



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİNDE RAT KALP
DOKULARINDAN miRNA EKSPRESYONLARININ ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ
DR. NUR FATMA VANLIOĞLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. TANER AKAR

ANKARA
MAYIS 2025

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI

POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİNDE RAT KALP
DOKULARINDAN miRNA EKSPRESYONLARININ
ANALİZİ

UZMANLIK TEZİ
DR. NUR FATMA VANLIOĞLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. TANER AKAR

ANKARA
MAYIS 2025

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	Nur Fatma VANLIOĞLU
Baba Adı	
Doğum Yeri/Tarihi	
Diploma Tarihi / Diploma No	
Mezun Olduğu Fakülte	
İhtisas Yaptığı	
Anabilim Dalı/Bilim Dalı	
İhtisas Süresi	
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Postmortem İnterval Tayininde Rat Kalp Dokularından miRNA Ekspresyonlarının Analizi

JÜRİ KARARI:

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN: Prof. Dr. Birol DEMİREL

ÜYE: Prof. Dr. Taner AKAR

ÜYE: Öğr. Üyesi Dr. Alper ÖZKÖK

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
TABLolar	viii
ŞEKİLLER	ix
RESİMLER.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Ölümün Tanımı.....	2
2.1.1. Somatik Ölüm.....	2
2.1.2. Hücresel Ölüm.....	3
2.2. Ölü Muayenesinde Değerlendirilmesi Gereken Özellikler	4
2.2.1. Ölümün Erken Belirtileri	4
2.2.1.1. Sıvı Kaybı	4
2.2.1.2. Kan ve Vücut Sıvılarındaki Değişiklikler.....	5
2.2.1.3. Otoliz	5
2.2.1.4. Ölü Soğuması (Algor Mortis)	6
2.2.1.5. Ölü Katılığı (Rigor Mortis).....	7
2.2.1.6. Ölü Lekeleri (Livor Mortis)	11
2.2.2. Ölümün Geç Belirtileri	14
2.2.2.1. Çürüme (Dekompozisyon).....	14
2.3. Postmortem İnterval Tayininde Kullanılan Diğer Yöntemler	16
2.3.1. Biyokimyasal Yöntemler	17

2.3.1.1. Vitröz Hümör Analizi	17
2.3.1.2. Sinoviyal Sıvı Analizi.....	19
2.3.1.3. Mide İçeriği Analizi	19
2.3.2. Entomolojik Yöntemler	20
2.3.3. Mikrobiyolojik Yöntemler	25
2.3.4. Genetik Yöntemler	32
2.3.4.1. DNA Degradasyonunun Kullanımı	32
2.3.4.2. RNA Degradasyonunun Kullanımı	34
2.3.4.3. Sirkadiyen Ritim Kullanımı.....	36
2.4. Postmortem İnterval Tayininin Adli Tıptaki Önemi.....	40
2.5. miRNA'nın Tanımı	40
2.6. miRNA'nın Biyolojik İşlevi	41
2.7. miRNA'nın Adli Tıpta Kullanımı.....	42
2.7.1. Yara Yaşı Tayini.....	42
2.7.2. Vücut Sıvılarının Ayırımı	44
2.7.3. PMI Tayini	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
3.1. Kullanılan Hayvan, Araç ve Gereçler	50
3.1.1. Deney Hayvanları	50
3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri.....	50
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	51
3.1.4. Kullanılan Kitler	52
3.2. Yöntemler	52
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması.....	52
3.2.2. Deney Grupları	53

3.2.2.1. Grup 1.....	53
3.2.2.2. Grup 2.....	53
3.2.2.3. Grup 3.....	53
3.2.2.4. Grup 4.....	54
3.2.2.5. Grup 5.....	54
3.2.3. Rat Kalp Dokusundan miRNA İzolasyonu	56
3.2.4. Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Yöntemi	57
3.2.5. Kantitatif Real Time PCR Yöntemi.....	58
3.2.6. İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR.....	61
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ.....	72
7. KAYNAKÇA.....	74
8. ÖZET	90
9. ABSTRACT.....	91
10. EKLER	92
11. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmam süresince bilgi birikimi, akademik rehberliği ve desteğiyle her zaman yanımda olan, Tıp Fakültesi eğitimim sırasında verdiği derslerle Adli Tıp alanına yönelmemde etkili olan kıymetli tez danışmanım, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Taner AKAR'a,

Uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve deneyimiyle daima yol gösteren, hekimlik anlayışı ve etik değerlere bağlılığıyla örnek aldığım, Tıp Fakültesi eğitimim sırasında verdiği derslerle Adli Tıp alanına yönelmemde önemli rol oynayan değerli hocam, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Birol DEMİREL'e,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimiyle yanımda olan, özellikle yaptığı titiz geri bildirimlerle mesleki gelişimime önemli katkılar sunan, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Alper ÖZKÖK'e,

Bilgi ve emeğiyle bu çalışmanın şekillenmesinde büyük rol oynayan, tezimin hayvan deneyleri ve genetik analiz süreçlerinde özveriyle katkı sunan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a,

Uzmanlık eğitimim süresince, mesleki dayanışma, samimiyet ve karşılıklı destek temelinde oluşturduğumuz uyumlu ekip ruhu ve huzurlu çalışma ortamı içerisinde birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında ve her kararında yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bugünlere gelmemin mimarları canım annem ve canım babama, koşulsuz sevgi ve desteklerini hep hissettiğim kız kardeşlerime ve hayatımın neşesi yeğenim Nil'e,

Her zaman yanımda hissettiğim, desteği, sevgisi ve duasıyla bu süreci benim için kolaylaştıran dedem Ahmet Hulusi ÖZTÜRK ve halam Nursel ÖZTÜRK'e, yol arkadaşlığı ve dostluğuyla bana moral olan sevgili arkadaşım Ece Tuğba VURAN'a,

En çok da hayatımdaki yerini tarif etmenin mümkün olmadığı, bu zorlu süreçte sabrı, anlayışı, sevgisiyle her anımda yanımda olan sevgili eşim Muhammet Emre VANLIOĞLU'na ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen eşimin değerli ailesine,

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2024-9269 nolu proje olarak desteklenmiştir, destek ve katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Dr. Nur Fatma VANLIOĞLU

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
3'UTR	3' çevrilmeyen bölge
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADD	Accumulated degree days
ADH	Accumulated degree hours
ARNTL	Aril hidrokarbon reseptörü nükleer translokator benzeri
ATP	Adenin trifosfat
Ba	Baryum
BFID	Vücut sıvısı tanımlaması
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CDI	Ceset ayrışma adası
cDNA	Tamamlayıcı DNA
circRNA	Dairesel RNA
COI	Sitokrom oksidaz I
CYCA	Siklofilin A
CZE	Capillary zone electrophoresis
DNA	Deoksiribonükleik asit
EMP	Earth Microbiome Project/Dünya Mikrobiyom Projesi
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
HIF	Hipoksiye bağlı faktör
HMBS	Hidroksimetilbilan sentaz
HMP	Human Microbiome Project/İnsan Mikrobiyom Projesi
IAT	Görüntü analizi tekniği
K	Potasyum
miRNA	MikroRNA

mRNA	Mesajcı RNA
mtDNA	Mitokondriyal DNA
Na	Sodyum
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NGS	Yeni nesil dizileme
NH₄	Amonyum
NR1D1	Nükleer reseptör subfamilyası 1 grup D üyesi 1
OTU	Operasyonel taksonomik birim
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PMI	Postmortem interval
RFLP	Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
RPS-29	Ribosomal protein small subunit-29
RQI	RNA kalite göstergesi
rRNA	Ribozomal RNA
RT-qPCR	Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SCGE	Tek hücreli jel elektroforezi
SCN	Suprakiazmatik çekirdek
SDHA	Süksinat dehidrogenaz kompleks alt birimi A
snRNA	Small nuclear RNA
srRNA	Mesajcı küçük düzenleyici RNA
TGF- β	Transforme edici büyüme faktör beta
UBC	Ubikitin C
VKİ	Vücut kitle indeksi

TABLÖLAR

Tablo 1. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları	57
Tablo 2. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program	58
Tablo 3. Gene özgü qPCR primer dizileri	59
Tablo 4. Real-time PCR tepkime karışımı	59
Tablo 5. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program	59



ŞEKİLLER

Şekil 1. Kontrol ve postmortem interval (3, 6, 12 ve 24 saat) gruplarında ilgili miRNA'ların bağıl ifade düzeyleri.....62

Şekil 2. Postmortem interval (3, 6, 12 ve 24 saat) gruplarında ilgili miRNA'ların bağıl ifade düzeyleri 63



RESİMLER

Resim 1. Deney hayvanları grupları (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4).....55

Resim 2. Deney hayvanları grupları (Grup 5) 55



1. GİRİŞ

Adli Tıp, tıbbi bilgilerin suç ve hukuk olaylarına uygulanması sanat ve bilimidir. Bu alandaki en önemli süreçlerden biri, postmortem intervali (PMI) doğru bir şekilde belirlemektir. PMI tayini, ölüm nedenini belirleme, cinayet ve intihar vakalarının çözülmesi, suçun ya da suçluların tespiti ve ölümlerin kimliklendirilmesi gibi adli süreçlerde kritik bir rol oynar. Geleneksel PMI belirleme yöntemleri, vücut sıcaklığı, ölü lekeleri ve ölü katılığı gibi fizyolojik verilere dayansa da bu yöntemlerin doğruluğu zamanla azalmaktadır ve bazı durumlarda belirsizlikler yaratmaktadır.

Son yıllarda moleküler biyolojik tekniklerin Adli Tıpta kullanımı artmış ve PMI tayininde yeni olanaklar ortaya çıkmıştır. miRNA'lar (mikroRNA), hücre içi gen ekspresyonunu posttranskripsiyonel düzeyde düzenleyen küçük, tek sarmallı RNA molekülleridir. miRNA'lar, postmortem süreçlerdeki genetik değişikliklere tepki olarak vücutta farklı profiller sergileyebilir, bu da onları PMI tayininde biyomarker olarak kullanma potansiyeli sunar.

Bu tez çalışması, rat kalp dokularından yapılacak miRNA analizleri ile PMI'yı geleneksel yöntemlere göre daha güvenilir bir şekilde tayin etmeyi amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ölümün Tanımı

Ölüm, biyolojik açıdan, bir organizmanın tüm hayati fonksiyonlarının geri dönüşsüz bir şekilde durması olarak tanımlanır. Bu süreç, solunum, dolaşım ve santral sinir sistemi fonksiyonlarının sonlanması ile karakterizedir (1).

2.1.1. Somatik Ölüm

Somatik ölüm, temel vücut fonksiyonlarının geri dönüşü olmayacak şekilde kaybıyla meydana gelir. Bu süreç dolaşım sistemi ve solunum sisteminin durması ile merkezi sinir sistemi fonksiyonlarının kaybolmasını kapsamaktadır. Ölümün şekline göre bu fonksiyonlardan birinin kaybı, bir süre sonra diğerlerinin de kaybına neden olacaktır (2).

Bu süreçte kişinin bilinci kapanır, iletişim kuramaz, herhangi bir duyuşal stimulusu hissedemez, istemli bir hareket yapamaz fakat refleks sinir aktiviteleri devam edebilir, dolaşım ve solunum fonksiyonları kendiliğinden veya yapay destekle devam edebilir, böylece birçok organ ve dokuda canlılık fonksiyonları devam eder (3).

Beyin ölümü, somatik ölüm kapsamında bir tanımdır. Beyin ölümü tanımı ilk kez 1959 yılında Mollart ve Goulon tarafından yapılmış ve bu hastalar için “komanın ötesinde” anlamına gelen “coma depasse” deyimini kullanılmıştır. Beyin ölümü, beynin tüm fonksiyonlarının geri dönüşsüz bir şekilde sonlanması

durumudur ve modern Tıpta ölümün kesin bir işareti olarak kabul edilir. Beyin ölümü, beynin iki ana bölümünün, beyin sapı ve beyin korteksinin tamamen işlevsiz hale gelmesiyle ortaya çıkar. Beyin sapı, solunum ve dolaşım sistemlerini kontrol ederken, beyin korteksi bilinç ve diğer yüksek düzeydeki fonksiyonları yönetir. Beyin ölümünde, her iki bölüm de fonksiyonlarını kaybeder ve bu durum kişinin hukuken ve tıbben ölü olduğu anlamına gelir (4).

Beyin ölümü gerçekleşmiş kişinin tıbben yaşatılabilme olasılığı bulunmamaktadır. Beyin ölümü saptanmış kişilerden, sağlıklıyken kendisinden veya kişi öldükten sonra yakınlarından izin alınmış olması koşulu ile hukuken organ ve doku transplantasyonu yapılabilmektedir (2).

2.1.2. Hücresel Ölüm

Somatik ölümden sonra hücre ve dokularda belli bir sıra ile ölüm gerçekleşir. Hücresel ölüm, hücrenin yaşam fonksiyonlarının durması ve geri dönüşümsüz şekilde sonlanması sürecini ifade eder. Solunum ve dolaşım sisteminin fonksiyonlarının durmasına bağlı olarak oluşan iskemi ve anoksi sonucunda meydana gelir. Ölüm anında, organizma genel olarak homeostatik dengeyi kaybeder. Bunun sonucunda hücreler, oksijen ve besin maddelerinin temin edilememesi nedeniyle hayati işlevlerini sürdürememeye başlar. Bu durum bir olaydan ziyade bir süreci ifade etmektedir (3).

2.2. Ölü Muayenesinde Değerlendirilmesi Gereken Özellikler

2.2.1. Ölümün Erken Belirtileri

2.2.1.1. Sıvı Kaybı

Ölümün erken döneminde, organizmada metabolik süreçlerin durması ile birlikte hücrel ve sistemik düzeyde sıvı kaybı başlar. Vücutta sıvı kaybının artması, dokularda dehidratasyona yol açar. Bunun sonucu olarak, deri elastikiyetini kaybeder. Sıvı kaybı nedeniyle ciltte, mukozal yüzeylerde, gözlerde, dilde, skrotumda ve postmortem meydana gelen travmalara sekonder gelişen sıyrıklarda parşömenleşme bulgusu ortaya çıkar (3). Ayrıca yenidoğan ölümlerinde, miad tayini açısından sübjektif bir bulgu olan cesedin ağırlığı değerlendirilirken sıvı kaybı dikkate alınmalıdır. Çünkü erişkinlerde oluşan sıvı kaybı vücut ağırlığına göre fazla değilken, yenidoğanda sıvı kaybı bebeğin kilosuna oranla önemlidir. Yenidoğan ağırlıklarının ölçümleri esnasında kg başına meydana gelen sıvı kaybı (18-20 g/kg/gün) göz önünde bulundurulmalıdır. Bu tür bulgular, Adli Tıp Uzmanları tarafından ölüm zamanı ve çevresel faktörler göz önünde bulundurularak değerlendirilir (5).

