

**T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ADLI TIP ANABİLİM DALI**

# **SİLİKA METODU İLE KEMİKTEN DNA EKSTRAKSİYONU**

**LEMEN DAMLA KOTAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI**

**Prof.Dr. Behnan ALPER**

**Tez No:**

**ADANA-2010**

Adli Tıp Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan **Silika Metodu ile Kemikten DNA Ekstraksiyonu** adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Prof. Dr. Behnan ALPER  
Çukurova Üniversitesi  
Adli Tıp Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mete K. GÜLMEN  
Çukurova Üniversitesi  
Adli Tıp Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ali Kemal TOPALOĞLU  
Çukurova Üniversitesi  
Çocuk Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulun .....2009 tarih ve.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil KASAP  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tezimin oluşum ve çalışma aşamasında bilgi ve deneyimleri ile desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Behnan Alper'e,

Eğitim ve tez dönemim içerisinde gösterdikleri ilgi ve destekleri için Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mete Korkut Gülmen ile ğretim yeleri Prof. Dr. Necmi ekin, Doç. Dr. Ahmet Hilal ve Kimya Yüksek Müh. Nebile Dağlıoğlu'na,

Bu tezin laboratuvar çalışması ve yazım aşamasında gösterdikleri sabır ve destekleri için Dr. Biyolog Ayşe Serin ve Dr. Biyolog Hüsniye Canan'a,

Çalışmalarımın her aşamasında bana her türlü anlayışı gösteren, yardım ve teşviklerini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Ali Kemal Topaloğlu'na,

Sevgili aileme,

TF2009YL3 nolu proje olarak bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi katkı sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

Leman Damla Kotan

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Dokunun Genel Özellikleri	3
2.2. Kemik Yapısı ve Organizasyonu	3
2.2.1. Sert Kemik (Kompakt Kemik)	3
2.2.2. Süngerimsi Kemik (Spongiyöz Kemik)	4
2.2.3. Kemik Matriksi	4
2.2.3.1. Organik Bölüm	4
2.2.3.1.1. Kollajen	5
2.2.3.2. İnorganik Bölüm	5
2.2.3.2.1. Kalsiyum	6
2.2.3.2.1.1. Hidroksiapatit	6
2.2.3.2.1.2. Fluorapatit	7
2.2.3.2.2. Magnezyum	7
2.2.3.2.3. Fosfor	7
2.3. Dekalsifikasyon	7
2.4. DNA Ekstraksiyon Yöntemleri	8
2.4.1. Organik Ekstraksiyon Yöntemleri	8
2.4.1.1. Fenol Kloroform Yöntemi	8
2.4.2. İnorganik Ekstraksiyon Yöntemleri	9
2.4.2.1. Silika Yöntemi	9
2.5. DNA Kantitasyonu	10
2.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi	10

2.5.2. Gerçek Zamanlı PCR	10
2.6. PCR (Polymerase Chain Reaction)	11
2.7. Kısa Ardışık Tekrar Dizileri	12
2.8. Kapiller Elektrophorez	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Kemik Örnekleri	17
3.2. Kan Örnekleri	17
3.3. DeneYlerde Kullanılan Malzemeler	17
3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
3.3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	17
3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	18
3.4.1. EDTA Solüsyonunun Hazırlanması	18
3.5. Çalışma Örneklerinin Hazırlanması	19
3.5.1. Kemiklerin Temizliği	19
3.5.1.1. Fiziksel Temizlik	19
3.5.1.2. Kimyasal Temizlik	19
3.5.1.3. Toz Haline Getirme (Pulverizasyon)	19
3.5.2. Dekalsifikasyon Protokolü	20
3.6. DNA Ekstraksiyonu	20
3.6.1. QIAmp Mini Kit ile DNA Ekstraksiyon Protokolü	20
3.6.2. Fenol Kloroform ile DNA Ekstraksiyon Protokolü	21
3.7. Agaroz Jel Elektrophorezi	23
3.7.1. Jelin Hazırlanması	23
3.7.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi	23
3.7.3. Elektrophorez Koşulları	23
3.7.4. Elektrophorezin Yapılışı	24
3.8. Gerçek Zamanlı PCR'da DNA Kantasyonu	24
3.9. PCR	25
3.10. Kapiller Elektrophorez	26
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	33

7. KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	39

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 3.8.</b> Gerçek Zamanlı PCR Cihazı	24
<b>Şekil 3.9.</b> Thermal Cycler Cihazı	25
<b>Şekil 3.10.</b> Kapiller Elektroforez Cihazı	26

## ÇİZELGELER DİZİNİ

**Çizelge 4.** Taze kemik dokusundan elde edilen DNA miktarı

27

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA: Deoksiribonükleik asit

STR: Short tandem repeat

PCR: Polymerase chain reaction

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

RNA: Ribonükleik asit

dNTP: Dinükleotid trifosfat

kg: Kilogram

gr: Gram

ng: Nanogram

ml: mililitre

$\mu$ l: Mikrolitre

kb: Kilo baz

M: Molar

cm: Centimeter

cc: Cubic centimeter

rpm: Revolutions per minute

g: Gravity force

$Ca^{+2}$ : Calcium ion

$PO_4^{3-}$ : Potassium ion

$H^+$ : Hydrogen ion

NaOH: Sodyum hidroksit

$Mg^{+2}$ : Magnesium ion

$^{\circ}C$ : Celcius

pH: Power of Hydrogen

mEq: mili equivalent

CCD: Charge coupled device

LIF: Laser-induced fluorescence

mA: Mili amper

V: Volt

W: Watt

K: Kadın

E: Erkek

## ÖZET

### Silika Metodu ile Kemikten DNA Ekstraksiyonu

Adli uygulamalarda ölüm olaylarının incelenmesinde en önemli aşamalardan birisi kişinin kimliğinin tespitidir. Kimliklendirme için çeşitli biyolojik delillerden DNA'ya ulaşmak mümkündür. Cesetlerin maruz kaldığı farklı fiziksel ve kimyasal faktörler sonrası DNA'nın en iyi korunabildiği ve kontaminasyondan en az etkilenen doku kemik dokusudur.

Bu çalışmada kemik dokudan silika esaslı DNA ekstraksiyon metodu ile DNA elde edilebilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada Adana Adli Tıp Kurumunda otopsi yapılan olgulardan alınan 15 adet kosta kemiği kullanılmıştır. 6 ay oda sıcaklığında bekletilen kemik örneklerinde silika temelli ticari kit olan Qiagen DNA Mini Kit ile 16 STR (D8S1179, D21S11, D7S820, CSFIPO, D3S1358, THO1, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818 ve FGA) sisteminin tanımlanabilmesi için yeterli kalite ve kantitede DNA elde edilebilmiştir. Çalışmada kullanılan 15 taze kemik örneğinden DNA eldesinde dekalsifikasyona gerek olmadığı görülmüştür.

Çalışmada kullanılan üç eski kemik örneğinin ikisinde dekalsifikasyonlu ve dekalsifikasyonsuz başarılı DNA ekstraksiyonu yapılamamıştır. Birinde ekstraksiyonda tanımlanabilir miktarda DNA bulunmamasına karşın 16 STR sisteminin çalışıldığı multiplex reaksiyonda relatif floresans ünitesi 50'nin altında olmakla birlikte D3S1358, THO1, D19S433, TPOX, AMEL ve D5S818 STR sistemleri tanımlanabilmiştir. Bu durum eski örneklerin toz haline getirilme aşamasında soğutma sistemli bir düzeneğin olmamasına bağlandı.

Elde edilen sonuçlar kemik dokudan silika temelli DNA ekstraksiyonunun Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adli Seroloji ve Genetik Laboratuvarında rutin hizmette kullanılabilirliğini gösterilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Kemik, DNA Ekstraksiyonu, Adli Bilimler, Silika, Kimliklendirme

## **ABSTRACT**

### **Silica Based DNA Extraction From Bone**

**Determining the identity of a dead person is one of the most important steps in the practise of Forensic medicine. DNA can be retrieved from a variety of biological material for the correct identification. DNA is best preserved and least likely to be contaminated in the bone tissue after a range of physical and chemical impacts on the corpse.**

**In this study, the feasibility of a silica-based method of DNA extraction from bone has been investigated. A total 15 costal bones obtained from autopsy cases at the Adana Forensic Medicine Institute has been used. Sufficient amount of good quality DNA to successfully run a 16 STR (D8S1179, D21S11, D7S820, CSFIPO, D3S1358, THO1, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818 and FGA) test has been extracted with a silica-based commercial kit, Qiagen DNA Blood Mini Kit) from six months old bones left in room temperature. It was also observed that decalcification was not necessary for the extraction of DNA from 15 fresh bones.**

**In three old bones, the DNA extraction failed with or without decalcification. In one case, although there was not a recognizable amount of DNA, we were able to determine D3S1358, THO1, D19S433, TPOX, AMEL and D5S818 in a 16 STR multiplex reaction, despite the relative fleurosence unit being below 50. This is explained by not using a system with a cooler during grinding of old samples in this study.**

**These results demonstrate that a silica-based metod of DNA extraction from bone can be employed for routine diagnostics at the Forensic Serology and Genetics Laboratory of the Çukurova University, Faculty of Medicine, department of Forensic Medicine.**

**Key words: Bone, DNA Extraction, Forensic Sciences, Silica, Identification**

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli Tıpta ölüm olaylarının incelenmesinin en önemli boyutlardan birisi kişinin kim olduğunun yani kimliğinin tespittir. Tüm şüpheli ölüm olaylarında, incelemeye ölen kişinin kimliklendirilmesi ile başlanır.

Tarihçe olarak bakacak olursak kimliklendirme için önce ana kan grup ve subgrupları kullanılmış, daha sonra ise çeşitli polimorfik eritrosit enzim ve serum proteinleri ile insan lökosit antijenleri de bu amaçla kullanılmıştır.

Kimliklendirmede Deoksiribonükleik asit (DNA) düzeyinde analiz ilk olarak 1985 yılında Jeffreys ve arkadaşları tarafından yapılmıştır<sup>1</sup>. DNA İlk kullanımından bu yana kimlik belirleme testlerinde güçlü bir araç haline gelmiştir. DNA polimorfizmlerini elde etme ve onaylama çalışmaları üzerine teknolojinin gelişmesi çok hızlı olmuştur<sup>2</sup>. 1985’de göçmenlik vakası için ilk adli DNA analizinin yapılmasının ardından, 1986’da ABD’de bir cinayet vakasında delil olarak kullanılmış ve hızlı bir şekilde diğer ülkelere yayılmıştır<sup>3</sup>.

DNA analizi için uygun deliller, nükleuslu hücreleri içeren biyolojik materyallerle sınırlıdır. Adli araştırmalarda en sık karşılaşılan doku tipi kandır. Bununla birlikte, semen, semen lekeleri, dokular, organlar, kemikler, dişler, saçlar, tırnaklar, tükürük, idrar ve diğer biyolojik sıvılar da adli kimliklendirme ve paternite amaçlı kullanılabilir<sup>4</sup>.

