



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**FORMALDEHİT İLE FİKSE EDİLMİŞ PSOAS KASI VE  
KARACİĞER DOKULARINDAN DNA EKSTRAKSİYONUNA  
ZAMANIN VE METODUN ETKİSİ HAKKINDA  
BİR ÇALIŞMA**

**Okan BAKŞI**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ TIP ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Yaşar BİLGE**

**2010- ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FORMALDEHİT İLE FİKSE EDİLMİŞ PSOAS KASI VE  
KARACİĞER DOKULARINDAN DNA EKSTRAKSİYONUNA  
ZAMANIN VE METODUN ETKİSİ HAKKINDA BİR ÇALIŞMA**

**Okan BAKŞI**

**DİSİPLİNLERARASI ADLİ TIP ANABİLİMDALİ  
ADLİ BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Yaşar BİLGE**

**2010 – ANKARA**

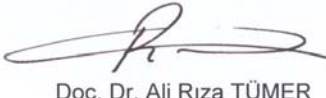
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Adli Biyoloji Yüksek Lisans Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma , aşağıdaki jüri tarafından  
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.  
Tez Savunma Tarihi: 03.02.2010

  
Prof. Tülin SÖYLEMEZOĞLU  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Yaşar BİLGE  
Ankara Üniversitesi

  
Doç. Dr. Gürol CANTÜRK  
Ankara Üniversitesi

  
Doç. Dr. Erhan BÜKEN  
Başkent Üniversitesi

  
Doç. Dr. Ali Rıza TÜMER  
Hacettepe Üniversitesi

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Olay Yeri İncelemesi	2
1.2. Biyolojik Delillerin Belgelenmesi, Toplanması, Korunması ve Paketlenmesinde Genel Kurallar	5
1.2.1. Delilin Belgelenmesi	5
1.2.2. Delilin Toplanması	6
1.2.2.1. Kan ve Kan Lekeleri	6
1.2.2.2. Semen ve Semen Lekeleri	7
1.2.2.3. Doku, Organ ve Kemikler	7
1.2.2.4. Tükürük ve Tükürük Lekeleri	8
1.2.2.5. Kıl Örnekleri	8
1.2.2.6. Referans DNA Örnekleri	9
1.2.3. Koruma ve Paketleme	10
1.2.3.1. Koruma	10
1.2.3.2. Paketleme	10
1.3. Formaldehit	11
1.3.1. Formaldehitin Kullanım Alanları	12
1.3.2. Formaldehitin Vücuttaki Metabolizması	13
1.3.3. Formaldehitin Toksik Etkileri	14
1.3.4. Formaldehitin Mutajenliği ve DNA Molekülüne Etkileri	15
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>17</b>
2.1. Materyal Temini	17
2.2. Fiksasyon	17

2.3. DNA İzolasyonu	18
2.3.1. Manyetik Partikül Tekniği ile İzolasyon	18
2.3.2. Kolon Filtrasyon Tekniği ile İzolasyon	19
2.4. DNA Miktar Tayini (Kantitasyon)	20
2.5. PCR	21
2.6. Tipleme	22
<b>3. BULGULAR</b>	23
3.1. Referans Örnekler	23
3.2. Birinci Gün Sonuçları	24
3.3. İkinci Gün Sonuçları	25
3.4. Beşinci Gün Sonuçları	27
3.5. Onuncu Gün Sonuçları	29
3.6. Yirminci Gün Sonuçları	31
3.7. Otuzuncu Gün Sonuçları	32
3.8. İstatistik sonuçları	33
<b>4. TARTIŞMA</b>	44
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	50
<b>ÖZET</b>	51
<b>SUMMARY</b>	52
<b>KAYNAKLAR</b>	53
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	57

## ÖNSÖZ

Otopsilerden elde edilmiş kas, iç organ parçası vb. dokular, trafik kazası, tren-uçak kazası gibi toplu ölümlerin meydana geldiği olaylar sonrasında alınan çeşitli organ veya doku parçaları ile cenin veya fetuslara ait dokuların bulunduğu küretaj materyalleri DNA analizlerine tabi tutulmak üzere kriminal laboratuarlara gönderilmektedir. Bu tip dokular çürüme ve kokuşma olmaması için sıklıkla alkol, formol gibi tespit solüsyonları içerisinde fikse edilerek laboratuara taşınmaktadır.

Tespit solüsyonları arasında günümüzde hala en sık kullanılan fiksatif olan formaldehitin DNA analizlerine olan etkisi karaciğer ve psoas kası dokuları ile çalışılarak, farklı tespit sürelerinde, iki farklı izolasyon metodu kullanılarak elde edilen DNA yoğunluğu ve çoğaltılabilen STR bölgeleri açısından incelenmiş ve bu çalışmanın konusunu oluşturmuştur.

Tez çalışmamda çok değerli fikirlerini ve tecrübelerini benimle paylaşan kıymetli Hocam Sayın Prof. Dr. Yaşar BİLGE'ye,

Çalışmamın deney aşamasının gerçekleşebilmesi için Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığı Biyoloji İhtisas Dairesi Laboratuvarının imkanlarından istifade etmemi sağlayan Adli Tıp Kurumu Başkanı Sayın Doç. Dr. C. Haluk İNCE'ye,

Tez çalışmamı gerçekleştirmem için beni teşvik eden ve kıymetli görüşleri ile beni yönlendiren, birlikte çalışmaktan büyük kıvanç duyduğum değerli insan Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığı Biyoloji İhtisas Dairesi Başkanı Sayın Uzm. Bio. Nurullah ZENGİN'e,

Materyal temini sırasında bizzat konu ile alakadar olan ve bana yol gösteren kıymetli büyüğüm Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığı Morg İhtisas Dairesi Başkanı Sayın Uzm. Dr. Tülay İŞBAŞAR'a

Yoğun ve yorucu laboratuvar çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen başta Bio. H. Cem ERTUĞRUL ve Bio. Ülker BİLAL olmak üzere tüm mesai arkadaşlarıma ve

Maddi ve manevi desteği ile her an yanımda olan biricik eşim Senem'e Teşekkür ederim.

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
bç	Baz çifti
°C	Santigrad Derece
CMK	Ceza Muhakemesi Kanunu
Cu	Bakır
DNA	Deoksiribonükleik asit
dk.	Dakika
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
g	gram
mg	miligram
µg	mikrogram
ml	mililitre
µl	mikrolitre
mmol/L	milimol/litre
ng/µl	nanogram/mikrolitre
PCR	Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Tepkimesi)
pg	pikogram
ppm	Parts Per Million
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Revolutions Per Minute (dakikadaki devir sayısı)
STR	Short Tandem Repeat (Kısa Tekrarlı Diziler)

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b> Bir olay yeri inceleme alanı ( <a href="http://www.eskisehir.gov.tr/jandarma">www.eskisehir.gov.tr/jandarma</a> )	3
<b>Şekil 3.1.</b> Psoas dokusundan manyetik partikül yöntemi ile elde edilen ortalama DNA miktarları.	38
<b>Şekil 3.2.</b> Psoas dokularından kolon filtrasyon yöntemi ile elde edilen ortalama DNA miktarları.	39
<b>Şekil 3.3.</b> Karaciğer dokularından manyetik partikül yöntemi ile elde edilen ortalama DNA miktarları.	41
<b>Şekil 3.4.</b> Karaciğer dokularından kolon filtrasyon yöntemi ile elde edilen ortalama DNA miktarları.	42
<b>Şekil 3.5.</b> Farklı günlerde kolon filtrasyon ve manyetik partikül tekniğine göre elde edilen ortalama DNA miktarları (ng/µl).	43



## ÇİZELGELER

<b>Tablo 1.1.</b> Olay yerinde bulunan delil üzerindeki DNA'nın olası yeri ve kaynağı (Açıkgöz ve ark., 2002)	4
<b>Tablo 3.1.</b> Formaldehit ile tespit edilmeyen referans dokulara ait DNA miktarları (ng/µl)	23
<b>Tablo 3.2.</b> Çalışmada kullanılan dokuların referans DNA profilleri	23
<b>Tablo 3.3.</b> 1 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/µl)	24
<b>Tablo 3.4.</b> 1 günlük tespit sonunda örneklerin DNA tipleme sonuçları (kc: karaciğer, ps: psoas)	25
<b>Tablo 3.5.</b> 2 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/µl)	26
<b>Tablo 3.6.</b> 2 günlük tespit sonunda örneklerin DNA tipleme sonuçları (kc:karaciğer, ps:psoas)	26
<b>Tablo 3.7.</b> 5 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/µl)	27
<b>Tablo 3.8.</b> Beşinci gün sonunda kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen örneklere ait tipleme sonuçları.	28
<b>Tablo 3.9.</b> Beşinci gün sonunda manyetik partikül yöntemi ile izole edilen örneklere ait tipleme sonuçları.	28
<b>Tablo 3.10.</b> 10 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/µl)	29
<b>Tablo 3.11</b> Onuncu gün sonunda kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen örneklere ait tipleme sonuçları.	30
<b>Tablo 3.12.</b> 20 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/µl)	31
<b>Tablo 3.13.</b> Yirminci gün sonunda kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen örneklere ait tipleme sonuçları.	32
<b>Tablo 3.14.</b> 30 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/µl)	33
<b>Tablo 3.15.</b> Psoas dokularından 1. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	34
<b>Tablo 3.16.</b> Karaciğer dokularından 1. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	34
<b>Tablo 3.17.</b> Psoas dokularından 2. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	34
<b>Tablo 3.18.</b> Karaciğer dokularından 2. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	35
<b>Tablo3.19.</b> Psoas dokularından 5. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	35
<b>Tablo 3.20.</b> Karaciğer dokularından 5. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	35

<b>Tablo 3.21.</b> Psoas dokularından 10. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	36
<b>Tablo 3.22.</b> Karaciğer dokularından 10. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	36
<b>Tablo 3.23.</b> Psoas dokularından 20. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	36
<b>Tablo 3.24.</b> Karaciğer dokularından 20. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	37
<b>Tablo 3.25.</b> Psoas dokularından 30. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	37
<b>Tablo 3.26.</b> Karaciğer dokularından 20. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması	37
<b>Tablo 3.27.</b> Manyetik partikül yöntemi ile psoas dokularından farklı günlerde elde edilen DNA miktarlarının varyans analizi	38
<b>Tablo 3.28.</b> Kolon filtrasyon yöntemi ile psoas dokularından farklı günlerde elde edilen DNA miktarlarının varyans analizi	39
<b>Tablo 3.29.</b> Manyetik partikül yöntemi ile karaciğer dokularından farklı günlerde elde edilen DNA miktarlarının varyans analizi	40
<b>Tablo 3.30.</b> Manyetik partikül yöntemi ile karaciğer dokularından farklı günlerde elde edilen DNA miktarlarının varyans analizi	41
<b>Tablo 3.31.</b> Kolon filtrasyon yöntemi ve manyetik partikül yöntemi ile farklı günlerde elde edilen DNA miktarlarına ait t testi	43

## 1.GİRİŞ

Adli bilimler farklı disiplinlerin işbirliğinden oluşan geniş bir şemsiyedir. Bu disiplinlerden biri olan adli biyoloji gelişen teknolojiye paralel olarak hukukun uygulanmasında gereksinim duyulan delillerin daha objektif ve sağlıklı bir biçimde değerlendirilmesine çalışmaktadır. Adli biyoloji biyolojik kökenli sıvı ve dokular ile bunlara ait leke ve artıkları tanımlayan ve kimliklendiren bir bilim dalıdır.

Genler, DNA'daki bazı kimyasal dizilimler olan nükleotidlerden meydana gelmiştir. 1953 yılında Watson ve Crick DNA molekülünün kendine has özelliklere sahip bir çift sarmal yapı halinde bulunduğunu söylediğinden günümüze kadar hem genetik biliminde hem de adli bilimlerde bir çok gelişmeler olmuştur (Açıkgöz ve ark., 2002). Bir kişiyi diğerlerine benzeten yada farklı kılan özellikler DNA molekülünden kaynaklanmaktadır. Adli bilimler kişinin farklılıklarını kullanarak kimliğinin belirlenmesinde yararlıdır. (Kalsoğlu ve Yükseloğlu, 2002). Adli kullanımda DNA kimliklendirme testinin parmak izinden bu yana kriminal araştırmalarda en önemli gelişme olduğu görülmektedir (Polat, 2009a). Adli amaçlı DNA analizlerinde kan, kıl, tükürük, semen, tırnak vb. örnekler yanında kas, iç organ parçası gibi dokular da kriminal identifikasyon için incelenmekte ve DNA izolasyonuna tabi tutulmaktadır.

DNA laboratuvarına biyolojik örnekler ya da biyolojik örnek taşıyan olay yeri numuneleri gönderilirken numunenin toplanması, ambalajlanması ve taşınması sırasında dikkat edilmesi gereken hususlar vardır. Doku numuneleri herhangi bir koruyucu madde içerisine konulmadan laboratuvara ulaştırılmalıdır (Açıkgöz ve ark. 2002). Ancak günümüzde hala çeşitli doku numuneleri patolojik ya da toksikolojik incelemeler için olduğu gibi DNA laboratuvarına da formaldehit ile fikse edilerek gönderilebilmektedir. Formaldehitin % 4-10'luk solüsyonu (formalin) rutin histopatolojik uygulamalarda en sık kullanılan fiksatiftir (Shi ve ark., 2002). Oysa formaldehit fiksasyonu PCR temelli genetik analizler için laboratuvar çalışmalarında engel oluşturduğundan ciddi bir problemdir. Çoğaltılabilir

DNA'nın miktarını ve uzunluğu azalttığından tanı koymayı zorlaştırır. Ancak buna dair araştırmaların sınırlı ve az sayıda olması nedeniyle incelemeler yetersiz kalmaktadır.

Bu çalışmamızda; formaldehit ile tespit süresinin elde edilen DNA miktarına ve STR (Kısa Tekrarlı Diziler) tiplendirmesine olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca değişik sürelerle fikse edilmiş dokulardan iki farklı yöntemle (silika membran temelli kolon filtrasyon tekniği ve manyetik partikül tekniği) DNA izolasyonu yapılarak elde edilecek DNA'nın miktarı ve STR çözümlenmeleri (tipleme) karşılaştırılıp izolasyon yöntemlerinin birbirlerine karşı bir üstünlüğü olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

Adli bilimlerde olay yeri incelemesi sırasında biyolojik delillerin toplanıp laboratuvara gönderilmesi ile ilgili bilgilerin sunulması gerektiğinden şimdi olay yeri ile ilgili bilgileri inceleyelim.

### **1.1. Olay Yeri İncelemesi**

Olay yeri incelemesi (keşif) herhangi bir adli olayın nasıl gerçekteştiğini, olayın oluş şeklini ve nedenini araştırmak, suçlu ve mağdura ait suç delillerinin saptanması, meydana gelen zarar ve kaybın belirlenmesi için olay yerinde yapılan adli incelemedir (İnanıcı ve ark. 2004). Elde edilen delillerin kayıt altına alınması, toplanması, korunması ve incelenmek üzere ilgili kriminal laboratuvarlara gönderilmesi işlemleri de olay yeri incelemesi kapsamındadır (Yükseloğlu ve ark. 2008).



**Şekil 1.1** Bir olay yeri inceleme alanı ([www.eskisehir.gov.tr/jandarma](http://www.eskisehir.gov.tr/jandarma))

Küçüker'e göre (2003) günümüzde ölümlü neticelenen veya neticelenmeyen adli olayların aydınlatılmasında en önemli adımların olay yerinin korunması ve olay yerinin ayrıntılı olarak incelenmesi ile buradan elde edilen delillerin değerlendirilmesinin oluşturduğu, araştırmanın başarısı ya da başarısızlığının buna bağlı olduğu, adli tıp otoritelerince ifade edilmektedir. Suçun bilgi ve delillerinin elde edilmesiyle yargılama sürecinin hızlandığı, suça karşı cezanın caydırıcılığının daha kolay ortaya çıktığı, aksi hallerde de bir çok suçun delil yetersizliği nedeniyle cezasız kaldığı, adaletin yerini bulamadığı bilinen bir gerçektir

Suç ve suçlularla mücadelede bilimsel ve hukuk çerçevesi içinde, olay yerinde uzmanlarca yapılacak inceleme neticesinde, elde edilecek delillerin; olay yeri inceleme birimleri, adli tıp ve kriminal laboratuvarlar ile bilimsel ve akademik kuruluşların yapacağı çalışmalar, bir bütün olarak olayın çözümüne etki edecektir ([www.jandarma.tsk.tr](http://www.jandarma.tsk.tr)). Hazırlık soruşturmasının en önemli unsurlarından biri olan olay yeri incelemeleri ancak doğru gerçekleştirildiğinde, adli olayların çözülmesinde doğru sonuca ulaşılabilir. Bu sebeple adli bilimlerin olay yerinde başladığı kabul edilir (Yükseloğlu ve ark., 2008).