Sıvı kaybı, çevresel faktörlere bağlı olarak artış gösterebilir. Yüksek sıcaklık, düşük nem oranı, doğrudan güneş ışığına maruz kalma gibi etmenler, ölüm sonrası vücutta sıvı kaybını hızlandırır. Bu durum, özellikle açık alanda kalan cesetlerde ya da sıcak iklim koşullarında gerçekleşen ölümlerde belirgin olur (2).

2.2.1.2. Kan ve Vücut Sıvılarındaki Değişiklikler

Ölüm anından sonra kardiyovasküler sistemin işlevinin durmasıyla birlikte kanın dolaşımı sona erer. Buna bağlı olarak kan, kalp içerisinde ve damarlarda göllenir. Bu süreç, kanın kıvamında ve bileşiminde önemli değişikliklere yol açar. Ölümden sonra kanın şekilli elemanları ve plazma kısmı ayrılarak çöker ve bulunduğu boşluğun şeklini alır. Meydana gelen bu oluşum postmortem pıhtı veya aleka olarak isimlendirilmektedir. Postmortem pıhtının özelliği bulunduğu boşluğun şeklini alması ama bu boşluğu tam olarak doldurmamasıdır. Postmortem pıhtı parlak ve elastik özelliktedir. Postmortem pıhtı ile antemortem trombüs ayrımının otopside mutlaka yapılması gerekmektedir. Eğer bir şüphe varsa, her iki oluşum formalin içine konulur, postmortem pıhtı belli bir süre sonra bu solüsyon içinde erir. Ayrıca postmortem pıhtı damardan kolayca çekilerek alınabilirken, antemortem trombüs damar duvarına yapışıktır (2, 5).

Ölüm sonrası kan gazlarında da belirgin değişiklikler meydana gelir. Oksijen tüketimi durur, karbondioksit seviyesi yükselirken oksijen seviyesi hızla azalır. Postmortem dönemde meydana gelen hemoliz, organlardaki otoliz ve mikroorganizmaların üremeye başlaması ile kanın pH seviyesi düşer. Kan şekeri giderek düşmeye başlar, magnezyum yükselirken sodyum ve klor seviyelerinde düşme meydana gelir (6).

2.2.1.3. Otoliz

Otoliz, ölüm sonrası hücresel seviyede gerçekleşen bir süreçtir ve vücudun kendi enzimleri tarafından dokularının sindirilmesi olarak tanımlanabilir. Bu süreç,

ölümün hemen ardından başlar. Hücrelerin ölümüne ve metabolik faaliyetlerinin durmasına bağlı olarak, hücre zarları bozulur ve bunun sonucunda lizozomlar, sitozoldeki düşük pH tarafından aktive edilen hidrolitik enzimleri serbest bırakır. Bu enzimler, hücre yapılarının kendi kendini yok etmesinde belirleyici bir rol oynar. Otoliz, genellikle 24 ile 48 saat içinde daha belirgin hale gelir ve hücrelerin yapısal bozulmaları vücudun çeşitli bölgelerinde görülür. Yaşam sırasında enzim açısından zengin olan pankreas, adrenal medulla gibi organlar, ölümden sonra çok hızlı sindirime uğrar; hidroklorik asit içermesi nedeni ile mide mukozasında otoliz daha belirgin bağ ve kas dokusu gibi kompakt dokular otolizden daha az etkilenir (7, 8).

2.2.1.4. Ölü Soğuması (Algor Mortis)

Normal bir insanın dış vücut ısısı 36-36,5°C'dir. Rektal bölgeden ölçülen iç vücut ısısı ise 0,5°C kadar daha yüksektir. Ölü soğuması tabiri ile, iç vücut ısısının düşmesi kast edilmektedir. Ölü soğumasını etkileyen birçok faktör vardır; cesedin bulunduğu ortamın ısısı, ölüm anındaki vücut ısısı, kişinin beslenme durumu, üzerindeki giysiler, rüzgar ve nem bunlardan bazılarıdır. Rektal ısı ölçümü en yaygın kullanılan yöntemdir, ancak uygulamada bazı zorluklar barındırır (3). Ölü soğuması sürecinde önce dış vücut ısısı düşmeye başlar. Bu dönemde iç vücut ısısı normaldir. Yapılan ölçümlerde görülen plato evresi bu döneme denk gelir. Vücudun dışı ile içi arasında ısı gradienti meydana geldiğinde iç vücut ısısı düşmeye başlar. Önce hızlı bir düşüş evresi görülür. İç vücut ısısı çevre ısısına yaklaşıncaya daha yavaş bir düşüş evresi gerçekleşir (5).

Marshall ve Hoare (1962), ölüm sonrası rektal soğumayı hesaplayabilmek için standart soğuma koşulları altında vücut soğuma deneyleri yaparak matematiksel bir formül yayınlamışlardır. Bu formül, ölümden sonra soğuma eğrisinin sigmoidal şekli göz önüne alınarak yapılmaktadır (9).

Ölüm zamanını tayin etmenin tüm yöntemleri arasında, Henssge'nin geliştirdiği nomogram yöntemi, çevresel faktörleri de hesaba katarak ölüm zamanını belirlemede en hassas ve en güvenilir yöntemlerden biridir (10),(11).

2.2.1.5. Ölü Katılığı (Rigor Mortis)

İskelet kaslarının kasılma ve gevşeme mekanizmaları, Hanson ve Huxley'in öne sürdüğü aktin ve miyozin filamentlerinin birbiri üzerinde kaymasına dayanan "kayan filament modeli" ile açıklanmaktadır(12). Kasılma sürecinde, miyozin başları ATP'nin sağladığı enerjiyle aktin filamentlerine bağlanmakta ve aktin filamentlerini sarkomerin merkezine doğru çekmektedir. Kas gevşemesi ise, miyozin başlarının aktin filamentlerinden ayrılması ve kas liflerinin dinlenme uzunluklarına dönmesiyle mümkün olmaktadır. Bu mekanizmada iki ana molekül kritik öneme sahiptir; kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) ve ATP. Aksiyon potansiyelinin kas hücre membranında yayılması, sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} iyonlarının salınımına yol açar. Salınan kalsiyum iyonu, troponin C'ye bağlanarak tropomiyozin kompleksinin yapısını değiştirir ve böylece miyozin başlarının aktin üzerindeki bağlanma bölgeleri açığa çıkar. Miyozin başlarının aktinle bağlanması ve ardından ayrılması ATP'nin varlığına bağlıdır. ATP ayrıca kalsiyumun sarkoplazmik retikuluma geri pompalanması için de gereklidir(13).

Ölü katılığı, ölüm sonrası kasların sertleşmesi ile ortaya çıkan bir durumdur. Ölü katılığı sırasında oluşan biyokimyasal olaylar bir dizi mekanizmayla açıklanmaktadır. İskelet kasları ölümden sonra üç süreçten geçer. Önce nöronal uyarının sona ermesi sonucu tüm kaslarda gevşeme meydana gelir. Bu durum özellikle ayakta veya oturur pozisyonda ölen kişilerde yerçekimi etkisiyle düşmeye neden olur. Oluşan travmatik lezyonlar adli açıdan değerlendirildiğinde düşmeye bağlı postmortem yaraların, antemortem yaralanmalardan ayrımının yapılması önemlidir. Antemortem yaralanmalarda inflamatuvar yanıtlar bulunurken, postmortem yaralanmalarda bu bulgular görülmez. Ortalama 3-6 saat süren bu dönemi takiben ölü katılığı gelişmektedir. Kas hücrelerinde ATP üretiminin durması, mevcut ATP konsantrasyonunun düşmesi sonucu miyozin başlarının aktin filamentlerinden ayrılması imkansız hale gelir. Bu durum, kas liflerinin kasılı pozisyonda kalmasına ve ölü katılığının oluşmasına neden olur. Aynı zamanda kas hücrelerinin aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya geçmesi sonucu dokuda laktik asit birikir, bu durum pH seviyesinin azalmasına neden olur. Sarkomere sızan kalsiyumun kas filamentlerine bağlanarak kasılmalarını güçlendirmesiyle ölü katılığı progresif olarak artar ve ortalama 6-12 saat içinde maksimum seviyeye ulaşır. Ölümden yaklaşık 36 saat sonra başlayan çürüme süreci ile proteolitik enzimlerin ve bakteriyel faaliyetlerin etkisi sonucu kas proteinleri aktin ve miyozin yıkıma uğrar. Bu proteinlerin denatürasyonu sonucunda kaslar yeniden gevşer ve ölü katılığı çözülür (5).

Ölü katılığı önce çene ve boyun gibi küçük kas gruplarından başlar. Ardından büyük kas gruplarına yayılır. Ölü katılığının ortaya çıkış süresi, ilgili

kasın kütlesi ile doğru orantılıdır. Ölü katılığı sürecinde vücut fleksör postür alır. Küçük kas gruplarında fleksiyon daha belirgin iken, büyük kas gruplarında daha hafif fleksiyon görülür. Bu durum, fleksör kasların fizyolojik olarak daha güçlü olmaları ile açıklanmaktadır (5).

Ölü katılığı aynı zamanda musculus arrector pili, musculus sphincter pupillae ve myokardda da görülür. Musculus arrector pilideki ölü katılığı ciltte kaz derisi görünümüne neden olur. Buna “cutis anserina” denir. Musculus sphincter pupilla kasında ölü katılığı gelişmesi sonucu pupil çapı değişmektedir. Antemortem dönemde, morfin gibi opioid zehirlenmelerinde gözlenen tipik "toplu iğne başı pupil" görünümü ile postmortem meydana gelen musculus sphincter pupillae kasında ölü katılığı gelişmesi nedeniyle pupil çapının daralması birbirlerinden ayırt edilemeyeceği için, pupil çapının değerlendirilmesi ölüm sonrası güvenilir bir belirteç değildir. Myokarddaki ölü katılığı kasta kontraksiyona sebep olmakta ve myokard hacmi artmış gibi görünmektedir. Bu nedenle otopside, kalbin sistol sırasında mı, yoksa diastol sırasında mı durduğunu saptamak mümkün değildir. Normal koşullarda, dolaşımdaki potasyum artışı kalbin sistolde durmasına neden olabilir. Ancak postmortem hücresel yıkım ve hemoliz sonucunda hücre dışına potasyum sızdığı için, yüksek doz potasyum verilerek kalbin durdurulması ile doğal postmortem hemoliz sonucu oluşan potasyum artışı arasında ayırım yapılamaz. Bu nedenle, yalnızca otopsi bulgularına dayanarak kalbin sistolde durduğunu kesin olarak söylemek mümkün değildir (7). Ölüm anına ilişkin video kaydı gibi objektif belgeler bulunmadığında veya fail suçu açıkça itiraf etmediğinde, bu tür olayların aydınlatılması Adli Tıp açısından oldukça zordur. Nitekim, ABD’de Dr. Jack

Kevorkian, 1990-1998 yılları arasında, Thanatron adını verdiği bir cihaz sayesinde, 130'dan fazla hastanın kendi başlatabileceği bir mekanizma ile önce sodyum tiyopental infüzyonu ile derin komaya girmesine, ardından potasyum klorür infüzyonu ile kalbinin durmasına yardımcı olmuştur. Birçok kez yargılanmasına rağmen beraat etmiş, ancak 1998 yılında ALS hastası Thomas Youk'a doğrudan ölümcül enjeksiyon uyguladığı anların CBS kanalının "60 Minutes" programında yayımlanması üzerine mahkum edilmiştir (14, 15)

Çevre sıcaklığı, ölüm şekli ve ölüm öncesi fiziksel aktivite gibi faktörler rigor mortisin başlama hızını ve süresini etkiler. Sıcaklık arttıkça ölü katılığına ortaya çıkışı hızlanır ve çözünme süresi kısalır. Sıcaklık düştükçe bu süre uzamaktadır. 10°C'nin altında ölü katılığı genellikle gelişmez. Bu olay donmuş cesetlerde daha belirgin olarak gözlenir. Ceset, sonrasında yüksek ısı bir ortama alındığında ölü katılığı beklenen şekilde gelişmektedir. Ölümden önce fiziksel aktivitede bulunan kişilerde, kasların çalışması enerji depolarını bitireceğinden ölü katılığının ortaya çıkışı erken olur ve çözünmesi kısa sürer. Ölümden önce konvülsiyon, organik fosfor bileşikler ve striknin zehirlenmesi gibi durumlarda kas metabolizması artmış olduğundan ölü katılığı erken olur ve kısa sürer (5).

Kadaverik spazm, ısıya bağlı sertlik ve donmaya bağlı sertlik gibi ölü katılığı ile karışabilecek bazı durumlar da dikkate alınmalıdır. Kadaverik spazm genellikle sadece bir grup kasta görülür. Somatik ölümden takiben kaslarda gevşeme olmasına rağmen bazı kaslarda spazm devam eder, bu duruma kadaverik spazm denilmektedir. Genellikle özel emosyonel faktörlerin etkili olduğu ve bunun sonucunda lokal olarak belli bir kas grubunda ani ATP kaybına bağlı spazm

geliştiği şeklinde açıklanmaktadır (2). Kadaverik spazm genellikle ellerde görülür. Bazı intihar olgularında intihar eden kişinin elinde silah veya bıçağı tuttuğu, suda boğulma olgularında kişinin yosun veya benzeri maddeleri elinde tuttuğu, cinayet olgularında saldırganın saçı veya elbise parçalarının kurbanın elinde olduğu görülebilmektedir. Kadaverik spazm bazı olgularda tüm vücutta da gelişebilmektedir. Kasların yüksek ısıya maruz kalmaları sonucu ısıya bağlı sertlik meydana gelir. Isı sertliği gelişen bir cesette kas proteinlerinin koagölasyonuna bağlı olarak yapılarının degradasyonu nedeniyle ölü katılığı oluşmaz. Isının etkisi ile kaslarda belirgin bir kısalma meydana gelir. Eğer tüm vücut yanarsa, cesette eklemlerin gerilmesine bağlı olarak pugilistik pozisyon gelişir. Donmaya bağlı sertleşmelerde de ölü katılığına benzer bir durum ortaya çıkmaktadır. Bu tip olgularda vücut aşırı derecede soğuktur. Eklemler hareket ettirildiğinde sinovyal sıvının donmasına bağlı olarak elle muayenede krepitasyon saptanır. Donma çözöldükten sonra ölü katılığı beklenen seyrine göre devam eder (5).