Degradasyonun yoğunluğuna bağlı olarak analiz amaçlı kullanılan doku tipi değişkenlik gösterebilmektedir. Adli olaylarda tercih etme şansının olmadığı, mevcut biyolojik deliller ile analiz yapılması gerektiği durumlar oldukça sıktır. Kadavralarda erken postmortem periyotta özellikle yumuşak dokularda DNA çok hızlı bir şekilde parçalanmaktadır<sup>5</sup>. Genellikle sıcak iklimlerde bakteriyel kontaminasyonla dekompozisyon çok hızlı gerçekleşmekte ve kısa bir sürede kemik dokusundan başka doku kalmamaktadır. Uçak kazaları, terörist saldırıları, doğal afetler gibi toplu ölümlerde vücut bütünlüğü bozulduğu durumlarda hem biyolojik materyalin dekompozisyonu çok hızlı olmakta, hem de örnekler tamamen birbirine karışık halde bulunabilmektedir<sup>6,7</sup>. Ayrıca mikroorganizmalar, bakteriyel enzimler, ısı, ultraviyole ışığı, nem ve mevcut nükleazlar gibi etkilere uğrayan veya parçalanan

biyolojik örneklerde analiz için her zaman yeterli miktarda DNA elde edilemeyebilmektedir. Bu tip durumlarda DNA'nın en iyi korunmuş olduğu ve kontaminasyonun en az olduğu doku kemik dokusudur<sup>8,9,10</sup>.

Populasyon ve evrim çalışmalarında da kemik dokusu DNA kaynağı olarak kullanılmaktadır<sup>11</sup>.

Birçok kriminal laboratuvarında kimliklendirme amaçlı kemik dokudan DNA analizi rutin uygulamalar arasında yer almakta ve elde edilen bilgi mahkemelerce delil olarak kullanılmaktadır.

DNA ekstraksiyonunda fenol kloroform, tuz ile çöktürme, kelatlaştırıcı ve miselleştirici yöntemler, monoklonal antikolar ve silika yöntemleri kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre avantajlı olduğu ifade edilen silika yöntemine dayalı ekstraksiyon yöntemi ile DNA elde edilebilirliği, elde edilen DNA'nın kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmesi ve bunun sonucunda yargıya bilirkişilik hizmeti veren Çukurova Üniversitesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kemik Dokunun Genel Özellikleri

Organizmadaki diğer bağ dokularında olduğu gibi kemik dokuda yapı, hücreler, kollajen lifler ve amorf maddeden oluşmuştur. Kemik ara maddesine kalsiyum çökmüştür ve bu nedenle vücudu oluşturan dokular arasında en sert olanıdır. Sertlik özelliğinden dolayı beyin, omurilik, akciğerler gibi hayati organları korumaya almakta ve aynı zamanda vücuda destek görevi yapmaktadır. Kemik dokusu beslenme, metabolik, endokrin ve mekanik koşullara çok duyarlı bir dokudur. Bu nedenle aktif doku olma özelliğini taşır<sup>12,13</sup>. Ayrıca kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içermesi ve metabolik önemi olan kalsiyumu depolaması da kemiğin destek dokusu olma dışında önemli rolleri olduğunu gösterir<sup>13</sup>.

Bunlar dışında dokuda kan ve kemik iliğinin olduğu bir de kanal sistemi bulunur. Lameller kemiğin tipik yapıları olup Havers kanalları etrafına konsentrik olarak yerleşmişlerdir. Laküna, kemik hücrelerinin yerleştiği kovuklardır ve kanalikül adı verilen ince kanallarla diğer lameldeki kovuklarla temastadırlar. Matriksin sert olması diffüzyona olanak vermemektedir.

### 2.2. Kemik Yapısı ve Organizasyonu

Kemik doku organik ve inorganik komponentlerden oluşmuştur. Ayrıca yapısal olarak da sert (kompakt) ve süngerimsi (spongiyöz) kemik olmak üzere iki farklı formda bulunur.

#### 2.2.1. Sert Kemik (Kompakt Kemik)

Kompakt kemik sıkı düzenlenmiş, boşluk içermeyen bir dokudur. Organizmada bulunan tüm kemiklerin dış yüzeyleri sert kemikle kaplıdır<sup>14</sup>. Çıplak gözle bakıldığında homojen ve dolgun bir yapıda görülen sert kemiğin mikroskopta düzenli yerleşim gösteren lameller ve kanal sistemleri içerdiği görülür. Sert bir matrikse sahip olan kemik dokusunda diffüzyon olanağı olmadığından kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve

kanaliküllerle hücelere kadar ulaşır<sup>12,13</sup>. DNA'nın çoğu kompakt kemikte osteositler içinde bulunur<sup>15</sup>.

### **2.2.2. Süngerimsi Kemik (Spongiyoz Kemik)**

Spongiyöz kemiğin düzensiz boşluklu ve dokusu gevşek bir yapısı vardır. Birbirleriyle kesişen kemik trabeküllerinden oluşur. Bu görünümü ile süngere benzer. Trabeküllerde bulunan kemik lamelleri birbirine paralel seyrederek. Trabeküllerin aralarında birbiriyle ilişkili labirent gibi düzensiz boşluklar vardır. İçleri kemik iliğiyle doludur. Bunlar gerekli olan maddeleri kemik iliğindeki damarlardan kanaliküller vasıtasıyla sitoplazmik uzantıları ile alırlar.

Sert kemikten oluşmuş ince bir tabakayla örtülü olarak bulunur. Kemik trabeküllerinden oluşması nedeniyle görünümü süngerimsidir. Kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ile yassı kemiklerin iç yüzlerinde bulunur<sup>12,13,14</sup>.

### **2.2.3. Kemik Matriksi**

Kemik matriksi iki esas öğeden oluşmuştur. Bunlardan birisi organik matriks, diğeri ise inorganik matrikstir. Kemik matriksinin zemin maddesi glikozaminoglikanlar (kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hiyaluronik asit), osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi küçük glikoproteinler ve birkaç sialoproteinden oluşur<sup>14</sup>.

#### **2.2.3.1. Organik Bölüm**

Organik bölüm kemiğin %30'unu oluşturur. Kollajen ve kollajen dışı proteinlerin oluşturduğu matriks ve kemik hüceleri bu bölümün parçalarıdır. Organik bölümün %98'ini matriks, %2'sini hüceler oluşturur. Matriksin %95'ini tendon ve derinin de major yapısal proteini olan tip 1 kollajen ve daha az miktarda da tip 5 kollojen oluşturur<sup>16</sup>. Kollajen fibriller, hidroksiapatit kristallerinin birikmesi için organik çerçeve görevi görürler. Kemiğin yüksek seviyedeki dayanıklılığı ve esnekliği başta kollajen olmak üzere organik matrikse bağlıdır<sup>14</sup>. Organik elemanların eksikliğinde kemiğin esnekliği ve sağlamlığı bozulur ve kolay kırılır hale gelir<sup>13</sup>.

### 2.2.3.1.1. Kollajen

Kollajen hareket sisteminin temelini oluşturan büyük yapısal bir proteindir. Tüm vücuttaki proteinin yaklaşık dördte biri kollajendir. Özellikle kemik, kıkırdak, eklem ve liflerde bulunur. Bu protein birbiri üzerine sarılmış üç alfa zincirden meydana gelir. On dokuz değişik tipi tanımlanmıştır<sup>17</sup>.

Kollajen fibriller; bağ dokusunun tüm çeşitlerinde değişik miktarlarda yer alan, kollajenden yapılmış fibrillerdir. En çok fibroblastlar tarafından sentezlenir. Bununla beraber osteoblast, odontoblast, kondroblastlar tarafından da sentezlenirler. Belirli bir uzunlukları yoktur, gerilme ve çekilmelere karşı çok dayanıklıdır. Bu özelliklerinden dolayı tendon, ligament, kemik, diş ve deride görülürler.

Kollajen tip 1, tip 2, tip 3, tip 4 ve tip 5 olmak üzere beş tip kollojen fibril bulunur. Vücutta en fazla bulunanı tip 1 olup toplamın %30 kadarını oluşturur. Osteoblast ve odontoblastlar tarafından sentezlenir. Kemik ve tendonlarda bulunurlar<sup>18</sup>.

Kemikteki kollajen, bağ dokusundakine benzer. Organik kemik matriksinin temel yapısal birimini oluşturan kollajeni çoğunlukla tip 1 kollajen, daha az miktarda tip 5 kollajendir. Çok sert olmasına karşın, kemiklerin kolay kırılmamasını sağlayan öğeler bu kollajen fibrillerdir. Kollajen fibriller, hidroksiapatit kristallerinin birikmesi için organik çerçeve görevi görür. Bu kristaller, kollajen fibriller üzerinde minik tabakalar ve çubukçuklar oluşturacak şekilde birikir. Protein-kristal kombinasyonu kemiğin güçlü, yerine göre esnek ve kırılmaya çok dayanıklı sağlam bir doku olmasına yol açar<sup>14</sup>.

### 2.2.3.2. İnorganik Bölüm

Kemiğin inorganik bölümü bütün kemik dokusunun %70'ini kaplar. Kemik dokusuna inorganik maddeler sertlik kazandırır. Büyük çoğunluğu kalsiyum hidroksiapatit ve az olarak da fluorapatit içerir<sup>19</sup>. Bunlardan başka sitrat ve karbonat iyonları da yer alır<sup>8,14,16,20,21</sup>. Vücuttaki kalsiyumun hemen hemen tümü burada bulunmaktadır. İnorganik maddeler kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadırlar<sup>12</sup>.

### 2.2.3.2.1. Kalsiyum

İnsanda, vücuttaki atomların yaklaşık %0.31'ini ve yetişkin bir insan ağırlığının yaklaşık kırkta birini (1.2 kg) oluşturacak miktarda bulunur. Toprak alkali metali olmasından dolayı vücutta kararlı  $Ca^{+2}$  iyonları halindedir<sup>22</sup>.

Kemik doku büyük miktarlarda kalsiyum ve fosfor deposu olarak önemli rol oynar<sup>14</sup>. İnsan vücudundaki yaklaşık 1 kg kalsiyum mevcuttur ve bunun %99'u fosfat ile birlikte kemiklerde ve dişte bulunur.

Kemiklerde inorganik komponentler kuru ağırlığın % 65'ini oluşturur. Bunun %85'i kalsiyum fosfat, %10'u kalsiyum karbonat ve kalanını da kalsiyum florid, magnezyum florid, hidroksit ve sülfat bileşikleriyle sodyum ve potasyumdur. Kalsiyum ve fosfor hidroksiapatit kristallerini oluştururlar<sup>14</sup>.

Kalsiyum iyonlarının temel rolü kemik mineralizasyonuna katılmaktır. Kemik mineralizasyonu, kalsiyum tuzlarının hidroksiapatit kristalleri şeklinde kollajen fibriller üzerinde birikmesi ile gerçekleşmektedir<sup>23</sup>.

D vitamini yağda eriyen ve kemik sağlığı için gerekli olan bir vitamindir. İnce bağırsaklardan kalsiyumun emilmesini ve kemik yapımında kullanılmasını kontrol eder. Vücutta normalden fazla D vitamini bulunduğu durumlarda kemiklerde sertleşme ve yumuşak dokularda kireçlenme görülebilir. Yetersizliğinde ise kemik mineralizasyonu bozulur ve büyüme çağındaki çocuklarda raşitizm, yetişkinlerde osteomalasia (kemiğin yumuşaması), daha ileri yaşlarda osteoporoz oluşur. Bu durum kemik ağırları ve deformitesine neden olur.

#### 2.2.3.2.1.1. Hidroksiapatit

Dişlerin dentin ve mine tabakası ile kemikte bulunan bir çeşit kalsiyum tuzudur. Kimyasal formülü  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  olan hidroksiapatit, doğada elmadan sonra bilinen en sert moleküldür. Organik çözücülerde ve asit çözücüler hariç inorganik çözücülerde de çözünmez. Biyoaktif yapıda bir biyomateryaldir<sup>24</sup>.