Olay yeri inceleme birimleri tarafından kriminal laboratuvarlara incelenmesi için yaygın bir şekilde gönderilen yüzlerce değişik fiziksel materyal vardır. Kan ve kan lekeleri, meni ve meni lekeleri, hücre ve dokular, kemik diş ve organlar, kök kılıflı kıl numunesi, tükürük ve tükürük lekesi,

kepek, idrar, gaita DNA izole edilebilen ve analizi yapılabilen biyolojik materyallerdir (Lee, 1997, Açıkgöz ve ark., 2002, Butler, 2005,). Bu biyolojik materyallerin bazılarının olay yerinde hangi deliller üzerinde ve delilin neresinde bulunabilecekleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Olay yerinde bulunan delil	DNA elde edilebilecek biyolojik materyalin olası yeri	Biyolojik materyalin cinsi
Şapka yada maske Gözlük Kürdan Çiğnenmiş sakız Diş fırçası Isırık izi Sigara izmariti Pul ve zarf Şişe, bardak, çatal, teneke kutu Kullanılmış prezervatif İç çamaşırı Giysi Tırnak, tırnak parçası Tırnak makası Battaniye, yastık, çarşaf vb.	İç kısmı Burun veya kulağa temas eden kısımları Uç kısımları Yüzey kısmı Fırça kısmı Mağdur yada sanığın derisi yada elbisesi Filtreli kısmı Yapışkanlı kısım Kenarlar, ağız kısmı İç/dış yüzeyi İç/dış yüzeyi Her yerinde Yüzey ve iç kısmında Yüzeyinde ve kesici kısmında Yüzey kısmında	Saç kılı Deri hücreleri Tükürük Tükürük Kan, tükürük Tükürük Tükürük Tükürük Tükürük Meni vajinal yada rektal hücre Kan, meni, deri hücreleri Kan, meni, kıl, tükürük, deri Kan, doku Kan, doku Kan, tükürük, meni, mekonyum, amniyon sıvısı lekese, kıl Kan, doku Kan, doku Kan, kıl, doku, deri Kan, kıl Kan, kıl Kan, kıl, doku Kan, kıl, doku
Silah Mermi çekirdeği Bıçak, balta vb. Fayans, yer döşemesi, duvar Koltuk, perde Ağaç, dal, toprak, yaprak Araba tamponu, far, asfalt vb.	Kabza Dış yüzeyi Kabza, kesici yüzey Yüzey kısmında Yüzey kısmında Yüzey kısmında Yüzey kısmında	Kan, doku Kan, doku Kan, kıl, doku, deri Kan, kıl Kan, kıl Kan, kıl, doku Kan, kıl, doku

**Tablo 1.1.** Olay yerinde bulunan delil üzerindeki DNA'nın olası yeri ve kaynağı (Açıkgöz ve ark., 2002)

Biyolojik delil üzerinde başarılı bir analiz yapma yeteneği olay yeri incelemesi ile doğrudan ilişkilidir. Bilge (2005), olay yerinde ayak izlerine ait bulgular kaydedildikten ve alındıktan sonra olay yerine girilmesi gerektiğini belirtmiştir. Olay yerinden alınan deliller uygun şekilde belge ile kanıtlanamaz ise kaynağından kuşku duyulabilir, uygun şekilde paketlenmez ise kontaminasyon oluşabilir, uygun koşullarda saklanmaz ise yapısında

bozulma olabilir ya da tamamen özelliğini yitirebilir (Açıkgöz ve ark., 2002, www.jandarma.tsk.tr). Bu nedenle biyolojik numunelerin toplanması, korunması ve paketlenmesinde bir takım kurallara uyulması gerekmektedir. Şimdi bu konuyu tetkik edelim.

## **1.2. Biyolojik Delillerin Belgelenmesi, Toplanması, Korunması ve Paketlenmesinde Genel Kurallar**

### **1.2.1. Delilin Belgelenmesi**

Belgeleme, adli bilimde, biri yasal diğeri bilimsel olan iki bakış noktasında önemlidir. Delilin orijinal şartları ve pozisyonu belgelenmedikçe hiçbir şeyin yeri değiştirilmemelidir. Belgelemenin birkaç farklı yolu mevcuttur. Genel olarak, bir metottan daha fazlasının kullanımı tavsiye olunur (Polat, 2009b). Delilin her parçası belgelenmelidir.

1-) Delile dokunmadan, hareket ettirmeden veya toplamadan önce fotoğraflamalı ya da video görüntüsü alınmalıdır.

2-) Delilin yeri ve pozisyonu not edilmelidir.

3-) Delilin, olay yeri ve mevcut diğerk nesnelere olan ilişkileri not edilmeli ve krokisi çizilmelidir.

4-) Delilin konumu not edilmeli ve krokisi çizilmelidir. (Lee ve Ladd, 2001, Açıkgöz ve ark., 2002)

Olay yerinin krokilerinin çizilmesi, görüntülenmesi ve fiziksel delillerle ilgili bilgilerin kaydedilmesi, delillerin kaybolmasını engelleyebileceği gibi olayın tekrar değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır (İnanıcı ve ark., 2004).

### **1.2.2. Delilin Toplanması**

DNA delilinin doğru bir şekilde toplanması oldukça önemlidir. Delilin henüz başlangıçta kontamine (biyolojik kirlenme) edilmesi, delilden elde edilecek kesin bilgileri şüpheli hale getirerek önemli bir soruşturmaya gölge düşürebilir (Butler, 2005).

Biyolojik delil doğrudan veya dolaylı yolla nakil edildiğinde, belirli bir şeyin üzerine yapışacak veya o yüzey tarafından emilecektir. Genellikle sıvı biyolojik deliller emilirken katı durumdaki deliller yapışacaktır. Toplama yöntemi çoğunlukla biyolojik delilin durumuna bağlıdır (Lee, 1997). Polat'a göre (2009b) her olaya uygulanabilecek tek bir kanıt toplama yöntemi yoktur. Belli delil tiplerine uygulanan özel yöntemler bulunmaktadır. Ancak özel bir durumda başvurulacak yöntem tamamen o özel durumun koşullarına bağlıdır.

Biyolojik delillerin toplanması aşamasında aşağıdaki hususlara dikkat edilmesi gerekir.

#### **1.2.2.1. Kan ve Kan Lekeleri**

Olay yerinde henüz pıhtılaşmamış sıvı kan örnekleri steril bir şırınga ya da tek kullanımlık temiz bir pipet yardımı ile alınarak antikoagulan (pıhtılaşmayı engelleyici madde) içeren test tüpüne konmalıdır. Steril pamuklu sürüntü çubuğu veya leke kartları sıvı kanı emdirmek için kullanılabilir. Örnekler tarih, saat, yer, olay numarası, örnek numarası, toplayıcı ismi bilgilerini içeren etiketle etiketlenmelidir. Bu etiketleme tüm biyolojik materyaller için aynı şekilde yapılmalıdır.

Kar, su birikintisi, banyo küveti ve lavaboda bulunan kan, sürüntü çubuğuna emdirilerek ya da steril bir şişe içerisine alınarak toplanabilir. Yaş kan lekeli giysiler öncelikle direk güneş ışığı görmeyen temiz bir zeminde,



oda ısısında kurumaya bırakılmalı ardından kağıt delil torbalarına alınarak etiketlenmelidir.

Yaş kan lekeli küçük nesnelere kurutulduktan sonra olduğu gibi alınabilir. Taşınamayan nesnelere üzerindeki yaş kan lekeleri sürüntü çubuğuna emdirilebilir. Taşınamayan ve emici olmayan yüzeye sahip eşyalar üzerindeki kurumuş kan lekesi steril bir kağıt üzerine kazınarak ya da serum fizyolojik ile ıslatılmış sürüntü çubuğuna emdirilerek alınabilir. Halı, perde, döşeme gibi nesnelere üzerindeki lekeler kesilip kurutulurken alınabilir (Açıkgöz ve ark., 2002, Butler, 2005)

#### **1.2.2.2. Semen ve Semen Lekeleri**

Sıvı semen örnekleri temiz bir şırınga yardımı ile temiz ve steril bir tüpe aktarılır ve etiketlenir. Diğer bir yolla sıvı semen numunesinin sürüntü çubuğuna emdirilip kurutulurken alınmasıdır.

Giysi, çarşaf, yastık kılıfı vb. taşınabilen lekeli eşyalar olduğu gibi alınmalıdır. Lekeler ıslaksa kurutulduktan sonra paketlenmelidir. Halı, yatak döşeme gibi büyük nesnelere üzerindeki lekeler kesilerek alınır. Taşınamayan ve emici olmayan yüzeylerdeki semen lekeleri steril bistüri ile kazınarak temiz bir kağıt üzerine toplanabilir.

Cinsel saldırıya uğramış mağdurlardan seminal delil, adli tabiplikte ya da hastanelerde yetkili sağlık personeli tarafından sürüntü kitlerine alınır. Sürüntü kiti vajinal, anal veya oral delillerin alınmasında kullanılır (Lee, 1997, [www.jandarma.tsk.tr](http://www.jandarma.tsk.tr))

#### **1.2.2.3. Doku, Organ ve Kemikler**

Olay yerinde bulunan taze doku, kemik veya organlar uygun şekilde belgelendikten sonra steril pensle toplanmalı ve yine steril bir kap içerisine

(kavanoz, petri kutusu vb.) herhangi bir koruyucu madde (alkol, formol vs.) eklenmeden konmalı, etiketlenmeli ve bu şekilde muhafaza edilmelidir.

Eski doku, organ ve kemiklerin toplanması tek kullanımlık eldivenlerle yapılabilir. Her bir numune için ayrı bir eldiven gereklidir. Örnekler birbirini kontamine etmeden her bir parça temiz bir kaba konmalı ve etiketlenmelidir (Jand. Gen K.lığı, 2001, Açıkgöz ve ark., 2002)

#### **1.2.2.4. Tükürük ve Tükürük lekeleri**

Sigara izmaritleri, olay yerine atılmış çiğnenmiş sakız, tükürük, balgam gibi numuneler tükürük numunesi olarak incelemeye alınmaktadır. Tükürük numunelerinin toplanması için sürüntü kitleri kullanılabilir. Sigara izmaritleri aynı kül tablası içerisinde bulunsa dahi ayrı ayrı paketlenmelidir. Örnekler yaş ise kurutulduktan sonra ambalajlanmalı ve etiketlenmelidir. Küllerin toplanmasına gerek yoktur. Cilt yüzeyine bulaşmış kuru tükürük serum fizyolojikle ıslatılmış sürüntü çubuğu ile alınabilir (Lee 1997, Açıkgöz ve ark., 2002).

#### **1.2.2.5. Kıl Örnekleri**

Mağdur ve saldırganın bulunduğu veya olayın meydana geldiği yerlerde, mağdur veya şüphelinin ellerinde, tırnak aralarında, mağdurun ısırması durumunda dişlerde, yatak üzerinde, tabanca ve bıçak gibi aletler üzerinde, tecavüz olaylarında mağdur veya maktulün bacakları arasında, iç çamaşırlarının üzerinde bulunabilmektedir.

Örnekler kıl gövdesinin kırılmasının önlenmesi ve kökün zarar görmemesi için temiz bir pensle toplanmalıdır. Kök ucu ellenmemelidir. Her grup kıl ayrı ayrı paketlenmeli ve etiketlenmelidir. (Lee, 1997, Jand. Gen K.lığı, 2001).

### 1.2.2.6. Referans DNA Örnekleri

Olay yerinde bulunmuş biyolojik örneklerle karşılaştırma yapmak üzere mağdur, şüpheli veya sanıktan alınacak referans biyolojik örneklere ihtiyaç vardır. Ayrıca babalık/annelik testleri, kayıp şahıs araştırmaları ya da felaket kurbanlarının kimliklendirilmesi çalışmalarında aile fertlerinin de karşılaştırma örneklerine ihtiyaç duyulur.

Karşılaştırma amacıyla alınacak sıvı kan numuneleri pıhtılaşmayı engelleyecek şekilde antikoagülanlı tüpler (örneğin EDTA'lı) içerisine alınmalıdır. Kan numunesi kuru olarak gönderilecek ise biyolojik leke saklama kartı (FTA vb.) üzerine 4-5 damla kan damlatılıp oda ısısında kurutularak zarf içerisinde gönderilebilir.

Alınan diğer bir biyolojik numune de ağız svabıdır (bukkal svap). Bugün bir çok laboratuvar ağız svabı ile çalışmayı kan almaya tercih etmektedir. Ağız svabı alınacak şahsın son yarım saat içerisinde bir şey yememiş olması gerekmektedir (EZ1 DNA handbook, 2008). Svap çubuğunun pamuk kısmı ıslatılmadan ağzın sol ve sağ yanak içlerine sürüntü yapılarak örnek alınır. Oda ısısında kurutulup laboratuvara gönderilir.

Şüpheli sanık veya diğer kişilerin beden muayenesi ve vücutlarından örnek alınması 5271 sayılı Ceza Muhakemesi Kanununun 75. ve 76. maddelerinde hükme bağlanmış ve bu hükümlerin nasıl uygulanacağı Ceza Muhakemesinde Beden Muayenesi, Genetik İncelemeler ve Fizik Kimliğin Tespiti Hakkında Yönetmeliğin 4-8. maddelerinde belirtilmiştir (Güngör ve Bakşi, 2009). Buna göre, bir suça ilişkin delil elde etmek için şüpheli veya sanık üzerinde iç beden muayenesi yapılabilmesine veya vücuttan kan veya benzeri biyolojik örneklerle saç, tükürük, tırnak gibi örnekler alınabilmesine; Cumhuriyet savcısı veya mağdurun istemiyle ya da re'sen hakim veya mahkeme, gerektiğinde sakınca bulunan hallerde Cumhuriyet savcısı tarafından karar verilebilir (CMK, m.75-f1). İç beden muayenesi yapılabilmesi veya vücuttan kan veya benzeri biyolojik örnekler alınabilmesi için müdahalenin, kişinin sağlığına zarar verme tehlikesinin bulunmaması gerekir

(CMK, m.75-f2). İç beden muayenesi veya vücuttan kan veya benzeri biyolojik örnekler alınması ancak tabip veya sağlık mesleği mensubu diğer bir kişi tarafından yapılabilir (CMK, m.75-f3)

### **1.2.3. Koruma ve Paketleme**

#### **1.2.3.1 Koruma**

Olay yerinden alınan deliller uygun şekilde toplanmazsa biyolojik aktivitesini yitirebilmektedir. Deliller niteliğine uygun bir şekilde ambalajlanmazsa kontaminasyona uğrayabilmekte ve uygun koşullarda saklanmazsa yapısında bozulma olabilmektedir ([www.jandarma.tsk.tr](http://www.jandarma.tsk.tr)). DNA teknikleri oldukça hassas olduğundan kontaminasyon gerçek bir sorundur.

DNA analizi için alınan numuneler +4° C'de saklanmalı ve mümkün olduğunca çabuk laboratuvara gönderilmelidir. Donmuş örnekler de uygundur ancak bunlar donmuş seviyede tutulmalıdır (Açıkgöz ve ark. 2002).

Olay yeri örnekleri gibi DNA kimliği elde edilebilecek diğer numuneler de, küf ve bakterilerin gelişmesine neden olan, DNA'ya zarar veren nemli ve sıcak şartlarda saklanmamalıdır. Numuneler ayrı ayrı paketlenmeli ve laboratuvara gönderilmeden önce dondurulmalı ya da buzdolabında saklanmalıdır. Nemli numuneler kurutulmalı ve öyle saklanmalıdır. (Lee ve Ladd, 2001)

#### **1.2.3.2. Paketleme**

Deliller ıslak vaziyette paketlenmemeli ıslak numuneler oda ısısında kurutulmalıdır. Plastik torbalar biyolojik delillerin paketlenmesinde kesinlikle kullanılmamalıdır. Bu tip torbalar nemli parçaların kurummasını engellediğinden, küf ve bakterilerin üremesine ve kokuşmaya elverişli bir

ortam oluştururlar. Bunların yerine kağıt torbalar kullanılmalıdır (Açıkgöz ve ark., 2002).

Silahlar, bardak, şişe gibi katı maddeler sürtünmeye izin vermeyen koruyucular içinde taşınmalıdır. Sıvı kan veya diğer vücut sıvılarının konuldukları kaplar sızdırmayacak şekilde kapatılmalı ve kırılıp dökülmeleri engellenecek şekilde paketlenmelidir.

Kıl numuneleri kök kısımları zarar görmeyecek şekilde paketlenmelidir. Zarf içerisine konulabilir fakat taşıma sırasında baskı görmeyecek şekilde zarflar ayrı bir koruyucu içerisine alınmalıdır. Benzer şekilde tırnak numuneleri de ayrı ayrı zarflar ya da delil kutuları içerisinde paketlenmelidir.

Kemik örnekleri üzerilerine herhangi bir koruyucu madde konmaksızın temiz kaplar (petri kutusu, plastik örnek kabı ya da cam kavanoz) içerisine konmalıdır (Jand. Gen. K.lığı, 2001).

Olay yerlerinde bulunmuş cilt, kas, organ parçaları gibi dokular ile delil olarak gönderilecek kürtaj materyali ya da cenin gibi dokular da üzerilerine herhangi bir tespit solüsyonu eklemeden steril bir kap içerisine konulmalıdır.

Patolojik ya da toksikolojik incelemeler için gönderilecek doku numuneleri sıkça kullanılan formaldehit tespit solüsyonu içerisine konularak gönderilmektedir. Bu tip incelemeler için dokuların formaldehit ile tespit edilerek gönderilmeleri uygundur ancak gönderilen dokulardan DNA analizi ile kimliklendirme yapılması isteniyor ise formaldehit fiksasyonu yapılmadan en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmaları gerekir. Çünkü formaldehit DNA analiz çalışmalarını olumsuz olarak etkilemektedir. Formaldehit ve DNA analizlerine etkileri aşağıda açıklanmıştır.