2.2.1.6. Ölü Lekeleri (Livor Mortis)

Dolaşımın durması ile kan, kalpte ve büyük venlerde hareketsiz kalır, yer çekimi etkisi ile büyük damarlardan vücudun yere yakın kısımlarındaki küçük damarlara, kapiller damarlara doğru toplanır. Eritrositlerin yıkılması sonucunda kan, başlangıçta kırmızıya yakın bir renk alırken, oksijen kaybıyla birlikte indirgenmiş hale geçer ve bu durum kanın koyu mor bir renge dönüşmesine yol açar. Ölüm sonrası dönemde, cesedin yer çekiminin etkisiyle alt kısımlarında ve bası altında kalmayan bölgelerinde, normal deri tonundan farklı olarak koyu mor, açık kırmızı ya da siyaha yakın renk değişimleri görülür. Bu oluşumlara 'ölü

lekeleri' adı verilir (2). Ölü lekelerinin rengi, doğrudan indirgenmiş hemoglobin düzeyiyle ilişkilidir. Vücuttaki hemoglobin miktarı azaldıkça, bu lekelerin rengi de daha soluk hale gelir. Ölüm öncesinde aşırı kan kaybı yaşanmışsa ve dolayısıyla hemoglobin düzeyinde belirgin bir azalma meydana gelmişse, ölü lekeleri hem daha sınırlı bölgelerde görülür hem de renkleri daha belirsiz olur. Ölü lekeleri ölümden ortalama birkaç saat sonra oluşmaya başlamakta ve yaklaşık 12 saatte maksimum yoğunluğa ulaşmaktadır. Normal şartlarda ölümden yaklaşık üç saat sonra hemoliz süreci başlar. Bu süreçte açığa çıkan hemoglobin, önce damarların iç yüzeyinde birikerek bu bölgeyi boyar; zamanla tüm damar duvarı tabakalarına yayılarak renk değişimine neden olur. Kan, damar duvarının aktif seçici geçirgenlik özelliğinin bozulması sonucu damar dışına çıkarak pasif difüzyonla çevre dokuları boyamaktadır. Ceset bu aşamaya gelmeden önce hareket ettirilip pozisyonu değiştirilirse ölü lekeleri yeni pozisyonuna göre gelişir. Ölümden 15-20 saat sonra hemolizin tamamlanması sonucu damar dışına sızan kan dokulara yerleşmiş ve ölü lekeleri belirginleşmiştir. Bu süreden sonra cesedin pozisyonu değiştirilse bile ölü lekelerinin yerinde bir değişiklik olmaz. Eğer ölü lekeleri cesedin bulunduğu pozisyonla uyumsuzluk gösteriyorsa, cesedin postmortem dönemde hareket ettirildiğinden şüphe edilmelidir (5).

Ölü lekelerinin vücutta ortaya çıktığı bölgeler, cesedin bulunduğu pozisyona bağlı olarak değişkenlik gösterir. Çoğunlukla cesetler sırtüstü pozisyonda bulunduklarından, lekeler en sık sırt bölgesinde, bacakların fleksör yüzlerinde ve ensede gözlemlenir. Vücudun zeminle temas eden bölgelerinde ise basınç nedeniyle kan birikimi engellendiği için bu alanlarda ölü lekeleri oluşmaz.

Sırt üstü yatan cesette kalpteki ve subklavian venlerindeki kapaklardan dolayı kafadan ve kollardan gelen kanın drenajı bozulabilir. Bu sebepten dolayı boynun ön yüzündeki venler normal olarak boşalamazlar. Böylece ensede oluşan ölü lekelerine ek olarak boyun ön yüzünde de ölü lekeleri görülebilir. Bu lezyonlar boyun bölgesine gelen travmalar ile karışabileceğinden dikkatli yorumlanmalıdır. Bu bulgu, özellikle elle ya da bağla boğma vakalarının ayırıcı tanısında dikkate alınması gereken önemli bir unsurdur. Cesedin yüzükoyun pozisyonunda bulunması durumunda, ölü lekeleri genellikle göğsün ön yüzünde, bacakların ekstansör yüzeylerinde ve yüzde ortaya çıkar. Asılı pozisyonunda belirli bir süre kalan cesetlerde ölü lekeleri tipik olarak ellerde ve ayaklarda “eldiven çorap tarzında” görülür. Suda bulunan cesetlerde ise, başın ağırlık merkezi olması ve vücudun aşağıda kalması nedeniyle ceset genellikle yüzüstü oblik bir pozisyonunda durur. Bu durum, ölü lekelerinin baş ve vücudun ön yüzeyinde oluşmasına yol açar (5).

Ölü lekelerinin renkleri ölüm nedeni, cesedin sağlık durumu gibi konularda bilgi vermektedir. Ölü lekeleri, içerdikleri deoksijenize hemoglobin nedeniyle karakteristik olarak mor renkte gözlemlenir. Cesetteki oksihemoglobin düzeyini etkileyen faktörler, ölü lekelerinin rengine değişimlere yol açar. Kalp yetmezliği, solunum yetmezliği, ası, elle boğma veya iple boğma gibi kandaki karbondioksit düzeyini artıran durumlarda, ölü lekeleri genellikle koyu mor renkte ortaya çıkar. Akciğerden oksijenin taşınmasını engelleyen karbonmonoksit zehirlenmesinde ise karbonmonoksitin hemoglobinle birleşerek karboksihemoglobin oluşturması sonucu, ölü lekeleri açık pembe-kırmızı renktedir. Donma vakalarında, cesedin soğuk ortamda kalması ya da suya maruz kalması gibi düşük ısıнын oksijen

tüketimini sınırladığı durumlarda ise lekeler açık kırmızı renkte görülür. Methemoglobinin oluştuğu, potasyum klorat ve anilin gibi kimyasal maddelere bağlı zehirlenmelerde ölü lekeleri kahverengi olur. Kolera gibi kanın sıvı içeriğini azaltan hastalıklarda ölü lekeleri siyaha yakın mor renkte oluşur. Ayrıca, tiner, yapıştırıcı gibi toluen ve ksilen içeren maddelere bağlı methemoglobinemi durumlarında ölü lekeleri koyu renktedir (2).

2.2.2. Ölümün Geç Belirtileri

2.2.2.1. Çürüme (Dekompozisyon)

Çürüme, cesetteki organik maddelerin bakteriler tarafından parçalandığı bir süreçtir. Bu süreç cilt ve mukozal yüzeylerde bulunan mikrobiyal flora ile başlar. Streptokoklar ve hareketli flagellumları sayesinde hızla yayılabilen Proteus türleri, bu süreçte özellikle önemlidir. Çürüme sırasında çeşitli gazlar (kükürt hidrojen, hidrokarbonlar) üretilir ve amonyak salınımı gerçekleşir. Bu da hem görsel (şişme) hem de kokuya dayalı (keskin amonyak kokuları) belirtilerin ortaya çıkmasına neden olur. Şişme özellikle düşük turgorlu dokularda, örneğin göz kapakları, ağız ve dilde belirgin hale gelir. Karın bölgesi, gaz birikimi nedeniyle aşırı derecede şişebilir. Sürecin ilerlemesiyle birlikte, sulfhemoglobin birikimi nedeniyle batin duvarında yeşilimsi bir renk değişimi görülür ve bu genellikle sağ alt kadrandan başlayarak tüm vücuda yayılabilir. Ayrıca deri altındaki damarlar içerisindeki eritrositlerin hemolizi nedeniyle açığa çıkan hemoglobin pigmentinin damar duvarlarını boyaması ve yüzeyel damarların cilt üzerinde görünür hale gelmesi sonucu “damarlı mermer görünümü” oluşur. Çürümenin bir diğer özelliği, cilt

yüzeyinde “çürüme bülleri” adı verilen, transüda sızıntısına bağlı büllerin oluşmasıdır. Süreç ilerledikçe saç ve tırnaklar gevşer ve kolayca dökülebilir (16).

Çürüme hızı, çevresel faktörlere bağlı olarak değişir. Sıcak ve nemli ortamlar, vücut üzerindeki örtüler, hastalıklar, yüksek yağ oranı ve enfeksiyonlar çürüme sürecinin hızlanmasına neden olurken, soğuk ve kuru çevre koşulları bu sürecin yavaşlamasını sağlar. Çürümenin ilerleyişi sabit bir ortam sıcaklığında bile büyük değişiklikler gösterir. Alman adli tıp doktoru Johann Ludwig Casper (1796–1864) tarafından ortaya konulan Casper Kuralı, farklı çevresel koşullardaki çürüme süreçlerini karşılaştırmak amacıyla geliştirilmiştir. Bu kurala göre; havada 1 hafta, suda 2 hafta ve toprak altında 8 hafta boyunca gerçekleşen çürüme miktarları birbirine eşdeğer kabul edilir (17). Casper Kuralı, çürümenin farklı ortamlarda nasıl ilerlediğini karşılaştırmak için kullanılan önemli bir prensiptir, ancak tek başına adli tıp açısından kesin zaman tespiti yapmaya yeterli değildir.

Ölüm belirtilerine dayanan postmortem interval tayini

1-2 gün sonra

Karın derisinde ilk yeşilimsi renk değişimi, göz kürelerinde yumuşama meydana gelir(16).

3-5 gün sonra

Batın duvarının büyük bölümünde koyu yeşil renk değişimi, vücudun diğer bölgelerinde yer yer yeşil lekeler, ağız ve burundan çürüme sıvısı sızması, damarlı mermer görünümü meydana gelir (16).

5-6 gün sonra

Epidermal soyulma meydana gelir (16).

6-8 gün sonra

Stratum germinativum'da (cildin alt tabakası) pigment kaybı meydana gelir (16).

8-12 gün sonra

Tüm vücut yüzeyinde koyu yeşil renk değişimi, yüz, boyun ve göğüs duvarında kırmızı-yeşil renk değişimi, batin, skrotum ve yüzde bölgesinde şişme, saçlarda gevşeyerek dökülmeye başlama, pütrefaktif kabarcıklar ve vücut boşluklarında pütrefaktif sıvı birikimi, cilt altı dokuda pütrefaktif amfizem (gaz birikimi), batin boşluğunda şişme meydana gelir (16).

4-20 gün sonra

Tüm vücutta yeşilimsi veya kırmızımsı-kahverengi renk değişimi, tüm vücutta şişme, ciltteki pütrefaktif sıvıyla dolu kabarcıklarda patlama, gözlerde (iris, sklera) kırmızımsı-kahverengi renk değişimi, tırnaklarda ayrışma meydana gelir (16).

2.3. Postmortem İnterval Tayininde Kullanılan Diğer Yöntemler

PMI tayini, adli tıpta ölüm sonrası geçen zamanı belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu tayin, ölümün kesin zamanını belirlemek ve olası suçları çözmek için kritik bir öneme sahiptir. PMI tayininde bir dizi yöntem kullanılır ve bu yöntemler çeşitli biyolojik, kimyasal ve çevresel faktörlere dayanarak ölüm

zamanını tayin etmeye çalışır. Bu süreçte kullanılan yöntemler farklı kategorilere ayrılabilir.

2.3.1. Biyokimyasal Yöntemler

Ölüm sonrası vücutta meydana gelen biyolojik ve kimyasal değişiklikler PMI tayininde kullanılabilir.

2.3.1.1. Vitröz Hümör Analizi

Vitröz hümör, kan ve beyin omurilik sıvısı ile karşılaştırıldığında, daha izole olması ve mikrobiyolojik kontaminasyona karşı direnci, bakteriyel bozulma ve biyokimyasal yapılarla etkileşime girmemesi nedeniyle postmortem konsantrasyon çalışmaları için oldukça uygun bir ortamdır (18).

Postmortem meydana gelen otoliz, ekstrasellüler sıvıda potasyum seviyesinde artışa, sodyum ve klorür seviyesinde azalmaya yol açar (3). Hücredeki enerji metabolizmasının durmasıyla, membranlardaki seçici geçirgenlik kaybolur ve iyonların konsantrasyon gradyanlarına göre difüzyonu başlar. Postmortem, intrasellüler potasyum, geçirgen hale gelen hücre zarı yoluyla kana, daha sonra beyin omurilik sıvısına ve vitröz hümöre geçer (16). Vitröz hümörde potasyum yoğunluğundaki postmortem artış, ilk olarak Sturner tarafından tanımlanmaktadır (19). Sonrasında Sturner ve Gantner tarafından vitröz hümördeki potasyum konsantrasyonunun uniform artışına dayalı olarak ölüm zamanını tayin etmek için bir formül geliştirmiştir (20). Ancak bu formülün çevre sıcaklığı ve süre arttıkça PMI tayininde hata payı içerdiği görülmektedir.

Postmortem vitröz hüümördeki potasyum konsantrasyonunun artışıını etkileyen faktörler; ortam sıcaklığı, kişinin yaşı, kronik hastalıkları, travma maruziyeti, üre birikimi olarak sıralanabilir (21).

Ölüm zamanını tayin etmek için farklı formüller karşılaştırıldığında, Madea ve arkadaşları ile Munoz ve arkadaşları tarafından açıklanan formüllerle güvenilir sonuçlar elde edildiği görülmektedir (22-25). Vitröz hüümörde potasyum yoğunluğu üzerine çok fazla literatür çalışması olmakla birlikte pratikte nadiren kullanılmaktadır (26).

Potasyuma ek olarak, vitröz hüümörde hipoksantin konsantrasyonunun ölçümü, PMI tayini için alternatif biyokimyasal bir yöntem olarak sunulmaktadır. Rognum ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada vitröz hüümördeki hipoksantin konsantrasyonunda potasyuma kıyasla daha küçük bir saçılma aralığı olduğu ortaya konmaktadır (27). Bununla birlikte, daha ileri çalışmalar, hipoksantin konsantrasyonundaki postmortem artışı doğrulamakla birlikte potasyum konsantrasyonunun ölüm zamanı ile korelasyonunun hipoksantin konsantrasyonundan çok daha anlamlı olduğunu belirtmektedir. (25, 27).