Yüksek derecede kristalize olan hidroksiapatit in vivo olarak stabildir ve %5-10 oranında rezorbe olur<sup>25</sup>. 2001 yılında Götherstrom ve arkadaşları kristalleşme ve DNA'nın korunması arasında yüksek korelasyon olduğunu bulmuştur<sup>20</sup>.

#### **2.2.3.2.1.2. Fluorapatit**

Kimyasal formülü  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$  olan fluorapatit, hidroksiapatit ile birlikte dişlerde ve kemiklerde bulunur<sup>20</sup>. Minerilizasyonda rol alan bir bileşendir.

#### **2.2.3.2.2. Magnezyum**

İnsan vücudunda yaklaşık 20 - 28 gr magnezyum vardır. Bir erişkinde ortalama 24 gr magnezyum bulunur (1 mol veya 2000 mEq). Bunun % 1'inden azı plazmada, % 50'den biraz fazlası kemikte depolanmıştır. Ana deposu kemikler olup vücuttaki magnezyumun % 60'ı kemik ve dişlerde dir. Kalan % 40'ı kan, doku ve diğer vücut sıvılarında yer alır. Vücut bu minerali dışardan yeteri kadar alamadığı takdirde kemiklerde depolanmış olan magnezyumu tüketmeye başlar<sup>26</sup>.

#### **2.2.3.2.3. Fosfor**

Kemik ve dişlerdeki kalsiyum tuzlarında yer alan önemli bir elementtir. Vücuttaki fosforun %90'ı kemik ve dişlerde fosfat iyonu,  $\text{PO}_4^{3-}$  şeklinde bulunur.

Fosfat iyonu fosforik asidin üç hidrojen iyonu ( $\text{H}^+$ ) vermesi ile oluşur. Fosforik asit aynı zamanda bir fosfat esterini oluşturmak üzere vücutta alkol gruplarıyla reaksiyona girer. Bu organik fosfat esterleri, hücre zarlarını ve sinir dokularını oluşturan fosfolipidlerde, protein sentezini ve kalıtımı denetleyen DNA ve RNA ile koenzimlerde bulunur<sup>23</sup>.

### **2.3. Dekalsifikasyon**

Kemiğin %70'ini oluşturan inorganik bölüm kalsiyum hidroksiapatit kristallerini içermektedir<sup>8,20</sup>. Temel rolü kemik mineralizasyonuna katılmak olan  $\text{Ca}^{+2}$  iyonları kemik dokusu içerisinde geniş mineralizasyon alanlarını oluşturur. Ekstraksiyon ayraçlarına karşı fiziksel bariyer durumundaki bu bölgeler DNA içeren hücrelere ulaşmayı zorlaştırır. Sağlıklı bir şekilde DNA'ya ulaşabilmek için  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının materyalden uzaklaştırılması gerektirdiği düşünülmektedir. Kemik ve diş gibi yapısal olarak sert olan DNA kaynakları için günümüz ekstraksiyon protokollerinin çoğu toz haline getirilmiş materyalin yüksek hacimdeki etilen diamin tetra-asetik asit (EDTA)

içeren ekstraksiyon tamponunda inkübasyonunu ve ardından süpernatantın toplanması esasını temel alır<sup>8</sup>.

## **2.4. DNA Ekstraksiyon Yöntemleri**

Deoksiribonükleik asit (DNA), tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik bilgileri taşıyan bir nükleik asittir.

Mitokondrial DNA analizleri dışında, DNA analizi için uygun deliller, nükleuslu hücreleri içeren biyolojik substanslarla sınırlıdır<sup>4</sup>. Adli bilimciler, olay yerinde bulunmuş olan kan, semen, deri, tükürük ve saçın yanı sıra diş ve kemik gibi biyolojik kalıntılardaki DNA'yı kullanarak genetik parmak izine ulaşabilirler.

Genel olarak genomik DNA ekstraksiyon protokolleri; hücrelerin parçalanması ile başlar, ardından deoksinükleoproteinler ve RNA'lar ortamdaki uzaklaştırılır. Şelatlama yapan maddeler, yüksek tuz konsantrasyonu, deterjanlar ve kimyasal denatürantların kullanılması ile son bulur<sup>27,28</sup>.

DNA ekstraksiyonunda temel amaç; ortamdaki inhibitörlerin ve nükleazların giderilmesi, maksimum miktarda ve kalitede DNA elde edilmesidir.

PCR reaksiyonunda ortalama 1 ng DNA'ya ihtiyaç vardır. Bu miktar yaklaşık olarak 1/20 µl kan veya 350 sperminden elde edilen DNA miktarına denk gelmektedir. En iyi şekilde izole edilen DNA 50-150 kb arasındadır.

Adli tıpta en çok kullanılan DNA ekstraksiyon yöntemleri; organik, inorganik ve iyon değişimi esasına dayanan metotlardır.

### **2.4.1. Organik Ekstraksiyon Yöntemleri**

Organik ekstraksiyon yönteminin en önemli adımı proteinlerin ortadan kaldırılmasıdır. Tuz ile çöktürme yapılarak veya basitçe fenol kloroform izoamil alkol ile uygulanabilir.

#### **2.4.1.1. Fenol Kloroform Yöntemi**

Bu yöntem protein komponentlerini uzaklaştırarak nükleik asitleri saflaştırmayı hedeflemektedir<sup>11</sup>.

Temel olarak fenol kloroform ekstraksiyon yönteminde; fenol proteini bağlar ve etkili bir şekilde denatüre eder. Kloroform ise fenolü bağlar.

Fenol benzen halkasına OH<sup>-</sup> molekülünün bağlanmasıyla oluşan bir kimyasaldır. İyi bilinen bir kanserojen olmasının yanı sıra son derece aşındırıcıdır ve ciddi yanıklara neden olabilir. Kimyasal adı triklorometan olan kloroform ise yağları çözen ve toksik etkisi yüksek bir maddedir<sup>29</sup>. Bu nedenle fenol ve kloroform hem DNA'nın bozulmasına neden olabilir hem de kullanıcıya zarar verebilir. Ayrıca fenol kloroform ekstraksiyonunun çok basamaklı bir metod olması dolayısıyla DNA kayıplarının oluşmasını ve kontaminasyon riskini arttırması açısından uygulaması zor bir yöntemdir.

## **2.4.2. İnorganik Ekstraksiyon Yöntemleri**

Fenol ve/veya kloroform gibi organik ayıraçların kullanılmadığı ekstraksiyon metodudur. Monoklonal antikorlar ve DNA'ya özgü tasarlanmış manyetik etkileşimli silika boncuklarının kullanıldığı yöntemlerdir. İnorganik ekstraksiyon ortamdaki tuzların atımıyla proteinlerin parçalanması esasına dayanır.

### **2.4.2.1. Silika Yöntemi**

Silika yönteminde hücre parçalayıcı olarak Guanidium izotiyosiyanat kullanılmaktadır<sup>30</sup>. Guanidium izosiyanat hücrelerin parçalanması ile açığa çıkan RNA'nın degradasyonunu engelleyen bir kimyasaldır. Silika yöntemi ile DNA ekstraksiyonu guanidium izotiyosiyanatın pozitif yüklü amin grupları içeren ucuna DNA, diğer ucuna da silika parçacığının bağlanması esasına dayanan bir metottür. DNA'nın silikaya bağlanması sonrası yapılan yıkama işleminde ortamda bulunan protein ve istenmeyen komponentler uzaklaştırılır ve DNA ortamdaki daha saf halde elde edilir. Bu sayede PCR inhibitörlerinin bir kısmı da ortamdaki uzaklaştırılmış olur ve PCR için daha yüksek kalitede ve miktarda DNA izolasyonuna imkan sağlar. Fakat fazla kontaminasyon olması ve/veya farklı iyon değişimi DNA'nın silikaya bağlanması engelleyebilir ve bu gibi durumlarda pozitif sonuç alınmayabilir. Yine de yüksek molekül ağırlıklı DNA geri kazanımları için tercih edilecek en uygun metod silika yöntemidir<sup>11</sup>.

Fenol kloroform ve son yıllarda kullanımı giderek artan silika yöntemi ile kemik dokudan DNA eldesinde başarılı sonuçlar alınmaktadır. Altunçul'a göre silika ile %77,

fenol kloroform ile %59 oranında başarılı sonuç alınmıştır<sup>11</sup>. Yapılan farklı bir araştırmada silika metodu ile %94, fenol kloroform ile %77 ve chelex ile de %20 başarı sağlanmıştır<sup>31</sup>. Bir başka araştırmada silika ile %65, sodyum asetat yöntemi ile de %55 oranında başarılı sonuç alınmıştır<sup>32</sup>.

## **2.5. DNA Kantitasyonu**

### **2.5.1. Agaroz Jel Elektrofrez**

Elektrofrez, elektriksel bir alanın etkisi altında sıvı bir ortamda yüklü partiküllerin göçüdür. Farklı tipte elektrofrez yöntemler olmasına karşın nükleik asitler için iyi sonuç veren ve 200-50.000 bp boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart yöntem agaroz elektrofrezidir<sup>33</sup>.

Agaroz jel elektrofrez ile özellikle değişik kaynaklardan izole edilen DNA'ların veya enzim kesim ürünlerinin moleköl ağırlıkları ve miktarları belirlenebilir. Aynı zamanda proteinlerin yüklerine göre ayrılmasında da kullanılmaktadır<sup>34,35</sup>.

Nükleik asitlerin ayırımı için en etkin agaroz konsantrasyonları %0.3-2.0'dir. Nükleik asitlerin agaroz jeldeki hareketleri agaroz konsantrasyonu ile nükleik asit moleküllerinin boyutları ve şeklinden etkilenir. Jel uygun şekilde hazırlanırken ya da örnekler yüklenip elektriksel olarak ayrıldıktan sonra boyanır ve örneklerin görüntülenmesi gerçekleştirilir.

Agaroz jel oldukça hızlı ve kullanışlı bir teknik olması ve az miktardaki protein ya da nükleik asit karışımlarını (ayrıca nükleoprotein ve polisakkarit karışımlarını) saflaştırmakta ve analiz yapmakta yaygın olarak kullanılmaktadır.

### **2.5.2. Gerçek Zamanlı PCR**

Son yıllarda PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (Thermal cycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, gerçek zamanlı PCR (real-time PCR) olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesini sağlamıştır.

Gerçek zamanlı PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziyeye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziyeye özgün problemlardan yararlanılmaktadır. Gerçek zamanlı PCR, reaksiyon esnasında her bir PCR döngüsünde yeterli miktarda

ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp reaksiyonu her aşamasında oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir<sup>36,37</sup>.

Gerçek zamanlı PCR teknolojisinin; reaksiyon boyunca verinin toplanıp anında analiz edilebilmesi, spesifik olmayan amplifikasyonlardan etkilenmemesi, duyarlılığının yüksek olması, PCR sonrası ikincil bir işlem gerektirmemesi sayesinde yüksek verimlilik ve düşük kontaminasyon riski içermesiyle klasik PCR yöntemine göre birçok avantaja sahiptir. Ayrıca gen ekspresyonunun kantitasyonunda, DNA hasarlarının tespitinde ve genotiplemede kullanılan güvenilir bir yöntem olması sonucunda adli seroloji laboratuvarlarında yerini almıştır<sup>38,39</sup>.