### **1.3. Formaldehit**

Formaldehit; asetaldehit, akrolein, malondialdehit, benzaldehit, vanilin, sitral gibi bileşiklerin bulunduğu aldehitler grubundan oldukça reaktif bir organik bileşiktir (Arıcan, 2005). Renksiz, keskin kokulu ve suda çok iyi çözünen bir aldehittir. Oda sıcaklığında rahatlıkla gaz haline dönüşebilen, yanabilen ve

düşük molekül ağırlığına sahip bu madde kuvvetli bir elektrofilik özelliğe sahiptir (Canbilen ve ark., 1999, Heck ve ark., 1990 ). Kimyasal formülü  $\text{CH}_2\text{O}$  'dur. pH'sı genellikle 2,8 ile 4,0 aralığındadır. Hem sıvı, hem gaz halindeki formaldehit kolaylıkla polimer hale gelebilir ve bu yüzden saf monomerik halde sınırlı bir zaman kalabilir. Bu sebepten bir çözelti içerisinde ya da polimer halde satılır ve taşınır. (Schander ve Halanych, 2003, Kuş ve ark., 2007). Metanolün Cu-kromitle dehidrojenasyonu ve bakır katalizör üzerinde hava oksijeni oksidasyonu sonucu elde edilir (Arıcan, 2005).

### 1.3.1. Formaldehitin Kullanım Alanları

Formaldehit ilk defa 1859'da A. Butlerov tarafından hazırlandı fakat Butlerov maddeyi nitelendirmede başarısız oldu. 1868'de A.W. von Hofmann formaldehiti farklı bir metodla hazırladı ve sonra onu tanımladı. 1901'de A.B.D.'de ticari olarak limitli ölçeklerde üretilmeye başlandı. 1800'lerin sonundan beri biyolojik ve tıbbi örneklerin korunmasında kullanılan sıvıların ana bileşenidir (Schander and Halanych, 2003, Çelik ve ark.). Formaldehitin % 37' lik sıvı çözeltisi formalin adı altında satılmaktadır. Formalin ilk olarak 1886'da Loew ve Fisher tarafından bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılmıştır (Arıcan, 2005). Casteel ve arkadaşları (1987), Amerikalı üreticilerin yılda yaklaşık 7 milyar libre (3 171 000 ton) formaldehit ürettiklerini belirtmişlerdir.

Formaldehit yüksek reaktivitesi, düşük maliyeti ve renksiz oluşu nedeniyle endüstriyel sahada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Vaizoğlu, 2007). Boya ve plastik sanayi, yapı izolasyon malzemeleri, kontraplak sanayisinde, halı, mobilya, duvar kaplamalarında ve ev temizlik ürünlerinde kullanılmaktadır (Zararsız ve ark., 2008, Arıcan, 2005, Aksakal ve ark., 2005). Reçine , deri ürünleri, kağıt ve ilaçların imalatında da ihtiyaç duyulan bir maddedir (Canbilen ve ark., 1999). Tekstilde giysilere ve perdelere ütülenmiş izlenimi vermek için kullanılır (Evcı ve ark., 2005). Proteinleri sertleştirip çürümeleri önlediğinden biyolojik örneklerin saklanmasında ve mumyacılıkta, ayrıca böcekleri ve bir çok mikroorganizmayı öldürdüğünden

dezenfektan olarak kullanılmaktadır (Yılmaz ve ark., 2002). Diş hekimliğinde kaplamaların yapısında, klinikte inatçı sistit tedavisinde ve bazı ilaçlarda da koruyucu madde olarak formaldehitten faydalanılmaktadır (Zararsız ve ark., 2008).

Tıp alanında ise formaldehitin kullanımı laboratuvarlarda yoğunlaşmaktadır. Anatomide kadavra ve organların tespiti, bozulmadan uzun süre saklanması formaldehit havuzlarında yapılmaktadır. Histoloji ve patoloji laboratuvarlarında dokuların fiksasyon aşamasında kullanılmaktadır. Patolojide formaldehitin 100 yıldan fazla bir süredir kullanıldığı bilinmektedir. (Zararsız ve ark., 2008, Yılmaz ve ark., 2002, Malmgren ve ark., 1992, Shi ve ark., 2002, Sarsılmaz)

### **1.3.2. Formaldehitin Vücuttaki Metabolizması**

Formaldehit tüm memelilerde görülen normal bir metabolittir. Vücutta pürinler, timidin ve bazı aminoasitlerin biyosentezi için gereklidir. Birkaç mikroorganizma istisna olmak üzere canlı organizmalarda formaldehit, genellikle bir dehidrojenaz yardımı ile metanol veya metilaminin katabolik reaksiyonları sonucu oluşur (Casteel ve ark., 1987, Ma ve Haris, 1988, Heck ve ark., 1990).

Meyve ve sebzeler (3 - 60 ppm), et (5,7-20 ppm), süt ve süt ürünleri (1-3,3 ppm) ve en fazla da deniz kabukluları ile vücuda alınmaktadır. Hesaplamak zor olmakla birlikte yiyeceklerle 1,5 - 14 mg/gün civarında formaldehit alındığı tahmin edilmektedir. İçme suyu ile günde 0,2 mg formaldehit vücuda alınmaktadır. (Canbilen ve ark., 1999, Arıcan, 2005)

İnsan, sıçan ve maymun kanındaki formaldehit konsantrasyonları ölçülmüştür. Dış maruziyet olmaksızın insan kanı için endojen formaldehit düzeyi  $2,61 \pm 0,14$  µg/g olarak belirlenmiştir (Heck ve ark., 1990).

Organizmaya dışarıdan alındığı zaman formaldehit dehidrojenaz enzimi (FDH) katalizörlüğünde karaciğerde ve eritrositlerde formik asite metabolize olur. Formaldehit vücut içerisinde depo edilmez formik asite

dönüşerek idrar ve gaita yoluyla ya da karbondioksite okside olarak solunum yoluyla atılır (Kuş ve ark., 2007).

Formaldehitin yaygın kullanımının yanında insan sağlığına önemli zararları da vardır. Formaldehit üretiminin yapıldığı ya da kullanıldığı endüstriyel alanlardaki meslek grupları ile tıp laboratuvarlarında çalışan kişiler bu kimyasal maddenin olumsuz etkileri ile karşı karşıya kalmaktadırlar (Yılmaz ve ark., 2002, Kuş ve ark., 2008).

### **1.3.3. Formaldehitin Toksik Etkileri**

Yaygın şekilde kullanılan ve bulunduğu her ortamda gaz haline dönüşen formaldehitin hayvan deneylerinde üst ve alt solunum yollarına zararları, mutajen ve karsinogen olduğu gösterilmiştir (Arıcan, 2005). Suda çözünebilen oldukça reaktif bir kimyasal olan formaldehit akut etkilerini ilk temas yeri olan mukoz membranlarda oluşturur (Casteel ve ark., 1987).

Anatomistler, patologlar ve tahniçiler formaldehite işlerinden dolayı aşırı maruz kalmaktadırlar. Tıp, veteriner, biyoloji öğrencileri fakültelerine girişlerinden itibaren sürekli olarak formaldehite maruz kalırlar. Bunun dışında birçok laboratuvarda çalışan teknisyenler de formaldehit buharına maruz kalır. İritasyon eşiği 1,0 – 1,2 ppm' dir. Formaldehit toksik etkilerini nonenzimatik yolla DNA, RNA, protein ve doymamış yağ asitleri ile güçlü bir şekilde birleşerek gerçekleştirme eğilimindedir. Makromoleküllerle kovalent reaksiyonlar göstermesi toksik etkilerinin başlıca nedeni olarak kabul edilir. Nörotoksik etkileri erken dönemde baş ağrısı, baş dönmesi, keyifsizlik, uykusuzluk ve iştahsızlık şeklinde kendini göstermektedir. Daha uzun süreli etkilenmelerde ise duygu-durum bozuklukları, davranış bozuklukları ve epilepsi belirtileri ortaya çıkabilmektedir. (Arıcan, 2005, Zararsız ve ark., 2008, Kuş ve ark., 2007, Heck ve ark., 1990).

Formaldehitin deri iltihabı, göz mukozasının tahriş olması, astım, akciğer ödemi, rinit ve farenjit gibi hastalıklara sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca formaldehitin, in vitro olarak, DNA tek zincir kırıklarına sebep olduğu



ve insan hücrelerinde olduğu gibi, Drosophila larvalarında, bakterilerde ve funguslarda mutajen ve rodentlerde bir solunum karsinojeni olduğu bilinmektedir. Üreme sistemi üzerinde de olumsuz etkiler gösteren formaldehitin, germinal hücrelere zarar verdiği ve fertilité problemlerine yol açtığı bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2002, Kuş ve ark., 2008).

Amerikan hükümeti endüstriyel hijyen komitesinin yapmış olduğu toplantıda formaldehitin kabul edilebilir üst sınırı 0,3 ppm olarak ortaya konmuştur. Fakat bu sınır laboratuvarlarda oldukça aşılmaktadır. Makroskobik patoloji laboratuvarında diseksiyon sırasında yapılan ölçümlerin % 94'ünde bu değerin aşıldığı belirlenmiştir.

Formaldehitin bu toksik etkisinden kaçınılamadığının görülmesi değişik tespit solüsyonlarına geçilmesini başlatsa da formaldehit hala en sık kullanılan tespit solüsyonu olarak yerini korumaktadır (Canbilen ve ark 1999).

#### **1.3.4. Formaldehitin Mutajenliği ve DNA Molekülüne Etkileri**

Formaldehitin genotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar, hem hücre tipine hem de doza bağlı olarak DNA'da bir çok yapısal değişikliklere sebep olduğunu ortaya çıkarmıştır. Formaldehit in-vivo ve in-vitro olarak eşit mutajenite gösterir. Formaldehit ile inkübe edilmiş memeli hücrelerinde DNA çapraz bağlantılarının oluştuğu, DNA iplik kırılmaları ve nükleotid havuzlarının karışması yüzünden fazla veya yanlış baz çifti yerleşmelerinin olduğu gösterilmiştir (Heck ve ark., 1990, Canbilen ve ark., 1999). Mikroskobik incelemelerde hücre içi yapıların sabitlenmesi ve kromatin presipitasyonunda DNA-protein bağlantı noktalarının hareketsizleştirilmesi amacıyla formaldehitin ilişkide olduğu moleküllerle çapraz bağlar oluşturması oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Schmiedeberg ve ark., 2009).

Formaldehit ile inkübe edilmiş hücrelerde gözlenen direkt DNA hasarına ek olarak, formaldehitin insan bronş mukoza hücrelerinde DNA sentezini inhibe ettiği ve tek-iplik kırılmalarının onarımını engellediği gösterilmiştir. İnsan fibroblast kültüründe, sıçan nazal mukozasında ve E.

coli'de formaldehitin önemli ölçüde DNA replikasyonunu geriletmediği bildirilmiştir. Formaldehitin bunu replikasyon çatalında DNA-protein çapraz bağlantısına neden olarak yaptığı düşünülmektedir (Canbilen ve ark., 1999, Ma ve Haris, 1988). Belirli bir biçimde formaldehitin çift zincir DNA'dan çok daha fazla etkili olarak tek iplikli DNA bölgelerine saldırdığı ve kimyasal olarak değiştirdiği değerlendirilmektedir (Aparna ve Palmer, 2009).

Formaldehit proteinler ile nükleik asitler arasında çapraz bağlar oluşmasına neden olur ve tespit süreci şartları oldukça düşük pH'da (<1) olduğundan nükleik asitlerin parçalanmasına yol açar. Bu durum yüksek moleküler ağırlıkta DNA çoğaltımını çok zorlaştırır. Çapraz bağlanmalar sadece DNA izolasyonunda problemlere neden olmaz, aynı zamanda PCR çoğaltımını bloke eder (Lin ve ark., 2009).

Nötral pH'da formaldehit DNA'daki üç baz ile (sitozin, guanin ve adenin) tepkimeye girer. Bu durum metilen grubu yoluyla primer bağlanmasını engelleyen, renatürasyonu inhibe eden ve PCR'daki replikasyon sürecini baskılayan reaktif bir formaldehit bileşiği yaratabilir. AT'den zengin bölgelerin, CG baz çiftinin baskın olduğu bölgelere oranla formaldehit ile reaksiyona daha dayanıksız olduğu düşünülmektedir. (Schander ve Halanych 2003). RNA'da da aynı baz grupları (sitozin, guanin, adenin) etkileşime girmektedir (Haselkorn ve Doty, 1961).

DNA analizine gönderilecek dokuların formaldehit içerisinde gönderilmemesi gerektiği bildirilmektedir ([www.atk.gov.tr](http://www.atk.gov.tr)). Buna rağmen mahkemeler ya da savcılıklar sıklıkla formaldehit içinde tespit edilen dokuları Biyoloji İhtisas Dairesine göndermektedir. Bu nedenle Formaldehit ile doku tespiti yapılan materyalde DNA analizine etki eden unsurlar incelenmesi gerekmektedir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal Temini

Formaldehit ile fikse edilmiş karaciğer ve kas dokularından DNA ekstraksiyonuna zamanın ve metodun etkisini belirleyebilmek için bir inceleme yapıldı. Adli Tıp Kurumu Başkanlığı'nın 16.06.2009 tarih ve 396 sayılı onayı alındıktan sonra Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığında otopsis yapılan ve henüz çürüme başlamamış 4 erkek ve 1 kadın cesedinden karaciğer ve psoas kası örnekleri alındı. 1 nolu örneklerin alındığı olgu 21 yaşında erkek, ateşli silah mermi çekirdeği yaralanması sonucu kaldırıldığı hastanede 01.10.2009 tarihinde (saat: 14.00) ölmüş, 02.10.2009 tarihinde otopsis yapılmıştır. 2 nolu örneklerin alındığı olgu 59 yaşında erkek, ateşli silah mermi çekirdeği yaralanması sonucu 04.10.2009 tarihinde ölmüş ve aynı gün otopsis yapılmıştır. 3 nolu örneklerin alındığı olgu 52 yaşında erkek, trafik kazası sonucu 06.10.2009 tarihinde ölmüş ve 07.10.2009 tarihinde otopsis yapılmıştır. 4 nolu örneklerin alındığı olgu 49 yaşında kadın, 06.10.2009 tarihinde (saat: 20.00) hastaneye eks duhül etmiş, 07.10.2009 tarihinde otopsis yapılmıştır. 5 nolu örneklerin alındığı olgu 47 yaşında erkek, rögar içerisinde zehirlenme sonucu 07.10.2009 tarihinde ölmüş ve aynı gün otopsis yapılmıştır. Referans numuneleri ayrıldıktan sonra örnekler formaldehit içerisinde fikse edilmeye başlandı.

### 2.2. Fiksasyon

Otopsilerden temin edilen karaciğer ve psoas kası örnekleri ayrı ayrı steril örnek kapları içerisine alındı. Üzerlerine dokuları örtecek kadar (yaklaşık 70 ml) % 37'lik formalinden ( sigma ) hazırlanan % 10 formaldehit solüsyonu eklendi ve oda ısısında bekletilerek fiksasyon başlatıldı. Her bir dokudan 1.

gün, 2. gün, 5. gün, 10. gün, 20. gün ve 30. gün sonunda numuneler alınarak DNA izolasyonuna geçildi.

### **2.3. DNA İzolasyonu**

Her bir örnek yukarıda belirtilen günlerin sonunda iki farklı yöntemle DNA izolasyonuna tabi tutuldu. Yöntemlerin her biri için 5 karaciğer ve 5 psoas kası örneği negatif ve pozitif kontrolü ile birlikte izolasyona alındı. Negatif kontrol tüplerine herhangi bir doku konulmadı. Sadece lizis karışımı eklendi. Pozitif kontrol tüplerinde ise formaldehit ile tespit edilmemiş psoas kası izole edildi. İzolasyona başlamadan önce formaldehit içerisinden alınan dokular ilki 2 saat, ikincisi 10 dakika olmak üzere iki kez serum fizyolojik ile çalkalamalı olarak yıkandı.

#### **2.3.1. Manyetik Partikül Tekniği ile İzolasyon**

MagAttract DNA M48 Mini Kit (Qiagen Ltd.) kullanılarak nükleik asit izolasyon cihazı (M48, Qiagen Ltd.) ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi. MagAttract DNA M48 Mini Kit yumuşak dokulardan ve hücre kültürlerinden DNA izolasyonunu otomatize etmek için tasarlanmış bir kittir. Amplifikasyon veya diğer enzimatik reaksiyonlar gibi aşağı akışlı (downstream) uygulamalar için doğrudan kullanıma uygun yüksek kalitede DNA saflaştırması, uygun manyetik partiküller ile gerçekleşir. DNA bir kaotropik tuz varlığında manyetik partiküllerin silika yüzeylerine bağlanır. DNA manyetik partiküllere bağlandıktan sonra etkili bir şekilde yıkanır. İki farklı yıkama tamponu kullanılır. Ardından DNA'yı daha çok saflaştırmak için hızlıca distile sudan geçirilir. DNA elüsyonu saf su içerisinde elde edilir (MagAttract DNA Mini M48 Forensic handbook).

Formaldehit (%10) ile fikse edilmiş 40 mg doku örneği serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra formaldehitin tamamen uzaklaştırılması amacıyla

(normal prosedürde olmadığı halde) saf etanol (merc) ile muamele edildi. Dokunun bulunduğu tüpe 1 ml etanol (%99,6) eklenerek vortekslenildi ve 14000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Üst faz pipetle alındı. Tüpteki alkolün tamamen kuruması için 37°C' de inkübatörde bekletildi. Ardından üretcinin tavsiyesine uygun olarak yöntem devam edildi.