Çoklu doğrusal regresyon analizi sonucunda, vitröz hüümörde potasyum konsantrasyonuna ek olarak sodyum, üre ve glikoz konsantrasyonları da hesaba katıldığında tahmini ölüm süresinin hassasiyetinde artış elde edildiği, vitröz hüümör iyonlarının (K, NH₄, Na ve Ba) CZE (capillary zone electrophoresis) ile ölçülmesi ve tüm iyonların hesaba katılmasının, sadece potasyum konsantrasyonu

kullanılarak elde edilen sonuçlardan beş kat daha yüksek hassasiyette tahmini bir ölüm süresiyle sonuçlandırıldığı ifade edilmektedir (18).

2.3.1.2. Sinoviyal Sıvı Analizi

Sinoviyal sıvı romatolojide kapsamlı bir şekilde araştırılmasına rağmen sinoviyal sıvı ile ilgili kısıtlı sayıda var olan adli çalışmalarda, sıvının postmortem kimyasal analizi yapılarak postmortem inceleme aracı olarak kullanılabilirliği ortaya konmaktadır. Sinoviyal sıvı potasyum konsantrasyonundaki zaman içindeki değişiklikler vitröz hüümördekine yakındır. Sinoviyal sıvı analizi, vitröz hüümörün elde edilemediği durumlarda alternatif bir yöntem olarak önemli olabilir (28, 29).

2.3.1.3. Mide İçeriği Analizi

Ölüm zamanını belirlemeye yönelik bir diğer yöntem, yemek yeme ile ölüm arasındaki zaman aralığını belirleyip, ölen kişinin son olarak ne zaman yemek yediğini bulmaktır (3, 8). Yapılan çalışmalarda, öğünlerin boyutuna göre sindirim süreleri belirlenmiştir. Küçük hacimli yemekler 1-3 saatte, orta büyüklükteki yemekler 3-5 saatte, büyük yemekler ise 5-8 saatte sindirilir (30). Mide boşalması yemeğin büyüklüğüne ve içeriğine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (31).

Mide boşalması, son yıllarda radyoloji, tüp aspirasyonu, radyoizotoplar, ultrasonografi, oral yoldan verilen çözünen maddelerin emilim kinetiği ve ferromanyetik izler dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak incelenmektedir (18).

2.3.2. Entomolojik Yöntemler

Adli entomoloji, ceset üzerinde bulunan artropodların incelenmesine dayanır (32). Artropodlar cesede yerleştikleri andan itibaren zamanla belirli bir başkalaşım aşamasına geçerler. Bu gelişim süreci, böcek türünün özelliklerine ve çevresel faktörlere bağlı olarak farklı hızlarda gerçekleşebilir. Cesetteki çürüme süreci ilerledikçe, organik materyal bir dizi değişim geçirir ve farklı türlerin adapte olabileceği yaşam alanları sunar. Çürüme sürecine böceklerin hangi sırayla tepki verdiğini anlamak ve bu türleri belirli çürüme aşamalarıyla ilişkilendirerek PMI tayini amacıyla çeşitli ülkelerde birçok süksesyon çalışması gerçekleştirilmektedir (33-38) Yapılan çalışmalarda hayvan cesetleri doğaya bırakılarak farklı çürüme aşamalarındaki böceklerin gelişimi incelenmektedir. Ancak, bu çalışmaların her biri dünyanın farklı bölgelerinde gerçekleştirildiği için elde edilen verilerin doğrudan karşılaştırılması zordur. Bu nedenle, yerel böcek faunasını anlamak için bölgesel süksesyon çalışmaları yapılması ve gerçek vakalardaki böceklerin incelenmesi önerilir.

Ceset üzerinde ekolojik açıdan dört farklı böcek topluluğu bulunur. İlk grup, PMI tayinine direkt katkısı bulunan ölü hayvan ve insan cesetleri ile beslenen ölü yiyici (Necrophagus) türlerdir. Ölü yiyici gruba ait örnekler; sinekler (Diptera; Calliphoridae (leş sineği), Muscidae (ev sineği), Sarcophagidae (et sineği)), kın kanatlılar (Coleoptera), leş kınkanatlılar (Silphidae) ve kürk ve deri kınkanatlıları (Dermestidae) şeklinde sıralanabilir. İkinci grup ise predatör ve parazitik türlerdir. Bunlar; belirli kanatlılar (Coleoptera), leş kınkanatlılar (Silphidae) ve bazı sinekler (Diptera)'dir. Bu türler cesede yerleşmiş diğer böceklerle beslenirler. Üçüncü

kategoriye giren böcekler ise omnivor (herbivor ve carnivor) türlerdir. Yaban arıları, karıncalar ve bazı kınkanatlılar bu grup içinde yer alırlar. Cesede ait maddeleri ya da diğer böcekleri tüketebilirler. Son olarak, dördüncü grup, cesedi doğal yaşam alanlarının bir parçası olarak kullanan böceklerden oluşur. Bu grup, örümcekler, kelebekler, kuyruklu sıçrayanlar (Collembola) ve benzeri diğer türleri içerir ve bu türler tesadüfi bir şekilde cesede yerleşen canlılar olarak kabul edilir (39).

Şişe sinekleri (Calliphoridae) cesede ilk gelen türler arasındadır, bu nedenle PMI tayininde önemli bir rol oynarlar (7). Çürüten organik materyal, hem sineklerin kendileri için bir protein kaynağı hem de yumurtalarını bırakabilecekleri bir üreme alanıdır (40). Gelişimleri dört evreden oluşur. Bunlar; yumurta evresi, larva evresi (üç aşama içerir), pupa evresi ve yetişkin evredir (41). Larva evresi içerisindeki üç aşamadan ilkinde, yeni yumurtadan çıkan larva sadece nemli dokularla beslenebilmektedir. Bu nedenle şişe sinekleri, yumurtalarını cesedin doğal açıklıklarına (gözler, burun delikleri, ağız, anüs) veya açık yaralara bırakır. Larva her aşamada bir sonraki gelişim evresine geçebilmek için deri değişimi geçirir. Üçüncü aşamadaki larvalar, pupalaşmak için uygun bir yer aramaya başlar (42). Daha sonra, pupa aşaması başlar ve yetişkin sinek, pupa kılıfı içinde gelişimini tamamlar (43). Pupa aşaması, sineğin tüm gelişim sürecinin yaklaşık yarısını kapsar. Son aşamada, yetişkin sinek kabuğundan çıkar ve yaşam döngüsü tamamlanmış olur.

İncelenecek böceklerin toplanması ve bu süreçte izlenecek adımlar son derece önemlidir. Ceset üzerinden en az üç farklı bölgeden örnekler alınmalı ve her

bir bölgeden toplanan örnekleri koymak için üç ayrı kap hazırlanmalıdır. Her kabın üzerine örneğin alındığı tarih, saat, toplama bölgesi, toplayan kişinin baş harfleri ve cesedin bulunduğu konum yazılmalıdır (7). Farklı boyutlarda ve farklı gelişim aşamalarında örneklerin toplanması gerekmektedir. En büyük ve dolayısıyla en yaşlı larvalar, en önemli örneklerdir (39). Üçüncü aşamaya giren larvalar pupalaşmak için cesetten uzaklaşma eğilimindedir. Bu nedenle açık havada bulunan cesetlerde olay yerinde ceset etrafındaki 2-10 metre çapındaki toprak alan araştırılmalıdır (44). Larvalar toplandıktan sonra, 10-15 saniye boyunca kaynama noktasına yakın suya batırılarak öldürülürler. Ardından %80 alkol çözeltisine konulurlar (45).

Adli vakalarda entomolojik incelemelerin en kritik aşaması, ceset ve çevresinde toplanan böcek türlerinin doğru bir şekilde tanımlanmasıdır. Tür tanımlaması, PMI tayininin yapılabilmesi için temel bir rol oynar. Şişe sineklerinin tanımlanması için yaygın olarak başvurulmuş kaynaklardan biri, "Blowflies (Diptera, Calliphoridae)" adlı eserdir (46). Ayrıca "A Manual of Forensic Entomology" adlı kitap da önemli bir kaynaktır (47). Bu eser, çürüyen dokularla ilişkili ergin böcekler ve larvalar için bir tanımlama rehberi sunmaktadır. Böceklerin morfolojik olarak tanımlanmaları, larva aşamalarına kıyasla daha kolaydır. Ancak, bazen böcekler zarar görmüş olabilir ve morfolojik tanımlama yapılamayabilir. Bu durumda, moleküler tanımlama yöntemleri kullanılır. Doğru tür tanımlamasını sağlamak için, adli entomoloji alanında çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmektedir (48). Özellikle mitokondriyal DNA (mtDNA) analizi ve sitokrom oksidaz I (COI) geni

dizilimi, Calliphoridae alt familyaları arasında tür ayrımı yapmak için oldukça faydalı bir araçtır (49).

Ceset üzerindeki larvaların yaşları hesaplanarak böceklerin cesette ne kadar süredir yerleşik bulunduğu belirlenebilir. Ancak tam bir PMI tayini yapmak için böceğin ölümden ne kadar süre sonra cesede yerleştiği de bulunmalıdır. Ayrıca, böceklerin cesede yerleşmesi kişi hala hayattayken de gerçekleşmiş olabilir. Böcekler yumurtlarını açık yara ve ülserlere bırakabilir ve bu bölgede larvalar oluşabilir. Larvaların canlı insanlar üzerinde beslenmesi myiasise yol açmaktadır (50). Buna karşılık, bir cesedin PMI'sı uzun olmasına rağmen, böcek larvaları henüz birkaç günlük olabilir. Böyle bir durumda cesedin böceklerin erişemeyeceği bir ortamda saklanmış ve yalnızca birkaç gün önce bulunduğu ortama bırakılmış olduğu düşünülecektir. (39) Bu tarz durumlarda yalnızca böcek kanıtlarına dayanarak cesedin ölüm zamanı hakkında kesin bir bilgi vermek mümkün değildir (16).

PMI tayininde, toplanan ve yetiştirilen böcek örnekleri temel alınarak postmortem geçen en az ve en çok süre belirlenmektedir. En az süre gelişen larvanın yaşı ve olay yeri civarındaki koşullar altında büyümek ve erişkinliğe ulaşmak için ihtiyaç duyulan zaman ile tayin edilir. En fazla sürenin tayini zordur çünkü zaman geçtikçe ve çürüme devam ettikçe belirsizlik büyür (39).

Larva yaşının hesaplanmasında en önemli faktörlerden biri sıcaklıktır. Her türün sıcaklık bağımlı büyüme hızı farklıdır. Böcekler soğukkanlı (poikilotermik) organizmalardır, yani vücut sıcaklıkları çevresel sıcaklık koşullarına bağlı olarak

değişkenlik gösterir. Soğukkanlı hayvanların metabolik hızları, kimyasal reaksiyon kinetiğine benzer bir sıcaklık bağımlılığı gösterir. Sıcaklık her 10°C arttığında, kimyasal reaksiyon hızı yaklaşık iki katına çıkar (51). Böceklerin gelişimi, belirli bir sıcaklık aralığında en optimal hızda gerçekleşir. Bu sıcaklık sınırlarının dışında, gelişim süreci tamamen durur (7). Ayrıca, larvaların geliştiği ortamın sıcaklık geçmişi de dikkate alınmalıdır. Bu amaçla; ölümün gerçekleştiği bölge birkaç gün boyunca izlenerek sıcaklık verileri toplanır ve bu veriler, en yakın hava durumu istasyonundan sağlanan bilgilerle karşılaştırılır. Regresyon analizi yöntemi kullanılarak, hava durumu istasyonundaki ölçümler temel alınarak cesedin çevresindeki sıcaklık tahmin edilir (7).

Adli entomoloji alanındaki çalışmalar sonucunda elde edilen entomolojik veriler dikkate alınarak, PMI tayini için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

1. İzomorfen/İzomegalen Diyagramı

Bu diyagramda, larva uzunluğu veya gelişim aşaması, zaman ve ortalama çevre sıcaklığına göre birleştirilir (52). Ancak, bu yöntem yalnızca cesedin sıcaklık değişimlerine maruz kalmadığı durumlarda güvenilir kabul edilir. Örneğin, kapalı bir ortamda sıcaklık büyük ölçüde sabit olduğu için daha doğru tahminler yapılabilir. Ancak, adli açıdan önemli tüm böcek türleri için izomorfen ve izomegalen diyagramı bulunmamaktadır.

2. Accumulated degree days (ADD) veya Accumulated degree hours (ADH)

Yöntemi

ADH, larva gelişimi için gerekli 'enerji saatleri'ni temsil eder. ADD, gelişimin türüne özgü sıcaklık aralığında doğrusal olarak ilerlediği varsayımına dayanır (32).

ADH hesaplama formülü: $ADH = (T - \theta_0) \times t$

Bu veriler sayesinde gerçek bir vakada larva yaşını hesaplamak mümkündür. Ancak, bu yöntemin doğrusal olmayan sıcaklık aralıklarında geçerli olmadığı unutulmamalıdır.

Ancak, bu yöntemleri uygularken hataya neden olan faktörler göz önünde bulundurularak istatistiksel hata payını hesaplamak son derece önemlidir. Bu tür hesaplamalar mahkemelerde kullanılacak bilimsel delillerin doğruluğunu artırmaya yardımcı olabilmektedir.

2.3.3. Mikrobiyolojik Yöntemler

Mikroorganizmalar, çevremizde ve hemen hemen her tür yaşam alanında bulunan, insanlar ve diğer hayvanları konak olarak kullanıp yaşam sürebilen basit, tek hücreli canlılardır. Bu mikroorganizmalar, konak organizmanın içinde bulunan ve konak organizma öldüğünde hızla değişen karmaşık topluluklar oluşturur; bu topluluklar, çürüyen hayvan cesetlerinde epinekrotik mikrobiyal topluluklar olarak adlandırılır (53). Hızla değişen bu epinekrotik topluluklar, PMI tayinine yardımcı olacak bir "mikrobiyal saat" oluşturmak için kullanılmaktadırlar (54).