## 2.6. PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR, Saiki ve arkadaşları tarafından insan genomik DNA'sının spesifik bir parçasının enzimatik amplifikasyonu olarak tanımlanmıştır<sup>40,41</sup>. PCR'ın keşfi Kary B. Mullis'e 1993 yılında nobel ödülü kazandırmıştır. Uygun laboratuvar koşullarında nükleik asitlerin çoğaltılması sayılabileceğinden bir çeşit in vitro klonlamadır.

PCR'ın gerçekleşebilmesi için; kalıp olarak kullanılacak DNA örneği, çoğaltılacak bölgeye uygun şekilde tasarlanmış ve bölgeyi 5' ucundan 3' ucuna çevreleyen yaklaşık 18-20 baz uzunluğunda bir çift primer dizisi, dinükleotid trifosfatlar (dNTPs), yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon derişimini ( $Mg^{+2}$ ) sağlayacak tampon çözelti gerekmektedir<sup>42</sup>.

Sırası ile denatürasyon, primer bağlanması ve yeni DNA'nın sentezi şeklinde üç aşamada gerçekleşir<sup>3</sup>.

**Denatürasyon:** Çoğaltılacak DNA'nın denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmesidir. Denatürasyon aşamasında çift zincirli DNA'nın tek zincirli hale gelmesi 94-98°C ısı aralığında yaklaşık 5 dakikada gerçekleşir. Sonuçta DNA'nın iki ipliği birbirinden ayrılır ve kalıp olarak kullanılacak hale gelir<sup>43,44,45</sup>.

**Primer bağlanması:** Sıcaklığın 37-65°C aralığına düşürülmesi ile tek iplikli DNA'ya primerlerin bağlanması sağlanır. Bu primerler yapay oligonükleotidlerdir ve çoğaltılacak DNA bölgesinin uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanırlar. Primerlerin görevi kalıp DNA sentezi için başlangıç noktası olarak görev yapmaktır.

Primer bağlanması aşamasında sıcaklık derecesi primerlerin baz içeriğine ve uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir.

**DNA'nın sentezi:** Polimeraz enziminin ortamdaki nükleotitleri, kalıp DNA zincirinin 5' ucundan 3' ucuna doğru eklemesi ile primerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın kopyasını oluşturulur. Sentez aşaması 72°C'de gerçekleşir.

Bu döngü yaklaşık olarak 20-30 kez tekrarlanabilmektedir<sup>46</sup>.

PCR işleminin teorik olarak verimliliğini değerlendirecek olursak; n=ısı döngüsü sayısı, y=başlangıçtaki kopya sayısı kabul edildiğinde sonuçta  $2^n \times y$  kadar DNA elde edilebilir.

Hızla gelişen PCR teknolojisi moleküler biyoloji ve genetik alanının temel taşı sayılmaktadır. PCR tekniği çok az miktardaki DNA ile çalışmayı mümkün kılmaktadır. Teorik olarak tek bir nükleuslu hücrenin varlığı bile PCR'ın uygulanabilirliği için yeterlidir<sup>47</sup>. Kısa sürede başarılı sonuç elde edilmesi sayesinde laboratuvar çalışmaları büyük hız kazanmıştır. Yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırmalarda kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların teşhisi, klonlama çalışmaları ve geçmiş DNA'ların incelenip evrimsel süreçlerinin aydınlatılması gibi geniş ve değişik konularda kullanılmaktadır. Adli bilimlerde ise; genetik parmak izlerinin tanımlanması, ölüm sebebinin ve zamanının araştırılması, genetik bozuklukların belirlenmesi, babalık testi ve diğer akrabalık ilişkilerinin saptanması gibi spesifik konularda PCR teknolojisi kullanılmaktadır<sup>48,49</sup>.

## **2.7. Kısa Ardışık Tekrar Dizileri (STR)**

Adli DNA çalışmalarında herhangi bir protein kodlamayan ve bu sebeple kişiden kişiye farklılık gösterebilen aynı baz gruplarının belirli sayılarda tekrarlanmasıyla oluşmuş kısa tekrar dizileri kullanılmaktadır<sup>50</sup>.

Mikrosatellitler, insan genomu boyunca dağılmış olarak bulunan ve 2-7 baz çiftlik, kısa ardarda tekrar eden (short tandem repeat, STR) DNA dizilerinden oluşmaktadır. STR'lerin her 6-10 kb'de bir görüldüğü ve yaklaşık  $4 \times 10^8$  adet STR bulunduğu saptanmıştır<sup>43,51</sup>.

STR lokusları insan genomunda 2-7 baz çifti uzunluğundaki DNA dizilerinin birbirlerine baş-kuyruk olacak şekilde ardarda tekrarlanması ile 100-400 baz çifti uzunluğunda baz dizilimlerini içeren bölgelerdir<sup>52</sup>.

Farklı alanlarda değişik amaçlarla kullanılan STR lokuslarından, adli serolojide, biyolojik materyallerin adli amaçlı kimliklendirilmesinde ve babalık araştırmalarında yararlanılmaktadır. Günümüzde STR lokusları, adli örneklerin analizinde sağladığı çeşitli avantajlar nedeniyle adli serologlar tarafından kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir.

İnsan genomunda heterozigotlukları % 70'in üzerinde olan 1300'den fazla STR lokusu tanımlanmıştır. Adli seroloji çalışmalarında, DNA'nın intron bölgelerinde yer alan STR lokusları tercih edilmektedir. Uzun süre sadece otozomal STR'ler kimliklendirme ve babalık tayini amacı ile kullanılmış son yıllarda ise gonozomal STR'ler adli amaçlı kimliklendirmede kullanıma girmiştir. Adli amaçlarla rutinde kullanılacak STR lokuslarının seçiminde; lokusun bireyleri ayırma gücü, kromozomal lokalizasyonu, yapısı, diğer STR lokusları ile birlikte aynı anda tek bir PCR tüpünde çoğaltılabilmesi, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi gibi kriterler göz önüne alınmaktadır<sup>53,54,55</sup>.

## **2.8. Kapiller Elektroforez**

Farklı boyutlardaki DNA parçalarının saptanmasında elektroforetik yöntemler kullanılmaktadır.

Kapiller elektroforez teknolojisi son onbeş yılda protein ve nükleik asitleri de kapsayan çok çeşitli moleküllerin ayırımında etkin ve ekonomik bir yöntem olarak geniş bir kullanıcı kitlesine sahip olmuştur<sup>56</sup>.

Bu cihazlar anot ve katot kutuplar arasında uzanan bir kapiller, sıcaklığı sabit tutacak bir ısıtıcı bölge ve anot uca yakın bir bölgede lazer ışık kaynağı ile CCD kameradan oluşur. Kapillerin içine polimer dolduran bir şırınga ve her iki kutupta elektrik geçirgenliği sağlayacak tampon hazneleri bulunmaktadır. Her bir örnek için yeniden polimerle doldurulan kapiller, örnek tüpüne girdiğinde PCR ile çoğaltılmış ve denatüre edilmiş DNA fragmanlarını elektrokinetik yöntemle kapiller içerisine alır ve bu aşamadan sonra sabit voltaj ve sabit sıcaklıkta anot kutba doğru hareket eden DNA fragmanları kapillerin silika ile kaplanmamış bölgesinden geçerken lazer ışığını

bağlandıkları primerin rengine göre değişik dalga boylarında yansıtılarak CCD kamera tarafından algılanırlar. Uygun bilgisayar yazılımı tarafından değerlendirilen bu veriler ekranda büyüklük ve yoğunluğu ifade eden pikler şeklinde belirir. Bu pikler bahsedilen yazılım tarafından daha önce bu yazılıma tanıtılan floresan boyalı ve fragman büyüklüğü bilinen standartlarla karşılaştırılarak değerlendirilmektedir.

DNA dizilemesi, mutasyon ve genetik polimorfizmin saptanması gibi analizlerde kullanılmıyyla adli serolojide yerini almıştır. LIF (laser-induced fluorescence) ile desteklenmesi sonucu ileri derecede hassaslaşan kapiller teknolojisini tek bir molekülü dahi saptayabilir hale gelmiş ve DNA fragmentlerinin ayrımında en hızlı gelişen yöntem olmuştur. Bu sayede DNA dizileme tekniğinde büyük yarar sağlanmıştır. Ayrıca analiz için çok az miktarda örneğe ihtiyaç duyması, hızlı ayırım gücü, anında pik görüntülenebilirliği, otomatizasyon ve ek cihazlarla uyumu ile de avantajlı bir sistemdir.

Yüksek hassasiyetinden dolayı eski yöntemle zayıf dahi olsa sinyal vermeyen örnekler yeni yöntemde ölçülebilir pikler oluşturmakta ve pikler değerlendirmeye alınmaktadır. Tipleme sonrası sonuçlanan piklerin bilgisayar ortamında muhafaza edilerek istendiğinde yeniden değerlendirmeye imkan vermesiyle geriye yönelik olarak pik sonuçlarının değerlendirilebilirliği çok önemli bir olanaktır<sup>50</sup>.

Günümüzde DNA ve RNA temelli nükleik asit uygulamalarında STR temelli insan kimliklendirme en sık ve yaygın kullanılan kapiler elektroforez yöntemlerinden birisidir. Adli bilimlerde kapiler elektroforez uygulamaları, kanıtların hukuksal açıdan analizi için avantaj sağlamaktadır<sup>57,58</sup>.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada otopsi Adana Adli Tıp Kurumu'nda yapılan 15 olgunun kosta kemiklerinden örnekler alınmıştır. Pozitif kontrol olarak da olgulardan alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan kemiklerin fiziksel temizliği bisti ve zımpara kağıdı ile, kimyasal temizliği sodyum hipoklorit, distile su ve etanol ile yapılmıştır. Temizlik aşamasından sonra kemik örnekleri matkapla mekanik olarak parçalanıp sıvı nitrojen ile muamele edilmiştir. Daha sonra dekalsifikasyon işlemi uygulanmış ve kemikler DNA ekstraksiyonu için kullanıma uygun hale getirilmiştir. Fenol kloroform izoamil alkol ile ve ticari olarak elde edilen silika temelli Qiagen DNA Mini Kit ile DNA ekstraksiyonu yapılmış; ekstrakte edilen DNA'da D8S1179, D21S11, D7S820, CSFIPO, D3S1358, THO1, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818, FGA STR sistemlerinin Perkin Elmer 9700 PCR cihazı ile multiplex PCR amplifikasyonu ve amplifiye edilen örneklerin ABI 3130 otomatik kapiller elektroforez cihazı ile elektroforezi yapılmıştır. Elektroforez sonrası pikler incelenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın projesi ve olgulardan alınan kemik örnekleri için hazırlanan bilgilendirme ve rıza formları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'na sunularak onay alındı. Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonunda TF2009YL3 no'lu proje ile parasal destek alındı.

## **Form 1. Bilgilendirme ve rıza formu**

### **Bilgilendirme Formu**

Çalışmamızda, Anabilim Dalımızda kemik dokudan DNA analizi yaparak, kimliklendirmede DNA düzeyinde tüm biyolojik örneklerde çalışma yapabilen bir merkez olunabilmesi amaçlanmaktadır.

Bu amaçla postmortem alınacak kemik dokularından DNA ekstraksiyonu yapılacak ve kemikten DNA ekstraksiyonu yönteminin Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda rutin hizmette kullanılabilirliği araştırılacaktır. Bu nedenle yakınınızdan vücut bütünlüğü bozulmayacak şekilde, otopsi işlemleri sırasında kesilen kemiklerin uç kısmından 3gr. kadar kemik dokusu örneği alınacaktır.

