz enzimleri ile parçalayabilir, bu enzimler amonyak ve antibakteriyel maddeler içerir. Larva sekresyonu ile dokuları eritir ve yarı sıvı haldeki materyali yutar (117,118). Yara dokusu hava alacak şekilde sargı bezi ile sarılır, ihtiyaç durumunda sargı bezi değiştirilir. Bu değişim esnasında nekrotik doku ile beslenmeye devam eden larvalar ortamı hiçbir şekilde terk etmezler (117,119). Larvalar uygulandıktan 72 saat sonra 3 evreye (Şekil 3 ve Şekil 25) geldikleri zaman cerahatli doku ya da nekrotik doku tamamen temizlenmese bile ortamı terk ederler. Gezinme evresini tamamladıktan sonra pupa olmak için

kısalır ve fiçı şekline benzer görünüme sahip hareketsiz bir hale geçerler. Ortalama 1 hafta içerisinde pupadan erişkin sinek olarak çıkar ve hayat döngüsünü yeniden başlatır (Şekil 3 ve Şekil 8) (31).

Yara dokusu üzerinde bakteri enfeksiyonu ve *L.sericata* 'nın güçlü sindirim enzimleri sebebiyle larva kursak ve bağırsak içeriklerinde degrede insan DNA'sı yanında bakteri DNA'sı bulunması muhtemel olacaktır. Bu sebeple larva kursak ve bağırsak içeriklerinden elde edilecek DNA, PCR aplikasyonu sırasında yanlış bağlanmalar yapabilir. Bu durumda PCR sonuçlarında artefakt pikler, alel eklenmeleri olarak gözlenebilir.

Olay yerinden veya cesetten alınan larva örnekleri ile ilgili DNA analizleri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Ayrıca FDP çalışmaları da günümüzde klasik DNA analizlerine göre nispeten daha yeni araştırmalardır. Adli entomoloji çalışmalarında *L.sericata* larvalarının kursak içeriğinden adli DNA fenotiplemesi ile ilgili literatürde bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, ceset ilk olay mahallinden taşınmış olsa dahi, şüpheli olay yerinde bulunacak larvaların kursak ve bağırsak içeriklerinden, insana ait DNA elde edilmesi, HirisPlex sistemi kişinin saç ve göz renginin tahmin edilmesidir. Ayrıca degrede olacak örneklerde DNA degradasyonun etkilerini belirlemektir.

Bu çalışmada 30 kişiden kan ve larva örnekleri toplanan örneklerden DNA elde edildi ve kişilerin HirisPlex genotipi, adli genetik araştırma laboratuvarlarında kullanılan minisekanslama yöntemine dayalı SNaPshot™ kiti ile belirlendi. Yöntem az miktarda DNA örneği ile çalışmaya uygun olması ve ayrıca kapiler elektroforezde yürütmeye uygunluğu sebebiyle tercih edilmektedir (76,98,107,120). Bu çalışmada fenotip özellikleri bilinen 30 kişiden elde edilen tüm genotip sonuçları değerlendirmesi multinominal regresyon istatistiği kullanılarak geliştirilen (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) online HirisPlex programı ile yapıldı.

Larvalardan elde edilen insana ait DNA ve degradasyon

L.sericata larvalarının diyabet yaralarında kullanmasının en önemli sebebi canlı insan dokusunda parazitlik yapmamasıdır (117). GETAT merkezine tedavi amaçlı gelen hastaların büyük çoğunluğu bu merkeze doku ya tamamen nekroza uğradıktan ve belirli bir bölgede dolaşım bozukluğuna bağlı olarak çürüme ilerledikten sonra ya da amputasyon sonrası yara pürülan durumdayken gelmektedir. Genelde gelen hastaların durumunu ölüm sonrası ilk 72 saat içerisinde olan değişikliklere benzetmek yanlış olmaz, kan dolaşımı duran bölgede kanın pıhtılaşması, morluklar ve fiksasyonun meydana gelmesi, bakteri aktivitesine bağlı kokuşma sürecinin başlaması ve dokuda meydana gelen değişiklikler ve son olarak kanın yeniden sıvılaşması benzer özellikler olarak sayılabilir. Hastalar bu aşamada geldiklerinde ilk larva uygulamasını takiben 72 saat içinde merkeze tekrar geldiklerinde yara dokusu üzerinde (Şekil 23, 25) beslenmelerine devam eden 3. evre larvalar kursak ve bağırsak içerikleri dolu şekilde olduğu görülür. Bu durumda toplanan numunelerde insana ait verimli DNA elde etmek mümkün olmaktadır.

Larvalar kursak ve bağırsak içeriklerinden insan DNA'sı eldesi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bu araştırmalarda, larvaların nasıl, ne kadar toplanması, nasıl saklanması, en ideal izolasyon yöntemi gibi birçok farklı araştırma yapılmıştır (12,33,55,57,62,64,66,67,121,122). Bu çalışmalardan biri olan Di Luise ve ark. (55) göre en ideal sonuçların alınabilmesi için en az 8 adet larva toplaması gerekir. Larva örneklerini diseksiyon sürecine kadar %70'lik etanol içinde ve kaynatma işlemi sonrası -20°C de olmak üzere iki farklı koşulda saklamıştır. Kaynatma işlemi sonrası insan DNA kalıntılarının bozulmasının arttırdığı görülmüştür. Çalışma sonucunda 6 otozomal ve 7 Y kromozom profili elde edilmiştir.

Njau ve ark. (61) yaptıkları çalışmada ideal sayı 10 olarak belirlenmiştir. Dikseksiyon işlemine kadar toplanan larvaları kaynatma işlemi ardından %70'lik etanolde bekletmişlerdir. Diseksiyon öncesi dış kontaminasyonu engellemek amaçlı numuneler 20 dakika %20'lik çamaşır suyunda bekletilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre insana ait 16 lokus STR profili elde edilebilmiştir.

Powers ve ark. (62) yaptıkları çalışmada farklı iki tür ve farklı adetlerde örnek toplamışlardır (en az 16 adet *Calliphora augur*, 20 adet *Calliphora stygia*). Bu çalışmada diğerlerinden farklı olarak sinekler kontrollü deney ortamında insan semeni ve sığır ciğeri ile beslenmişlerdir. Çalışmanın sonucuna göre *C. stygia* larva aşamaları ve pupa örneklerinde 0,002–0,008 ng/μl insana ait DNA örnekleri tespit edilmiştir ve ayrıca *C. stygia*'ya ait tüm örneklerden toplamda 28 STR lokus elde edilmiştir. *C. augur*'dan ise erişkin numunelerde insan DNA'sı elde edilememiş, ikinci ve üçüncü evre larva örneklerinin bazılarının kursak ve bağırsak içreklerinde az miktarda degrede olmuş insana ait DNA saptanmıştır.

Mukherjee ve ark. (50) yaptıkları çalışmada 1,3 ve 5 larva olacak şekilde kursak ve bağırsak içerikleri ekstrakte edilmiştir. Diseksiyon işlemine kadar larva örnekleri -20°C' de dondurma ve %98 etanol içinde bekletmeyi tercih etmişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre minimum veri elde edilecek alt sınırın 3 adet olduğu tespit edilmiştir.