Örnekler üzerine 190 µl ATL buffer ve 10 µl proteinaz-K (10 mg/ml) eklenerek vortekslenildi. 56°C'de 1 gece çalkalanarak inkübe edildi. Kısa süre ile santrifüjlenen örnekler nükleik asit izolasyon cihazına yüklendi. "Trace TD" yazılım protokolü seçilerek cihaz çalıştırıldı. Her bir örnek için 50 µl izolat elde edildi .

### **2.3.2. Kolon Filtrasyon Tekniği ile İzolasyon**

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen Ltd.) ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi. FFPE Tissue Kit formalin ile fikse edilmiş (ve parafine gömülmüş) dokulardan DNA eldesi için tasarlanmış bir kittir. Küçük miktarlardaki örneklerden dahi genomik ve mitokondriyal DNA elde etmeyi amaçlamaktadır. Kit, silika temelli membranın seçici bağlanma özelliğini 20 - 100 µl arasındaki değişken elüsyon hacmi özelliği ile birleştirir. Gece boyu inkübasyonuna ihtiyaç duymadan formalin ile fikse edilmiş (parafine gömülmüş) dokulardan etkili DNA izolasyonu sağlamak için lizis şartları özellikle geliştirilmiştir. Yükselttilmiş ısıda proteinaz K ile muameleden sonra yapılan inkübasyon formalinin çapraz bağlanmalarını kısmen kaldırır, DNA ürününü olabildiğince artırır (QIAamp DNA FFPE Tissue handbook).

Formaldehit ile fikse edilen doku örnekleri serum fizyolojik ile ilki 2 saat, ikincisi 10 dakika olmak üzere iki kez yıkandıktan sonra üretcinin tavsiyesine uygun olarak izolasyona alındı. Doku örnekleri parafine gömülü olmadığından parafinin uzaklaştırılmasını amaçlayan ilk basamak (1 ml ksilen ile yıkama) atlandı. Örnekler üzerine 1 ml saf etanol (Merc) eklenerek vortekslenildi. 2 dk. 14000 rpm' de santrifüj edildi. Süpernatant pipetle alındı.

Tüplerin kapakları açılarak 37°C'de inkübatörde bekletildi. Alkolün tamamen buharlaşması sağlandı. 180 µl buffer ATL ve 20 µl proteinaz K eklenerek vortekslendi. 56 °C'de 1 gece termomikserde inkübe edildi. Ardından 90°C'de 1 saat inkübe edildi. Tüpler kısa bir süre santrifüj edildi. Her bir örnek üzerine 200 µl buffer AL ve 200 µl etanol (%99,6) eklenerek vortekslendi. Tüpler kısa bir süre santrifüj edildikten sonra tüm lizat spin kolonlara transfer edildi. Kolonlar 8000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi. Kolonlara 500 µl AW1 buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi. Sonra kolonlara 500 µl AW2 buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi. Kolon membranlarının tamamen kuruması için 14000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi. Membranların merkezine 50 µl ATE buffer eklendi. 5 dk. oda ısısında bekletildikten sonra 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek örneklere ait DNA izolatları alındı.

#### 2.4. DNA Miktar Tayini (Kantitasyon)

DNA izolasyonunun ardından doku örneklerinden elde edilen izolatlar DNA miktar tayin çalışmasına alındı. Real-Time PCR cihazı (ABI7500, Applied Biosystems) kullanılarak Quantifiler Human kiti (Applied Biosystems) ile üreticinin tavsiyesine uygun olarak örneklerin kantitasyonu yapıldı.

Karışım (her bir örnek için):

Reaction mix	= 12,5 µl
Primer mix	= 10,5 µl
<u>DNA</u>	= <u>2µl</u>
Toplam	= 25 µl

## 2.5. PCR

Cinsiyet geni haricinde 15 STR lokusunun çoğaltılmasına imkan sağlayan Identifiler kiti (Applied Biosystems) ile ABI 9700 (Applied Biosystems) ısı döngü cihazı (thermal cycler) kullanılarak doku örneklerinin PCR işlemi gerçekleştirildi. D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, THO1, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA STR lokusları çoğaltıldı. PCR karışımı ve şartları üreticinin tavsiyesine uygun olarak aşağıdaki gibi uygulandı.

### Karışım (her bir örnek için) :

PCR reaction mix	= 10 µl
PCR primer mix	= 5 µl
<u>Taq DNA polimeraz</u>	<u>= 0,5 µl</u>
15 µl tüplere dağıtıldı	

0,5 – 1,2 ng/µl DNA eklendi ve saf su (dH<sub>2</sub>O) ile toplam hacim 25 µl'ye tamamlandı. Yoğun örnekler yine dH<sub>2</sub>O ile seyreltildi.

### PCR şartları :

İlk inkübasyon	= 95°C -11dk.
Denatürasyon	= 94°C – 1 dk.
Bağlanma	= 59°C – 1dk
Uzama	= 72°C – 1dk.
Son uzama	= 60°C – 60 dk

Tavsiye edilen standart 28 döngü uygulandı.

## 2.6. Tipleme

PCR ile çoğaltılan DNA STR bölgeleri 3130xl genetik analizör cihazı (Applied Biosystems) yardımı ile kapiller elektroforez işlemine tabi tutuldu ve GeneMapper (v3.1) yazılım programı ile tiplendirildi. Elektroforez işlemi için yükleme karışımı üreticinin tavsiyesine uygun olarak her bir örnek başına aşağıdaki gibi hazırlandı.

Formamid	= 10 µl
Standart (LIZ)	= 0,5 µl
<u>PCR ürünü</u>	<u>= 0,5 µl</u>
Toplam	= 11 µl

Yükleme öncesinde karışım yine tavsiye edildiği şekilde 95° C'de 3-4 dk. denatüre edildi.

Elde edilen veriler parametrik test olan bağımlı örneklem için t testi ve varyans analizi ile SPSS programı (15.0) kullanılarak istatistiksel olarak test edildi.  $p < 0,05$  anlamlı fark olarak kabul edildi.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Referans Örnekler

Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığında otopsisini yapılan beş farklı cesetten temin edilen psoas kası ve karaciğer dokularına ait DNA miktarları tablo 3.1'e aktarılmıştır. Referans DNA profilleri, psoas kaslarından manyetik partikül tekniği ile yapılan izolasyon sonucunda elde edilmiştir ve tablo 3.2'deki gibidir.

Örnek	Manyetik Par.Tek.	Kolon filtr. Tek.
1 Psoas	59,0	164,45
2 Psoas	61,48	250,16
3 Psoas	60,67	190,22
4 Psoas	67,32	145,90
5 Psoas	81,55	180,25
1 karaciğer	43,81	1970,54
2 karaciğer	87,22	1140,67
3 karaciğer	100,50	1260,43
4 karaciğer	82,0	830,46
5 karaciğer	76,74	1190,98

**Tablo 3.1.** Formaldehit ile tespit edilmeyen referans dokulara ait DNA miktarları (ng/µl)

STR bölgesi	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5
D8S1179	10-13	8-11	13-14	13-14	14-15
D21S11	29-31,2	30-31	28-29	27-29	29-29
D7S820	10-12	10-10	10-12	7-10	9-10
CSF1PO	10-14	11-11	11-11	11-11	11-11
D3S1358	15-19	11-14	15-16	17-17	17-17
THO1	7-9	6-6	6-9,3	6-7	7-9
D13S317	11-12	11-11	8-8	11-12	12-12
D16S539	9-9	9-11	11-12	12-13	11-12

D2S1338	21-25	18-21	16-19	19-24	17-17
D19S433	14-15	13-16	13-13	13-13	14-14
vWA	16-17	17-18	14-14	16-17	17-18
TPOX	8-9	9-11	8-11	8-11	8-12
D18S51	14-14	13-16	17-17	15-18	13-18
AMELOGENİN	XY	XY	XY	XX	XY
D5S818	10-13	12-12	11-12	11-14	7-11
FGA	24-26	21-22	22-25	22-23	22-23

**Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan dokuların referans DNA profilleri

### 3.2. Birinci Gün Sonuçları

Bir gün boyunca %10 formaldehit solüsyonunda tespit edilen dokulardan izolasyon yöntemine göre elde edilen DNA miktarları tablo 3.3'deki gibidir.

Örnek	Manyetik Par.Tek.	Kolon filtr. Tek.
1 Psoas	6,59	39,90
2 Psoas	4,04	198,01
3 Psoas	0,75	168,58
4 Psoas	0,02	166,64
5 Psoas	9,91	209,97
1 karaciğer	9,39	920,82
2 karaciğer	13,93	738,91
3 karaciğer	31,65	408,78
4 karaciğer	18,11	831,07
5 karaciğer	13,63	870,46

**Tablo 3.3.** 1 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/µl)

İlk gün sonunda kolon filtrasyon tekniği ile ortalama 455,31 ng/µl DNA elde edilmişken manyetik partikül tekniği ile ortalama 10,80 ng/µl DNA elde edildi. Doku tipine göre ortalama DNA miktarları; kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen psoas örneklerinde 156,62 ng/µl, karaciğer dokularında 754

ng/ $\mu$ l, manyetik partikül yöntemi ile izole edilen psas örneklerinde 4,26 ng/ $\mu$ l ve karaciğer örneklerinde 17,34 ng/ $\mu$ l'dir.

PCR ile çoğaltım sonucunda her iki yöntemle izole edilen tüm örneklerde STR bölgelerinin tamamı tiplendirildi. Profiller tablo 3.4'e aktarıldı.

<b>STR bölgesi</b>	<b>Örnek 1 kc-ps</b>	<b>Örnek 2 kc-ps</b>	<b>Örnek 3 kc-ps</b>	<b>Örnek 4 Kc-ps</b>	<b>Örnek 5 kc-ps</b>
D8S1179	10-13	8-11	13-14	13-14	14-15
D21S11	29-31,2	30-31	28-29	27-29	29-29
D7S820	10-12	10-10	10-12	7-10	9-10
CSF1PO	10-14	11-11	11-11	11-11	11-11
D3S1358	15-19	11-14	15-16	17-17	17-17
THO1	7-9	6-6	6-9,3	6-7	7-9
D13S317	11-12	11-11	8-8	11-12	12-12
D16S539	9-9	9-11	11-12	12-13	11-12
D2S1338	21-25	18-21	16-19	19-24	17-17
D19S433	14-15	13-16	13-13	13-13	14-14
vWA	16-17	17-18	14-14	16-17	17-18
TPOX	8-9	9-11	8-11	8-11	8-12
D18S51	14-14	13-16	17-17	15-18	13-18
AMELOGENİN	XY	XY	XY	XX	XY
D5S818	10-13	12-12	11-12	11-14	7-11
FGA	24-26	21-22	22-25	22-23	22-23

**Tablo 3.4.** 1 günlük tespit sonunda örneklerin DNA tipleme sonuçları (kc: karaciğer, ps: psas)

### 3.3. İkinci Gün Sonuçları

Formaldehit ile tespitinin ikinci günü sonunda dokulardan izolasyon yöntemine göre elde edilen DNA miktarları tablo 3.5'e aktarılmıştır.

Örnek	Manyetik Par.Tek.	Kolon filtr. Tek.
1 psoas	16,63	75,20
2 psoas	5,84	74,59
3 psoas	23,39	49,80
4 psoas	0,001	62,70
5 psoas	0,17	28,50
1 karaciğer	7,91	282,97
2 karaciğer	16,10	117,06
3 karaciğer	29,59	233,17
4 karaciğer	29,39	244,36
5 karaciğer	18,54	223,76

**Tablo 3.5.** 2 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/µl)

İkinci gün sonunda kolon filtrasyon tekniği ile elde edilen DNA miktarı ortalama 139,21 ng/µl ,manyetik partikül tekniği ile elde edilen DNA miktarı ortalama 14,76 ng/µl'dir. Doku tipine göre ortalama DNA miktarları; kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen psoas örneklerinde 58,16 ng/µl, karaciğer dokularında 220,26 ng/µl, manyetik partikül yöntemi ile izole edilen psoas örneklerinde 9,21 ng/µl ve karaciğer örneklerinde 20,31 ng/µl'dir.

PCR ile çoğaltım sonucunda, manyetik partikül yöntemi ile izole edilen 4 nolu psoas dokusu hariç her iki yöntemle izole edilen tüm örneklerde STR bölgelerinin tamamı tiplendirildi. 4 nolu psoas dokusunda tiplene yapılamadı. Profiller tablo 3.6'ya aktarıldı.

STR bölgesi	Örnek 1 kc-ps	Örnek 2 kc-ps	Örnek 3 kc-ps	Örnek 4 Kc	Örnek 5 kc-ps
D8S1179	10-13	8-11	13-14	13-14	14-15
D21S11	29-31,2	30-31	28-29	27-29	29-29
D7S820	10-12	10-10	10-12	7-10	9-10
CSF1PO	10-14	11-11	11-11	11-11	11-11
D3S1358	15-19	11-14	15-16	17-17	17-17
THO1	7-9	6-6	6-9,3	6-7	7-9
D13S317	11-12	11-11	8-8	11-12	12-12
D16S539	9-9	9-11	11-12	12-13	11-12
D2S1338	21-25	18-21	16-19	19-24	17-17
D19S433	14-15	13-16	13-13	13-13	14-14
vWA	16-17	17-18	14-14	16-17	17-18

TPOX	8-9	9-11	8-11	8-11	8-12
D18S51	14-14	13-16	17-17	15-18	13-18
AMELOGENİN	XY	XY	XY	XX	XY
D5S818	10-13	12-12	11-12	11-14	7-11
FGA	24-26	21-22	22-25	22-23	22-23

**Tablo 3.6.** 2 günlük tespit sonunda örneklerin DNA tiplene sonuçları (kc:karaciğer,ps:psoas)

### 3.4. Beşinci Gün Sonuçları

Formaldehit ile beş günlük tespit sonucunda dokulardan izolasyon yöntemine göre elde edilen DNA miktarları tablo 3.7'deki gibidir.

Örnek	Manyetik Par.Tek.	Kolon filtr. Tek.
1 Psoas	-	25,38
2 Psoas	1,36	20,45
3 Psoas	1,32	5,34
4 Psoas	0,002	66,44
5 Psoas	1,55	35,79
1 karaciğer	5,85	18,96
2 karaciğer	7,70	162,28
3 karaciğer	4,31	103,67
4 karaciğer	4,72	266,84
5 karaciğer	3,25	122,73

**Tablo 3.7.** 5 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/µl)

Beşinci gün sonunda kolon filtrasyon tekniği ile elde edilen DNA miktarı ortalama 82,79 ng/µl, manyetik partikül tekniği ile elde edilen DNA miktarı ortalama 3,01 ng/µl'dir. Doku tipine göre ortalama DNA miktarları; kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen psoas örneklerinde 30,68 ng/µl, karaciğer dokularında 134,90 ng/µl, manyetik partikül yöntemi ile izole edilen psoas örneklerinde 0,85 ng/µl ve karaciğer örneklerinde 5,17 ng/µl'dir. 1 nolu örneğin psoas dokusundan DNA izole edilememiştir.

PCR ile çoğaltım sonucunda tiplendirilebilen STR bölgeleri kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen örnekler için tablo 3.8'e manyetik partikül tekniği ile izole edilen örnekler için tablo 3.9'a aktarılmıştır.

STR bölgesi	Örnek1 psoas	Örnek2 psoas	Örnek3 psoas	Örnek4 psoas	Örnek5 psoas	Örnek1 k.ciğer	Örnek2 k.ciğer	Örnek3 k.ciğer	Örnek4 k.ciğer	Örnek5 k.ciğer
D8S1179	10-13	8-11	13-14	13-14	14-15	10-13	8-11	13-14	13-14	14-15
D21S11	29- 31.2	30-31	-	27-29	29-29	29- 31.2	30-31	28-29	27-29	29-29
D7S820	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSF1PO	-	11-11	-	11-11	-	-	-	-	-	-
D3S1358	15-19	11-14	15-16	17-17	17-17	15-19	11-14	15-16	17-17	17-17
THO1	7-9	6-6	6-9.3	6-7	7-9	7-9	6-6	6-9.3	6-7	7-9
D13S317	11-12	11-11	-	11-12	12-12	11-12	11-11	8-8	11-12	12-12
D16S539	9-9	9-11	-	12-13	11-12	9-9	9-11	-	-	-
D2S1338	-	18-21	-	19-24	17-17	-	-	-	-	-
D19S433	14-15	13-16	13-13	13-13	14-14	14-15	13-16	13-13	13-13	14-14
vWA	16-17	17-18	14-14	16-17	17-18	16-17	17-18	14-14	16-17	17-18
TPOX	8-9	9-11	-	8-11	8-12	8-9	9-11	8-11	8-11	8-12
D18S51	14-14	13-16	-	15-18	-	14-14	-	17-17	-	-
AMELO.	XY	XY	XY	XX	XY	XY	XY	XY	XX	XY
D5S818	10-13	12-12	-	11-14	7-11	10-13	12-12	11-12	11-14	-
FGA	24-26	21-22	-	22-23	22-23	24-26	21-22	22-25	22-23	22-23

**Tablo 3.8.** Beşinci gün sonunda kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen örneklere ait tipleme sonuçları.