Örnek alma işlemi öncesi bu çalışmaya onay verdiğinizize dair rıza formunu imzalamanız gerekmektedir.

### **Rıza Formu**

Yapılacak örnekleme işlemi tarafıma detaylı şekilde anlatılmıştır. Bu işlem sonucunda yakınımın vücut bütünlüğünde herhangi bir bozulma olmayacağından dolayı, bu çalışma için yakınımın kemik örneği (3 gr.) alınmasına onay vermekteyim.

ONAY VEREN

### **3.1. Kemik örnekleri**

Otopsi esnasında kostadan yaklaşık 5 cm. uzunluğunda kemik örneği alındı. Steril kapaklı kavanozlara koyulup, her örneğe bir protokol numarası verildi.

### **3.2. Kan örnekleri**

Otopsi esnasında alınan yaklaşık 2cc kan örneği alındı. Steril EDTA'lı tüplere aktarılıp her örneğe bir protokol numarası verildi.

### **3.3. Deneylerde Kullanılan Malzemeler**

#### **3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA): Sigma, E5134.
- Amonyum Oksalat
- Sodyum hidroksit (NaOH): Merck, art. 6462.
- Sıvı azot
- Etanol %96'lık: Delta.
- Fenol: Sigma, P4161.
- Kloroform: Sigma, E2432.
- TBE tampon: Fermentas.
- Sodyum hipoklorid
- Etidyum Bromür: Merck, 1.11615.0001.
- Formamid: Applied Biosystems.
- Agaroz: Nusieve.

#### **3.3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler**

- Tüpler: 0.2, 0.5, 1.5µl'lik steril ependorf tüpler kullanıldı.
- Mikropipet: 10µl, 200µl ve 1000µ hacminde volümü ayarlanabilir Eppendorf marka mikropipetler kullanıldı.
- Mikro Santrifüj: Dakikada maksimum 18000 x rpm devir hızına ulaşan, 12 tüpe uygun başlıklı, zaman ve hız ayar göstergesi bulunan, Hettich EBA 12 santrifüj kullanıldı.

- Makro santrifüj: Dakikada maksimum 5000 x rpm devir hızına ulaşan 4 tüpe uygun başlıklı, zaman, hız ve ısı ayar göstergesi bulunan Eppendorf 5810 R soğutmalı santrifüj kullanıldı.
- Vorteks (Elektro-mag M 16)
- Manyetik karıştırıcı (Janke & Kunkel)
- PCR cihazı (Perkin Elmer 9700)
- Kapiller elektroforz cihazı (Applied Biosystems 3130 Genetic analyzer)
- Ultrasonifikasyon cihazı (Bandelin Sonorex)
- DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen)
- Falcon tüp: 50ml hacimli
- Matkap (Globus 111305)
- Derin Dondurucu (Bosch)
- Buzdolabı (Philco)
- Enjektör: 10 ml'lik standart enjektör
- Filtre Kağıdı (Whatman)
- pH ayıracı (Merck)
- Jel tankı (Thermo)
- UV transluminator (Syngene)
- Bistüri: 22 numara
- Balon joje
- Etüv (Binder)
- 50'lik rack: Axygen
- Saf su (deiyonize, RNAaz free, DNAaz free)
- Steril gazlı bez
- Pastör pipeti (İsolab)
- Zımpara kağıdı

### **3.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

#### **3.4.1. EDTA Solüsyonunun Hazırlanması (0.5 M 500 ml EDTA)**

93.05 gr EDTA 500 ml'ye tamamlanacak şekilde balon joje içerisinde distile suda çözüldü. Çözelti pH'nın 7.5'e ayarlanması için yaklaşık 10 gr NaOH çözelti içerisinde eritildi. Hazırlanan EDTA +4°C'de muhafaza edildi.

### **3.5. Çalışma örneklerinin hazırlanması**

#### **3.5.1. Kemiklerin Temizliği**

DNA'nın maksimum korunabildiği doku olan kemik doku ile çalışmak kontaminasyon gibi bazı zorlukları beraberinde getirdiğinden bunun minimuma indirilmesi için çalışmanın bütün basamaklarında eldiven, maske, saç bonesi ve önlük kullanıldı<sup>59</sup>. Kemikler için kullanılacak bütün malzemeler steril edildi. Kemik örnekleri önce fiziksel, ardından kimyasal olarak temizlenerek toz haline getirme işlemi için hazırlandı<sup>6</sup>.

Adana Adli Tıp Kurumunda otopsi yapılan vakalardan alınan taze kemik örnekleri fiziksel temizliği yapılarak yumuşak dokularından uzaklaştırıldı. DNA analizi öncesi temizlenmiş kemik örnekleri 6 ay oda ısısında bekletilerek kurutuldu. Toz haline getirme işleminin öncesinde kemiklerin kimyasal temizliği yapıldı.

##### **3.5.1.1. Fiziksel Temizlik**

Araştırmada kullanılan kemik örneklerinin dış yüzeyi toprak, yumuşak dokular ve diğer kontaminantlardan whattman kağıdı üzerinde bistüri ile temizlendi. Dış yüzey üzerinden 2-3 mm'lik kısım zımpara yardımıyla kemikten uzaklaştırıldı<sup>6,60,61,62,63</sup>.

##### **3.5.1.2. Kimyasal Temizlik**

Fiziksel temizliği tamamlanan kemik örnekleri literatürde gösterildiği şekilde öncelikle %6'lık sodyum hipoklorit içinde 5 dakika ultrasonifikasyonda tutuldu. Daha sonra 5 dakika didistile suda ultrasonifikasyon yapıldı. Son aşama olarak da saf etanolde (%96-100) 5 dakika ultrasonifikasyonda tutulan örnekler gece boyu oda ısısında kurumaya bırakıldı<sup>6,8,60,61,62,64</sup>.

##### **3.5.1.3. Toz Haline Getirme (Pulverizasyon)**

Kemikten DNA ekstraksiyonu için kullanılan metodlar, numunenin sertliği yüzünden toz haline getirme işlemini içermektedir<sup>65</sup>. Fiziksel ve kimyasal temizliği

yapılan kemik örnekleri matkap yardımı ile pulverize edilip DNA ekstraksiyonu için hazır hale getirildi.

Pulverizasyon işleminin sıvı azot ile birlikte yapılması için gerekli alt yapı noksanlığı nedeni ile matkap ve sıvı azotun aynı anda kullanılması mümkün olmadı. Kemik miktarı blender'da öğütmeye yeterli olmadığından çelik blender içinde sıvı azotta bekletildikten sonra matkapla toz haline getirildi. Toz haline getirme işlemi sırasında kemik parçası ara ara sıvı azotta tutularak soğutuldu<sup>63,66</sup>.

### **3.5.2. Dekalsifikasyon protokolü**

1 gr kemik tozu 50'lik falcon tüpü içerisine koyuldu ve üzerine 10 mL EDTA eklendi, hafifçe karıştırıldı.

Gece boyunca +4°C'de bekletildi.

3000 x g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi, üst faz atıldı.

Üst faz örnekten steril enjektör ile uzaklaştırıldı. Atılan üst faz amonyum oksalat ile karıştırılarak dekalsifikasyon kontrolü yapıldı. Üst faz ve amonyum oksalat karışımı berraklaşınca kadar dekalsifikasyon işlemine devam edildi<sup>15</sup>. Dekalsifikasyon ortalama 3-5 gün sürmektedir.

Dekalsifikasyon sonunda üst fazın atılmasının ardından örneğe 10 mL deiyonize su eklendi.

5000 x g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek yıkama yapıldı.

Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Kemik örnekleri DNA ekstraksiyonu için hazır hale getirildi.

### **3.6. DNA ekstraksiyonu**

#### **3.6.1. QIAamp DNA Mini Kit ile DNA Ekstraksiyon Protokolü<sup>67</sup>**

1 gr kemik tozu üzerine 500 µl ATL Buffer ve 40 µl Proteinaz K eklendi.

56°C'de gece boyunca bekletildi.

500 µl AL Buffer eklendi, vorteksle karıştırıldı.

70°C'de 10 dakika bekletildi. (her 3 dakikada bir vorteksle karıştırıldı.)

500 µl saf etanol (%96-100) eklendi, vorteksle karıştırıldı.

Karışım kolona aktarıldı.

6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.

Filtreden geçen kısım atıldı.

Kolona 500 µl Buffer AW1 eklendi.

6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.

Filtreden geçen kısım atıldı.

Kolona 500 µl Buffer AW2 eklendi.

20000 x g'de (14000 rpm) 3 dakika santrifüj edildi.

Filtreden geçen kısım atıldı.

Kolon boş şekilde 20000 x g'de (14000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.

Kolon temiz 2 ml'lik eppendorf tüpüne alındı.

30 µl distile su veya Buffer AE eklendi.

Oda ısısında 5 dakika bekletildi.

6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.

DNA örneği -20°C'de saklandı.

### **3.6.2. Fenol Kloroform ile DNA Ekstraksiyon Protokolü**

Karışımın toplamına eşit hacimde fenol (pH 4) eklendi.

Yaklaşık 15 saniye vorteksle karıştırıldı.

4°C'de 4500 x g'de 15 dakika santrifüj edildi.

İki faz oluştu ve alt faz atıldı.

Karışımın yarı hacminde fenol ve yarı hacminde kloroform eklendi.

Yaklaşık 15 saniye vorteksle karıştırıldı.

4°C'de 4500 x g'de 15 dakika santrifüj edildi.

Alt faz uzaklaştırıldı.

Karışımın toplamına eşit hacimde kloroform eklendi.

4°C'de 4500 x g'de 15 dakika santrifüj edildi.

İki faz oluştu, alt faz atıldı.

Hacmin iki katı kadar etanol eklendi.

Yaklaşık 15 saniye vorteksle karıştırıldı.

-20°C'de 30 dakika bekletildi.

4°C'de 18000 x g'de 30 dakika santrifüj edildi.

Üst faz atıldı.

Tüpe %70'lik etanol eklendi ve karıştırıldı.

Dipte pellet kalacak şekilde tüpteki alkol döküldü.

Tüpün kuruması için 37°C'de etüvde bekletildi.

Kuruduktan sonra 30 µl distile su eklendi.

DNA örneği -20°C'de saklandı.

### **3.7. Agaroz Jel Elektroforezi**

#### **3.7.1. Jelin hazırlanması**

Balon joje içerisine 150 ml 1 x TBE jel tamponu ve 5.25 gr agaroz eklendi.

Karıştırılıp orta ısıda 7 dakika mikrodalga fırında eritildi.

Isısı yaklaşık 50°C'ye düşüncü içerisine 5µl etidyum bromür eklendi.

Karıştırılıp jel plağının içerisine döküldü.

Hava kabarcıkları giderildikten sonra taraklar yerleştirildi.

Oda ısısında 30 dakika katılaşması için bekletildi.

Jel katılaştıktan sonra taraklar dikkatlice çıkarılarak örneklerin yükleneceği kuyucuklar belirlendi.

#### **3.7.2. Örneklerin Jele Yüklenmesi**

5µl ekstrakte edilen DNA örneğini 2µl boya ile karıştırıldı.

10µl'lik eppendorf pipet yardımıyla boya ve DNA karışımı kuyucuklara aktarıldı.

Boş bir kuyuya 5µl marker koyuldu.