Chamoun ve ark. (66,67) yaptıkları ilk çalışmada 10 ile 15 arası larva örnekleri ve 10 adet pupa örneği almışlardır. Sineklerin yumurtladığı günden itibaren 24 saatlik aralıklarla 192 saatlik sürede larva ve pupa örnekleri almışlardır. Diseksiyon sürecine kadar örnekler %70'lik etanol içinde bekletilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre numuneler bireysel olarak değerlendirildiğinde insana ait olduğu tespit edilen 5 ile 11 lokusluk sonuçlar görülmüştür. 96'ncı ve 168'nci saatlerde alınan numunelerden sonuç alınamamıştır.

Kondakci ve ark. (4) yaptıkları çalışmada *L.sericata* kursak ve bağırsak içeriklerinden insana ait DNA'dan SNP ve STR miktarı araştırılmıştır. Çalışmada numune altı sınır olarak 8 örnek alınmıştır. Diseksiyon işlemine kadar örnekler -20 °C'de saklanmıştır. Diseksiyon öncesi dış kontaminasyonu önemek amacıyla %20'lik çamaşır suyu kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre insana ait oldukça degrede STR lokusları elde edilmiştir. Yazar SNP analizleri daha uygun sonuçlar bulunacağı görüşündedir.

Sanavio ve ark. (64) yaptıkları çalışmada mumya üzerinde buldukları larva kalıntıları ve pupa örneklerini -20 °C'de diseksiyon işlemine kadar muhafaza etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre örneklerinden 2 ng DNA elde edebilmişlerdir. Fakat insana ait olmadığı tespit edilmiştir. Yazara göre bu durumun sebebi larvaların yeteri kadar beslenecek doku bulamamasıdır.

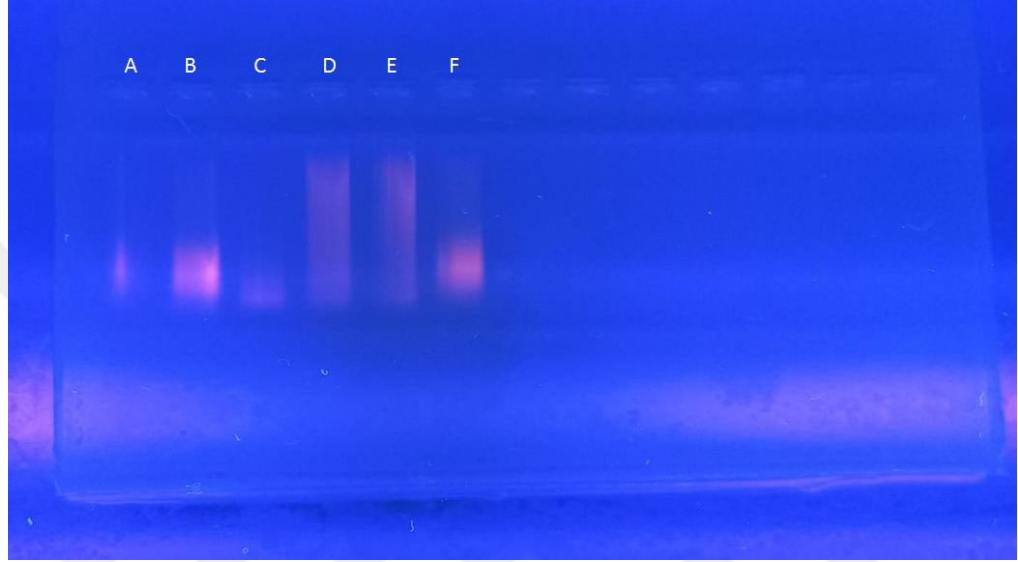
Bu tez çalışmasında diğer birçok çalışmada olduğu gibi alt sınır 8 adet olarak alındı. Örnekler en düşük larva sayısı 8 (T21-XY-139L), en fazla 70 (T21-XX-116L) adet olacak şekilde toplandı. Larvalar kaynatma işlemine maruz bırakılmadan -20 °C' de dondurularak diseksiyon sürecine kadar saklandı. Diseksiyon öncesi çevresel kontaminasyonu engellemek amacıyla 2 saat kadar %20'lik çamaşır suyunda bekletildi. Alınan örnek sayısının fazla olasında rağmen miktar tayini aşmasında elde edilen en az DNA miktarının 0,108 ng (T21-XY-100L) ve ölçülebilen en yüksek değer 97 ng (T21-XX-118L) olduğu görülmüştür (Tablo VI). Toplanacak larvaların post feeding evreye (beslenme sonrası) (Şekil 5) geçip geçmediği de dikkate alınmalıdır. Post feeding evrede larva beslenmez ve kursak ve bağırsak içeriklerinin tamamen sindirilir ve larva aşamasının son basamağı olan pupa durumuna geçmek için dokuyu terk eder. Bu aşamada alınan örneklerden HİrisPleks sisteminde kullanmak için yetecek kadar DNA elde edilmemektedir. Çalışmamızda larva örneklerinin tamamı 3'üncü evre olduğu, kursak ve bağırsak içeriklerinin dolu olduğu görülmüştür. Larva örneklerinden sonuç

alınamayan 5 örnek olmasına karşılık, elde edilen en düşük SNP oranı 9 lokus (T21-XY-107L) en yüksek ise 23 lokus (T21-XX-124L ve T21-XX-132L) olduğu görülmüştür. HirisPlex sisteminde saç ve göz rengini birlikte değerlendirmeye uygun en düşük 14 SNP lokuslu T21-XX-118L kodlu (97 ng DNA) örnekte olduğu görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda kullanılan DNA miktar tayini çift zincirli tüm DNA'ları (bakteri, insan ve larvalar dahil) ölçmektedir. Sadece insana özgü bir DNA miktar kiti kullanılmadığından elde edilen DNA miktarları yüksek olsa da bunların tamamı insan ait olmayabilir.

Larvaların üzerinde beslendiği nekrotik ve pürülan dokunun daha da parçalanmasına sebep olan biyofilm üreten, aneorob bakteriler olduğu bilinmektedir. Fakat *L.sericata* larvalarının biyofilm tabakaları etkisiz hale getirdikleri tespit edilmiştir (117).

Larvalar sindirim enzimlerini bulundukları ortama salgılar ve ölü dokunun parçalanmasından sonra bu sıvı ile beslenirler. Bu durumdan yola çıkarak çalışmamızda karşılaştığımız, yürütmeler sonucunda larva profillerinde kan profillerinden farklı olarak ortaya çıkan alel değişimleri tartışılabilir. Yara dokusu üzerinde biyofilm oluşturduğu bilinen ve en sık görülen üç önemli bakteri türü vardır. Bunlar *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ve *Propionibacterium*’dur. Bağışıklık sistemin baskılanmış olması, kan dolaşımının da durması bu bakterilerin popülasyonunun hızla artmasına sebep olur. Larvalar sekresyon ile bu bakterileri ve ölü dokuları parçalar ardından sindirir. *Staphylococcus aureus* (123) ile yapılan birçok genotiplendirme ve tanımlama çalışmaları mevcuttur. Larva kursak ve bağırsak içeriğinde insana ait DNA, bakteri DNA'sı ile kontamine olmuş veya bakteri DNA'sı yoğunluğu sebebiyle floresan boyalı SNaPshot ddNTP leri yanlış lokuslara bağlanmış olabilir. Sonuç olarak da elektroforegramda elde edilen genotiplerde alel eklenmesi veya düşmesi şeklinde alel değişiklikleri görülebilir. Bu durumda kan ve larva örneklerinden elde edilen genotip ve fenotip değerleri arasında bir fark yaratmaktadır (Tablo VII-VIII). Şekil 46'daki jel elektroforezi bu

durumun en iyi örneğidir. DNA miktarları yüksek çıkmasına karşılık yürütme sonucunda C,D ve E kolonlarındaki örneklerde degradasyon görülmektedir ve bu örneklerden fenotip sonuçları alınamamıştır. B ve F kolonlarındaki örneklerden ise profil elde edilebildiği görülmüştür.