STR bölgesi	Örnek1 psoas	Örnek2 psoas	Örnek3 psoas	Örnek4 psoas	Örnek5 psoas	Örnek1 k.ciğer	Örnek2 k.ciğer	Örnek3 k.ciğer	Örnek4 k.ciğer	Örnek5 k.ciğer
D8S1179	-	8-11	13-14	-	14-15	10-13	8-11	13-14	13-14	14-15
D21S11		-	-	-	-	-	-	-	27-29	-
D7S820	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSF1PO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D3S1358	-	11-14	15-16	-	17-17	15-19	11-14	15-16	17-17	17-17

THO1	-	6-6	6-9.3	-	7-9	7-9	6-6	6-9.3	6-7	7-9
D13S317	-	-	8-8	-	-	-	-	-	11-12	-
D16S539	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D2S1338	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D19S433	-	13-16	13-13	-	14-14	14-15	13-16	13-13	13-13	14-14
vWA	-	17-18	14-14	-	17-18	16-17	17-18	14-14	16-17	-
TPOX	-	-	-	-	-	8-9	-	-	-	-
D18S51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMELO.	-	XY	XY	-	XY	XY	XY	XY	XX	XY
D5S818	-	12-12	11-12	-	7-11	10-13	-	11-12	11-14	-
FGA	-	-	-	-	-	-	-	-	22-23	-

**Tablo 3.9.** Beşinci gün sonunda manyetik partikül yöntemi ile izole edilen örneklere ait tiplendirme sonuçları.

### 3.5. Onuncu Gün Sonuçları

Formaldehit ile tespitinin onuncu günü sonunda izolasyon yöntemine göre dokulardan elde edilen DNA miktarları tablo 3.10'da yer almaktadır.

Örnek	Manyetik Par.Tek.	Kolon filtr. Tek.
1 Psoas	0.005	5.05
2 Psoas	0.004	8.98
3 Psoas	0.04	9.59
4 Psoas	0.001	18.01
5 Psoas	0.002	5.14
1 karaciğer	0.17	20.67
2 karaciğer	0.07	28.10
3 karaciğer	0.08	30.01
4 karaciğer	0.26	12.42
5 karaciğer	0.08	21.63

**Tablo 3.10.** 10 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/µl)

Ortalama DNA miktarı kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen örnekler için 15,96 ng/μl, manyetik partikül tekniği ile izole edilen örnekler için 0,07 ng/μl olarak belirlenmiştir. Doku tipine göre ortalama DNA miktarları; kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen psoas örneklerinde 9,35 ng/μl, karaciğer dokularında 22,57 ng/μl, manyetik partikül yöntemi ile izole edilen psoas örneklerinde 0,01 ng/μl ve karaciğer örneklerinde 0,13 ng/μl olarak bulundu.

Kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen örnekler için tiplendirilebilen STR bölgeleri tablo 3.11'e aktarılmıştır. Manyetik partikül tekniği ile izole edilen örneklerin hiçbirisinden tiplendirme yapılamadı.

STR bölgesi	Örnek1 psoas	Örnek2 psoas	Örnek3 psoas	Örnek4 psoas	Örnek5 psoas	Örnek1 k.ciğer	Örnek2 k.ciğer	Örnek3 k.ciğer	Örnek4 k.ciğer	Örnek5 k.ciğer
D8S1179	10-13	8-11	-	13-14	7-8	10-13	8-11	13-14	-	-
D21S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D7S820	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSF1PO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D3S1358	15-19	11-14	15-16	17-17	17-17	15-19	11-14	15-16	17-17	17-17
THO1	7-9	6-6	6-9.3	6-7	7-9	7-9	6-6	6-9.3	6-7	7-9
D13S317	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D16S539	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D2S1338	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D19S433	14-15	13-16	13-13	13-13	14-14	14-15	13-16	13-13	13-13	14-14
vWA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPOX	-	-	-	8-11	-	-	-	-	-	-
D18S51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMELO.	XY	XY	XY	XX	XY	XY	XY	XY	XX	XY
D5S818	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FGA	-	-	-	22-23	-	-	-	-	-	-

**Tablo 3.11.** Onuncu gün sonunda kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen örneklere ait tiplene sonuçları.



### 3.6. Yirminci Gün Sonuçları

Yirmi günlük formaldehit tespiti sonucunda izolasyon yöntemine göre dokulardan elde edilen DNA miktarları tablo 3.12'de yer almaktadır. Manyetik partikül yöntemi ile izole edilen 3 nolu psoas dokusundan DNA elde edilemedi.

Örnek	Manyetik Par.Tek.	Kolon filtr. Tek.
1 Psoas	0,02	3,19
2 Psoas	0,02	7,45
3 Psoas	-	2,38
4 Psoas	0,06	0,07
5 Psoas	0,02	4,07
1 karaciğer	0,62	6,45
2 karaciğer	0,45	6,93
3 karaciğer	0,59	7,90
4 karaciğer	1,06	10,61
5 karaciğer	0,20	21,95

**Tablo 3.12.** 20 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/μl)

Yirminci gün sonunda kolon filtrasyon tekniği ile elde edilen DNA miktarı ortalama 7,10 ng/μl, manyetik partikül tekniği ile elde edilen DNA miktarı ortalama 0,30 ng/μl'dir. Doku tipine göre ortalama DNA miktarları; kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen psoas örneklerinde 3,43 ng/μl, karaciğer dokularında 10,77 ng/μl, manyetik partikül yöntemi ile izole edilen psoas örneklerinde 0,02 ng/μl ve karaciğer örneklerinde 0,58 ng/μl'dir.

Kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen örnekler için tiplendirilebilen STR bölgeleri tablo 3.13'e aktarılmıştır. Manyetik partikül tekniği ile izole edilen örneklerin hiçbirisinden tiplendirme yapılamadı.

STR bölgesi	Örnek1 psoas	Örnek2 psoas	Örnek3 psoas	Örnek4 psoas	Örnek5 psoas	Örnek1 k.ciğer	Örnek2 k.ciğer	Örnek3 k.ciğer	Örnek4 k.ciğer	Örnek5 k.ciğer
D8S1179	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D21S11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D7S820	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CSF1PO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D3S1358	-	11-14	-	-	-	-	-	-	-	-
TH01	-	-	-	17-17	17-17	-	-	-	-	-
D13S317	-	-	-	6-7	7-9	-	-	-	-	-
D16S539	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D2S1338	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D19S433	14-15	13-16	13-13	13-13	14-14	14-15	13-16	13-13	13-13	14-14
vWA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TPOX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D18S51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMELO.	XY	XY	XY	XX	XY	XY	XY	XY	XX	XY
D5S818	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tablo 3.13.** Yirminci gün sonunda kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen örneklere ait tiplene sonuçları.

### 3.7. Otuzuncu Gün Sonuçları

Otuz gün formaldehit ile tespit edildikten sonra dokulardan izolasyon yöntemine göre elde edilen DNA miktarları tablo 3.14'deki gibi bulunmuştur.

Örnek	Manyetik Par.Tek.	Kolon filtr. Tek.
1 Psoas	0,85	1,39
2 Psoas	1,86	2,36
3 Psoas	0,15	0,89
4 Psoas	0,22	3,34
5 Psoas	0,17	1,49
1 karaciğer	1,46	1,36
2 karaciğer	0,38	1,32
3 karaciğer	0,71	1,91
4 karaciğer	1,33	1,05
5 karaciğer	1,47	0,57

**Tablo 3.14.** 30 günlük tespit sonunda örneklerden elde edilen DNA miktarları (ng/μl)

Otuzuncu gün sonunda kolon filtrasyon tekniği ile elde edilen DNA miktarı ortalama 1,57 ng/μl, manyetik partikül tekniği ile elde edilen DNA miktarı ortalama 0,86 ng/μl'dir. Doku tipine göre ortalama DNA miktarları; kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilen psosas örneklerinde 1,89 ng/μl, karaciğer dokularında 1,24 ng/μl, manyetik partikül yöntemi ile izole edilen psosas örneklerinde 0,65 ng/μl ve karaciğer örneklerinde 1,07 ng/μl'dir. Manyetik partikül yöntemi ile izole edilen örneklerin hiç birinden tiplendirme yapılamadı. Kolon filtrasyon tekniğiyle izole edilen 2 ve 5 nolu psosas örneklerinin amelogenin ve D19S433 bölgeleri, 1, 3, 4 nolu psosas örnekleri ile 3, 4, 5 nolu karaciğer örneklerinin ise sadece D19S433 bölgeleri tiplendirilebilmiş, 1, 2 nolu karaciğer örnekleri tiplendirilememiştir.

### 3.8. İstatistik sonuçları

Psoas dokularından 1. gün ölçülen DNA miktarları izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark göstermektedir ( $p < 0,05$ ). Bulunan fark kolon filtrasyon yöntemi lehinedir (tablo 3.15).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
1.gün	Manyetik	5	4,26	4,11	-4,993	4	0,008*
	Kolon	5	156,62	67,87			

**Tablo 3.15.** Psoas dokularından 1.gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Karaciğer dokularından 1. gün ölçülen DNA miktarları izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark göstermektedir ( $p<0,05$ ). Bulunan fark kolon filtrasyon yöntemi lehinedir (tablo 3.16).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
1.gün	Manyetik	5	17,34	8,57	-7,761	4	0,001*
	Kolon	5	754,01	204,17			

**Tablo 3.16.** Karaciğer dokularından 1. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Psoas dokularından 2. gün ölçülen DNA miktarları izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark göstermektedir ( $p<0,05$ ). Bulunan fark kolon filtrasyon yöntemi lehinedir (tablo 3.17).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
2.gün	Manyetik	5	9,21	10,42	-5,461	4	0,005*
	Kolon	5	58,16	19,56			

**Tablo 3.17.** Psoas dokularından 2. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Karaciğer dokularından 2. gün ölçülen DNA miktarları izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark göstermektedir ( $p<0,05$ ). Bulunan fark kolon filtrasyon yöntemi lehinedir (tablo 3.18).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
2.gün	Manyetik	5	20,31	9,26	-7,135	4	0,002*
	Kolon	5	220,26	61,93			

**Tablo 3.18.** Karaciğer dokularından 2. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Psoas dokularından 5. gün ölçülen DNA miktarları arasında izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. ( $p>0,05$ , tablo 3.19).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
5.gün	Manyetik	4	1,06	0,71	-2,319	3	0,103
	Kolon	4	32,01	26,11			

**Tablo3.19.** Psoas dokularından 5. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Karaciğer dokularından 5. gün ölçülen DNA miktarları izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark göstermektedir ( $p<0,05$ ). Bulunan fark kolon filtrasyon yöntemi lehinedir (tablo 3.20).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
5.gün	Manyetik	5	5,17	1,69	-3,205	4	0,033*
	Kolon	5	134,90	90,45			

**Tablo 3.20.** Karaciğer dokularından 5. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Psoas dokularından 10. gün ölçülen DNA miktarları izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark göstermektedir ( $p<0,05$ ). Bulunan fark kolon filtrasyon yöntemi lehinedir (tablo 3.21).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
10.gün	Manyetik	5	0,01	0,02	-3,958	4	0,017*
	Kolon	5	9,35	5,28			

**Tablo 3.21.** Psoas dokularından 10. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Karaciğer dokularından 10. gün ölçülen DNA miktarları izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark göstermektedir ( $p<0,05$ ). Bulunan fark kolon filtrasyon yöntemi lehinedir (tablo 3.22).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
10.gün	Manyetik	5	0,13	0,08	-7,138	4	0,002*
	Kolon	5	22,57	6,95			

**Tablo 3.22.** Karaciğer dokularından 10. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Psoas dokularından 20. gün ölçülen DNA miktarları arasında izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. ( $p>0,05$ , tablo 3.23).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
20.gün	Manyetik	4	0,03	0,02	-2,402	3	0,096
	Kolon	4	3,70	3,04			

**Tablo 3.23.** Psoas dokularından 20. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Karaciğer dokularından 20. gün ölçülen DNA miktarları izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark göstermektedir ( $p<0,05$ ). Bulunan fark kolon filtrasyon yöntemi lehinedir (tablo 3.24).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
20.gün	Manyetik	5	0,58	0,31	-3,442	4	0,026*
	Kolon	5	10,77	6,45			

**Tablo 3.24.** Karaciğer dokularından 20. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Psoas dokularından 30. gün ölçülen DNA miktarları arasında izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. ( $p>0,05$ , tablo 3.25).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
30.gün	Manyetik	5	0,65	0,74	-2,532	4	0,065
	Kolon	5	1,89	0,97			

**Tablo 3.25.** Psoas dokularından 30. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Karaciğer dokularından 30. gün ölçülen DNA miktarları arasında izolasyon yöntemlerine göre anlamlı bir fark bulunamamıştır. ( $p>0,05$ , tablo 3.26).

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
30.gün	Manyetik	5	1,07	0,50	-0,439	4	0,684
	Kolon	5	1,24	0,49			

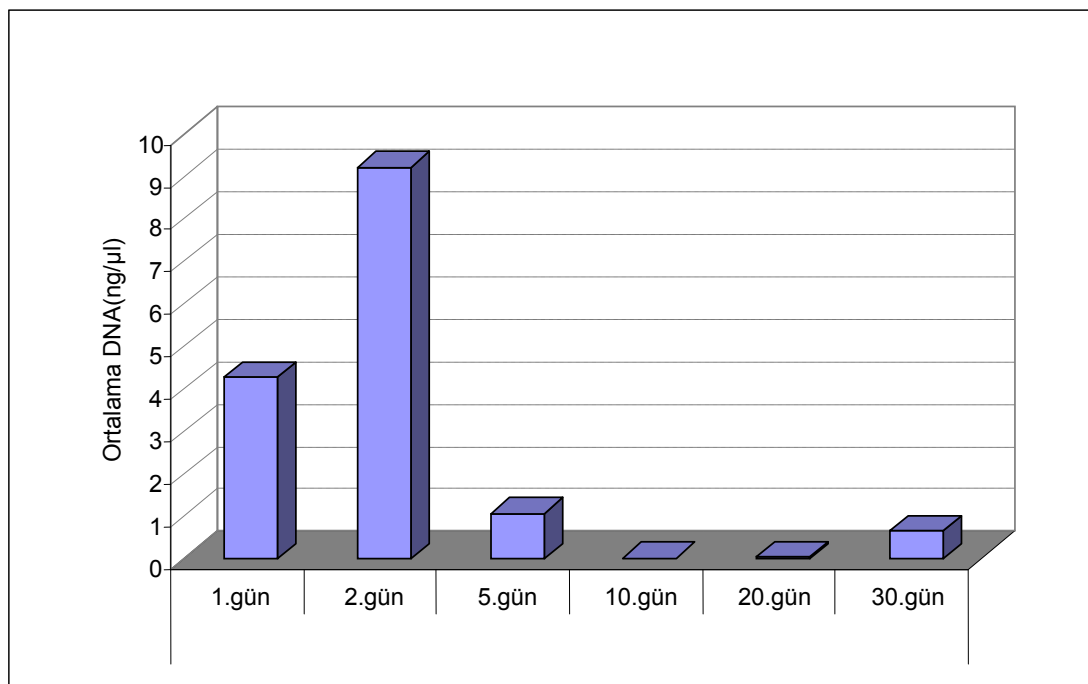
**Tablo 3.26.** Karaciğer dokularından 30. gün ölçülen DNA miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması

Psoas dokularından manyetik partikül tekniği ile 2. gün izole edilip ölçülen DNA miktarlarının ortalaması (9,21 ng/ $\mu$ l) diğer günlerde alınan ölçümlere göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak, psoas dokularından farklı zamanlarda manyetik partikül yöntemi ile alınan DNA miktarları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile test edildiğinde sonuçlar tablo 3.27’de gösterilmiştir.

Yöntem		Karelerinin Toplamı	Sd	Karelerinin Ortalaması	F	p	Anlamlı Fark
Manyetik	Gruplar arası	320,322	5	64,064	2,789	0,043*	*2.gün ile 5. gün
	Gruplar içi	505,399	22	22,973			*2.gün ile 10. gün
	Toplam	825,721	27				*2.gün ile 20. gün
							*2.gün ile 30. gün

**Tablo 3.27.** Manyetik partikül yöntemi ile psoas dokularından farklı günlerde elde edilen DNA miktarlarının varyans analizi

Varyans analizine göre psoas dokularından farklı zamanlarda manyetik partikül yöntemi ile alınan DNA miktarları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bulunan fark 2. gün elde edilen ölçümler ile 5, 10, 20 ve 30. günlerde elde edilen ölçümler arasındadır. Farklı günlerde manyetik partikül yöntemi ile elde edilen DNA miktarları şekil 3.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** Psoas dokusundan manyetik partikül yöntemi ile elde edilen ortalama DNA miktarları.