İnsan vücuduyla ilişkili olan mikrobiyal organizmalar, insan mikrobiyomu olarak da adlandırılır ve bu organizmalar prokaryotik, ökaryotik ve viral türlerden

oluşur. Bu ekolojik sistem içerisinde, bakterilerin vücuttaki insan hücrelerinden 10 kat daha fazla sayıda olduğu varsayılmaktadır (55-57)

İnsan epinekrotik mikrobiyomunun, PMI tayini için kullanılma potansiyeline sahip olduğu birçok deney ve çalışma ile gösterilmektedir (58).

Postmortem, hücresel otoliz ile başlayan bozunma süreci, mikroorganizmaların neden olduğu çürümeyle devam eder (59). Bozunma ilerledikçe, özellikle bağırsaklarda bulunan anaerobik bakteriler çeşitli gazlar üretir ve batin şişmeye başlar. Vücut sıvılarının boşalmasının ardından, besinler ve mikroorganizmalar cesedin altındaki toprağa salınarak toprak bileşimini değiştirir (54, 60).

Çürümenin başlangıcında, cesetteki oksijeni tüketen aerobik bakteriler çoğalır (61). Çürüme ilerledikçe endojen, enterik bakteriler devreye girer ve gaz halinde hidrokarbonlar üreterek cesedin şişmesine ve derinin yırtılmasına yol açarlar (62). Çürüme, gastrointestinal sistemden gelen endojen bakteriler ve kan ve lenf sistemleri aracılığıyla vücudun bazı bölgelerine yayılan diğer mikroorganizmalar tarafından ilerletilir (63). Karın boşluğunun oksijene maruz kalması, Alphaproteobacteria, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae ve Brucellaceae ailelerindeki Rhizobiales ve özellikle Enterobacteriaceae ailesinden fakültatif anaerobik Gammaproteobacteria dahil olmak üzere birkaç aerobik taksonun büyümesine izin verir (54). Aerobik mantarlar, cesetlerin ayrışma süreciyle ilişkilendirilerek incelenmektedir. Ancak araştırmacılar, mantar

büyümesinin cesedin ayrışma sürecindeki rolü ya da PMI tayini için kullanılmaları hakkında net bir yaklaşım geliştirememektedir (64).

Son yirmi yılda yeni nesil dizileme teknolojisinin kullanılmasından önce, mikrobiyologlar çevrenin mikrobiyal çeşitliliğini incelemek için birden fazla moleküler teknik kullanmışlardır. Bu biyometrik profillemeye yaklaşımları, çeşitli kemotaksonomik veya kültüre dayalı genotipleme teknikleri zemininde polimorfizmi, DNA uzunluğunu, yağ asidi analizini ve denatürasyon tekniklerini içermektedir. Bu teknikler, doğadaki mikrobiyal toplulukların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlasa da, maliyetli olmaları, zaman alıcı olmaları ve kültürlenemeyen mikroorganizmaları tanımlamakta kullanılamamaları gibi zorluklar barındırmaktadır (65). Ancak son zamanlarda, yeni nesil metagenomik dizileme, İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) ve Dünya Mikrobiyom Projesi'nin (EMP) geniş ölçekli çabaları sayesinde, bilim insanları mikroorganizmaların gerçek çeşitliliği hakkında daha iyi bir taksonomik anlayış elde etme fırsatına sahiptir. (55, 66).

Dünya Mikrobiyom Projesi (EMP)'nin amacı, metagenomik, metatranskriptomik ve amplikon dizilimi kullanarak dünya genelindeki mikrobiyal örnekleri karakterize ederek küresel bir gen atlası üretmektir (67).

Topraktaki mikrobiyal toplulukları analiz etmek için yüksek miktarda ve kaliteli genomik DNA elde edilmelidir. Ancak, topraktaki bakterilerin büyük çoğunluğu yetiştirilemez (68). Bu nedenle, toprak gibi karmaşık adli örneklerden yüksek kaliteli metagenomik DNA çıkarmak için moleküler genetik yöntemler

kullanılmaktadır. Toprak örnekleri için DNA ekstraksiyon protokolleri alanındaki ileri araştırmalar, ticari olarak temin edilebilen, sağlam ve tekrarlanabilir kitlerin ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bu kitlerin başarısı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi, mikrodizi ve yeni nesil dizileme gibi işlemler için uygun genomik DNA ekstraksiyonunu etkin bir şekilde sağlamalarına dayanır (65).

Toprak örnekleri binlerce farklı tür içerir ve çok çeşitli mikrobiyal topluluklar oluştururlar. Bir vücut ayrıştıkça, insan mikropları "ceset ayrışma adası"na (CDI) eklenmek üzere alttaki mezar toprağının mikrobiyal topluluğuna dahil olur (69). Ceset ayrışma adaları, çürüten bir cesedin altında ve etrafındaki toprak bölgesidir. Yapılan çalışmalar, ceset ayrışma adası toprak habitatlarındaki filogenetik olarak yakın ilişkili bakterileri inceleyerek bu bakterilerin 16S rRNA gen dizilerinin %0,3 ile %2,7 arasında bir farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır (70).

Metcalf ve arkadaşları, 48 gün boyunca çürüten farelerdeki bakterileri ve diğer mikroorganizmaları (nematodlar ve mantarlar gibi) ve bunların altında bulunan topraktan alınan mikroorganizmaları incelemek için yüksek verimli dizileme yöntemlerini kullanmışlardır. Değişiklikler önemliydi ve cesetler arasında tutarlıydı; cesetlerdeki mikrobiyal topluluklar, topraktakileri etkilemişti, bunun tersi de geçerliydi. Metcalf ve arkadaşları, bu ölçümlerin PMI'yı yaklaşık 3 gün içinde tayin etmek için kullanılabileceğini ifade etmektedir, bu da çalışmalarının adli bilimlerde uygulama alanı bulabileceğini düşündürmektedir (54).

Günümüzde filogenetik değerlendirme için en yaygın kullanılan yöntem, mikroorganizmalardaki housekeeping genlerin genetik belirteçlerinin kullanılmasıdır. Hakim olan yaklaşım, ribotiplerin operasyonel taksonomik birimlerinin (OTU) toplam sayısının karakterize edilmesidir; bu birimler genellikle 16S (prokaryotik) veya 18S (ökaryotik) rRNA genlerine dayanır (71). Prokaryotik 16S genleri, mikrobiyal çeşitliliğin moleküler karakterizasyonu için "altın standart" olarak kabul edilmektedir (72). NCBI GenBank veritabanında, 16S rRNA geninin en çok temsil edilen gen olduğu bildirilmektedir (73). Filogenetik çalışmalar için 16S rRNA geninin dizilenmesi tercih edilmektedir, çünkü bu gen, çoğu prokaryotta bulunmakla birlikte evrimsel süreçte işlevi büyük ölçüde korunmaktadır. Bakteriyel 16S rRNA genleri, bakteri türleri arasında önemli dizi çeşitliliği gösteren V1–V9 olmak üzere dokuz hiperdeğişken bölge içerir. Belirli bir hiperdeğişken bölgedeki türlere özgü diziler, tanı testleri ve diğer bilimsel araştırmalar için yararlı hedefler oluşturur (74).

Mikrobiyom analizi, postmortem iç organları (75), vücut sıvılarını (76), ölü bedenin açıklıklarını (thanatomikrobiyom) ve ceset yüzeyindeki mikroorganizmaları (epinekrotik mikrobiyota toplulukları) inceleyerek yapılır (77).

İnsan mikrobiyomu analizinin avantajları, mikroorganizmaların her mevsimde ve en ekstrem ortamlar dahil her tür habitatta bulunmasıdır (78). Mikrobiyal topluluklar çevresel değişikliklere öngörülebilir bir şekilde yanıt verdiğinden, bakteri topluluğunun zamanla nasıl değiştiği belirlenebilir ve böylece PMI tayini yapılabilir (79). Mikrobiyal topluluklar, postmortem çevresel

koşullardaki değişiklikler ve vücut içinde besin bulunabilirliği, oksijen ve nem seviyeleri gibi faktörler nedeniyle zaman içinde dinamik ve ardışık olarak değişir.

Ayrıca, bu mikrobiyom değişiklikleri anatomik bölgeye göre farklılık gösterir (58). Vücudun çeşitli anatomik bölgelerinden ve cesedin altındaki topraktan alınan mikrobiyomun PMI tayini için kullanılma potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (58). Örneğin, bağırsaktaki Clostridium, Bacteroides ve Lactobacillus en ilginç görünenlerdir çünkü bunların miktarı artan PMI ile öngörülebilir şekilde değişmektedir (79). Ancak oral mikrobiyomda, cesetlerin başlangıçtaki farklı koşullarına bakılmaksızın, PMI arttıkça aynı ardışık değişiklikler gözlemlenir ve Bacillota filumuna ait bakterilerin daha fazla bulunduğu oral mikrobiyotadan, Pseudomonadota filumuna ait bakterilerin daha fazla bulunduğu bağırsak ve toprak mikrobiyotasına doğru bir geçiş yaşanır (80).

Adserias-Garriga ve arkadaşları tarafından önerildiği gibi aerobik metabolizma taze aşamada bakteriyel kolonizasyonu ve dolayısıyla bakteriyel çeşitliliği güçlü bir şekilde belirler. Sonrasında, oksijenin tükenmesi ve şişkinlik aşamasının başlaması ile anaerobik bakteriler öncü rol üstlenir. Oral ve bağırsak mikrobiyotasında, şişkinlik aşamasına geçişle birlikte, çevresel değişikliklere bağlı biyolojik rekabet nedeniyle bakteri topluluklarında dramatik bir değişim tetikleniyor gibi görünmektedir. Çürüme aşamalarının ilerlemesi ve oksijen mevcudiyetinin azalması, gözlemlenen ardışık değişiklikleri yönlendirmektedir (81).

Cesedin iç organlarını analiz ederken de benzer sonuçlara ulaşılmaktadır. Postmortem mikrobiyal çoğalma, besin açısından zengin ortamlar sayesinde kolaylaşır ve Clostridiales takımı iç organlar ve kanda PMI'nın iyi bir öngörücüsü olarak belirlenmektedir (75).

Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, PMI'yı tayin etmede en yüksek doğruluk, beş anatomik bölgenin (kulaklar, gözler, burun, ağız ve rektum) tamamı kullanıldığında elde edilmektedir. Bu nedenle, farklı anatomik bölgelerden alınan mikrobiyal topluluk analizlerinin daha iyi sonuçlar vermesi beklenmektedir (82).

Bazı çalışmalar PMI tayininde bakterilerin yanı sıra ökaryot organizmaları da araştırmaktadır. Sonuçlar prokaryot organizmaların analizinin PMI'yı tayin etmede daha değerli olduğunu göstermektedir (58).

Mikrobiyal topluluktaki değişikliklerin incelenmesi, ölüm sonrası mikrobiyal saati belirlemek ve PMI'yı doğrulamak için kullanılabilir. Ayrıca, mezar toprağındaki mikroorganizmaların profilini PMI ve ölüm sonrası mikrobiyal saatle ilişkilendirmek için doğrusal bir ilişki kurulabilirse, adli tıp alanında önemli kazanımlar elde edilecektir. (65).

Son zamanlarda, bakteriler ve diğer mikroorganizmaların DNA'sının kapsamlı bir şekilde analiz edilerek, ölüm sonrası mikrobiyota değişikliklerinin detaylı bir şekilde incelenmesine yönelik yapılan çalışmalar umut verici sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu mikrobiyota temelli yöntem, PMI'yı tayin etmek için güçlü bir araç gibi görünmektedir (16).

2.3.4. Genetik Yöntemler

Moleküler biyoloji ve analitik tekniklerdeki ilerlemeler, biyolojik belirteçlerin (DNA, RNA, proteinler) bozunma örüntülerini analiz edip PMI tayinine katkı sağlayarak biyoloji, genetik, patoloji ve klinik tıpta önemli gelişmeler yaşanmasına olanak tanımaktadır (83).

2.3.4.1. DNA Degradasyonunun Kullanımı

Sir Alec Jeffreys'in 1985 yılında DNA analizinin adli amaçlarla potansiyel kullanımını ilk kez göstermesinin (84) ardından DNA analizi adli bilimlerde devrim niteliğinde bir değişim oluşturmuştur. Zaman içinde adli biyoloji alanındaki tekniklerin ilerlemesiyle birlikte, DNA'nın postmortem degradasyon sürecinde PMI tayini için kullanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla çeşitli yöntemler geliştirildi. Perry ve arkadaşları insan kostasındaki DNA degradasyon hızını kullanarak PMI'yı belirlemenin uygulanabilirliğini araştırdıkları çalışmalarında, farklı bireylerden alınan örneklerdeki DNA'nın degradasyon hızının oldukça benzer olduğunu, DNA degradasyonunun bireyler arasındaki farklılıklardan çok ısı ve nemden etkilendiğini gözlemlemişlerdir (85).

O zamandan sonra, DNA miktarındaki azalma oranını analiz ederek PMI'yı tayin etmek amacıyla Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) (86), DNA akış sitometrisi analizi (87), IAT (Görüntü Analizi Tekniği) (88), SCGE (Tek Hücreli Jel Elektroforezi) (89, 90), real time kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) analizi (91) ve DNA analizine dayalı diğer teknikler kullanılarak birçok çalışma yapıldı (92, 93).

Ancak, elde edilen umut verici sonuçlara rağmen, akış sitometrisi, IAT ve SCGE yöntemlerinin düşük spesifitesi olduğu saptandı çünkü bu yöntemler, sağlam insan DNA'sını (hedef dizi DNA'sı) ve hedef olmayan DNA'yı (bakteriyel veya fungal DNA) ayırt edememektedir. Bu nedenle, bu yöntemler sınırlı bir değere sahip olup, genel bir kabul görmemektedir (94).

Son birkaç yıl içinde, RT-qPCR tabanlı yöntemlerin ve kapiller elektroforezin önceki yöntemlere göre daha hassas ve spesifik oldukları kanıtlanmıştır (94).

Her organın DNA stabilitesi farklı olup, en yüksek stabilite beyinde, ardından kaslarda, böbreklerde ve en düşük karaciğerde bulunmaktadır (91). Genel olarak, karaciğer dokuları, postmortem çalışmalar için en çok kullanılan DNA kaynağı iken, bunu sırasıyla dalak ve beyin dokuları takip etmektedir (94). Bu çeşitlilik, dokuların antemortem ribonükleaz aktivitesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Ribonükleaz açısından fakir olan dokular, örneğin beyin ve retina, ribonükleaz açısından zengin olan dokulara örneğin karaciğer ve dalak kıyasla daha yüksek nükleik asit stabilitesine sahiptirler (95).