Şekil 46: Agaroz jel elektroforezi (A) Boş, (B) T21-XY-138L kodlu (70 ng DNA) örnek, (C) T21-XY-123L kodlu (19,5 ng DNA) örnek, (D) T21-XX-118L kodlu (97 ng DNA) örnek, (E) T21-XY-117L kodlu (69 ng DNA) örnek, (F) T21-XY-139L kodlu (50,8 ng DNA) örnek.

Bu duruma ek olarak, diseksiyon işlemi öncesi çevresel kontaminasyonu önlemek amacıyla uygulanan dezenfeksiyon işlemleri de çalışmayı etkileyebileceği unutulmamalıdır.

HirisPlex Sisteminin Hassasiyeti ve Degradasyon Çalışmaları

Walsh ve ark. yaptıkları çalışmada olay yerinde bulunabilecek biyolojik delil niteliği niteliğinde örnekler (kan, tükürük, semen, köklü saç) ile HirisPlex sisteminin hassasiyetini test etmişlerdir. 63 pg'a kadar degrade olmuş ve düşük miktar DNA ile çalışıldığında tam DNA profilleri elde edilebilmiştir (8,89).

Chaitanya ve ark. (124) 2. Dünya Savaşından kalan kalıntılar ile yaptıkları çalışmada Slovenya'nın 6 farklı bölgesinden insana ait 70 yıllık kemik ve diş kalıntılarından oluşan toplamda 49 örnek toplamışlardır. Örnekler ekstraksiyon sürecine kadar -20 C'de muhafaza edilmiştir. En düşük DNA miktarı 4 pg ve en yüksek DNA miktarının 313 pg olduğu görülmüştür. HirisPlex sisteminin hassasiyetini test etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre 41 örnekte N29insA lokusunun alel drop-out olduğu görülmüştür. İskelet kalıntılarından yüksek başarı oranı ile saç ve göz rengi tahmini elde edildiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da N29insA lokusu tüm örneklerde alel kaybına uğramıştır (Tablo VII). Bu bölge Walsh ve ark. çalışmalarında da en düşük pik yüksekliğine (RFU değerine) sahip bölge olup, hassasiyet çalışmalarında ilk kaybolan piktir (8).

Kukla-Bartoszek ve ark. (125) yaptıkları çalışmada 1939-56 yılları arasında gömülmüş olan insan kalıntılarının NGS yöntemi ile HirisPlex-S sistemi ile saç, göz ve ten rengi analizleri çalışılmıştır. Çalışmada farklı degradasyon seviyelerine sahip 63 kemik ve diş örnekleri toplanmıştır. Diş ve kemikler 0,05% lik Tween® 20 ile yıkanmış distile su ile durulanıp UV altında kurutulmuştur. DNA konsantrasyonları ile 0,0008 ile 2,615 ng arasında olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre 35 örnekten tam DNA profili, 23 örnekten kısmi DNA profil sonuçları alınmış, fakat 5 örnekten DNA profili elde edilememiştir. 23 kısmi profilde 6 örnekte göz rengi ve 10 örnekte de saç rengi hesaplanamamıştır. En çok drop-out meydana gelen lokuslar ten rengi SNP bölgeleri olan rs10756819, rs1470608 ve rs1545397 olduğu görülmüştür.

Pajnič (126) yaptığı çalışmada 1944 yılında öldürülen bir kadının iskelet kalıntılarının NGS teknolojisi ve HirisPlex sistemi yardımıyla fenotip tahmini üzerine araştırma yürütmüştür. Alınan örnekler %5'lik Alconox® deterjanı ile dezenfekte edilmiş ve ekstraksiyon işlemine kadar -20 C'de saklanmıştır. Degrede olmuş kemik kalıntıları ve diş örneklerinden 0,09- 9,36-

ng DNA elde etmiştir. Aynı kişiye ait 4 farklı örnekten kısmi profil verileri elde edilmiş, bu verilerin birleştirilmesi ile rs312262906 lokusu hariç 23 SNP noktası belirlenmiş ve tam bir fenotip profili çıkarılmıştır.

Bu tez çalışmasında da yukarıdaki çalışmalarda olduğu gibi degrede örnekler (larva örnekleri) ve gönüllülerden alınan kan örnekleri çalışılmıştır. Walsh ve ark (8) yaptıkları çalışma haricinde diğer bütün araştırmacılar en az 70 yıllık olan iskelet kalıntıları ile benzer saklama koşulları altında çalışılmıştır. Kemik ve diş kalıntılarından elde edilen DNA'dan tam profiller elde edildiği gibi, bizim çalışmamızda da olduğu üzere kısmi profil elde edilen örnekler de görülmüştür.

Çalışmamızda kan örneklerinde Walsh ve ark. belirlemiş oldukları eşik değerinin altında profil veren örnek görülmemiştir. Çevresel kontaminasyonun fazla olduğu ve birçok farklı etkenin bir arada bulunduğu larva örneklerimizde ise, alel kayıpları olmasına rağmen birçok örnek için doğru fenotip tahminleri yapıldığı görülmüştür. Çalışmamızda larva örneklerinde elde edilen genotipler tam profil (N=9), kısmi (N=16) profil ve sonuçsuz (N=5) olarak üçe ayrılmıştır (Şekil 44). Göz rengi için tam veya kısmi profil edilen 25 örneğin 17'sinde (%68) doğru göz rengi tahmini yapılmıştır. Geriye kalan örneklerin 7'sinde ise (%28) bir fenotip sonucu alınamamıştır. Bu örneklerde rs12913832 (HERC2) aleli eksik olması sebebiyle göz rengi elde edilememiştir. rs12913832 varyantı göz renginin belirlenmesinde en etkili SNP varyasyonudur. Bu SNP bölgesinin tiplenemediği örneklerde göz rengi tahmini HirisPlex sisteminde yapılamamaktadır (9,89). Bunun yanında larva örneklerinde göz rengi tahmininde yalnızca bir örnekte (% 4) yanlış göz rengi tahmini gözlemlendi. Kısmi profil elde edilen bu örnekte (T21-XX-118L) göz rengi için en önemli olan SNP genotipinin rs12913832 (CC) olarak gözlemlendiği görüldü.