#### **3.7.3. Elektroforez Koşulları**

Akım: 40 mA

Gerilim: 120 V

Güç: 5 W

Isı: Oda sıcaklığı

Süre: 1 saat

### 3.7.4. Elektroforezin Yapılışı

Elektroforez tankının kenarındaki boşluklar elektroforez tamponu ile dolduruldu. Jel plağı tank köprüsünün üzerine düz bir şekilde yerleştirilerek kapağı kapatıldı. Güç kaynağı 120 V, 40 mA, 5 W ve 60 dakikaya ayarlandı ve elektroforez cihazı çalıştırıldı. 1 saat sonunda güç kaynağı kapatılarak jel tanktan çıkartıldı. UV transluminator cihazında görüntüleme yapılarak sonuçlar değerlendirildi.

### 3.8 Gerçek Zamanlı PCR'da DNA Kantitasyonu

Ekstrakte edilen örneklerin DNA miktarı Quantifiler Duo DNA Quantification Kit kullanılarak gerçek zamanlı PCR cihazında ölçüldü.

Çalışmada kit içinde bulunan 200ng/µl stok solüsyonundan 50, 16.7, 5.56, 1.85, 0.62, 0.21, 0.068 ve 0.023 ng/µl konsantrasyonlarda standard dilüsyon serisi hazırlandı. Daha sonra her örnek için

Quantifiler Duo Primer Mix            10.5 µl  
Quantifiler Duo PCR Reaction Mix 12.5µl

oranlarında konularak karıştırıldı. Optik plate üzerindeki kuyucuklara bu karışımdan 23µl konuldu. Üzerine toplam hacim 25 µl olacak şekilde standartlar için işaretli kuyucuklara 2'şer µl standard DNA dilüsyonları ve örnekler için işaretli kuyucuklara 2'şer µl örnek eklendi. Daha sonra platein üzeri plate örtücü ile kapatıldı, hava kabarcığı varsa santrifüj edildi. DNA miktar tayini için uygulanan PCR protokolü aşağıdaki şekildedir.

Gerçek Zamanlı PCR Protokolü

50°C'de 2 dk

95°C'de 10 dk

95°C'de 15 sn }  
60°C'de 1 dk } 40 döngü



Şekil 3.8. Gerçek Zamanlı PCR Cihazı

### 3.9. PCR

Ekstrakte edilen örneklerde DNA miktarına bakıldıktan sonra amplifikasyon aşamasına geçildi. PCR’da 16 STR tiplendirmesi için AmpF $\square$ STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> PCR Amplification Kit protokolü izlendi. PCR reaksiyonu her örnek için;

AmpF STR<sup>®</sup> PCR Reaction Mix: 10.5 $\mu$ l

AmpF STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Primer Set: 5.5 $\mu$ l

AmpliTaq Gold DNA Polymerase: 0.5 $\mu$ l

steril eppendorf tüpte karıştırıldı ve 0.2 $\mu$ l’lik eppendorf tüplere her örnek için bu karışımdan 15  $\mu$ l karışımdan konuldu. Üzerine DNA miktarı 2-10 ng olacak şekilde dilüe edildikten sonra 10 $\mu$ l DNA örneği eklendi. Daha sonra örnekler thermal cycler’a konuldu. Thermal Cycler cihazı aşağıdaki parametrelere göre ayarlandı:

95°C'de 11 dk

94°C'de 1 dk

59°C'de 1dk

72°C'de 1dk

} 28 döngü

60°C'de 1 saat

4°C'de ∞



Şekil 3.9. Thermal Cyclers Cihazı

### 3.10. Kapiller Elektroferez

Amplifiye olan DNA örnekleri 16 STR sistemini (D8S1179, D21S11, D7S820, CSFIPO, D3S1358, THO1, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51,

AMEL, D5S818 ve FGA) tiplendirmek için otomatik kapiller elektroforez cihazına (Genetic Analyzer) konuldu. Cihaza konulmadan önce plate üzerindeki kuyucuklara;

9.5 µl Formamid

0.5 µl GeneScan 500 LIZ Size Standard

0.5 µl DNA örneği

koyuldu. Her yürütmeye kuyucuklardan birine 0.5 µl AmpF $\Phi$ STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Kit Allelic Ladder konuldu ve kuyucuklarda hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edildi. Eğer hava kabarcığı varsa plate santrifüj edilerek kabarcıkların gitmesi sağlandı. Daha sonra plate üzerine septa kapatılarak örnekler 95°C’de 3 dakika denatüre edildi. Denatürasyon sonrası plate soğutucuya konularak 3 dakika buzdolabında bekletildi. Plate, plate taşıyıcıya konularak cihaza yerleştirildi. Her yürütmeye elektroforezin sağlıklı olabilmesi için elektroforez ortamında hava olup olmadığı, polimerin, tamponların ve yıkama sularının seviyeleri kontrol edildi. Elektroforez bittikten sonra sonuçlar GeneMapper ID v3.2 programı ile analiz edildi.



**Şekil 3.10.** Kapiller Elektroforez Cihazı

## 4. BULGULAR

Çizelge 4'te 15 adet taze kemik dokusunda Qiagen DNA Blood Mini Kit ile ekstrakte edilen ve gerçek zamanlı PCR ile belirlenen DNA miktarları sunulmaktadır. 100 mg kemik dokuda belirlenen DNA miktarları ortalama 19.2 ng'dır.

**Çizelge 4.** Taze kemik dokusundan elde edilen DNA miktarı

Örnek no	Örnek miktarı/gr	Male	Human (ng/μl)	Total DNA (ng/100mg)	Cinsiyet
1	1.0	-	10.85	325.50	K
2	0.1	-	0.64	19.32	K
3	0.1	0.72	0.61	18.45	E
4	0.1	0.44	0.22	6.60	E
5	0.1	-	0.72	21.65	K
6	0.1	-	0.32	9.63	K
7	0.1	1.35	1.06	32.02	E
8	0.1	0.26	0.18	5.40	E
9	0.1	-	0.81	24.50	K
10	0.1	-	0.76	23.02	K
11	0.1	0.61	0.47	14.26	E
12	0.1	-	0.43	13.06	K
13	0.1	-	0.70	21.17	K
14	0.1	-	1.00	30.29	K
15	0.1	1.24	1.07	32.13	E

Bir numaralı kemik örneğinden 1 gr. kullanılarak yapılan ilk çalışmada elde edilen değerin yüksek olması sonucu kemik tozu miktarı 100 mg'a düşürülerek

çalışmalara devam edildi. Gerçek zamanlı PCR'da alınan sonuçlar doğrultusunda, PCR'ı yapılan taze kemik örneklerinde 16 STR sistemi (D8S1179, D21S11, D7S820, CSFIPO, D3S1358, THO1, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818 ve FGA) tanımlandı.

Bu çalışmada kullanılan eski kemik örneklerinden; su altında yaklaşık 3 ay kaldığı belirtilen bir olgudan alınan femur kemiğinden 5 gr kemik tozu çıkartılarak çalışıldı. Örneğe hem dekalsifikasyon işlemi yapılarak hem de yapılmadan Qiagen Blood DNA Mini Kit ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ayrıca açık havada yaklaşık 3 yıl kaldığı belirtilen bir olgudan alınan femur kemiğinden 1 gr. kemik tozu çıkartılarak dekalsifikasyon işlemi yapılmadan Qiagen Blood DNA Mini Kit ile DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstrakte edilen örneklerin DNA miktarı kimyasal malzemenin yetersizliği nedeniyle gerçek zamanlı PCR'da değerlendirilemedi. Kantitasyonunun belirlenmesi amacıyla örnekler %3.5'lik Nusieve agaroz jelde yürütüldü. DNA'nın görünürleştirilmesi amacıyla etidyum bromid kullanıldı. Her iki örnekte de jelde görülebilir düzeyde DNA saptanmadı. Buna rağmen örneklerin PCR'ı yapıldı. PCR sonucu alınmadı.

Eski örneklerdeki başarısızlığın nedeninin DNA ekstraksiyon stratejisine bağlı olup olmadığını test etmek için ayrıca fenol kloroform yöntemi de denendi. Ancak sonuçta bir değişiklik gözlenmedi.

Bununla birlikte, 7 yıllık bir olguya ait ön kol kemiği kullanılarak 2'si silika metodu ile ekstrakte edilen 1'er gr'lık kemik tozu ve diğeri fenol kloroform yöntemi ile ekstrakte edilen 2 gr kemik tozundan elde edilen DNA örnekleri birleştirilip konsantre edildi. Yeni konsantre örneğin PCR'ı yapıldı. Relatif floresans ünitesi 50'nin altında olmakla birlikte bu örnekte D3S1358, THO1, D19S433, TPOX, AMEL ve D5S818 STR DNA sistemleri tanımlanabildi.

## 5. TARTIŞMA

Adli uygulamalarda DNA tipleme metotları son on beş yıldan beri biyolojik kanıtın incelenmesinde büyük bir ilerlemeyi oluşturmuştur<sup>68</sup>. Genetik identifikasyon teknikleri adli tıpta güçlü bir avantaj sağlar ve kimliklendirme çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılabilir.

Savaşlardan ve büyük afetlerden geriye kalan insan kalıntılarının kimliklerini tespit etmek için devamlı olarak büyük bir çaba sarf edilmiştir. Modern toplumların sosyal hareketliliğinden dolayı kimliği tespit edilememiş kadavralara, bulunan insan kalıntılarına ve kayıp şahıs vakalarına rastlamak her zaman mümkündür. Bunların yanı sıra önceki yıllarda, özellikle hukuki süreçlerde babalık davası üzerine yapılan genetik araştırmalar için mezardan çıkarılan insan kalıntılarında biyolojik örneklerin alınması isteminde de bir artış olmuştur<sup>2,7,69</sup>.

Tarihsel olarak, iskelet kalıntıları DNA ekstraksiyonun yapıldığı en ilgi çekici biyolojik örneklerden biri olmuştur<sup>66</sup>. Romanov ailesine ait olduğu iddia edilen toplu mezardaki kalıntıların, Josef Mengele'nin ve Amerikan iç savaşında ölen askerlerin kimlik tespiti gibi tarihi açıdan önemli olayların aydınlatılmasında kemik dokudan elde edilen DNA bilgisi kullanılmıştır<sup>11,70</sup>.

İnsan kalıntılarında ya da yeni kadavrada biyolojik materyalin bozulmasından dolayı yüksek moleküler ağırlıklı DNA çok azdır. Cesetlerin maruz kaldığı nem, ortam ısı, mikroorganizmalar ve çok sayıda organik bileşim gibi dış etkenler de mevcut DNA'nın bozulmasında rol oynamaktadır. Biyolojik örnekler arasında uzun süreli korunumundan dolayı kemikler en avantajlı örneklerdir. Eski örneklerde, sonuçlardaki nicel ve niteliksel farklılıklar, hüküm süren ilgili çevresel faktörlerle veya saklama koşullarıyla ilgilidir. Elde edilen bilgi, DNA korunmasıyla zaman arasında hiçbir ilişkinin olmadığını gösterir. Olumlu koşullar, binlerce yıl sonrasında bile tüm DNA türlerinin incelenmesini ve tespitini mümkün kılarak kimyasal ve fiziksel hasarları belli bir ölçüde yavaşlatabilir<sup>2</sup>.