DNA degradasyon hızını etkileyen faktörler incelendiğinde; ölüm nedeni, cinsiyet, yaş ve ölüm öncesi sağlık durumu gibi faktörlerin DNA degradasyonuna önemli bir katkı sağlamadığı gösterilmiştir (94). Sıcaklık, nem, suya batma veya toprağa gömülme gibi faktörler, DNA degradasyonunu farklı oranlarda etkilemektedir (96). Çevresel faktörler arasında en belirleyici olanı sıcaklıktır (91). Bu nedenle, sıcaklığın etkilerini daha doğru bir şekilde değerlendirmek amacıyla,

ölüm sonrası takvim günleri yerine ADD ile korelasyonları dikkate alınarak araştırmalar yapılmaktadır (97).

DNA degradasyonunu analiz etmek için yapılan çalışmalar, genellikle hayvan modelleri ve belirli dokular (dalak, kalp, beyin) üzerinde yoğunlaşmaktadır (94).

Uzun PMI sürelerinde, cesetlerden elde edilen DNA, bakteriler ve mantarlarca üretilen DNA ile kontamine olmaktadır. Bu sebeple, insan spesifik DNA dizilerini hedef alan bir tespit yöntemi kullanmak büyük önem taşımaktadır (94).

2.3.4.2. RNA Degradasyonunun Kullanımı

RNA'nın PMI tayininde kullanılmasıyla ilgili araştırmalar, DNA'nın kullanımından on yıl sonra başlamıştır (16). Yirmi birinci yüzyıla kadar, RNA degradasyonu ile PMI tayinine yönelik çok az çalışma yayınlanmıştır çünkü RNA'yı izole etmek ve elektroforezle değerlendirmek zordur (98). Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ve 2002 yılında Inoue ve arkadaşlarının ölü ratlardan alınan örneklerdeki RNA seviyelerinin analizi için RT-qPCR'nin güvenilirliğini gösteren çalışmaları sayesinde, PMI tayini için postmortem RNA degradasyonu yeni bir gösterge olarak ortaya çıkmıştır (99).

RNA degradasyonu, postmortem erken dönemde endojen RNazlar tarafından tetiklenir. Bakteriyel RNazlar ise PMI'nın ilerleyen aşamalarında devreye girer. Endojen RNaz aktivitesi organlar arasında farklılık gösterir ve bu da her organın postmortem RNA stabilitesini belirler. Bu nedenle, RNA

degradasyonuna dayalı PMI tayini için hedef organ seçimi kritik bir öneme sahiptir (16).

Yapılan çalışmalar, RNA'nın postmortem dönemde beyinde en stabil, karaciğerde en kararsız olduğunu göstermektedir (100). Diş pulpası, diğer organlara göre çok daha yüksek RNA stabilitesine sahip olup, geç PMI tayini için kullanılabilir kabul edilmektedir (101).

Bir cesette RNA degradasyonunu etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bauer'in bu konudaki çalışmaları RNA'nın postmortem stabilitesinin, doku türüne, çevre sıcaklığına ve agonal faktörlere göre değiştiğini göstermektedir (102). Vennemann ve Koppelkamm'ın çalışmaları ise, mRNA degradasyonunun postmortem dönemde çevresel faktörlerden (güneş ışığı, nem, yüksek sıcaklık) ve ölüm öncesi parametrelerden (cinsiyet, ölüm yaşı, ilaçlar, terminal koma, hipoksi, ateş ve dehidratasyon) etkilenebileceğini göstermektedir (103).

PMI tayininde hedef RNA için mRNA, rRNA, circRNA, snRNA, srRNA ve miRNA gibi çok sayıda RNA türü test edilmektedir (16).

RNA degradasyonuna dayalı PMI tayininde veri standardizasyonu için en iyi yöntem, endojen referans genlerin analizidir; özellikle çeşitli mRNA belirteçleri (GAPDH, β -aktin, RPS-29 ve IL-1 β dahil) biyokimyasal araştırmalarda endojen kontrol için uygun belirteçler olarak kabul edilir (104). Vennemann ve Koppelkamm, başka bir çalışmada ölüm sonrası insan doku örneklerinin (kalp, iskelet kası ve beyin dokusu) gen ifadesi çalışmalarında endojen kontrol gen olarak uygun buldukları on farklı gen transkriptini incelemişlerdir (105). HMBS, UBC,

SDHA ve CYCA gibi genler için nispeten yüksek transkript kararlılığının çeşitli parametrelere bağlı olduğunu ve β -aktin veya 18S rRNA gibi yaygın olarak kullanılan kontrol genlerinin postmortem örneklerde daha az kararlı olduğunu ve bu nedenle normalizasyon için uygulanamaz hale geldiğini bulmuşlardır (105). Aksine, Zhang ve arkadaşları U6, GAPDH ve 18S rRNA'nın kendi örnek setlerinde uygun belirteçler olduğunu, B2M ve β -aktinin yalnızca kalp dokusunda güvenilir iç kontroller olduğunu ve miRNA'ların endojen kontrol genleri için seçilmemesi gerektiğini belirtmişlerdir (106). Ancak, rutin kullanımlarına rağmen, bu belirteçler zamanla, özellikle yüksek ısılar gibi istikrarsız çevre koşullarında bozuldukları için PMI göstergesi olarak etkinliklerinin bir kısmını kaybederler (107).

Daha sonra yapılan çalışmalar, diğer endojen ve daha stabil RNA türlerini (mikroRNA, snRNA ve circRNA) ve birden fazla RNA belirteci kullanma prensibini benimsemektedir (98).

Ancak mevcut biyobelirteçler insanlarda PMI tayini için tüm gereklilikleri karşılamada hala yetersizdir ve PMI tayini için daha hassas biyobelirteçlere ihtiyaç vardır (98).

2.3.4.3. Sirkadiyen Ritim Kullanımı

Kronobiyoloji, biyolojik zamanı inceleyen geniş bir araştırma alanıdır ve bu alan, yüksek frekanslı döngüler (gün içinde farklı zaman dilimlerinde gerçekleşen hormon salgıları), günlük döngüler (aktivite ve dinlenme döngüleri) ve aylık ya da yıllık döngüler (bazı türlerdeki üreme döngüleri) gibi çeşitli zamanları kapsamaktadır (108). Bu kronobiyoloji alanları arasında, sirkadiyen ritim günlük

döngüleri ifade etmektedir. Sirkadiyen ritim, bakterilerden bitkilere ve insanlara kadar çeşitli canlı türlerinde gözlemlenen temel bir biyolojik fenomendir (109). "Sirkadiyen" terimi, "yaklaşık bir gün" anlamına gelen Latince "circa diem" ifadesinden türemiştir (110). Sirkadiyen saatlerin keşfi, Fransız astronom Jean Jacques Ortois de Malran'ın güneş ışığı yokluğunda mimoza bitkilerinin yapraklarını günlük olarak açıp kapatmaya devam ettiğini gözlemlediği 1729 yılına dayanır (111).

İnsanlar da diğer canlılar gibi fizyolojik süreçlerinde (vücut ısısı, kan basıncı ve hormon salgıları gibi) ve davranışlarında (yeme ve uyuma gibi) belirgin bir sirkadiyen ritim sergilerler. Bu ritmi düzenleyen moleküler mekanizma, vücuttaki her hücrede bulunan ve "sirkadiyen saat" ya da "hücrel saat" olarak adlandırılan bir sistem tarafından kontrol edilir (16).

Memelilerde sirkadiyen saat, hipotalamusta bulunan SCN'ler tarafından, göz aracılığıyla alınan ışık uyarılarıyla kalibre edilir (112). Ana saat, vücutta yer alan periferik hücrel saatlerin işleyişini düzenler. Bu periferik saatler her organ için özelleşmektedir (113).

Sirkadiyen saati düzenleyen moleküler mekanizmaların incelenmesi, davranışsal döngüleri bozulmuş *Drosophila* mutantları üzerinde yapılan araştırmalarla başlamıştır (114). Bu çalışmalarda, biyolojik saatin düzenlenmesinde rol oynayan bir gen grubu olan periyod geni ilk kez keşfedilmiştir. BMAL1, Clock, CK1 ϵ , mPer ve mCry farelerde tanımlanan sirkadiyen saat genleridir (110). Memelilerde sirkadiyen fizyoloji ve davranış onlarca yıldır incelenmiş olmasına

rağmen, ilk sirkadiyen genler (Clock, Per1 ve Per2) yakın tarihlerde keşfedilmiş ve sonrasında memeliler üzerinde yapılan araştırmalarla birçok farklı sirkadiyen saat geni daha keşfedilmiştir (110, 115).

Sirkadiyen saati kontrol eden birçok genin ifade seviyeleri gün içinde dalgalanma göstermektedir. Örneğin, bu kontrolün ana bileşenlerinden ARNTL ya da BMAL1 olarak da bilinen genin ifade seviyesi, insanlarda sabah 06:00'da en düşük, akşam 06:00'da ise en yüksektir. Buna karşın, ARNTL transkripsiyonunu baskılayan NR1D1 ya da REV-ERB alfa olarak bilinen nükleer transkripsiyon faktörünün ifade seviyesi, sabah 06:00 civarında en yüksek, akşam 06:00 civarında ise en düşüktür. Bu iki genin ifade seviyeleri, bir saatin ibreleri gibi hareket eder ve ölüm anında bu ifadelerin durduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle, ölüm zamanını tayin etmek amacıyla ARNTL ve NR1D1 genlerinin organlardaki postmortem ifade seviyeleri incelenerek bir tahminde bulunulabilmektedir (116).

Bu genlerin birbirlerine oranları incelendiğinde, NR1D1/BMAL1 oranı sabah saatlerinde meydana gelen ölümlerde daha yüksek iken BMAL1/NR1D1 oranı akşam saatlerinde meydana gelen ölümlerde daha yüksektir (117).

Bugüne kadar, PMI tayini için kullanılan yöntemlerin çoğu ölümden bu yana geçen zamanı tahmin etmekte iken, sirkadiyen ritim kullanılarak yapılan çalışmalarda ölümden bu yana geçen zaman değil ölüm zamanı tahmin edilmekte ve bu yöntem kullanılarak ölümün sabah mı yoksa akşam mı gerçekleştiği belirlenebilmektedir (117).

Sirkadiyen ritim kullanılarak cinsiyet, yaş, ölüm nedeni ve PMI gibi faktörlerden bağımsız olarak sabah ve akşam saatlerinde meydana gelen ölümleri tahmin etmek mümkündür (117).

Ancak istisnai durumlar da dikkate alınmalıdır. Vardiya usulü çalışan kişilerde gen ifadelerinin değiştiği (118), tip 2 diyabetli hastalarda sirkadiyen saat genlerinin ifadesinin zayıfladığı (119), Alzheimer hastalığı olanlarda pineal bezde sirkadiyen saat genlerinin ifadesinin bozulduğu (120) ve majör depresyon bozukluğu olan hastaların beyinlerinde gen ekspresyonunun sirkadiyen deseninin bozulduğu (121) bildirilmektedir. Sirkadiyen saat genlerinin ifadesi bireysel faktörlerden yüksek oranda etkilenebileceğinden, ölen kişinin yaşam tarzı ve kronik hastalıkları dikkate alınmalıdır.

Sirkadiyen ritmin ifadesi yalnızca sirkadiyen saat genlerine bağlı değildir. Sirkadiyen saat genleri tarafından düzenlenen pek çok gen, sirkadiyen döngülere uygun bir şekilde ifade gösterir. Melatonin, bu durumu en iyi açıklayan örneklerden biridir. PMI, ölen kişinin epifiz bezinde, plazmasında ve idrarında bulunan melatonin seviyeleri radioimmunoassay tekniğiyle ölçülerek tahmin edilebilmektedir (122).

Genom genelindeki bütünsel çalışmalar, fare karaciğerindeki birçok mRNA ve miRNA'nın sirkadiyen salınım sergilediğini göstermiştir (123). miRNA'ların, mRNA'lardan daha iyi postmortem stabiliteye sahip olduğu bilinmektedir (124). Bir hedef transkriptin sirkadiyen birikimine katkıda bulunmak için miRNA'nın kendisinin sirkadiyen olması gerekmemektedir (124). Vitröz hüümörde miR-106b

ve miR-96 düzeyleri gündüz ölümlerinde gece ölümlerine göre daha yüksek, kanda ise miR-142-5p ve miR-219 düzeyleri gündüz ölümlerinde gece ölümlerine göre daha yüksek bulunmaktadır (125). Bu sonuçlar miRNA'nın gündüz ve gece arasında farklı şekilde ifade edildiğini doğrulamaktadır.

Sirkadiyen ritme dayalı yöntemler, PMI tayini için kullanılabileceği gibi, diğer PMI tayini yöntemleriyle birleştirilerek spesifik bir ölüm tarihi ve ölüm saatinin tahmin edilebileceği düşünülmektedir.

2.4. Postmortem İnterval Tayininin Adli Tıptaki Önemi

PMI tayini, Adli Tıpta ölüm sonrası geçen zamanın belirlenmesidir. Ölüm zamanını belirlemek medeni hukuk ve ceza hukuku soruşturmaları için önemlidir (126). Ceza soruşturmalarında ölüm zamanını bilmek esastır. Cinayet davalarında ölüm zamanı, araştırmacıların şüphelilerden bazılarını elemesine ve dolayısıyla diğerlerine odaklanmasına yardımcı olarak soruşturma sürecini hızlandırır (126).

Ölüm zamanının doğru tahmini, adli araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen en önemli ve en karmaşık görev olarak kabul edilir (127). Ölüm zamanını doğru belirleyen bir yöntem arzu edilmekle birlikte mevcut yöntemler değişken sonuçlar vermektedir (128).