Çalışmamızda yeşil göz rengine sahip üç gönüllünün kan örneklerinde (T21-XY-111K, T21-XX-113K ve T21-XY-123K) göz rengi ise kahverengi olarak tahmin edildi. Bu paneli geliştiren Walsh ve ark. HirisPlex sistemi hassasiyet çalışmalarında mavi ve kahverengi göz renkleri üzerine yüksek doğruluk oranlarında tahmin yapabildiklerini fakat yeşil, ela ve ara göz renkleri üzerinde tahmin oranlarının düştüğü ve doğru tahmin yapılamadığını bildirmişlerdir (8,90). Bu sebepten ara göz rengine sahip bu üç örneğin fenotip tahminin kahverengi olarak görüldüğü tespit edilmiştir. Larva örneklerinden ise yeterli miktar DNA elde edilemediği için sonuç alınamamıştır. **Göz rengi tahmini değerlendirildiğinde, hem kan örneklerinde (%100) hem de larva (>%66) mavi ve kahverengi göz rengine sahip kişilerin genotipten fenotip tahmin başarısının yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo X ve XI).**

Çalışmamızda saç rengi için larva örneklerinde elde edilen fenotip tahminine bakıldığında 25 örneğin 14'sinde (%56) doğru saç rengi tahmini yapılmıştır. Geriye kalan örneklerin 2'sinde ise (%8) bir fenotip sonuç alınamamıştır (Şekil 44). Bu örneklerde (T21-XY-104L ve T21-XY-107L) MC1R (11 SNPs), rs2402130 (SLC24A4) ve rs12203592 (IRF4) alel eksiklikleri sebebiyle saç rengi elde edilememiştir. Saç rengi tahmini için özellikle MC1R geni üzerindeki 11 SNP noktası en etkili olanlarıdır (8,90). Saç rengi tahmininde 9 örnekte (%36) yanlış saç rengi sonuçları alındığı görüldü. Bilinen fenotipi siyah olmasına rağmen iki örnek (T21-XX-119L ve T21-XY-121L) kırmızı olarak görülmüştür. Kırmızı saç rengi için MC1R üzerindeki rs1805008, rs1805007, rs1805009, rs11547464, N29insA ve Y152OCH lokuslarının etkili olduğu ayrıca MC1R dışında olan rs12913832 (HERC2), ve rs2378249 (PIGU/ASIP) lokuslarının da kırmızı saç rengi tahminini için etkili noktalardır (8,90). Saç rengi tahmin başarı oranlarına bakıldığında en yüksek tahmin başarısını kahverengi bireyli kişilerde olduğu (%93 kan, %66 larva) görülmüştür. Larva örneklerinde siyah saç rengine sahip kişilerde genellikle kahverengi olarak tahmin edildiği gözlemlendi. Bunun yanı sıra HirisPlex sistemindeki eşik değerler ve eksik alellerle yapılmayan p-değeri hesaplarından dolayı bazı örneklerde saç rengi

tahmini yapılamadı. Bu da aslında yanlış tahmin yapmaktansa hiç tahmin yapılmamasının da önemli olduğunu göstermektedir.

Saç rengi tahmini değerlendirildiğinde, hem kan örneklerinde hem de larva örneklerinden elde edilen genotiplerden fenotip tahmininde kahverengi ve sarı saçlı bireylerde tahmin başarısının (%66-93) en yüksek olduğu belirlendi. Bu çalışmadaki siyah saçlı bireylerin ise genellikle kahverenkli olarak tahmin edildiği gözlemlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmada saç rengi tahmininde göz rengi tahminine göre literatürde de belirtildiği gibi daha düşük oranda başarı elde edildi (8,80). Bunun temel sebeplerinden biri saç rengi genetiğinin göz rengine göre daha karmaşık olmasıdır.

Literatürde ilk kez yapılmış olan bu çalışma, saç ve göz rengi analizlerinde tercih edilen 24 SNP lokusu içeren HirisPlex paneli ve adli entomoloji yardımıyla, larvalardan insana ait degrade DNA'dan saç ve göz rengi tespiti üzerine yapılmıştır. Larva örneklerinde kan örneklerine göre degradasyona bağlı lokus kayıpları ve alel farklılıkları olmasına rağmen larva örneklerinden insana ait saç ve göz renginin belirlenmesine dair güvenilir ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Larvanın bulunduğu ortam şartları göz önüne alındığında iyileşme sürecindeki dokudan beslenememesi, kursak ve bağırsak içeriklerinin tamamen sindirilmesi, aşırı parçalanma ya da bakteriyel kontaminasyon da neticesinde DNA degradasyonu oluşur ve bu da bazı örneklerde alel değişikliklerine veya az sayıda da olsa sonuç alınamamasına sebep olmuştur. Bu durumun dışında çevresel kontaminasyonu en aza indirmek için uygulanan dezenfeksiyon işlemleri sırasında meydana gelen aksaklıklar beklenilmedik değişikliklere sebebiyet vereceği için benzer çalışmalarda bu ve benzeri durumlar iyileştirilerek daha iyi sonuçlar görülebilir. Gelecek çalışmalar için, larvadan kaynaklı DNA kontaminasyonlarının önlenmesi için larvaların moleküler tespiti için kullanılan COI-II çalışılarak, larva profilinin insandan ayrılması, benzer

şekilde bakteri profillerinin belirlenip genotipinin çıkartılması, kısmi olarak tespit edilen profillerin sayısını azaltacaktır. Ayrıca NGS gibi yeni teknolojiler ile genotiplerler daha başarılı olabilir.