Psoas dokularından 1. gün kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilip ölçülen DNA miktarlarının ortalaması (156,62 ng/μl) diğer günlerde alınan

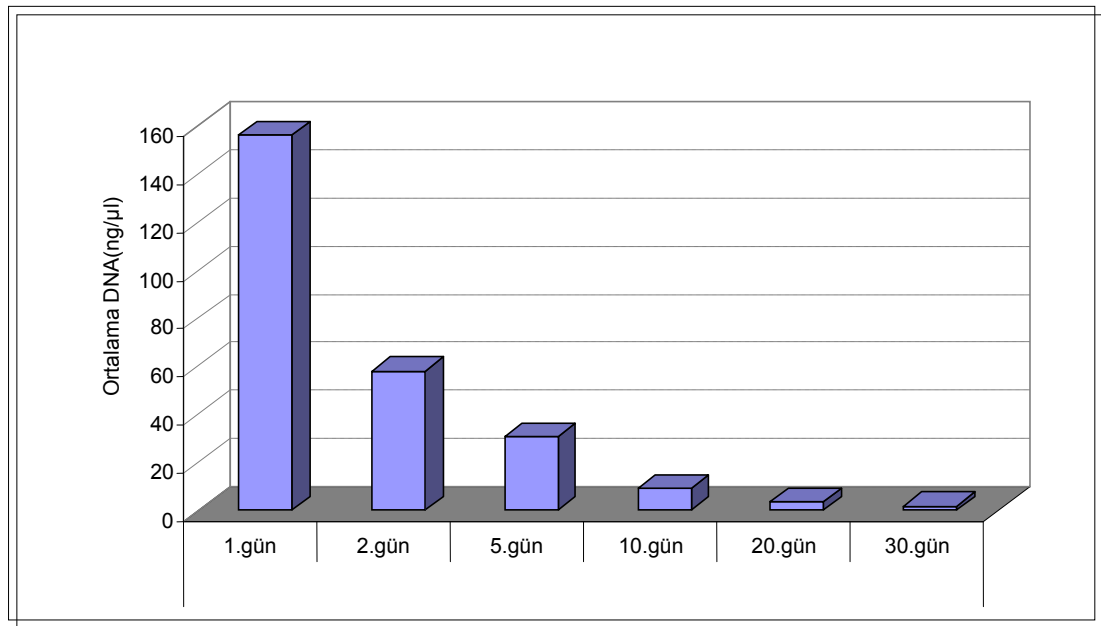


ölçümlere göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak, psoas dokularından farklı zamanlarda kolon filtrasyon yöntemi ile alınan DNA miktarları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile test edildiğinde sonuçlar tablo 3.28’de gösterilmiştir.

Yöntem		Karelerinin Toplamı	Sd	Karelerinin Ortalaması	F	p	Anlamlı Fark
Kolon	Gruplar arası	88.388,365	5	17.677,673	19,128	0,000*	*2.gün ile 20. gün *2.gün ile 30. gün
	Gruplar içi	22.180,784	24	924,199			
	Toplam	110.569,149	29				

**Tablo 3.28.** Kolon filtrasyon yöntemi ile psoas dokularından farklı günlerde elde edilen DNA miktarlarının varyans analizi

Varyans analizine göre psoas dokularından farklı zamanlarda kolon filtrasyon yöntemi ile alınan DNA miktarları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bulunan fark 2. gün elde edilen ölçümler ile 20. ve 30. günlerde elde edilen ölçümler arasındadır. Farklı günlerde kolon filtrasyon yöntemi ile elde edilen DNA miktarları şekil 3.2’de gösterilmiştir.



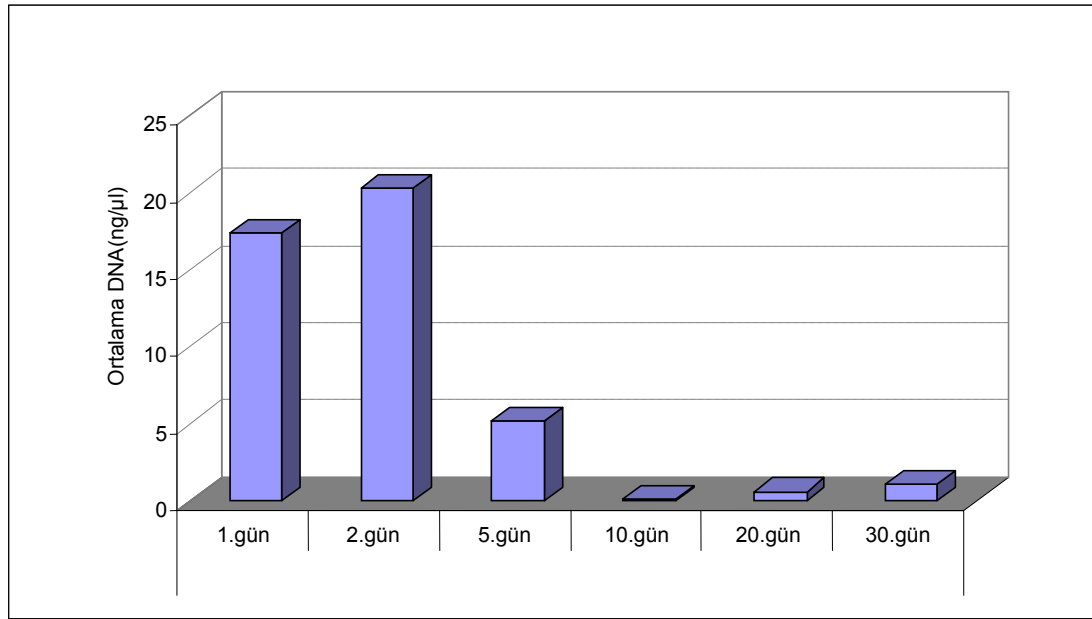
**Şekil 3.2.** Psoas dokularından kolon filtrasyon yöntemi ile elde edilen ortalama DNA miktarları.

Karaciğer dokularından manyetik partikül tekniği ile 2. gün izole edilip ölçülen DNA miktarlarının ortalaması (20,31 ng/µl) diğer günlerde alınan ölçümlere göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak, karaciğer dokularından farklı zamanlarda manyetik partikül yöntemi ile alınan DNA miktarları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile test edildiğinde sonuçlar tablo 3.29'da gösterilmiştir.

Yöntem		Karelerinin Toplamı	Sd	Karelerinin Ortalaması	F	p	Anlamlı Fark
Manyetik	Gruplar arası	2.048,714	5	409,743	15,128	0,000*	*5.gün ile 10. gün *5.gün ile 20. gün
	Gruplar içi	650,043	24	27,085			
	Toplam	2.698,757	29				

**Tablo 3.29.** Manyetik partikül yöntemi ile karaciğer dokularından farklı günlerde elde edilen DNA miktarlarının varyans analizi

Varyans analizine göre karaciğer dokularından farklı zamanlarda manyetik partikül yöntemi ile alınan DNA miktarları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bulunan bu fark 5. gün elde edilen ölçümler ile 10. ve 20. günlerde elde edilen ölçümler arasındadır. Farklı günlerde karaciğer dokularından manyetik partikül yöntemi ile elde edilen DNA miktarları şekil 3.3'de gösterilmiştir.



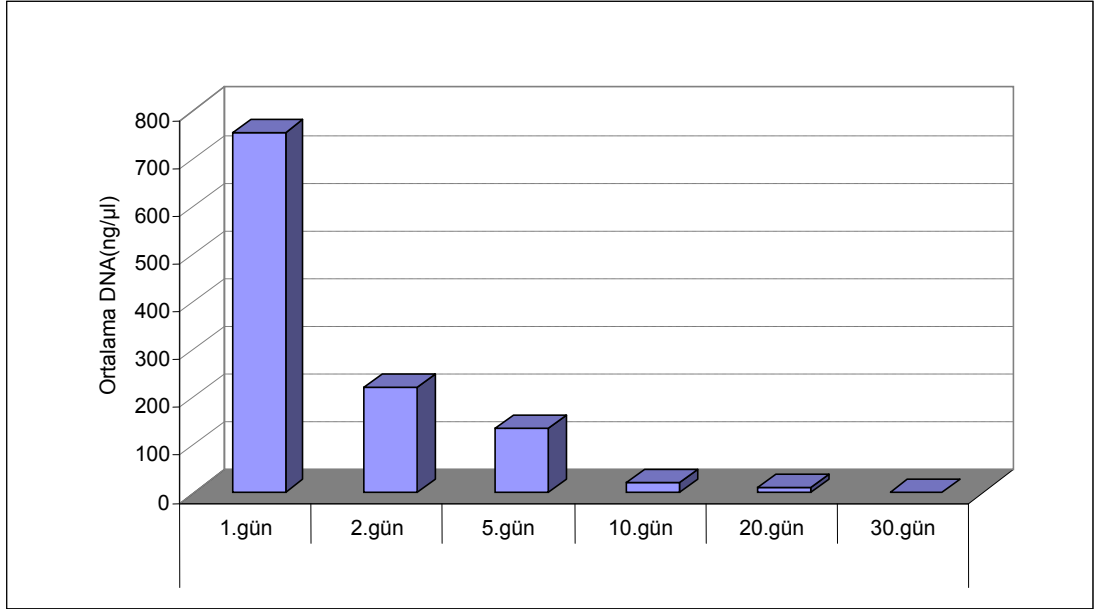
**Şekil 3.3.** Karaciğer dokularından manyetik partikül yöntemi ile elde edilen ortalama DNA miktarları.

Karaciğer dokularından 1. gün kolon filtrasyon yöntemi ile izole edilip ölçülen DNA miktarlarının ortalaması (754,01 ng/μl) diğer günlerde alınan ölçümlere göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak, Karaciğer dokularından farklı zamanlarda kolon filtrasyon yöntemi ile alınan DNA miktarları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile test edildiğinde sonuçlar tablo 3.30'da gösterilmiştir.

Yöntem		Karelerinin Toplamı	Sd	Karelerinin Ortalaması	F	p	Anlamlı Fark
Kolon	Gruplar arası	2.089.214,425	5	417.842,885	46,608	0,000*	*1.gün ile 2. gün *1.gün ile 5. gün
	Gruplar içi	215.163,099	24	8.965,129			*1.gün ile 10. gün *1.gün ile 20. gün
	Toplam	2.304.377,524	29				*1.gün ile 30. gün *2.gün ile 10. gün *2.gün ile 20. gün *2.gün ile 30. gün *10.gün ile 30. gün

**Tablo 3.30.** Manyetik partikül yöntemi ile karaciğer dokularından farklı günlerde elde edilen DNA miktarlarının varyans analizi

Varyans analizine göre karaciğer dokularından farklı zamanlarda kolon filtrasyon yöntemi ile alınan DNA miktarları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bulunan bu fark 1. gün elde edilen ölçümler ile 2, 5, 10, 20 ve 30. günlerde elde edilen ölçümler; 2. gün elde edilen ölçümler ile 10, 20 ve 30. günlerde elde edilen ölçümler; 10. gün elde edilen ölçümler ile 30. günde elde edilen ölçümler arasındadır. Farklı günlerde karaciğer dokularından kolon filtrasyon yöntemi ile elde edilen DNA miktarları şekil 3.4'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.4.** Karaciğer dokularından kolon filtrasyon yöntemi ile elde edilen ortalama DNA miktarları.

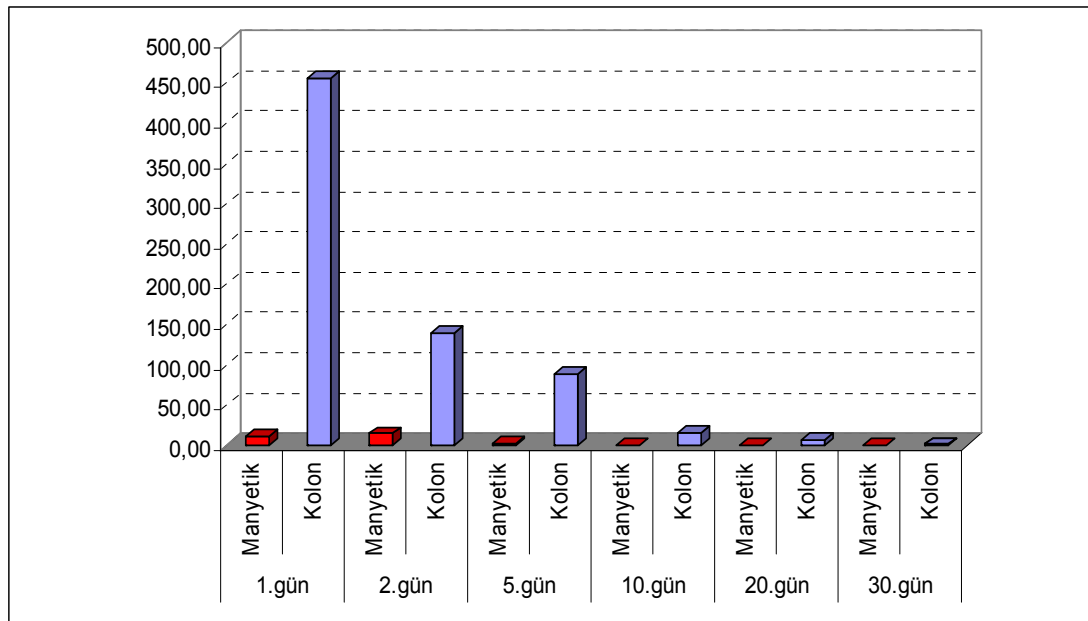
Doku tipi dikkate alınmaksızın farklı tespit günlerinde elde edilen DNA miktarları arasında kullanılan yöntemle göre fark olup olmadığına dair sonuçlar tablo 3.31'deki gibidir.

Süre	Yöntem	N	Ortalama	Std.sapma	t	Sd	p
1.gün	Manyetik	10	10,80	9,37	-4,111	9	0,003*
	Kolon	10	455,31	345,98			
2.gün	Manyetik	10	14,76	10,98	-4,331	9	0,002*
	Kolon	10	139,21	95,78			
5.gün	Manyetik	9	3,34	2,51	-3,061	8	0,016*
	Kolon	9	89,17	85,36			
10.gün	Manyetik	10	0,07	0,09	-5,551	9	0,000*
	Kolon	10	15,96	9,08			
20.gün	Manyetik	9	0,34	0,37	-3,585	8	0,007*
	Kolon	9	7,62	6,18			
30.gün	Manyetik	10	0,86	0,63	-2,046	9	0,071
	Kolon	10	1,57	0,80			

**Tablo 3.31.** Kolon filtrasyon yöntemi ve manyetik partikül yöntemi ile farklı günlerde elde edilen DNA miktarlarına ait t testi

Formaldehit ile tespitin 1, 2, 5, 10, 20 . günlerinde ölçülen DNA miktarları yöntemlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermektedir ( $p < 0,05$ ). ancak 30. günde ölçülen DNA miktarları yöntemlere göre fark göstermemektedir ( $p > 0,05$ ).

Kolon filtrasyon yöntemi ile elde edilen DNA miktarı ortalaması tüm günlerde manyetik partikül yöntemi ile elde edilen ortalama DNA miktarından yüksek bulunmuştur (şekil 3.5)



**Şekil 3.5.** Farklı günlerde kolon filtrasyon ve manyetik partikül tekniğine göre elde edilen ortalama DNA miktarları (ng/μl).

#### 4.TARTIŞMA

Tarihsel olarak formalin ile tespit edilmiş dokular ileri derecede degrade olduğundan adli bilimlerde DNA kaynağı olarak kullanılmıyordu. Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) tekniği ile tanınmasıyla bu biyolojik materyallerin DNA'sının kullanılabilirliği yeniden değerlendirildi (Romero ve ark., 1997). Günümüzde formaldehit ile tespit edilmiş veya formaldehit ile tespit edilip parafin bloğa gömülmüş dokular klinik olgular ve adli olaylar için fevkalade DNA kaynaklarıdır (Ota ve ark., 2006). Fakat formaldehit ile tespit edilmiş dokulardan DNA izolasyonu zordur. Elde edilen DNA sıklıkla parçalanmıştır (Noguchi ve ark., 1997, Gilbert ve ark., 2007) ve nükleik asitlerin proteinlerle çapraz bağlanmaları PCR' da bloklar oluşturur (Lin ve ark., 2009).

Çalışmamızda formaldehit ile tespit süresinin etkisi, izolasyon protokolünün rolü, doku farklılıkları ve PCR çoğaltımının etkinliği araştırıldığından aşağıda bu konular incelenmiştir.

Beş farklı otopside elde edilen psoas ve karaciğer dokuları 1, 2, 5, 10, 20 ve 30 gün sürelerle %10 formaldehit solüsyonunda tespit edilmiş ve belirtilen günlerin sonunda kolon filtrasyon ve manyetik partikül tekniğine dayalı iki farklı yöntemle DNA izolasyonu yapılarak elde edilen DNA'nın miktarı belirlenmiş ve çoklu lokus PCR ile 15 STR bölgesi tiplendirilmiştir. Buna göre;

Tespit süreleri, çalışmanın gerçekleştiği Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığı'na dışarıdan gönderilen kolilerin kuruma varış zamanları dikkate alınarak belirlendi. Koliler kargo firması veya kurye vasıtası ile kuruma gönderildiği takdirde 1-2 gün içerisinde, normal posta yolu ile gönderildiği takdirde 5-10 gün içerisinde kuruma ulaşmaktadır. Evrak eksikliği, usulüne uygun olmayan ambalajlama ve benzeri sebeplerle geri çevrilen koliler ise 20-30 gün veya daha uzun sürelerde yeniden kuruma ulaşmaktadır. Legrand ve arkadaşları (2002) çalışmalarında 3,7,16 ve 32 gün sürelerle dokuların tespit edildiğini belirtmişler ama neden bu günleri seçtiklerini açıklamamışlardır. Ancak süre olarak verilerimizle benzerlik göstermektedir.

Bu nedenle inceleme süremiz olan 1, 2, 5, 10, 20 ve 30 günlük zamanlar doğru seçimlerdir.

Karaciğer ve psoas dokuları otopside kolay temin edilebildikleri için tercih edilmişlerdir. Spektrofotometrik ölçümler doku kaynağına göre DNA miktarında ve saflığında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Yüksek DNA miktarları karaciğer, böbrek ve beyin doku örneklerinden elde edilmiştir ([www.rtalabs.com](http://www.rtalabs.com)). Psoas kası da DNA analizi için gönderilebilecek dokular arasında tarif edilmektedir ([www.atk.gov.tr](http://www.atk.gov.tr)). Ayrıca psoas dokusu karın arkasında olması nedeniyle geç çürüdüğünden DNA izolasyonu için uygun bir doku tipidir (Bilge, 2005).