2.5. miRNA'nın Tanımı

miRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, tek sarmallı, kodlamayan, küçük RNA molekülleridir (129). Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında tanımlanan miRNA'lar, gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel regülasyonunda önemli işlevler üstlendikleri için moleküler biyoloji ve genetik alanında devrim

niteliğinde bir keşif olarak kabul edilmektedir (130). Lee ve arkadaşları *C. elegans*'taki lin-4 adı verilen kısa bir RNA'nın protein kodlamadığını ancak lin-14 mRNA'sına antisens bağlanarak başka bir gen olan lin-14 tarafından kodlanan proteinin ifadesini engellediğini keşfetmiştir (130). Günümüzde lin-4'ün miRNA adı verilen ve çeşitli diğer proteinlerin ifadesini benzer şekilde düzenleyen çok sayıda miRNA'nın ilk örneği olduğu bilinmektedir (131). İlk mikroRNA'nın (lin-4) 1993'te keşfedilmesinden bu yana, insan genomunda yaklaşık 2000 mikroRNA tanımlanmıştır ve genlerin >%60'ını düzenlediği tahmin edilmektedir (132).

miRNA dizi verileri ve hedef tahmini için çevrimiçi bir havuz olan miRBase'de tanımlanan isimlendirme sistemi şu şekildedir; miRNA'lar, miR veya let gibi üç harfli bir kısaltma ve ardından bir sayı (örneğin, miR-1) ile tanımlanır. Eğer bir miRNA birden fazla gen tarafından ifade ediliyorsa, buna karşılık gelen bir sayısal ek eklenir, örneğin miR-1-1 ve miR-1-2 gibi. Homolog miRNA'lar ise ortak bir sayısal ek ve ardından farklı bir harf ile tanımlanır (örneğin, Let-7a, Let-7b, Let-7c, vb.). Bazı durumlarda, aynı stemloop prekürsöründen iki olgun miRNA işlenir, 5' kolundan serbest kalan için 5p ve 3' kolundan serbest kalan için 3p ekleri eklenir (örneğin, miR-199a-5p ve miR-199a-3p) (133).

2.6. miRNA'nın Biyolojik İşlevi

miRNA'lar, genetik materyalin doğrudan kontrolü yerine, gen ekspresyonunu düzenleyerek hücresel fonksiyonları denetler. Bu işlev, miRNA'ların genetik mekanizmalardaki rolünün anlaşılması açısından önemlidir. miRNA'lar, gen ifadesini transkripsiyon sonrası düzeyde negatif olarak düzenleyen

küçük kodlamayan RNA'lardır (129). miRNA'lar, mRNA moleküllerine bağlanarak onların translasyonunu baskılamaya neden olmak için hedef mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesine (3'UTR) bağlanırlar (134).

miRNA'lar embriyogenez, organ gelişimi, çoğalma, hücrel farklılaşma, apoptoz, metabolizma ve homeostaz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde temel rol oynarlar (135). miRNA'ların hem fizyolojik süreçlerde hem de patolojik durumların düzenlenmesinde etkileri bulunmaktadır (136). Birçok araştırma, miRNA'ların onkogenler ve tümör baskılayıcı genler üzerinde önemli etkileri olduğunu ortaya koymuştur, bu da miRNA'ları kanser gibi hastalıkların gelişiminde etkili bir moleküler araç yapar (137).

Ayrıca, miRNA'lar kararlılıkları, invaziv olmayan yöntemlerle kolayca elde edilebilmeleri, hastalıkların erken evrelerinde tespit edilebilmeleri, belli dokulara özgü olmaları gibi özellikleri nedeniyle biyobelirteç olarak kullanılmaya uygundurlar (135).

2.7. miRNA'nın Adli Tıpta Kullanımı

2.7.1. Yara Yaşı Tayini

Adli uygulamalarda yara yaşının saptanması ölüm nedeni ve yaralar arasındaki ilişkinin açıklanması, ölüm orijinin belirlenmesi, antemortem yaralar ile postmortem yaraların ayırt edilmesi, birden fazla yaralanmanın mevcut olduğu durumlarda yaraların sırasının belirlenmesinde büyük faydalar sağlar (138).

Yara yaşı tayininde makroskopik analiz (139), histolojik değerlendirme (140), immünohistokimyasal yöntemler (141), histamin seviyesi (142), PCR ile

inflamatuvar sitokinlerin ve yara iyileşmesi faktörlerinin mRNA seviyelerinin tespiti (138) gibi birçok yöntem kullanılmış olmakla birlikte, tek bir parametrenin yeterli olmadığı, bu parametrelerin birleştirilmesinin hata oranını azaltacağı bilinmektedir (143).

Bu nedenle, son yıllarda yara yaşı tahmininde miRNA'ların kullanımıyla ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Çünkü miRNA'lar inflamasyon ve remodeling gibi yara iyileşme fizyolojisinde çeşitli aşamalarda rol oynamaktadır (144). Yara iyileşme sürecinin düzenlenmesinde belirli miRNA'ların rol oynadığı gösterildikten sonra yapılan çalışmalarda miRNA'lar olası biyobelirteçler olarak kullanılmaktadırlar (145).

Örneğin, miR-130a, miR-132, miR-155, miR-198, miR-21, miR-31 ve miR-378a, miR-155 cilt onarımı sırasında inflamatuvar yanıtı kontrol etmede önemli bir rol üstlenirler; farelerde miR-155'in genetik olarak silinmesi, yaralı dokuda yüksek sayıda makrofaj ve tip-1 kolajen birikiminin artmasıyla ilişkili olarak hızlanmış iyileşmeye yol açar (146). TGF- β ile indüklenebilir miR-132 insan derisinde inflamasyondan proliferatif faza geçiş sırasında gen aktivasyonunu artırmaktadır (147). Buna karşılık, miR-378a remodelling fazını olumsuz yönde etkileyerek, β 3 integrin ve vimentin ekspresyonunu azaltarak fare deri yaralarının iyileşmesini geciktirmektedir (148).

Adli Tıpta yara yaşı tayininde, yaraların etrafındaki deri, iskelet kası ve beyin dokusu en çok incelenen dokulardır (149).

Albino ratlar üzerinde yapılan hayvan çalışmasında, kesi yarası oluşturulduktan sonra, yara kenarlarının artan postmortem süreçle birlikte ilerleyici morfolojik değişiklikler gösterdiği, inflamatuvar fazın hemen sonra ortaya çıktığı, bu dönemden sonra, dejeneratif değişikliklerin başladığı, RT-PCR ile tespit edilen mRNA-205 ve mRNA-21 ifadelerinin, yara oluşumundan 24 saat sonra önemli ölçüde arttığı, ardından artan postmortem süreçle anlamlı olarak düştüğü gösterilmiştir (150).

Yapılan otopsi çalışmasında, asiya bağlı ölüm olgularının telem dokuları üzerinden alınan deri örneklerinde kontrol deri örneklerine göre miR-146a-5p, miR125a-5p, miR125b-5p, miR21 ekspresyonunun arttığı, miR155-5p ve miR146b-5p ekspresyonunun ise azaldığının gösterilmesi, asının canlı ası olup olmadığının değerlendirilmesinde önemlidir (151).

2.7.2. Vücut Sıvılarının Ayrımı

Vücut sıvıları, herhangi bir suçta en sık karşılaşılan kanıt türlerinden biridir ve genellikle bir kişinin kimliğini belirlemek için kullanılırlar. Suç mahallinden elde edilen biyolojik materyalin tespiti, suçun çözülmesinde vazgeçilmez bir araçtır. Belirli bir vücut sıvısının varlığının belirlenmesi ve ardından kan, semen, tükürük, idrar vb. gibi sıvı türünün tanımlanması suçun niteliğini belirlemede faydalıdır (145).

Vücut sıvısı tanımlaması (BFID), kurban ve fail hakkında değerli bilgiler sağladığı için adli soruşturmaların önemli bir aşamasıdır. Bunlar kan, semen, vajinal sıvı, tükürük gibi sıvılar olup, cinayet, cinsel saldırı, hırsızlık gibi suçlarda

sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bu süreç, suçun niteliğinin belirlenmesine, şüphelinin suç mahallinde bulunup bulunmadığının tespitine, olaya karışan kişi sayısının saptanmasına ve bir bireyin kimliğinin belirlenmesine yardımcı olur (152).

Olay yerinden elde edilen vücut sıvılarının tanımlanması için, kimyasal reaksiyon analizleri, enzimatik ve immünolojik analizler, spektroskopik yöntemler ve mikroskopi gibi çok sayıda analitik yöntem geliştirilmiştir ancak bu yöntemler örneklerin tahrip olması, zahmetli olmaları, ayrıca duyarlılık ve özgüllüklerinin kararsız olması gibi kısıtlılıklar içerirler (153).

miRNA, yüksek ekspresyonu, stabilitesi ve dokuya özgü olması nedeniyle vücut sıvılarının tanımlaması için en umut verici biyobelirteçlerdendir (154). Vücut sıvılarının tanımlamasında miRNA kullanımının önemli avantajlarından biri, tek bir numuneden hem miRNA belirteçleri ile vücut sıvılarının tanımlanması hem de buna paralel olarak STR analizi yapılabilmesi ve her ikisinden de başarılı sonuçlar alınmasıdır (155).

Yeni Nesil Dizileme (NGS) kullanılarak vücut sıvılarının mikroRNA desenleri aracılığıyla tanımlanması için güçlü bir teknik geliştirilmiştir. NGS, bir örnekteki yüzlerce miRNA'yı aynı anda analiz etmeyi mümkün kılar ve sıvının kökenine ilişkin ayrıntılı bir genetik parmak izi oluşturur. Bu teknoloji, vücut sıvısı tanımlamasının doğruluğunu ve güvenilirliğini, özellikle daha geleneksel yöntemlerin yetersiz olduğu durumlarda önemli ölçüde iyileştirir (156).

Çok sayıda çalışma, bazı miRNA'ların dokuya özgü bir şekilde ifade edildiğini göstererek bir vücut sıvısına özgü bir veya birden fazla miRNA

tanımlamayı amaçlar. Ancak çoğu miRNA, özgüllük açısından bu gereklilikleri karşılamaz, bu nedenle belirli bir vücut sıvısında daha yüksek yoğunlukta bulunan ancak diğer vücut sıvılarında daha düşük yoğunlukta bulunan miRNA'lar aday olarak seçilir (145).

Vücut sıvılarının tanımlanmasında miRNA kullanımını değerlendirmek için Hanson tarafından 2009 yılında raporlanan ilk araştırmadan günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde; miR-451a'nın kan tanımlaması için güçlü bir aday biyobelirteç olduğu ve kanı diğer vücut sıvılarından ayırt edebildiği, ayrıca miR-144-3p ve miR-16'nın venöz kanı diğer vücut sıvılarından ayırmak için yararlı bulunduğu, miR-214-3p ve miR-412'nin menstruasyon kanında diğer vücut sıvılarına kıyasla daha yüksek ifade seviyeleri gösterdiği için menstruasyon kanı için aday belirteç olarak önerildiği, miR-203a ve miR-205-5p'nin tükürük için aday belirteçler olarak öne çıktığı, miR-891a, miR-10b, miR-888 ve özellikle epididim dokusuna özgü miR-891a'nın semen için spesifik belirteçler olarak doğrulandığı, miR-203a'nın vajinal salgının tanımlanması için önerildiği ifade edilmektedir (145, 157).

2.7.3. PMI Tayini

Bilim insanları geleneksel yöntemlerin sınırlamalarından etkilenmeyen yeni araçlar belirlemeye çalışmaktadırlar (158). PMI'nın doğru tayin edilebilmesi için ölümden sonra zaman içinde sabit bir değişim gösteren bir parametre gerekmektedir (100). Bu tanım, postmortem nükleik asitlerin degradasyonu ile uyumludur (100). Moleküler biyolojideki ilerlemeler, PMI tayininin doğruluğunu artırmak için

protein, DNA ve RNA'daki zaman içindeki değişiklikleri araştırmayı mümkün kılmıştır (159). RT-qPCR, biyomoleküler alanda araç ve tekniklerin geliştirilmesine olanak tanımış ve rRNA, mRNA ve miRNA gibi nükleik asit formlarını incelemeyi sağlamıştır (83). Bu bağlamda, miRNA'lar özellikle kararlılıkları ve belirgin degradasyon paternleri nedeniyle PMI tayini için değerli biyobelirteçler olarak ortaya çıkmaktadır (129).

Ancak, doku örnekleme gibi gerçek RNA konsantrasyonlarını etkileyebilecek ve gen ifadesinde değişikliklere ve ardından yanlış veri yorumlamasına neden olabilecek bazı koşulların olduğu bilinmektedir (160). Bundan dolayı, uygun veri standardizasyonu büyük önem taşımaktadır (161). RNA degradasyonu üzerine araştırma yürütülürken normalizasyon sağlamak için referans genler kullanılmalıdır (161). Referans genler, hedef genlerin dizilerinden farklılık gösteren internal reaksiyon kontrolleridir. Güvenilir bir referans olarak kabul edilebilmek için bir genin karşılaması gereken kriterlerden en önemlisi, deney ortamında stabil kalmasıdır (162). Şu anda, GAPDH ve β -aktin yaygın olarak kullanılmakta ve endojen referans genler olarak önerilmektedir (98). Ancak β -aktin ve GAPDH gibi bazı mRNA'lar veri standardizasyonu için en iyi belirteçler arasında kabul edilseler de, bu genlerin nispeten dar zaman dilimlerinde bozulma eğiliminde olduğu ve bu durumun onların PMI göstergesi olarak güvenilirliğini azalttığı bilinmektedir (163). β -aktin ve GAPDH dışında 18S rRNA, 5S rRNA, U6 snRNA, RPS29, Let-7a da referans genler olarak kullanılmaktadırlar (145).

Bazı miRNA'ların ölümle birlikte ekspresyon seviyeleri düşerken, bazı miRNA'ların ekspresyon seviyeleri ölümden bir süre sonrasına kadar stabil kalır

(164). Bu özellikleri nedeniyle miRNA'lar hem PMI tayininde hem de normalizasyon için internal kontrol belirteçleri olarak kullanılmaktadırlar (158). Özellikle miR-133a, miR-125b ve miR-1, tutarlı degradasyon oranları gösterdikleri ve bu sayede veri normalizasyonu sağlamada uygun oldukları için güvenilir referans genleri olarak tanımlanmaktadırlar (158).

Normalizasyon hatalarını azaltmak amacıyla, geNorm ve Normfinder algoritmaları, her dokuya özgü bir referans gen listesi oluşturur ve PMI tayininin doğruluğunu artırmak için bu referans genler kullanılır (98). PMI boyunca stabil ekspresyona sahip miR-122, miR-133a ve miR-1 kalpte referans genler olarak kullanılmaktadır (159).