Sonuç olarak; Adli entomoloji ve adli genetik, disiplinler arası çalışmalara ve gelecek araştırmalara açık alanlardır. Dünya genelinde adli entomoloji alanında, larvalardan elde edilecek veriden cesedin kimlik tespiti ya da tecavüzü örtmek amacıyla işlenen cinayet vakalarında failin kimliğini tespit etmek için larva kursak ve bağırsak içerikleri kullanılmaktadır. Fakat larva kursak ve bağırsak içeriklerinden kişinin fenotip tahminine yönelik çalışma yapılmamıştır. Bu sebeple larvalardan kişilerin fenotiplerinin belirlenmesine yönelik yürüttüğümüz bu çalışma ile adalet sistemine diğer delillerle birlikte yardımcı olacağı da unutulmamalıdır. Bu çalışmayla ileri derecede çürümüş ve kimliği belirlenemeyecek durumda olan veya yeri değiştirilen cesedin ilk olay yerinde bulunacak larvaların kursak ve bağırsak içeriklerinden elde edilen insana ait DNA örnekleri ile, kişi ya da kişilerin fenotipleri hakkında bilgi sahibi olmamıza katkı sağlamaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Kulshrestha P, Satpathy D. Use of beetles in forensic entomology. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2001 Aug;120(1–2):15–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073801004108>
2. Clark K, Evans L, Wall R. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2006 Jan;156(2–3):145–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073805000290>
3. Arnaldos MI, García MD, Romera E, Presa JJ, Luna A. Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2005 Apr;149(1):57–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073804003470>
4. Kondakci GO, Bulbul O, Shahzad MS, Polat E, Cakan H, Altuncul H, et al. STR and SNP analysis of human DNA from *Lucilia sericata* larvae's gut contents. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2009 Dec;2(1):178–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176809001607>
5. Kester KM, Toothman MH, Brown BL, Scott Street W, Cruz TD. Recovery of environmental human DNA by insects. *J Forensic Sci*. 2010;55(6):1543–51.
6. Barnard AM. Dna Profiling From the Crop Content of Sarcophagidae Spp. Larvae. 2017;(January). Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/3293/5d8c7deed4ed413df6938dff8c8743419ac2.pdf>
7. Lee HY, Lee SD, Shin K-J. Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB Rep* [Internet]. 2016 Jul 31 [cited 2021 Feb 6];49(7):359–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27099236/>
8. Walsh S, Liu F, Wollstein A, Kovatsi L, Ralf A, Kosiniak-Kamysz A, et al. The HIRISplex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2013 Jan;7(1):98–115. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.07.005>
9. Walsh S, Kayser M. A Practical Guide to the HIRISplex System: Simultaneous Prediction of Eye and Hair Color from DNA. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2016. p. 213–31. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3597-0_17
10. Bulbul O, Zorlu T, Filoglu G. Prediction of human eye colour using highly informative phenotype SNPs (PISNPs). *Aust J Forensic Sci* [Internet]. 2020 Jan 2;52(1):27–37. Available from: <https://doi.org/10.1080/00450618.2018.1484161>
11. Kondakci GO. Adli bilimlerde *Lucilia sericata* larvalarının kullanımı. [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü; 2009.
12. Marchetti D, Arena E, Boschi I, Vanin S. Human DNA extraction from empty puparia. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2013 Jun;229(1–3):e26–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.03.043>
13. Byrd JH, Tomberlin JK. Insects of Forensic Importance. In: *Forensic Entomology* [Internet]. Third edition. | Boca Raton, FL : CRC Press, Taylor & Francis Group, [2020]; CRC Press; 2019. p. 15–62. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781351163750/chapters/10.4324/9781351163767-2>
14. Açıkgöz HN. [Forensic entomology]. *Türkiye parazitolojii Derg* [Internet]. 2010;34(3):216–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20954127>
15. Karataş D, Darılmaz MC. A preliminary study on aquatic forensic entomology in Turkey. *Turkish J Forensic Med* [Internet]. 2018;32(1):18–29. Available from: https://www.journalagent.com/z4/download_fulltext.asp?pdire=adlitip&plng=eng&un=ADLITIP-48091
16. Benecke M. A brief history of forensic entomology. *Forensic Sci Int*. 2001;120(1–2):2–14.
17. Anderson GS. Determining time of death using blow fly eggs in the early postmortem interval. *Int J Legal Med*. 2004;118(4):240–1.
18. Aventaggiato RGL. Gagliano-Candela2001. 2001;197–203.
19. Bourel B, Tournel G, Hedouin V, Deveaux M, Goff ML, Gosset D. Morphine extraction in

- necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. *Forensic Sci Int*. 2001;120(1-2):127-31.
20. Introna F, Campobasso C Pietro, Goff ML. Entomotoxicology. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2001 Aug;120(1-2):42-7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073801004182>
 21. Kökdener M. Adli bilimlerde entomolojinin uygulanması. *Türkiye Entomoloji Bülteni* [Internet]. 2016 Aug 15;6(3):269. Available from: <http://dergipark.gov.tr/doi/10.16969/teb.90382>
 22. Sharanowski BJ, Walker EG, Anderson GS. Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons. *Forensic Sci Int*. 2008;179(2-3):219-40.
 23. Buckland PC, Smith KG V. A Manual of Forensic Entomology. *Am J Archaeol* [Internet]. 1988 Apr;92(2):287. Available from: <https://www.jstor.org/stable/505635?origin=crossref>
 24. Tüzün A, Yüksel S. Postmortem İnterval'in Saptanmasında Adli Entomoloji. *Türkiye Klin Adli Tıp Derg*. 2007;4(1):23-32.
 25. Savran BE Al. Journal of forensic medicine & toxicology. *Adli Tıp Derg*. 1994;10(5):143-52.
 26. Amendt J, Krettek R, Zehner R. Forensic entomology. *Naturwissenschaften* [Internet]. 2004 Feb 1;91(2):51-65. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00114-003-0493-5>
 27. Arnott S, Turner B. Post-feeding larval behaviour in the blowfly, *Calliphora vicina*: Effects on post-mortem interval estimates. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2008 May;177(2-3):162-7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037907380700833X>
 28. Matuszewski S. Post-Mortem Interval Estimation Based on Insect Evidence: Current Challenges. *Insects* [Internet]. 2021 Apr 1;12(4):314. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4450/12/4/314>
 29. Verves Y, Barták M, Kubík Š. Checklist of flesh flies of Turkey (Diptera, Sarcophagidae). *Zookeys* [Internet]. 2018 Feb 28;743(743):95-136. Available from: <https://zookeys.pensoft.net/articles.php?id=22022>
 30. Benecke M. Arthropods and Corpses. In: *Forensic Pathology Reviews* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. p. 207-40. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-872-2:207>
 31. Grassberger M, Reiter C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2001 Aug;120(1-2):32-6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073801004133>
 32. Özdemir S, Sert O. Determination of Coleoptera fauna on carcasses in Ankara province, Turkey. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2009 Jan;183(1-3):24-32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073808003873>
 33. Kondakci GO, Bulbul O, Shahzad MS, Polat E, Cakan H, Altuncul H, et al. STR and SNP analysis of human DNA from *Lucilia sericata* larvae's gut contents. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2009 Dec;2(1):178-9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176809001607>
 34. Altınsoy F. Talyumun *Lucilia sericata* meigen 1826'nın larval gelişimi ve PMI tahmini üzerine etkileri. 2011;112:103-12.
 35. Bana R, Beyarslan A. Determination of Coleoptera Species of Pig Carcasses and Internal Organs of Bovine in Edirne City of Turkey *. *BEÜ Fen Bilim Derg BEU J Sci*. 2012;1(2):122-6.
 36. Polat E. Samsun Türkiye'de, Çürümekte Olan Köpek Canis Lupus Familiaris L. Leşi Üzerinde Mevsimsel Böcek Suksesyonu, Adli Bilimlerdeki Önemi. 2014;42(3):429-34.
 37. Kökdener M. Bazı Esansiyel Yağların *Lucilia sericata* Larvaları Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi. *ANADOLU J Agric Sci* [Internet]. 2021 Feb 15;36:138-45. Available from: <https://dergipark.org.tr/tr/doi/10.7161/omuanajas.845454>
 38. Kökdener M, Yılmaz AF. The Effects of Gunshot Residue Components (Pb, Ba, and Sb) on the Life History Traits of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) . *J Med Entomol*. 2021;58(6):2130-7.