Manyetik partikül tekniği ve kolon filtrasyon tekniğine dayalı izolasyon metodları Adli Tıp Kurumu'nun yanı sıra Polis Kriminal ve Jandarma Kriminal Laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan DNA izolasyon yöntemleridir. Chelex-100, fenol-kloroform, amonyum asetat vb. geleneksel izolasyon yöntemlerine göre daha etkin sonuç verme özelliğinden dolayı tercih nedenidir. Kolon filtrasyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalara kaynaklarda rastlanmıştır (Coombs ve ark.,1999, Legrand ve ark., 2002, Gillbert ve ark., 2007). Ancak manyetik partikül yöntemi ile yapılan çalışmalara karşılaşılmamıştır. 2000'li yılların başlarına kadar sıklıkla kullanılan Chelex-100 metodu artık rutinden çıkma durumunda olduğundan tercih edilmedi. Fenol-kloroform yöntemi de karsinojen olması, çalışanların meslek hastalığına tutulmalarına neden olması ve çevre kirliliği yapması gibi etkilerinden dolayı kullanılmadı. Bu nedenle çalışmamızda manyetik partikül yöntemi ve kolon filtrasyon yöntemi seçildi.

Kolon-filtrasyon tekniği ile yapılan izolasyonlarda tüm günlerde her iki doku tipi için elde edilen ortalama DNA miktarları tespit süresine bağlı olarak azalmıştır (şekil: 3.2, 3.4). Tespit süresi uzadıkça elde edilen DNA'nın azaldığını belirten çeşitli çalışmalar vardır. Legrand ve arkadaşları (2002) tespit süresi arttıkça izole edilen DNA'nın miktarının azaldığını belirtmişlerdir. Foss ve arkadaşları (1994), dokuları 2, 8 ve 24 saat süre ile tespit ettikleri çalışmalarında elde edilen DNA miktarları arasında küçük farklar olduğunu

belirtmekle beraber çoğaltılabilir DNA'nın en iyi 2 saat sonunda elde edildiğini bildirmişlerdir.

Manyetik partikül tekniği ile yapılan izolasyonlarda ise beklenenin aksine farklı günlerde farklı sonuçlar alındı. Şöyle ki; İstatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen ( $p>0.05$ ) 2. güne ait ortalama DNA miktarı her iki doku tipi için 1. güne göre yüksektir. 5. ve 10. günlerde ortalama DNA ürünü azalmış ancak, 20. ve 30. günlerde yine 10. günden daha yüksek ortalama değerlere ulaşmıştır (şekil 3.1, 3.3). Bu yöntemin yalancı pozitifliğini akla getirmektedir. Bu durum manyetik partikül yöntemi için bir dezavantajdır. Kolon filtrasyon yönteminde böyle sonuçlar görülmediğinden manyetik partikül tekniğine dayalı yöntemle göre daha geçerli ve güvenilir yöntem olduğu anlaşıldı.

Kolon filtrasyon tekniğine dayalı izolasyon yöntemiyle, manyetik partikül tekniğine dayalı izolasyona nazaran daha yüksek oranda DNA elde edilmiştir. Tüm günlerde ve her iki doku tipi için elde edilen DNA ürünü manyetik partikül yöntemine göre daha yüksektir (tablo: 3.3, 3.5, 3.7, 3.10, 3.12, 3.14).

Çalışmamızda, tespit süresi uzadıkça çoğaltılabilen DNA bölgelerinin azaldığı gözlenmiştir. Birinci ve ikinci gün sonunda izole edilen tüm dokulara ait DNA STR bölgeleri, manyetik partikül yöntemi ile DNA izole edilemeyen (sadece 1 pg DNA elde edildi) 4 nolu psoas dokusu hariç tiplendirilmiştir (tablo 3.4 ve tablo 3.6). Diğer örneklerin tamamından DNA elde edildiğinden 4 nolu psoas örneğinden sonuç alınamamasının tespit kaynaklı değil izolasyonun uygulanma aşamasında yaşanan bir sorundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Lizis tamponuna proteinaz K eksik eklenmiş ve iyi sindirilemeyen doku parçası nükleik asit izolasyon cihazının pipetini tıkamış olabilir.

Beş günlük tespit ve sonrasında kolon filtrasyon tekniği ile izole edilen örnekler için tiplendirilen bölge sayısı giderek azalmaktadır (tablo 3.8, 3.9, 3.11, 3.13). Belirlenebilen bölgeler çoğunlukla D8S1179, D21S11, D3S1358, THO1, D19S433 gibi 100 ila 240 bp arasında değişen uzunluklara sahip kısa STR lokusları iken D7S821, CSF1PO, D2S1338, D18S51, FGA gibi 255 ila



358 bç arasında değişen uzunluklara sahip uzun STR bölgeleri tiplendirilememiştir. Bu durum literatürde de belirtildiği üzere (Fang ve ark., 2002, Romero ve ark., 1997, Vincek ve ark., 2003) formaldehit ile tespit süresi arttıkça bu madde doku içine infiltre olduğundan dolayı hücredeki DNA'yı degrade etmesi sonucudur. Lin ve arkadaşları (2009), izole ettikleri DNA örneklerinin PCR için uygunluğunu test ettiklerinde, 191 bç uzunluğa sahip beta-actin fragmentlerini tüm örneklerde çoğaltabildiklerini fakat 606 bç uzunluğa sahip fragmentleri sadece 2001 ve 2005 yıllarında tespit edilip parafine gömülmüş dokularda çoğaltabildiklerini daha eski yıllara ait örneklerde çoğaltamadıklarını belirtmişlerdir.

Çoğaltılabilir DNA kalitesi temelde formaldehit ile tespit sorunudur. Bununla beraber, tespit edilmiş örneklerdeki nükleik asit kalitesinin, nükleik asitlerde degradasyona neden olabilen çok sayıda parametreye de bağlı olduğu belirtilmektedir. Tespit öncesi faktörler (doku tipi ve miktarı, otoliz derecesi), tespit sürecindeki faktörler (pH, sıcaklık, tespit süresi, fiksatif tipi), tespit sonrası faktörler (sıcaklık ve saklama süresi) bu gibi parametrelerdendir (Gillbert ve ark., 2007). Bu nedenle yukarıda belirtilen sorunlar dikkate alınarak çalışma yapmak gerekir.

Kolon filtrasyon yöntemi ile tespit sürelerinde elde edilen ortalama DNA miktarları manyetik partikül yöntemi ile elde edilen ortalama DNA miktarlarından yüksektir (şekil 3.5). Bu fark 1, 2, 5, 10, ve 20. günlerde istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ , tablo 3.31). Manyetik partikül yöntemi ile izole edilen örneklerden 5. günden sonra hiçbir STR lokusunda tiplene yapılamamıştır. 5. gün elde edilen DNA'larda da tiplendirilebilen lokus sayısı kolon filtrasyon tekniği ile izole edilen örneklerden daha azdır (tablo 3.8, 3.9). Bu durum FFPE Tissue kit (Qiagen Ltd.) ile yapılan kolon filtrasyon tekniğine dayalı izolasyon yönteminin MagAttract DNA M48 Mini kit (Qiagen Ltd.) ile yapılan manyetik partikül tekniğine dayalı izolasyon yöntemine göre formalin ile tespit edilmiş dokulardan çoğaltılabilir DNA eldesi bakımından daha üstün olduğunu göstermektedir.

FFPE Tissue kit (Qiagen Ltd.) ile yapılan izolasyon işleminde 90°C ısı uygulaması, manyetik partikül tekniğine karşı kolon filtrasyon yöntemi lehine

avantaj sağlamaktadır. Zira yüksek ısı uygulamasının formalin ile tespit edilmiş dokularda DNA ürününü ve kalitesini arttırdığına dair önce yapılan araştırmalarda elde edilmiş sonuçlar vardır (Wu ve ark., 2002, Shi ve ark., 2002). Yüksek ısı uygulamasının formaldehit kaynaklı çapraz bağlanmaları kısmen geri dönüştürdüğü belirtilmektedir (Gillbert ve ark., 2007)

Deneyimizde izolasyonlarda kullanılan doku miktarı tüm günlerde ve her iki doku tipi için örnek başına 40 mg'dır. Buna karşın, karaciğer dokularından elde edilen DNA miktarı psoas kası dokularından elde edilen DNA ürününe göre belirgin derecede yüksektir (şekil: 3.1, 3.2, 3.3, 3.4). Fakat tiplendirme sonuçlarımız dikkate alındığında çoğaltılabilir DNA kalitesi açısından PCR için daha uygun oldukları sonucuna ulaşılamaz (tablo: 3.8, 3.9, 3.11, 3.13).

Çalışmamızda İzolasyon yöntemleri uygulanırken lizis aşaması ve daha sonrasında, PCR analizinde ve tipleme işlemlerinde herhangi bir değişiklik yapılmamış ve üreticilerin tavsiyelerine bağlı kalınmıştır. Sadece izolasyona başlamadan önce formaldehitin dokulardan uzaklaştırılması için Tuğ ve Elma'nın çalışmasında (2006) olduğu gibi ilki iki saat ikincisi 10 dk. olmak üzere örnekler iki kez serum fizyolojik ile yıkanmıştır. Yine aynı amaçla manyetik partikül yönteminde yer almasa da kolon filtrasyon yönteminde yer aldığı şekilde tüm örnekler %99 etanol ile muamele edilmiştir. Formaldehitin dokulardan uzaklaştırılması bu tip örneklerden PCR'da başarılı çoğaltım yapabilmek için önemli bir noktadır.

Formaldehit ile fikse edilmiş veya formaldehit ile fikse edildikten sonra parafin bloğa gömülmüş dokulardan DNA izolasyonları problemlili olduğundan bazı araştırmalarda izolasyon metodunda DNA miktarını ve kalitesini arttırmak amacıyla değişiklikler yapıldığı ve PCR'da döngü sayısının arttırıldığı görülmektedir. Shi ve arkadaşları (2002) çalışmalarında PCR aşamasında 40 döngü uygulamışlardır. Fang ve arkadaşları (2002), formalinin uzaklaştırılması aşamasında doğrudan saf etanol uygulaması yerine kademeli etanol uygulamasını önermektedirler. Çalışmamızda dokuların tamamen parçalanabilmesi için lizis aşamasında gece boyu inkübasyon yapılmıştır.

Deneyimiz oda ısısında tamponlanmamış formaldehit solüsyonu (%10) ile gerçekleştirilmiştir. Formaldehit ile tespit edilmiş dokulardan DNA izolasyonunun başarısı örneğin alımı ile tespit başlanması arasında geçen süre, tespit süresi, fiksatifin türü ve konsantrasyonu, pH, sıcaklık gibi değişkenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir (Romero ve ark., 1997). Noguchi ve arkadaşları (1997), klasik %10 formalin fiksasyonuna karşı 4°C'de soğuk formalin ve oda ısısında ancak 5 mmol/L EDTA eklenmiş %10 formaldehit fiksasyonlarında belirgin derecede yüksek moleküler ağırlıkta DNA'nın korunduğunu belirlemişlerdir. Deneyimizde tespit aşamasında dokular 4°C'de bekletilseydi belki de DNA kalitesi daha yüksek olabilirdi. Shi ve arkadaşları (2002) 6-9 aralığında pH değerine sahip lizis tamponda 120 °C sıcaklıkta bekletilmiş dokulardan en yüksek miktarda DNA elde ettiklerini belirtmişlerdir. pH'nın çok düşük olduğu tamponlanmamış tespit solüsyonlarında nükleik asitler parçalanırlar (Gillbert ve ark. 2007). Çalışmamız verilerine göre yüksek ısı ile DNA izolasyonu daha uygundur. Ayrıca sorun yaşanan durumlarda +4 °C' de bekleme, pH 6-9 aralığında lizis tamponu kullanılmasının gereği düşünülmüştür.

Çalışmamız sadece psoas kası ve karaciğer dokuları ile gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle beyin, kalp gibi organlar ya da başka bir kas dokusunun formaldehit ile tespitinin sonuçlarının ne olacağı hakkında bir değerlendirme yapılamadı.

Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesine formaldehit ile tespit edilmiş olarak en çok kürtaj materyali, cenin ya da fetus gibi dokular gönderilmesine rağmen kısa sürede bu dokulardan yeter sayıda temin etmek mümkün olmadığından bu tip örnekler deneyimizde kullanılmadı.

Tespit aşamasında tamponlanmış ve/veya +4°C'de bekletilmiş formaldehit kullanımıyla daha yüksek kalitede DNA elde edildiği yönünde bulgular bulunduğu için oda ısısında tespiti paralel olarak tamponlanmış formaldehit kullanılıp +4°C'de bekletilerek tespit yapılabilir, elde edilen DNA miktarları ve kalitesi karşılaştırılabilirdi ancak, süre sıkıntısı ve izolasyon aşamasında maliyeti arttıracığından bahsedilen paralel çalışma gerçekleştirilemedi.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Formaldehit ile tespit süresi uzadıkça karaciğer ve psoas dokularından elde edilen DNA miktarı azalmaktadır.

2. Kolon filtrasyon tekniğine dayalı izolasyon yöntemiyle, manyetik partikül tekniğine dayalı izolasyona nazaran daha yüksek oranda DNA elde edilmiştir. Tüm günlerde ve her iki doku tipi için elde edilen DNA ürünü manyetik partikül yöntemine göre daha yüksektir. Bu fark 1, 2, 5, 10, ve 20. günlerde istatistiksel olarak anlamlıdır.

3. Formaldehit ile tespit süresi uzadıkça çoğaltılabilen DNA STR bölgelerinin azaldığı gözlenmiştir.

4. Kolon filtrasyon tekniğine dayalı izolasyon yöntemi manyetik partikül tekniğine dayalı yöntemle göre formaldehit ile tespit edilmiş dokulardan DNA izolasyonu için daha geçerli ve güvenilir bir yöntemdir.

5. İzolasyon işleminde lizis aşamasından sonra 90°C ısı uygulaması, manyetik partikül tekniğine karşı kolon filtrasyon yöntemi lehine avantaj sağlamaktadır.

6. Karaciğer dokularından elde edilen DNA miktarı psoas kası dokularından elde edilen DNA ürününe göre belirgin derecede yüksektir. Fakat tiplendirme sonuçları dikkate alındığında çoğaltılabilir DNA kalitesi açısından PCR için daha uygun oldukları söylenemez.

7. 5 günden fazla formaldehit ile tespit edilmiş karaciğer veya psoas dokusu adli amaçlı DNA tiplendirmeleri için uygun değildir.

8. DNA analizi yapılamayan durumlarda 4°C'de bekletme, 6-9 pH aralığında lizis tamponu kullanma veya başka fiksatifle tespit etme gereği bulunmaktadır.

## ÖZET

### **Formaldehit ile Fikse edilmiş Psoas Kası ve Karaciğer Dokularından DNA Ekstraksiyonuna Zamanın ve Metodun Etkisi Hakkında Bir Çalışma**

Formaldehitin % 4-10'luk solüsyonu rutin histopatolojik uygulamalarda dokuların tespiti amacıyla en sık kullanılan fiksatiftir. Formaldehit fiksasyonu biyolojik delillerin laboratuvara gönderilmesi esnasında da kullanılmakta olup, PCR temelli genetik analizler için laboratuvar çalışmalarında engel oluşturduğundan ciddi bir problemdir. Çoğaltılabilir DNA'nın miktarını ve uzunluğunu azalttığı bildirilmektedir.

Bu çalışmada; formaldehit ile tespit süresinin elde edilen DNA miktarına ve STR tiplendirmesine olan etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığında otopsi yapılan ve henüz çürüme başlamamış 5 cesetten karaciğer ve psos kası örnekleri alındı. % 10 formaldehit solüsyonu eklendi ve oda ısısında tespit edildi. Her bir dokudan 1. gün, 2. gün, 5. gün, 10. gün, 20. gün ve 30. gün sonunda numuneler alınarak DNA izolasyonuna geçildi. DNA izolasyonunda manyetik partikül tekniği ve kolon-filtrasyon tekniğine dayalı iki farklı izolasyon yöntemi kullanıldı. Miktar tayininin ardından 15 STR lokusu PCR ile çoğaltıldı ve genetik analizörler yardımıyla tiplendirildi.

Kolon-filtrasyon tekniğine dayalı yöntemle elde edilen ortalama DNA miktarı manyetik partikül tekniğine dayalı yöntemle elde edilen ortalama DNA miktarından tüm tespit günleri için daha fazladır. Bu fark 1, 2, 5, 10 ve 20. günler için istatistiksel olarak anlamlıdır. Karaciğer dokularından elde edilen DNA miktarı da psos dokularından elde edilen DNA'ya göre daha yüksektir. Tespitin 1. ve 2. günü sonunda dokuların tüm STR bölgeleri çoğaltılmıştır. Tiplendirilebilen bölgeler 5. gün ve sonrasında giderek azalmıştır. Bu sonuçlara göre; Formaldehit ile tespit süresi uzadıkça karaciğer ve psos dokularından elde edilen DNA miktarı ve kalitesi azalmaktadır. Kolon filtrasyon tekniğine dayalı izolasyon yöntemi manyetik partikül tekniğine dayalı yöntemle göre formaldehit ile tespit edilmiş dokulardan DNA izolasyonu için daha güvenilir bir yöntemdir. Beş günden fazla formaldehit ile tespit edilmiş karaciğer ve psos dokuları adli DNA analizleri için uygun değildir. Dokuların formaldehit ile tespit edilmeden DNA analizine gönderilmesinin gerektiği anlaşıldı.