Yapılan çalışmanın başarısı büyük ölçüde kullanılan yöntemlere bağlıdır. Bu nedenle çalışmamızdaki kemik örneklerine dekalsifikasyon yapılarak ve dekalsifikasyon yapılmadan ekstraksiyon işlemi uygulandı. Ayrıca fenol kloroform ve silikaya temelli

ticari Qiagen DNA Mini Kit ekstraksiyon kiti kullanılarak kemikten DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

Genomik DNA ekstraksiyonu için hangi yöntemin kullanılacağı, doğrudan DNA ekstraksiyonundan sonra elde edilen genomik DNA'nın hangi amaç ve/veya amaçlar için kullanılacağına bağlıdır. Uygun genomik DNA ekstraksiyon yöntemlerini belirlemek için laboratuvar koşulları ve kullanılan kimyasal maddeler de dikkate alınmalıdır. Ayrıca elde edilen genomik DNA'nın miktarı ve saflık derecesi de DNA ekstraksiyon yöntemini belirlemede önemli parametrelerdir<sup>71</sup>.

Kemik ve diş tozu örneklerine tam bir deminerilizasyonu kapsayan DNA ekstraksiyon protokolü uygulandığında DNA eldesinde verimin arttığı ifade edilmiştir. Ancak, dekalsifikasyon işlemi yapılırken süpernatantın toplanması aşamasında henüz ekstrakte edilmemiş DNA'yı içeren toz halindeki materyalin de EDTA yıkama çözeltisi ile atılması sonucu örnek kaybı olabilmektedir<sup>8</sup>.

Bazı çalışmalarda kemikte dekalsifikasyon işlemi yapılmasına gerek olmadığı belirtilirken, bazı çalışmalarda kemikte total dekalsifikasyon işleminin DNA verimini önemli ölçüde arttırdığı ve dekalsifikasyonun gerekliliği ifade edilmiştir. Kemik dokusundaki yüksek mineral içeriğinin DNA kazancını engelleyebildiği için biriken iyonların giderilmesi amacıyla dekalsifikasyon yapılmaktadır<sup>15</sup>. Taze kemik dokusu fazla miktarda DNA içerdiğinden, yapısındaki yüksek mineral içeriğine rağmen DNA ekstraksiyonu için dekalsifikasyona gerek yoktur.

Çalışmamızda kullandığımız oda sıcaklığında 6 ay bekletilmiş kemik örneklerinin 0.1 gr'ından 16 STR sistemini tanımlayabilecek miktarda DNA elde edilebildiğinden dekalsifikasyon işlemine gerek olmadığı görülmüştür.

Bosna-Hersek Savaş kurbanlarının arasından 3'ünün (ölümden 1,5 yıl sonra) uzun kemik örneklerinden hazırlanan 5-20 gr. kemik tozundan yapılan organik DNA ekstraksiyonu sonucunda her 1 gr kemik için yaklaşık 100 ng DNA elde edildiği ve HLA DQA1 ile PM lokuslarının saptanabildiği belirtilmektedir<sup>2,72</sup>.

3 gr kaburga kemiği ve omur kemiğinden yaklaşık 1 µg DNA, 2 gr kafatası kemiğinden ise yaklaşık 800 ng DNA elde edildiği belirtilmektedir. Bu miktarların rutin olarak süngerimsi veya sert taze kemikten elde edilen DNA değerlerin yaklaşık 3 ya da 4'te biri kadar olduğu ifade edilmektedir<sup>73</sup>. Silika temelli DNA ekstraksiyon kiti

kullanılarak yapılan çalışmamızda 6 ay oda sıcaklığında kurutulan 15 kosta kemiğinin 100 mg'ından ortalama 19.2 ng DNA elde edilmiştir. Bu sonucun literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

3 yıllık kemik örnekleri kullanılarak yapılan bir çalışmada kosta kemiklerinden DNA eldesi başarı oranı %96.15 iken bu oran kafatası kemiklerinde %51.37, kol kemiğinde ise %66.67 olarak gösterilmiştir. Kosta kemiklerinden DNA ekstraksiyon şansının yüksek oluşu ve normal otopsi prosedüründe vücut bütünlüğünün bozulmasına yol açmaması nedeniyle çalışmamızda kosta kemiği kullanıldı<sup>74</sup>.

Bu projede silika temeline dayalı ve ticari olarak elde edilen Qiagen Mini Kit kullanılmıştır. Karşılaştırma amacı ile uygulanan fenol kloroform DNA ekstraksiyon yöntemini kullanılmıştır. Kontaminasyona daha açık olan ve zararlı kimyasalların kullanıldığı bu yöntem tercih edilmemiştir.

Eski kemik örnekleri ile yapılan çalışmalarda pulverizasyon aşamasının eldeki olanaklar doğrultusunda soğutuculu sistemle yapılamaması nedeniyle DNA kayıpları oluşmuş ve DNA eldesi olmamıştır. Ayrıca dekalsifikasyon işleminde üst fazın çekilmesi ile her aşamada mevcut DNA kayıpları gerçekleşmektedir.

Temel bilimler ve tıbbi bilimlerde rutinde çeşitli amaçlarla kullanılan DNA analizleri, adli bilimlerde mahkemelere objektif deliller sunabilmek amacıyla kullanılmaktadır<sup>53,75</sup>.

Kemik, enzimlerin ve sıvıların olmadığı bir materyaldir. Bu nedenle kemik içindeki hücreler otolitik işlemlerden daha az zarar görürler ve muhtemelen kemikler diğer dokular ve hücrelere göre diagenetik etkilenmelerden daha iyi korunurlar.

Sonuç olarak dişler ve kemikler doğal kontaminasyonlardan (mikroorganizmalar, mantarlar vs.) fiziksel ve kimyasal bariyerleri sayesinde diğer biyolojik materyallere göre daha az etkilenirler<sup>8,20,21</sup>.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu çalışma kemik dokudan DNA ekstraksiyonun Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adli Seroloji Genetik Laboratuvarında rutin hizmette kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.
2. Deneylede Adana Adli Tıp Kurumunda otopsi yapılan olgulardan alınan 15 adet kosta kemik örneği ile 2 adet eski femur örneği ve bir adet de ön kol kemiği kullanılmıştır.
3. Çalışılan taze kemik örneklerinden 9'u kadın, 6'sı erkektir. Eski olgulardan 2si kadın 1'i erkektir.
4. 6 ay oda sıcaklığında kurumaya bırakılan kemik örneklerinde silika temelli ticari kit olan Qiagen DNA Blood Mini Kit ile 16 STR (D8S1179, D21S11, D7S820, CSFIPO, D3S1358, THO1, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, VWA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818, FGA) sisteminin tanımlanabilmesi için yeterli kalite ve kantitede DNA elde edilebilmiştir.
5. Silika temelli DNA ekstraksiyon kiti ile 6 ay oda sıcaklığında kurutulan 15 kosta kemiğinin 100 mg'ında ortalama 19.2 ng DNA elde edilmiştir.
6. Deneyle sonunda elde edilen bilgilere dayanarak taze kemik dokudan DNA ekstraksiyonu yapılabilmesi için dekalsifikasyon işlemine gerek olmadığı görülmüştür.
7. 7 yıllık bir olguya ait ön kol kemiği ile silika temelli ticari kit olan Qiagen DNA Blood Mini DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak yapılan çalışmada 16 STR sisteminden 6'sı (D3S1358, THO1, D19S433, TPOX, AMEL ve D5S818) tanımlanabilmiştir.
8. 3 ay su altında ve 3 yıl açık havada kaldığı belirtilen olgularda yapılan çalışmalar sonucu STR tiplemesi yapılacak düzeyde DNA elde edilememiştir.
9. Eski kemik örneklerinden DNA ekstraksiyonunun uygun ve başarılı şekilde yapılabilmesi için pulverizasyon aşamasının mutlaka soğutma işlemi ile beraber yapılması gerektiği görülmüştür.

10. Bu çalışma planı ile Anabilim Dalımızın ihtiyaç duyduğu kemik dokudan DNA ekstraksiyonu için gerekli araç, gereç ve malzemeler belirlenmiş ve bir kısmı temin edilmiştir. Böylece Anabilim Dalımızda kemik dokudan DNA ekstraksiyonu yapılabilecek bir alt yapı oluşturulmuştur.

11. Kemik dokudan silika metoduna dayalı DNA ekstraksiyonun rutin hizmete yönelik olarak kullanılabilceği görölmüştür. Böylece Anabilim Dalımızda kimliklendirme amacına yönelik olarak çalışılan diğer tüm biyolojik doku ve sıvılara ilaveten kemik dokudan da DNA ekstraksiyonu yapılabilecek ve rutin hizmete geçilebilecektir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Jeffreys AJ, Brookfield JF, Semeonoff R**, Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints, **1985**, 6;317(6040):818-9.
2. **Iwamura ESM, Soares-Vieira JA, Munoz DR**, Human identification and analysis of DNA in bones. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo, **2004**, 59(6):383-388.
3. **Hummel S**, Ancient DNA typing: methods, strategies and applications, Springer, Germany, **2003**.
4. <http://www.baskent.edu.tr/~mustafak/BME-201/dokumanlar/adlit%FDpdoc.pdf>. Erişim: 25.11.2009
5. **Paabo S, Poinar H, Serre D, Despres VJ, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M**, Genetic analyses from ancient DNA, Annu. Rev. Genet. **2004**, 38:645-79.
6. **Kemp MB, Smith GD**, Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth, Forensic science international, **2005**, 154:53-61.
7. **Davoren J, Vanek D, Konjhodzić R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ**, Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. Croat Med J. **2007**, (4):478-85.
8. **Loreille MO, Diegoli MT, Irwin AJ, Coble MD, Parsons TJ**, High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization, Forensic Science International: Genetics 1, **2007**, 191-195.
9. **Parsons TJ, Weeden VW**, Preservation and recovery of DNA in postmortem specimens and trace samples, Forensic Taphonomy, p: 109-180
10. **İşcan MY, Altunçul H, Belli O, Konyar E**, Eski insan kalıntılarından DNA çekilmesi, Turkish Journal of Forensic Sciences, **2007**, 6 (1): 71-79.
11. **Altunçul H**, Kemik dokudan DNA çekilme ve tipleme yöntemleri, doktora tezi, İstanbul, **2001**.
12. **Çevir E**, Takma dişlerde çeneye monte edilen implantların çığneme kuvveti altındaki gerilme analizi, Bitirme projesi, İzmir **2007**.
13. **Açıklık E, Gürer F, Bayçu C, Aral E**, Histoloji, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 894, **2006**, 124-45.
14. **Koç H**, Hayvan Histolojisi, 2009 [http://www.hasankoc.net/yukle/histoloji\\_0.pdf](http://www.hasankoc.net/yukle/histoloji_0.pdf) Erişim: 14.11.2009
15. **Hochmeister M, Budowle B, Borer U, Eggman U, Comey C, Dirnhofer R**, Typing of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains, Journal of Forensic Science, **1991**, Vol 36, No 6, pp320-330.
16. **Kutlu M, Odabaşı E**, Kemik doku ve fizyolojisi, Türkiye Klinikleri J Endocrin, **2004**, 73-89
17. **Haspolat K, Söker M**, Kemiğe ait biyokimyasal değerler ve onkoloji, Dicle tıp dergisi, Journal of medical school, **2002**, c:29, s:3.
18. **Perumal S, Antipova O, Orgel J**, Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis, PNAS, **2008**, vol.105 no.8, 2824-2829.
19. **Panislı A**, Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler, Makine teknolojileri elektronik dergisi, **2004** (4) 25-34.
20. **Baubliene J, Daugnora L, Miceikiene I**, Evaluation of the DNA extraction method from ancient animal bones, Ekologija, **2003**, Nr. 1
21. **Milos A, Selmanović A, Smajlović L, Huel RL, Katzmarzyk C, Rizvić A, Parsons TJ**, Success rates of nuclear short tandem repeat typing from different skeletal elements. Croat Med J. **2007**;48(4):486-93.