39. Koç S, Can M. Ölüm Kavramı ve Ölü Muayenesi. Birinci Basamakta Adli Tıp. 2011;31.
40. Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJR. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol* [Internet]. 2011 Dec 7;7(4):379–92. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12024-010-9209-2>
41. Rodriguez WC, Bass WM. Insect Activity and its Relationship to Decay Rates of Human Cadavers in East Tennessee. *J Forensic Sci* [Internet]. 1983 Apr 1;28(2):11524J. Available from: <http://www.astm.org/doiLink.cgi?JFS11524J>
42. Greenberg B. Flies as Forensic Indicators. *J Med Entomol* [Internet]. 1991 Sep 1 [cited 2021 Jul 23];28(5):565–77. Available from: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/28.5.565>
43. Alejandra Perotti M, Lee Goff M, Baker AS, Turner BD, Braig HR. Forensic acarology: an introduction. *Exp Appl Acarol* [Internet]. 2009 Oct 16;49(1–2):3–13. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10493-009-9285-8>
44. Amendt J. Current Concepts in Forensic Entomology [Internet]. Amendt J, Goff ML, Campobasso CP, Grassberger M, editors. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. 376 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-9684-6>
45. Açıkgöz A. İnsan cesetleri üzerinden toplanan entomolojik delillerle ölüm zamanı tayini. [Doktora Tezi] Ankara Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Disiplinlerarası Adli Tıp Ana Bilim Dalı; 2008.
46. Vieira BRC, Carvalho EF, Silva DA. Analysis of human DNA present in the digestive tract of *Aedes aegypti* mosquitoes for possible forensic application. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2017 Dec;6:e324–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.124>
47. Catts EP, Goff ML. Forensic Entomology in Criminal Investigations. *Annu Rev Entomol* [Internet]. 1992 Jan;37(1):253–72. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.en.37.010192.001345>
48. Higley LG, Huntington TE. Forensic Entomology: An Introduction. *J Med Entomol* [Internet]. 2009 Sep 1;46(5):1244–1244. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128140437000054>
49. Gabbin A, D'Angiolella G, Politi C, Sanavio M. Human DNA extraction from larvae: a brief review of the Literature. *J Integr OMICS* [Internet]. 2020 Aug 31;10(2):5–9. Available from: <http://www.jiomics.com/index.php/jio/article/view/333>
50. Mukherjee S, Singh P, Tuccia F, Pradelli J, Giordani G, Vanin S. DNA characterization from gut content of larvae of *Megaselia scalaris* (Diptera, Phoridae). *Sci Justice* [Internet]. 2019 Nov;59(6):654–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2019.06.006>
51. El-Moaty ZA, Kheirallah AEM. Developmental variation of the blow fly *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) by different substrate tissue types. *J Asia Pac Entomol* [Internet]. 2013 Sep;16(3):297–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2013.03.008>
52. Tenquist JD. Rearing of *lucilia sericata* (diptera: Calliphoridae) on a modified *musca domestica* medium. *New Zeal Entomol* [Internet]. 1971 Jan;5(1):30–1. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00779962.1971.9722950>
53. Campobasso CP, Linville JG, Wells JD, Introna F. Forensic genetic analysis of insect gut contents [Internet]. Vol. 26, *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. 2005 [cited 2021 Feb 20]. p. 161–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15894851/>
54. Mohammad Z, Alajmi R, Alkuriji M, Metwally D, Kaakeh W, Almeaiweed N. Role of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Maggot Crop Contents in Identifying Unknown Cadavers. Brundage A, editor. *J Med Entomol* [Internet]. 2021 Jul 29 [cited 2021 Feb 20];58(1):93–8. Available from: <https://academic.oup.com/jme/advance-article/doi/10.1093/jme/tjaa147/5877892>
55. Di Luise E, Magni P, Staiti N, Spitaleri S, Romano C. Genotyping of human nuclear DNA recovered

- from the gut of fly larvae. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2008 Aug;1(1):591–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187517680800108X>
56. Ames C, Turner B, Daniel B. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species - *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria*. *Forensic Sci Int*. 2006;164(2–3):179–82.
 57. Tuccia F, Giordani G, Vanin S. A combined protocol for identification of maggots of forensic interest. *Sci Justice* [Internet]. 2016;56(4):264–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scijus.2016.04.001>
 58. Nelson LA, Wallman JF, Dowton M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med Vet Entomol*. 2007;21(1):44–52.
 59. Meiklejohn KA, Wallman JF, Dowton M. DNA Barcoding Identifies all Immature Life Stages of a Forensically Important Flesh Fly (Diptera: Sarcophagidae). *J Forensic Sci*. 2013;58(1):184–7.
 60. Morewitz SJ, Colls CS. Handbook of Missing Persons [Internet]. Morewitz SJ, Sturdy Colls C, editors. Handbook of Missing Persons. Cham: Springer International Publishing; 2016. 1–585 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40199-7>
 61. Njau DG, Muge EK, Kinyanjui PW, Omwandho COA, Mukwana S. STR analysis of human DNA from maggots fed on decomposing bodies: Assessment of the time period for successful analysis. *Egypt J Forensic Sci* [Internet]. 2016 Sep;6(3):261–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.04.002>
 62. Powers J, van Oorschot RAH, Durdle A. Investigation into the presence of human DNA in the various life stages of forensically relevant Calliphorid species. *Aust J Forensic Sci* [Internet]. 2019;51(sup1):S234–7. Available from: <https://doi.org/10.1080/00450618.2019.1569143>
 63. Levine ND. Myiasis in Man and Animals in the Old World. A Textbook for Physicians, Veterinarians and Zoologists. F. Zumpt. *Q Rev Biol* [Internet]. 1966 Sep [cited 2022 Feb 18];41(3):343–4. Available from: https://books.google.com.tr/books/about/Myiasis_in_Man_and_Animals_in_the_Old_Wo.html?id=S4FrAAAAMAAJ&redir_esc=y
 64. Sanavio M, Tozzo P, Nespeca P, Caenazzo L. “Mummified” human DNA extraction from larvae: A difficult genetic analysis. A case report and a brief review of the literature. *Rom J Leg Med*. 2019;27(3):297–9.
 65. Skowronek R, Tomsia M, Drożdżiok K, Kabiesz J. Insects feeding on cadavers as an alternative source of human genetic material. *Arch Med sądowej i Kryminol*. 2014;64(4):254–67.
 66. Chamoun CA, Couri MS, Louro ID, Garrido RG, Moura-Neto RS, Oliveira-Costa J. Research Article In vitro recovery and identification of Y-STR DNA from *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) larvae fed a decomposing mixture of human semen and ground beef. *Genet Mol Res* [Internet]. 2019;18(1):1–11. Available from: http://www.funpecrp.com.br/gmr/articles/year2019/vol18-1/pdf/gmr18189_-_vitro-recovery-and-identification-y-str.pdf
 67. Chamoun CA, Couri MS, Garrido RG, Moura-Neto RS, Oliveira-Costa J. Recovery & identification of human Y-STR DNA from immatures of *chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). Simulation of sexual crime investigation involving victim corpse in state of decay. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2020 May;310:110239. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110239>
 68. Budowle B, Johnson MD, Fraser CM, Leighton TJ, Murch RS, Chakraborty R. Genetic Analysis and Attribution of Microbial Forensics Evidence. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2005 Jan 11;31(4):233–54. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410500304082>
 69. Hinchliff S, Norman S, Schober J. Forensic Biology [Internet]. Forensic Biology, Second Edition. CRC Press; 2015. 1–534 p. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781439889725>
 70. Budowle B, Van Daal A. Forensically relevant SNP classes [Internet]. Vol. 44, BioTechniques. Biotechniques; 2008 [cited 2021 Feb 13]. p. 603–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18474034/>