**Anahtar Sözcükler:** Biyolojik materyale formaldehitin etkisi, DNA izolasyonu, formaldehit tespiti, PCR, STR,

## SUMMARY

### **A Study about Effect of Time and Method on DNA Extraction from Formaldehyde Fixed Psoas Muscle and Liver Tissues**

Four to ten percent concentration of formaldehyde is most common fixative used for fixing tissues in routine histopathological practices. Formaldehyde fixation is used during transfer of biological evidences to laboratory, but a serious problem is encountered as this procedure creates a barrier against PCR-based genetic analysis. It has been reported that it reduces amount and length of reproducible DNA.

In this study, it was aimed to determine effect of fixation with formaldehyde on amount of DNA obtained and STR typing. Liver and psoas samples were obtained from 5 dead cadavers, who had no signs of decay and were previously undergone autopsy in Ankara Group Management, Council of Forensic Medicine. Ten percent formaldehyde solution was added and it was fixed at room temperature. Sample were obtained from each tissue at the end of Day 1, Day 2, Day 5, Day 10, Day 20 and Day 30 and DNA isolation was started. Two different isolation methods, including magnetic particle technique and column-filtration technique based methods, were used for DNA isolation. Following amount quantification, 15 STR loci were replicated using PCR and they were typed using genetic analyzers.

Mean amount of DNA obtained using column-filtration technique based method was higher than mean amount of DNA obtained using magnetic particle technique based method for all sampling days. The difference was statistically significant for Day 1, 2, 5, 10 and 20. Amount of DNA obtained from liver tissues was also higher than amount of DNA obtained from psoas muscle. At the end of post-fixation Day 1 and 2, all STR regions of tissues were replicated. Number of typed regions gradually decreased at and following Day 5. Based on these results, as formaldehyde fixation period prolongs, amount and quality of DNA obtained from liver and psoas tissues reduce. In comparison with magnetic particle technique based method, column filtration technique based isolation method is a safer approach for isolating DNA from tissues fixed using formaldehyde. Liver and psoas tissues, fixed using formaldehyde 5 days before analysis, are not suitable for forensic DNA analysis. It is understood that tissues should be sent to DNA analysis without formaldehyde fixation.

**Key words:** Effect of formaldehyde on biological material, DNA isolation, formaldehyde fixation, PCR, STR,

## KAYNAKLAR

- AÇIKGÖZ, H. N., HANCI, İ. H., ÇAKIR, A. H., (2002). Bölüm:18 DNA Laboratuvarının İşleyişi, Olay yerinden Örnek Toplama, Örnekleri laboratuvara gönderme Usulleri, Adli Tıp ve Adli Bilimler, 1. Baskı, İ. H., HANCI, Ankara: Seçkin Yayıncılık
- AÇIKGÖZ, . N., HANCI, İ. H., ÇAKIR, A. H., (2002). DNA laboratuvarının İşleyişi, *Sürekli Tıp Eğitim Dergisi*, **4**:126-128
- AKSAKAL, F. N., VAİZOĞLU, S. A., GÜLER, Ç., (2005). Mobilyadaki Kimyasallar ve Sağlık Etkileri, *Sürekli Tıp Eğitim Dergisi*, **14(12)**: 268-272
- APARNA, D., PALMER, N., (2009). DNA Isolation and Amplification from Formaldehyde-Fixed Animal Tissues Rich in Mucopolysaccharides, Pigments and Chitin, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **39**: 72-80
- ARICAN, Y., (2005). Formaldehit İnhalasyonunun Sıçan Burun Mukozasındaki Hücrelerarası Bağlantı kompleksleri üzerine etkileri, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
- BAYRAK, F., ALTUNBAŞ, S., (16.09.2008). Olay Yerinden Mahkemeye. Erişim: [http://www.jandarma.tsk.tr/kriminal/turkish%20internet/anasayfa/bilarinde\\_dosyalar/bil arinde2.htm](http://www.jandarma.tsk.tr/kriminal/turkish%20internet/anasayfa/bilarinde_dosyalar/bil arinde2.htm). Erişim tarihi: 03.10.2009
- BİLGE, Y., (2005). Adli Tıp, 1. Baskı, Ankara: Üçbilek Matbaası
- BUTLER, J., (2005). Forensic DNA Typing, Chapter 3, p.: 33-39, Burlington, USA: Elsevier Academic Press
- CANBİLEN, A., SEZEN, Ş., AVUNDUK, M. C., ÇON, N. E., (1999). Formaldehit ve Toksik Etkileri, *Genel Tıp. Derg.*, **9(1)**: 33-39
- CASTEEL, S. W., VERNON, R. J., BAİLEY, E. M., (1987). Formaldehyde: Toxicity and Hazards, *Vet. Hum. Toxicol.*, **29(1)**: 31-33
- COOMBS, N. J., GOUGH, A. C., PRIMROSE, J. N. (1999). Optimisation of DNA and RNA Extraction from Archival Formalin-Fixed Tissue, *Nucleic Acids Res.*, **27(16)**: e12
- ÇELİK, H. H., SARGON, M. F., ÇELİK, H. M., USLU, S. S., ÇELİK, H. T., A Review of the Health Effects of Formaldehyde Toxicity, Erişim: <http://www.anatomidernegi.org/belge/formaldehit.pdf> Erişim Tarihi: 12.10.2009
- EVCİ, D., VAİZOĞLU, S., ÖZDEMİR, M., AYGAN, S., GÜLER, Ç., (2005). Ankara'da 46 Kahvehanede Formaldehit Düzeylerinin Belirlenmesi, *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, **4(3)**: 129-131
- FANG, S. G., WAN, Q. H., FUJİHARA, N., (2002). Formalin Removal from Archival Tissue by Critical Point Drying, *BioTechniques*, **33**: 604-611
- FOSS, R. D., THAKURTA, N. G., CONRAN, R. M., (1994). Effects of Fixative and Fixation Time on the Extraction and Polymerase Chain Reaction Amplification of RNA from parafin-Embedded Tissue, *Diagn. Mol. Pathol.*, **3(3)**: 148-155

- GİLLBERT, M. T. P., HASELKORN, T., BUNCE, M., SANCHEZ, J. J., LUCAS, S. B., JEWELL, L. D., MARK, E. V., WOROBEY, M., (2007). The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues- Which Methods Are Useful When?, PLOSone, [Electronic Journal], June 2007, 6:e537 Erişim: <http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0000537>
- GÜNGÖR, D., BAKŞI, O., (2009). Ceza Muhakemesinde Beden Muayenesi, Bedenden Örnek Alınması ve Genetik İncelemeler, *Adli Bilimler Dergisi*, **8(3)**: 63-71
- HASELKORN, R., DOTY, P., (1961). The Reaction of formaldehyde with Polynucleotides, *The Journal of J. Biol. Chem.*, **236(10)**: 2738-2745
- HECK, d'A., CASANOVA, M., STARR, T. B., (1990). Formaldehyde Toxicity – New Understanding, *Toxicology*, **20(6)**: 397-426
- İNANICI, M.A., ÇOLAK, B., ÖZASLAN, A., (2004). Olay Yeri İncelemesi ve Adli Tıp Uzmanının Yeri, *Türkiye klinikleri J Foren Med*, **1**: 97-103
- KALFOĞLU, E. A., YÜKSELOĞLU, H., (2002). İnsan Genomu Suç ve Suçun önlenmesi, 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, İnsan Genom Projesi Özel Sayı: 71-80
- KUŞ, İ., ZARARSIZ, İ., ÖGETÜRK, M., YILMAZ, H. R., (2007). Formaldehit Nörotoksitesine Bağlı Hipokampusta Gelişen Oksidatif Hasar ve Melatonin Hormonunun Koruyucu Etkisi: Deneysel Bir Çalışma, *Fırat Tıp Dergisi*, **12(4)**: 256-260
- KUŞ, İ., ZARARSIZ, İ., ÖGETÜRK, M., YILMAZ, H. R., SARSILMAZ, M., (2008). Deneysel Formaldehit Toksikitesinde Testis SOD, GSH-Px, MDA Düzeyleri ve  $\omega$ -3 Yağ Asitlerinin Koruyucu Etkisi, *Fırat Tıp Dergisi*, **13(1)**: 01-04
- KÜÇÜKER, H., (2003). Olay Yeri İncelemesi ve Delil Toplanmasının Önemi: Üç Cinsel Olgu Sunumu, *Adli Tıp Derg.*, **17(1)**: 54-58
- LEE, H. C., (1997). Collection and Preservation of DNA Evidence, in: Proceedings from the Seventh International Symposium of Human Identification, 1996, Promega Corporation: 39-47
- LEE, H. C., LADD, C., (2001). Preservation and Collection of Biological Evidence, *Croat Med J*, **42**: 225-228
- LEGRAND, B., MAZANCOURT, P., DURIGON, M., KHALIFAT, V., CRAINIC, K., (2001). DNA genotyping of unbuffered formalin fixed Paraffin Embedded Tissues, *Forensic Sci. Int.*, **125**: 205-211
- LIN, J., KENNEDY, S. H., SVAROVSKY, T., ROGERS, J., KEMNITZ, J. W., XU, A., ZONDERVAN, K. T., (2009). High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin- embedded samples deparaffinized using mineral oil, *Anal. Biochem.* **395**: 265-267
- MA, T., HARRİS, M. M., (1988). Review of the Genotoxicity of formaldehyde, *Mutat. Res.*, **196**: 37-59
- MALMGREN, C., GUSTAVSSON, I., HURTE, I., (1992). Reliable typing of DNA amplified from formalin-fixed tissue biopsies, *Genome Res.*, **2**:175-176
- NOGUCHI, M., FURUYA, S., TAKEUCHI, T., HIROHASHI, S., (1997). Modified Formalin and Methanol Fixation Methods for Molecular Biological and Morphological Analyses, *Pathol. Int.*, **47**: 685-691



- OTA, M., SHIMADA, K., ASAMURA, H., KATSUYAMA, Y., FUKUSHIMA, Y., (2006). Highly Sensitive HLA-DNA Typing from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Samples, *Am J Forensic Med Pathol*, **27(4)**: 347-351
- POLAT, O., (2009a). DNA Analizi. Erişim: <http://www.adlitip.org/?p=105>. Erişim Tarihi: 03.08.2009
- POLAT, O., (2009b). Cinayet Olaylarında Olay Yeri İncelemesi. Erişim: <http://www.adlitip.org/?p=225>. Erişim Tarihi: 03.08.2009
- ROMERO, R. L., JUSTON, A. C., BALLANTYNE, J., HENRY, B. E., (1997). The Applicability of Formalin-Fixed and Formalin-Fixed paraffin Embedded Tissues in Forensic DNA Analyses, *J. Forensic Sci.*, **42(4)**: 708-714
- SARSILMAZ, M., Erişim: <http://www.anatomidernegi.org/belge/sarsilmaz.pdf> Erişim Tarihi: 17.10.2009
- SCHANDER, C., HALANYCH, K. M., (2003). DNA, PCR and formalized animal tissue- a short review and protocols, *org. Divers. Evol.*, **3**:195-205
- SCHMIEDEBERG, L., SKENE, P., DEATON, A., BİRD, A., (2009). A Temporal, Treshold for Formaldehyde Crosslinking and Fixation, *PLOSone*, [Electronic Journal], February 2009,4(2):e4636,Erişim: <http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0004636>
- SHI, S. R., COTE, R. J., WU, L., LİU, C., DATAR, R., SHİ, Y., LİU, D., LİM, H., TAYLOR, L. C., (2002). DNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Tissue Sections Based on the Antigen retrieval Principle: Heating Under the Influence of pH, *J. Histochem. Cytochem.*, **50(8)**: 1005-1011
- TUĞ, A., ELMA, C., (2006). KARIŞAN Patoloji laboratuvar örneklerinin Dna analizi ile kimliklendirilmesi, *Türk Patoloji Dergisi*, **22(3)**: 187-191
- YÜKSELOĞLU, E. H., ÖZCAN, Ş. Ş., CEYLAN, B., (2008). Olay Yeri İncelemesi ve Türkiye'deki Uygulamalar, *Polis Bilimleri Dergisi*, **10(1)**:1-4
- VAİZOĞLU, S. A., (2007). Bazı Kapalı Ortamlarda Formaldehit Etkilenimi, VIII. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi, Sempozyum Bildirisi, İzmir.
- VINCEK, V., NASSIRI, M., NADJI, M., MORALES, A. R., (2003). A Tissue Fixative that Protects Macromolecules (DNA, RNA and Protein) and Histomorphology in Clinical Samples, *Lab. Invest.*, **83**: 1427-1435
- YILMAZ, Z., (2006). Hukuk Cep Kitapları Dizisi, Anayasa TCK-CMK İnfaz Kanunu, Ankara: Seçkin yayınevi, s.: 264-268
- YILMAZ, H. R., ÖZEN, O. A., SONGUR, A., SÖĞÜT, S., ÖZYURT, H., SARSILMAZ, M., (2002). Subkronik Formaldehit İnhalasyonunun Bazı Böbrek Enzim Aktivitelerine Etkisi, *Van Tıp Dergisi*, **9(1)**: 1-5
- WU, L., PATTERN, N., YAMASHIRO, C.T., CHUI, B., (2002). Extaction and Amplification of DNA from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues, *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, **10(3)**: 269-274
- ZARARSIZ, İ., KUŞ, İ., YILMAZ, H. R., KÖSE, E., SARSILMAZ, M., (2008). Deneysel Formaldehit Toksikitesi Sonucu Hipokampusta Oluşan Doku Hasarına Karşı Omega-3 Yağ Asitlerinin Antioksidan Etkileri, *Fırat Tıp Dergisi*, **22(2)**:59-64

Jandarma Genel Komutanlığı, Olay Yerinin Sistemik İncelenmesi, Delillerin Toplanması ve Laboratuvarlara Gönderilmesi Esasları, (2001). Ankara: Jandarma Genel Komutanlığı Basımevi Müdürlüğü

AmpFISTR Identifiler PCR Amplification Kit User's Manual (Applied Biosystems, 2006, Foster City, USA)

EZ1 DNA Handbook (Important Notes, p.: 12, Qiagen Ltd., 4/2008, UK)

MagAttract DNA Mini M48 forensic Handbook (Qiagen Ltd., 2006, UK)

QIAamp DNA FFPE Tissue handbook (Qiagen Ltd., 10/2007, UK)

Quantifiler Duo DNA Quantification Kit User's Manual (Applied Biosystems, 2008, Foster City, USA)

Erişim: <http://www.mevzuat.adalet.gov.tr/html/23168.html> Erişim Tarihi: 11.09.2009

Erişim: <http://www.eskisehir.gov.tr/jandarma/dosyalar/htm/resim/oly.jpg> Erişim Tarihi: 11.09.2009

Erişim: <http://www.atk.gov.tr/tr/index.php?task=teslimbiyoloji> Erişim Tarihi: 22.11.2009

Erişim: [http://www.rtalabs.com.tr/assets/pdf/Dokudan%20DNA\\_Tr.pdf](http://www.rtalabs.com.tr/assets/pdf/Dokudan%20DNA_Tr.pdf) Erişim Tarihi: 22.11.2009

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

**Adı:** Okan  
**Soyadı:** Bakşı  
**Doğum yeri ve Tarihi:** Tarsus-1978  
**Uyruğu:** T.C.  
**Medeni Durumu:** Evli  
**Askerlik Durumu:** Yaptı (277. K.D.)  
**İletişim Adresi ve Telefonu:** Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığı,  
 Biyoloji İhtisas Dairesi, Keçiören/ Ankara  
 312 3407324 / 5120

### II - Eğitimi:

Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi  
 Biyoloji Bölümü (1995-1999),  
 Tarsus Lisesi (1992-1995),  
 Barbaros Hayrettin Ortaokulu (1989-1992),  
 İstiklal İlkokulu (1984-1989),  
**Yabancı Dil:** İngilizce (Upper Intermediate)

### III- Ünvanları:

Biyolog (Akdeniz Üniversitesi, 1999)

### IV- Mesleki Deneyimi:

Biyolog (Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığı, 2000- )

Birim Sorumlusu (Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığı, Biyoloji Dairesi, 2002-)

### V- Diğer Bilgiler:

#### Eğitim Seminerleri:

DNA Data Evaluation, March 2002, University of Strathclyde, Glasgow, UK

Pre-congress Educational Workshops 22.nd Congress of the ISFG, Copenhagen, 21- 25 August 2007

DNA in Forensic, Ancona (Italy), 27-30 may 2008

**T. C.**  
**ADALET BAKANLIğI**  
**Adli Tıp Kurumu Başkanlığı**

Sayı : B.03.1.ATK.0.01.00.08/ 396  
Konu: Bilimsel Kurul

16.06.2009

**Sayın, Bio. Okan BAKŞI**

“Formaldehit İle Fikse Edilmiş Psoas Kası Ve Karaciğer Dokularında DNA Ekstraksiyonuna Zamanın ve Metodun Etkisi Hakkında Bir Çalışma” isimli çalışma öneriniz; 16.06.2009 tarihli Eğitim ve Bilimsel AraŐtırma Komisyonu toplantısında görüŐülmüŐ ve kabul edilmiştir.

Bilginize rica ederim.

  
**Doç. Dr. C. Haluk İNCE**  
**BAŐKAN**