22. **Kanışkan N, Aıkkalp E, Caner N, Gven A**, Temel Kimya, Biyoelementler, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları no:627, **2006**, 314-25.
23. <http://www.phosphatesfacts.org/pdfs/PhosphorusEssential.pdf> Erişim: 10.12.2009.
24. **Shojai MS**, Preparation of Hydroxyapatite Nanoparticles: Comparison between Hydrothermal and Solvo-Treatment Processes and Colloidal Stability of Produced Nanoparticles in a Dilute Experimental Dental Adhesive, J. Iran. Chem. Soc, **2009**, Vol. 6, No. 2, pp. 386-392.
25. **Yetkin H**, Ortopedi ve Travmatolojide Biomateryaller, 8th Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED8), Ankara, **2001**.
26. **Grmş SI, Ergene N**, Magnezyumun klinik nemi, Genel tıp dergisi, **2003**;12(2):69-75.
27. **Chrispeels MJ**, Molecular techniques and approaches in developmental biology. California University Press, USA, **1973**, p.128-150.
28. **Silhavy TJ, Berman ML, Enquist LW**, Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, **1984**, p.177-183.
29. **EPA/635**, Toxicological review of chloroform, Washington DC, **2001**.
30. **Rohland N, Hofreiter M**, Comparison and optimization of ancient DNA extraction, BioTechniques, **2007**, 42:343-352.
31. **Hoff-Olsen P, Mevag B, Staalstrom E, Hovde B, Egeland T, Olaisen B**, Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. Forensic Sci Int, **1999**; 105 (3): 171-83.
32. **Cattaneo C, Craig O, James N, Sokol R**, Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. J Forensic Sci, **1997**; 42 (6): 1126-35.
33. <http://www.uvp.com/pdf/ab-1000-02.pdf> Erişim: 04.12.2009
34. **Westermeier R**, Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations, Weinheim, VCH Press, 2nd edition, **1997**.
35. **Righetti PG**, J. Biochem Biophys Methods, **1989**, 19, 1.
36. **Bustin SA**, Absolute Quantification of mRNA using Realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays, J Mol Endo, **2000**; 25:169-93.
37. **Gnel T**, Gen anlatımının kantitatif analizi Real-time PCR, Türkiye klinikleri, J Med Sci, **2007**;27:763-767.
38. **Aydın SM**, Hematolojide Real Time PCR, İstanbul niveritesi, deneysel tıp araştırma enstits, genetik anabilim dalı, İstanbul.
39. **Kontanis EJ, Reed FA**, Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors, J. Forensic Sci, **2006**, 51, 795–804.
40. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA**, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, Science, **1988**;239(4839):487-91.
41. **Yang DY, Eng B, Wayne JS, Dudar JC, Saunders RS**, Technical Note: Improved DNA Extraction From Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns, American journal of physical anthropology, **1998**, 105:539-543.
42. [http://www.promega.com/profiles/1001/ProfilesinDNA\\_1001\\_09.pdf](http://www.promega.com/profiles/1001/ProfilesinDNA_1001_09.pdf) Erişim: 01.11.2009
43. **Duncan GT, Tracey ML**, Serology and DNA typing. In: Eckert WG. Eds. Introduction to Forensic Sciences, 2nd Ed, USA:CRS Press, **1997**:233-293.

44. **Lee HC, Ladd C, Bourkr MT, Pagliaro E, Tirnady F**, DNA typing in forensic science I. Theory and background, *Am. J. Forensic Med and Pathol*, **1994**; 15(4):269-282.
45. **Westwood S, Werret DJ**, An evolution of the polymerase chain reaction method for forensic applications, *Forensic Sci Int*, **1990**; 45: 201-215.
46. **Blake E, Mihalovich J, Higuchi R, Walsh PS, Erlich H**, Polymerase chain reaction (PCR) amplification and human leukocyte antigen (HLA)DQ $\alpha$  oligonucleotide typing on biological evidence samples-casework experience, *J Forensic Sci (JFSCA)*, **1992**; 37(3): 700-726.
47. **Salamon M, Tuross N, Arensburg B, Weiner S**, Relatively well preserved DNA is present in the crystal aggregates of fossil bones, *PNAS*, **2005**, vol 102, no39, 13783-13788.
48. **Isacson J, Cao H, Ohlsson L, Nordgren S, Svanik N, Westman G, Kubista M, Sjöback R, Sehlstedt V**, Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes, *Molecular and Cellular Probes*, **2000**; 14: 321-328.
49. **Lee HC, Pagliaro EM, Berka KM, Folk NL, Anderson DT, Ruano G, Keith TP, Phipps P, Herrin GL, Garner DD, Gaensslen RE**, Genetic markes in human bone: I. Deoxyribonucleic acid (DNA) analysis, *J Forensic Sci (JFSCA)*, **1991**; 36(2): 320-330.
50. **Aşcıoğlu F, Koluvaçık TS, Çetinkaya Ü, Akyüz F**, Kapiller Elektroferez Teknolojisinin Klinik ve Adli Amaçlı DNA Analizlerinde Kullanımı: Geleneksel jel elektroferez yöntemi ile karşılaştırma, *Adli Tıp Derg*, **2002**, Sayı 2-4, Cilt 16, Sayfa 88-93.
51. **Sprecher CJ, Puers C, Lins AM, Schumm WJ**, General Approach to Analysis of Polymorphic Short Tandem Repeat Loci, *BioTechniques*, **1996**, 20:266-276.
52. **Altun A**, Çukurova yöresinde HUMVWA lokusu allel frekans dağılımı, doktora tezi, Adana, **1999**.
53. **Dönbak L**, Kısa ardarda tekrar eden DNA dizilerinin adli amaçlı DNA çalışmalarındaki yeri, *T Klin Tıp Bilimleri* **2002**, 22:233-238.
54. **Gill P, Urquhart A, Millican E, Oldroyd N, Watson S, Sparkes R, Kimpton CP**, A new method of STR interpretation using inferential logic-development of a criminal intelligence database, *Int J Leg Med* **1996**;109:14-22.
55. **Aşcıoğlu F**, X-STR polimorfizminin adli DNA analizlerindeki önemi, *Turkish Journal of Forensic Sciences*, **2007**, 6(2):58-67.
56. **Butler JM**, *Forensic DNA typing*, 2th Ed. Academic Press, London **2003**: 167-191.
57. **Tatlıcı G, Baroğlu A**, Adli Bilimlerde Kapiler Elektroferez Uygulamalarında Son Gelismeler, *Türkiye Klinikleri J Foren Med* **2006**, 3:65-71
58. **Woolley AT, Mathies RA**, Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips, *Biophysics Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1994, Vol. 91, pp. 11348-11352.
59. **Kalmar T, Bachrati CZ, Marcsik A, Rasko I**, A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones, *Oxford university press, nucleic acids research*, **2000**, vol. 28 no. 12.
60. **Ye J, Ji A, Parra JE, Zheng X, Jiang C, Zhao X, Hu L, Tu Z**, A simple and efficient method for extracting DNA from old and burned bone, *J Forensic Science*, **2004**, Vol. 49, No. 4
61. **Andelinovic S, Sutlovic D, Erceg Ivkosic I, Skaro V, Ivkosic A, Paic F, Rezic B, Definis Gojanovic M, Primorac D**, Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J*, **2005**;46(4):530-9.
62. **Marjanovic D, Durmic-Pasic A, Bakal N, Haveric S, Kalamujic B, Kovacevic L, Ramic J, Pojskic N, Skaro V, Projic P, Bajrovic K, Hadziselimovic R, Drobnic K, Huffine E, Davoren J, Primorac D**, DNA identification of skeletal remains from the World War II mass graves uncovered in Slovenia. *Croat Med J*. **2007**;48(4):513-9.
63. **Alonso A, Andelinovic S, Martín P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E, Simón LF, Albarrán C, Definis-Gojanovic M, Fernández-Rodriguez A, García P, Drmic I, Rezic B, Kuret S, Sancho M, Primorac D**, DNA Typing from Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on DNA Isolated from Bone and Teeth Samples, *Croatian Medical Journal*, **2001**, 42, 260–6.

64. **Barbaro A, Cormaci P**, Validation of DNA typing from skeletal remains using the invitrogen charge switch forensic DNA purification kit, *Forensic Science International Genetics*, Vol. 1, issue 1, **2008**, p398-400
65. [http://www.pressurebiosciences.com/downloads/app\\_notes/AN-10003.v1.pdf](http://www.pressurebiosciences.com/downloads/app_notes/AN-10003.v1.pdf).  
Erişim:10.10.2009
66. **Holland MM, Cave CA, Holland CA, Bille TW**, Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks, *Croat Med J.* **2003**;44(3):264-72.
67. [http://www.calpoly.edu/~bio/ubl/protocols\\_files/qiaalu.pdf](http://www.calpoly.edu/~bio/ubl/protocols_files/qiaalu.pdf) Erişim: 10.12.2009
68. **Motoc M, Verdeş D, Corina S, Felicia S, Monica N**, Procedures for obtaining biological samples from ancient bones for DNA analysis, **2003**.
69. **GojanoviC MD, Sutlovi D**, Skeletal remains from World War II mass grave: from discovery to identification. *Croat Med J.* **2007**;48(4):520-7.
70. **Coble DM, Loreille MO, Wadhams MJ, Edson SM, Maynard K, Meyer CE, Niederstatter H, Berger C, Berger B, Falsetti AB, Gill P, Parson W, Finelli LN**, Mystery Solved: The Identification of the Two Missing Romanov Children Using DNA Analysis, *Plos one*, **2009**, vol 4, issue 3.
71. **Özdil F, Başpınar E**, Keçi Sütü Somatik Hücrelerinden Genomik DNA İzolasyonunda Fenol-Kloroform ve Chelex® 100 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması, *Tarım Bilimleri Dergisi*, **2005**, 11 (1) 16-20.
72. **Primorac D, Andelinovic S, Gojanovic MD, Drmic I, Rezic B, Baden MM, Kennedy MA, Schanfield MS, Skakel SB, Lee HC**, Identification of war victims from mass graves in croatia, bosnia, and herzegovina by use of standard forensic methods and DNA typing, *Journal of forensic science*, **1996**, vol.41 issue.5, 891-894.
73. **Gaensslen RE, Berka KM**, Amplification of a genomic sequence in 19th century human bone DNA, *Naturwissenschaften*, **1993**, 80, 80-83.
74. **Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parsons TJ, Barritt SM**, Naming the dead - Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains, *Forensic Sci Rev*, **2004**, 16:63.
75. **Jobling MA, Gill P**, Encoded evidence: DNA in forensic analysis, *Nature reviews genetics*, **2004**, vol 5, 739-751.

## ÖZGEÇMİŞ

Leman Damla Kotan 1985 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladıktan sonra, 2003-2007 yılları arasında Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde okuyarak mezun oldu.

2007 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adli Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen TÜBİTAK destekli “Normosmik idiopatik hipogonadotropik hipogonadizimli olgularda moleküler genetik analizler yoluyla insanda puberte sürecinde rol alan yeni genlerin tanımlanması” adlı projede araştırmacı olarak çalışmaktadır.