71. McCuen RH. Book Reviews. JAWRA J Am Water Resour Assoc [Internet]. 2012 Oct;48(5):1071–3. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1752-1688.2012.00687.x>
72. Butler JM. Single Nucleotide Polymorphisms and Applications. Adv Top Forensic DNA Typing. 2012;347–69.
73. Clery JM. Stability of prostate specific antigen (PSA), and subsequent Y-STR typing, of *Lucilia* (*Phaenicia*) *sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) maggots reared from a simulated postmortem sexual assault. Forensic Sci Int [Internet]. 2001 Aug;120(1–2):72–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073801004297>
74. Budowle B, Van Daal A. Forensically relevant SNP classes [Internet]. Vol. 44, BioTechniques. 2008. p. 603–10. Available from: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000112806>
75. Butler JM, Coble MD, Vallone PM. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. Forensic Sci Med Pathol [Internet]. 2007 Nov 12;3(3):200–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12024-007-0018-1>
76. Walker JM. Forensic DNA Typing Protocols [Internet]. Goodwin W, editor. New York, NY: Springer New York; 2016. 298 p. (Methods in Molecular Biology; vol. 1420). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-3597-0>
77. Barbaro A. Manual of Forensic Science. In: Forensic Genetics [Internet]. CRC Press; 2017. p. 98–9. Available from: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781315181424>
78. Lao O, Duijn K Van, Kersbergen P, Knijff P De, Kayser M. Proportioning Whole-Genome Single-Nucleotide–Polymorphism Diversity for the Identification of Geographic Population Structure and Genetic Ancestry. Am J Hum Genet [Internet]. 2006 Apr;78(4):680–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707637057>
79. Zaorska K, Zawierucha P, Nowicki M. Prediction of skin color, tanning and freckling from DNA in Polish population: linear regression, random forest and neural network approaches. Hum Genet [Internet]. 2019;138(6):635–47. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02012-w>
80. Breslin K, Wills B, Ralf A, Ventayol Garcia M, Kukla-Bartoszek M, Pospiech E, et al. HIRISplex-S system for eye, hair, and skin color prediction from DNA: Massively parallel sequencing solutions for two common forensically used platforms. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2019;43(August):102152. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102152>
81. Sarkar A, Nandineni MR. Development of a SNP-based panel for human identification for Indian populations. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2017;27:58–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.12.002>
82. Daniel R, Sanchez JJ, Nassif NT, Hernandez A, Walsh SJ. SNPs associated with physical traits: A valuable tool for the inference of biogeographical ancestry. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser. 2008;1(1):538–40.
83. Grandell I, Samara R, Tillmar AO. A SNP panel for identity and kinship testing using massive parallel sequencing. Int J Legal Med [Internet]. 2016 Jul 1;130(4):905–14. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00414-016-1341-4>
84. Børsting C, Morling N. Mutations and/or close relatives? Six case work examples where 49 autosomal SNPs were used as supplementary markers. Forensic Sci Int Genet. 2011;5(3):236–41.
85. Ralf A, van Oven M, Zhong K, Kayser M. Simultaneous analysis of hundreds of Y-chromosomal SNPs for high-resolution paternal lineage classification using targeted semiconductor sequencing. Hum Mutat. 2015;36(1):151–9.
86. Ge J, Budowle B, Planz J V., Chakraborty R. Haplotype block: a new type of forensic DNA markers. Int J Legal Med. 2010;124(5):353–61.
87. Parson W, Fendt L, Ballard D, Børsting C, Brinkmann B, Carracedo Á, et al. Identification of West Eurasian mitochondrial haplogroups by mtDNA SNP screening: Results of the 2006–2007 EDNAP collaborative exercise. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2008 Jan;2(1):61–8. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497307001184>

88. Kayser M, De Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2011;12(3):179–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2952>
89. Walsh S, Chaitanya L, Clarisse L, Wirken L, Draus-Barini J, Kovatsi L, et al. Developmental validation of the HIRISplex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2014 Mar;9(1):150–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.006>
90. Kayser M. Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2015 Sep;18:33–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.003>
91. Canales Serrano A. Forensic DNA phenotyping: A promising tool to aid forensic investigation. *Current situation. Spanish J Leg Med* [Internet]. 2020 Oct;46(4):183–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.remle.2020.01.002>
92. Frudakis T, Terravainen T, Thomas M. Multilocus OCA2 genotypes specify human iris colors. *Hum Genet* 2007 1223 [Internet]. 2007 Jul 7 [cited 2022 Feb 14];122(3):311–26. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00439-007-0401-8>
93. Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, Helgason A, Rafnar T, Magnusson KP, et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet*. 2007;39(12):1443–52.
94. Mengel-From J, Børsting C, Sanchez JJ, Eiberg H, Morling N. Human eye colour and HERC2, OCA2 and MATP. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2010 Oct;4(5):323–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497309002117>
95. Alghamdi J, Amoudi M, Kassab AC, Al Mufarrej M, Al Ghamdi S. Eye color prediction using single nucleotide polymorphisms in Saudi population. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2019 Nov;26(7):1607–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.09.011>
96. Liu F, van Duijn K, Vingerling JR, Hofman A, Uitterlinden AG, Janssens ACJW, et al. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr Biol* [Internet]. 2009 Mar;19(5):R192–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982209005971>
97. Salvo NM, Janssen K, Kirsebom MK, Meyer OS, Berg T, Olsen GH. Predicting eye and hair colour in a Norwegian population using Verogen's ForenSeq™ DNA signature prep kit. *Forensic Sci Int Genet*. 2022;56(May 2021).
98. Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O, Kayser M. IrisPlex: A sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2011 Jun;5(3):170–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.004>
99. Ruiz Y, Chiurillo MA, Borjas L, Phillips C, Lareu MV, Carracedo Á. Analysis of the SNPforID 52-plex markers in four Native American populations from Venezuela. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2012 Sep;6(5):e142–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.02.007>
100. Ruiz Y, Phillips C, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, Casares De Cal M, Cruz R, et al. Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Sci Int Genet*. 2013;7(1):28–40.
101. Grimes EA, Noake PJ, Dixon L, Urquhart A. Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2001 Nov;122(2–3):124–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073801004807>
102. Branicki W, Brudnik U, Kupiec T, Wolańska-Nowak P, Wojas-Pelc A. Determination of Phenotype Associated SNPs in the MC1R Gene. *J Forensic Sci* [Internet]. 2007 Mar;52(2):349–54. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1556-4029.2006.00361.x>
103. Valenzuela RK, Henderson MS, Walsh MH, Garrison NA, Kelch JT, Cohen-Barak O, et al. Predicting Phenotype from Genotype: Normal Pigmentation. *J Forensic Sci* [Internet]. 2010 Mar;55(2):315–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1556-4029.2009.01317.x>

104. Branicki W, Liu F, Van Duijn K, Draus-Barini J, Pośpiech E, Walsh S, et al. Model-based prediction of human hair color using DNA variants. *Hum Genet.* 2011;129(4):443–54.
105. Tavacı İ, ŞİMŞEK SZ, SAPAN V, ARSLAN C, AŞICIOĞLU F, FİLOĞLU G, et al. Optimization and Validation of HIRisPlex Panel for Predicting of the Eye and Hair Color. *Türkiye Klin J Forensic Med Forensic Sci* [Internet]. 2021;18(1):10–20. Available from: <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-optimization-and-validation-of-h-risplex-panel-for-predicting-of-the-eye-and-hair-color-91870.html>
106. Deng L, Xu S. Adaptation of human skin color in various populations. *Hereditas* [Internet]. 2018 Dec 15;155(1):1. Available from: <http://hereditasjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41065-017-0036-2>
107. Chaitanya L, Breslin K, Zuñiga S, Wirken L, Pośpiech E, Kukla-Bartoszek M, et al. The HIRisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2018 Jul;35:123–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.04.004>
108. Stokowski RP, Pant PVK, Dadd T, Fereday A, Hinds DA, Jarman C, et al. A Genomewide Association Study of Skin Pigmentation in a South Asian Population. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2007 Dec;81(6):1119–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000292970763763X>
109. Carratto TMT, Marcorin L, Debortoli G, Silva G V., Fracasso NCA, Oliveira MLG, et al. Evaluation of the HIRisPlex-S system in a Brazilian population sample. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2019;7(1):794–6.
110. Claes P, Liberton DK, Daniels K, Rosana KM, Quillen EE, Pearson LN, et al. Modeling 3D Facial Shape from DNA. *PLoS Genet.* 2014;10(3).
111. Qiagen. QIAamp DNA Investigator Handbook. 2012;(June):1–55.
112. Qiagen. QIAamp DNA Mini Kit. Genomic DNA [Internet]. 2019;(April). Available from: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-translational-research/dna-rna-purification/dna/qiaamp-dna-mini-kit/#orderinginformation>
113. Hahn S, Mourges M, Simpson A. Forensic Sciences and Forensic Identification. In: *Forensic Odontology* [Internet]. Elsevier; 2018. p. 1–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128051986000013>
114. Jneid J, Lavigne JP, La Scola B, Cassir N. The diabetic foot microbiota: A review. *Hum Microbiome J.* 2017;5–6(November):1–6.
115. Shettigar K, Murali TS. Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(12):2235–46.
116. Wilson MR, Nigam Y, Jung W, Knight J, Pritchard DI. The impacts of larval density and protease inhibition on feeding in medicinal larvae of the greenbottle fly *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol.* 2016;30(1):1–7.
117. Polat E. Larva debridement therapy (LDT). *Türkiye Aile Hekim Derg* [Internet]. 2010;14(4):188–91. Available from: <http://www.turkailehekderg.org/search.asp>
118. Brown A, Horobin A, Blount DG, Hill PJ, English J, Rich A, et al. Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/eschar and with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Med Vet Entomol.* 2012;26(4):432–9.
119. Pritchard DI, Telford G, Diab M, Low W. Expression of a cGMP compatible *Lucilia sericata* insect serine proteinase debridement enzyme. *Biotechnol Prog.* 2012;28(2):567–72.
120. Phillips C, Salas A, Sánchez JJ, Fondevila M, Gómez-Tato A, Álvarez-Dios J, et al. Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2007 Dec;1(3–4):273–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497307001019>

121. Njau DG, Muge EK, Kinyanjui PW, Omwandho COA, Mukwana S. STR analysis of human DNA from maggots fed on decomposing bodies: Assessment of the time period for successful analysis. *Egypt J Forensic Sci* [Internet]. 2016;6(3):261–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.04.002>
122. Zehner R, Amendt J, Krettek R. STR Typing of Human DNA from Fly Larvae Fed on Decomposing Bodies. *J Forensic Sci* [Internet]. 2004 Feb 19 [cited 2021 Feb 20];49(2):1–4. Available from: <http://www.astm.org/doiLink.cgi?JFS2003248>
123. Cramton SE, Schnell NF, Götz F, Brückner R. Identification of a new repetitive element in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* [Internet]. 2000;68(4):2344–8. Available from: <https://journals.asm.org/journal/iai>
124. Chaitanya L, Pajnič IZ, Walsh S, Balažic J, Zupanc T, Kayser M. Bringing colour back after 70 years: Predicting eye and hair colour from skeletal remains of World War II victims using the HirisPlex system. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2017 Jan;26:48–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497316301752>
125. Kukla-Bartoszek M, Szargut M, Pośpiech E, Diepenbroek M, Zielińska G, Jarosz A, et al. The challenge of predicting human pigmentation traits in degraded bone samples with the MPS-based HirisPlex-S system. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2020;47(March):102301. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102301>
126. Zupanič Pajnič I. Identification of a Slovenian prewar elite couple killed in the Second World War. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2021 Oct;327:110994. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073821003145>

EKLER

Ek-1 Bilgilendirilmiş Onam Formu

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü tarafından yürütülen ve aşağıda adı geçen araştırma projesinde kullanılmak üzere fotoğraf ve biyolojik örnek (ağız içi sürüntüsü veya kan) verme yoluyla katkıda bulunmanızı dileriz. Gönüllü katılımcılarından alınacak biyolojik örnekler İ.Ü.C. Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulama ve Araştırma (GETAT) Merkezi'ne görevli olan hemşire tarafından EDTA'lı tüplere 2ml tam kan örneği olacak şekilde alınır.

Projenin adı: *Lucilia sericata* larvalarından insan saç ve göz renginin belirlenmesi

Proje Yürütücüsü: Özlem Bülbül ERCAN

Araştırmanın amacı: Soruşturma aşamasında olay yerinden elde edilecek suçluya ait olduğu düşünülen biyolojik (tükürük, kan, saç gibi) delillerden kişi ya da kişilere ait bilgiler elde edilmek istenir. Olay yeri materyallerinden elde edilecek DNA soruşturmanın aydınlatılması için önemli katkı sağlar. Elde edilen DNA'dan kişinin göz ve saç rengine ait bir tahminde bulunulursa Polis, Jandarma ve Savcılık şüpheliye ya da maktule ilişkin bilgilere daha kolay ulaşılabilir. Olay yerinde cesedin kimliği belirlenemeyecek kadar çürümüş ise veya yeri değiştirilen cesedin ilk olay yerinde larvalar bulunabilir. Bu larvalardan cesedin kimliğinin tespiti için genetik incelemeler yapılabilir. Larvaların kursağında cesede ait DNA profili belirlenebilir. Cesedin fenotipinin SNP markırları ile tayini de kişinin kimliklendirilmesine katkı sağlar. Günümüz teknolojisi ile adli fenotiplemede saç, göz, ten rengi gibi dış görünüşüne ait fiziksel özellikler genetik markırlar ile açıklanabilir.

Bu çalışmanın amacı *Lucilia sericata* larvalarının kursak içeriğinden ölçülebilir, işlevsel ve analize yetecek kalitede DNA elde edilmesi ve HIRISPLEX multipleks sistemi ile kişilerin saç ve göz renklerinin tahminin yapılmasıdır. Böylece kimliği belirlenemeyen çürümüş cesetlerde kimliklendirmeye katkıda bulunulması hedeflenmektedir.

Bilgilendirilmiş olur: Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum.

Araştırmaya gönüllü katılan kişinin

Adı – Soyadı:

Doğum yeri:

Boy:

Kilo:

Göz rengi:

Saç rengi (boyalı ise not düşünüz):

Tarih:

İmza:

Ek-2 Etik Kurul Kararı



ÖZGEÇMİŞ**Kimlik Bilgileri**

Adı Soyadı Emre DEYMENCİ
Doğum yeri
E-Posta

Eğitim bilgileri

Lise 2005-2009 Mehmetçik Lisesi, İstanbul
Lisans 2011-2014 Aksaray Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Yüksek lisans 2019 - İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Fen Bilimleri Anabilim Dalı
Yabancı dil İngilizce