Doku türü, çevresel koşullar (yüksek sıcaklıklar) veya çürüme gibi faktörler miRNA'ların stabilitesini etkiler. RNA'nın ölüm sonrası stabilitesi beyin, kalp ve iskelet kası dokusunda yüksekken, ribonükleaz açısından zengin organlar olan pankreas ve karaciğer dokusunda düşüktür (102). MiRNA'ların stabilitesi de analiz edildiği dokuya bağlı olarak değişmektedir, bazı miRNA'lar uzun süreler boyunca ve farklı dokularda stabil kalırken, diğerleri daha hızlı bozulur, bu nedenle hedef dokuya göre doğru miRNA hedefi seçmek gerekmektedir (164). PMI tayininde miRNA kullanan çalışmalarda karaciğer, iskelet kası, kan, kemik, kalp, deri, tükürük, semen, beyin, akciğer, vitröz hümmör, lenf ve böbrek dokuları kullanılmıştır (164). Mevcut literatürde kalp, beyin ve iskelet kası dokularının bu çalışmaları gerçekleştirmek için en iyi dokular olduğu sonucuna varılmıştır (158).

Doku örneklerinin farklı sıcaklıklarda depolanması da ifade seviyesini etkilemektedir. Bu nedenle birçok çalışma ölüm sonrası cesetleri ya da dokuları farklı sıcaklık koşullarında bekleterek birbiriyle kıyaslamaktadır (164).

miRNA'ların ifadesini değiştirebilen bir diğer faktör ölüm nedenidir (165). Özellikle mekanik asfiksi nedeniyle meydana gelen ölümlerde; miR-3185, hipoksiye bağlı faktörlerin (HIF'ler) veya diğer hipoksi ile ilişkili genlerin ifadesini düzenler, anjiyogenez, metabolizma ve hücre sağ kalımında rol oynayan proteinleri kodlayan mRNA'ların stabilitesini ve translasyonunu etkiler, bu nedenle asfiksi ölümlerinde RNA upregülasyonu görülürken, diğer nedenlerle gerçekleşen ölümlerde RNA downregülasyonu görülmektedir (165).

Literatürdeki sınırlı sayıda araştırmadan elde edilen ümit verici sonuçlar, miRNA'ların PMI tayininde potansiyel bir araç olarak umut verici olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak miRNA'lar ve mRNA'lar gibi farklı RNA'ların davranış bilgilerini birleştiren çok parametrelili matematiksel modellerin geliştirilmesi önemlidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen TTU-2024-9269 kodlu bu çalışma, 03.08.2023 tarih ve G.Ü.ET-23.075 kod numaralı Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayını almıştır. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde (GÜDAM) ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilirken, Gazi Üniversitesi Etik Kurulu Yönergesi'nin 13. maddesinde belirtilen “etik kurallara uygunluk esası” kararına uyulmuştur.

3.1. Kullanılan Hayvan, Araç ve Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, GÜDAM'dan sağlanan 250-300 gram ağırlığındaki Wistar cinsi, albino, erkek ratlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

- Soğutmalı masa üstü santrifüj (Hettich, Mikro 22R)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000)
- Otomatik ısı döngü cihazı (Eppendorf, Master Cycler Ep Gradient)
- Gerçek zamanlı PCR cihazı (Roche, LC 480)
- Sıvı Azot Tankı (GT21)
- Vortex (REAMIX, 2789)

- Kuru ısıtıcı blok (BIOSAN, TDB-120)
- TMA 2071 marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı
- Derin dondurucu, -80°C (SANYO)
- Derin dondurucu, -30°C (SANYO)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Mikrobiyoloji Güvenlik Kabini (CLANLAF VFRS 1206)
- 10 uL steril pipet ucu
- 100 uL steril pipet ucu
- 1000 uL steril pipet ucu
- Steril enjektör (1 cc)
- Steril enjektör (5 mL)
- 1,5 ml'lik ependorf tüpler

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Ketamin hidroklorür
- Xylasin hidroklorür
- Reaksiyon Tamponu (Tris-HCl, MgCl₂, CaCl₂, KCl veya NaCl, DTT (Ditiotreitol), dNTP karışımı, RNaz inhibitörü)
- MicroScript microRNA enzim mix (Reverse Transkriptaz, Poly(A) Polymerase, RNaz inhibitörü, DTT, Stabilizatörler ve tamponlayıcılar)

- Nükleaz free distile su
- Serum fizyolojik
- Steril dH₂O
- Master miks (Reverse Transkriptaz Enzimi, dNTP Karışımı (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), RNaz inhibitörü, DTT, Primerler)

- Primer F

- Primer R

3.1.4. Kullanılan Kitler

-miRNA primer

-Animal Tissue RNA İzolasyon Kiti

-microScript microRNA cDNA Sentez Kiti

-Faststart Essential DNA Green Master

-Lightcycler 480 Multiwell Tüp 96 well

3.2. Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Her birinde GÜDAM'dan temin edilen 6 adet erkek Wistar albino rat bulunan 5 grup oluşturulmuştur.

Tüm ratlara intrakardiyak kan alınması yöntemi ile ötenazileri gerçekleştirilmeden önce 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine intramuskuler (IM) enjeksiyonu uygulanmıştır.

Deney 24 saatlik bir dönem için planlanmıştır.

3.2.2. Deney Grupları

3.2.2.1. Grup 1

Kontrol grubu olarak seçilerek, anestezi için intramuskuler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben intrakardiyak kan alınması yöntemi ile ötenazileri gerçekleştirildikten sonra 0. saatte kalp dokusu örnekleri alınıp moleküler biyolojik incelemeler için Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir (Resim 1).

3.2.2.2. Grup 2

Anestezi için intramuskuler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben intrakardiyak kan alınması yöntemi ile ötenazileri gerçekleştirildikten sonra postmortem 3. saatte kalp dokusu örnekleri alınıp moleküler biyolojik incelemeler için Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir (Resim 1). (Toplam 6 rat)

3.2.2.3. Grup 3

Anestezi için intramuskuler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben intrakardiyak kan alınması yöntemi ile ötenazileri gerçekleştirildikten sonra postmortem 6. saatte kalp dokusu örnekleri alınıp

moleküler biyolojik incelemeler için Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir (Resim 1). (Toplam 6 rat)

3.2.2.4. Grup 4

Anestezi için intramuskuler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben intrakardiyak kan alınması yöntemi ile ötenazileri gerçekleştirildikten sonra postmortem 12. saatte kalp dokusu örnekleri alınıp moleküler biyolojik incelemeler için Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir (Resim 1). (Toplam 6 rat)

3.2.2.5. Grup 5

Anestezi için intramuskuler 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg xylazine enjeksiyonunu takiben intrakardiyak kan alınması yöntemi ile ötenazileri gerçekleştirildikten sonra postmortem 24. saatte kalp dokusu örnekleri alınıp moleküler biyolojik incelemeler için Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir (Resim 2). (Toplam 6 rat)



Resim 1. Deney hayvanları grupları (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4)



Resim 2. Deney hayvanları grupları (Grup 5)

3.2.3. Rat Kalp Dokusundan miRNA İzolasyonu

Doku örneklerinden miRNA izolasyon kiti (Norgen, Canada) kullanılarak yapılan miRNA izolasyonunun işlem basamakları aşağıdaki şekildedir:

- 1- Dondurulmuş dokudan 30 mg kadar doku alınarak, üzerine sıvı nitrojen döküldü ve doku havanda ezildi.
- 2- Nitrojen buharlaştıktan sonra üzerine 300 µl Buffer RL eklendi ve homojenize edildi.
- 3- Homojenize edilen lizat, pipetle eppendorf tüpe alındı.
- 4- Ardından 600 µl RNase-Free Water lizatın üzerine eklenerek 10 saniye vortekslendi.
- 5- 20µl Proteinase K eklendi ve 55 °C'ta 15 dakika bekletildi.
- 6- 14.000 x g'de 1 dakika santrifüjlenerek hücre artıkları çöktürüldü.
- 7- Dibe temas etmeden, sadece berrak sıvı kısım olan süpernatant çekilerek RNase-free bir eppendorfa alındı. Üzerine 450µl %96-100 etil alkol eklenir ve karışana kadar vortekslendi. Spin kolonlar toplama tüplerine yerleştirildi.
- 8- Lizat spin kolona tek seferde 650 µl'den fazla olmamak kaydıyla yüklendi. 3.500 x g'de 1 dakika santrifüjlenerek toplama tüpünde toplanan kısım atıldı.

- 9- 400 µl Wash Buffer A kolona eklendi ve 14,000 x g’de 1 dakika santrifüjlenerek toplama tüpünde toplanan sıvı atıldı.
- 10- İkinci kez 400 µl Wash Buffer A eklenip, 14,000 x g’de santrifüj yapılarak kolon yıkandı.
- 11- Sonraki aşamada kolondaki alkolü uçurabilmek için 2 dakika boyunca 14,000 x g’de santrifüj yapıldı ve toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
- 12- Kolon RNase’sız bir tüpün üzerine yerleştirilerek, 50 µl Elution Solution A kolona eklendi.
- 13- 200 x g’de 2 dakika ve hemen ardından 14,000 x g’de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 14- Tüpte toplanan kısım olan RNA -20°C’de saklandı.

3.2.4. Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) Yöntemi

Elde edilen her bir miRNA için spesifik “stem-loop primer” dizayn edilip cDNA sentezinde bu primerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA’dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları

	Hacim
Reaksiyon Tamponu (2X)	10 µl
MicroScript microRNA enzim mix	1 µl
Nükleaz free distile su	7 µl
Total RNA	2 µl

Hedef miRNA'lar için Qiagen miScript Reverse Transcription (RT) Kit II (Hilden, Almanya) kiti kullanılarak, ters transkripsiyon PCR gerçekleştirildi. Çalışılması hedeflenen miRNA genlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi için RNA'nın miktarı 20 µl hacim içerisinde 200 ng/µl olacak şekilde ayarlanarak RNA örnekleri ile karışım RNaz içermeyen su, revers transkriptaz enzimi, enzim tamponu ve nükleik asit karışımı eklenerek Tablo 2'de belirtilen programdaki tepkime koşullarına göre RT-PCR yapıldı.

Tablo 2. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program

İşlem	Sıcaklık	Zaman
Primer Bağlanması	37°C	30 dk
Ters Transkripsiyon	50°C	30 dk
İnaktivasyon	70°C	15 dk

Ardından cDNA miktarları 50 ng/µl olacak şekilde ayarlanıp, kantitatif Real Time PCR (qPCR) için kullanıma hazır hale getirildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA'lar, cDNA'ların kullanım ömrünü uzatmak için qPCR'da kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.2.5. Kantitatif Real Time PCR Yöntemi

Gen ekspresyonunun kantitatif analizi için qPCR yapıldı. Tablo 3'te ifade edilen miRNA genlerine özgü primer çiftleri kullanılarak ilgilenilen bölge LightCycler480 cihazında çoğaltıldı. qPCR için tepkime bileşenleri Qiagen miScript SYBR Green PCR kiti kullanılarak hazırlandı. Toplam 20 µl reaksiyon hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler ve Master miks kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir (Tablo 4).

Tablo 3. Gene özgü qPCR primer dizileri

Gen	Forward primer (5'- 3')	Reverse primer (5'- 3')
miR-1	5'-TGGAATGTAAAGAAGTGTGTAT-3'	5'-TGGAATGTAAAGAAGTGTGTATTC-3'
miR-2	5'-CGGTATCATTTGGCTGTCT-3'	5'-GTGCAGGGTCCGAGT-3'
miR-9	5'-CGTTCGTCTCTTTGGTTATCTAGC-3'	5'-AATGGTTGATCTGCTCTCTCTCTC-3'
miR-122	5'-ATCGACATCTGGAGTGTGACAATG-3'	5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTC-3'
miR-125b	5'-GCGGCTCCCTGAGACCCTAAC-3'	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
miR-133a	5'-CTGCAGCTGGAGAGTGTGCG-3'	5'-GTGCTCTGGAGGCTAGAGGT-3'
miR-143	5'-GCCGCTGAGATGAAGCACT-3'	5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
miR-150	5'-CTCCCAACCCTTGTA-3'	5'-GAACATGTCTGCGTATCTC-3'
miR-195	5'-GGGGTAGCAGCAGCACAGAAAT-3'	5'-TCCAGTGCCTGTCTGTGA-3'
miR-206	5'-CCACCAGGACTGGAAGACTC-3'	5'-CGCTGGAATGTAAGGAAGTGTG-3'
miR-208	5'-ATAAGACGAGCAAAAAGCTTGT-3'	5'-GAATCGAGCACCAGTTACG-3'
U6 snRNA	5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT-3'

Tablo 4. Real-time PCR tepkime karışımı

	Hacim
dH ₂ O	6 µl
Master miks	10 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
cDNA	2 µl

miR-1, miR-2, miR-9, miR-122, miR-125b, miR-133a, miR-143, miR-150, miR-195, miR-206, miR-208 ve U6 snRNA için termal döngü koşulları Tablo 5'te belirtilen programdaki tepkime koşullarına göre yapıldı.

Tablo 5. Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program

İşlem	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Enzim Aktivasyonu	95°C	10 dk	1 döngü
Denatürasyon	95°C	10 sn	40 döngü
Bağlanma	55°C	12 sn	40 döngü
Uzama	72°C	20 sn	40 döngü
Melt Curve Başlatma	95°C	10 sn	1 döngü
Melt Curve – Hibritleşme	60°C	60 sn	1 döngü
Soğutma	37°C	30 sn	1 döngü

Ekspresyon düzeyinin karşılaştırılması için U6 small nuclear RNA (snRNA) mRNA seviyeleri referans olarak alınmıştır. Sonuçlar LightCycler480 cihazında mRNA seviyeleri ile karşılaştırılarak belirlenen genlere ait ifadenme düzeyi kantitatif olarak belirlenmiştir. Sonuçlar LightCycler480 cihazında miRNA seviyeleri ile karşılaştırılarak belirlenen genlere ait ifadenme düzeyi kantitatif olarak belirlenmiştir. miRNA ekspresyonları kantitasyonu snRNA U6 referans olarak kullanılarak kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplamasında “ $\Delta\Delta C_t$ Yöntemi” kullanılmıştır.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Elde edilen kalp dokusu örneklerinde gruplar arasında ve kontrol grubunda miRNA ifade düzeylerine ait veriler SPSS 24.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. cDNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırılmıştır. Sürekli verileri karşılaştırmak için Student's t testi kullanıldı. P değerleri * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

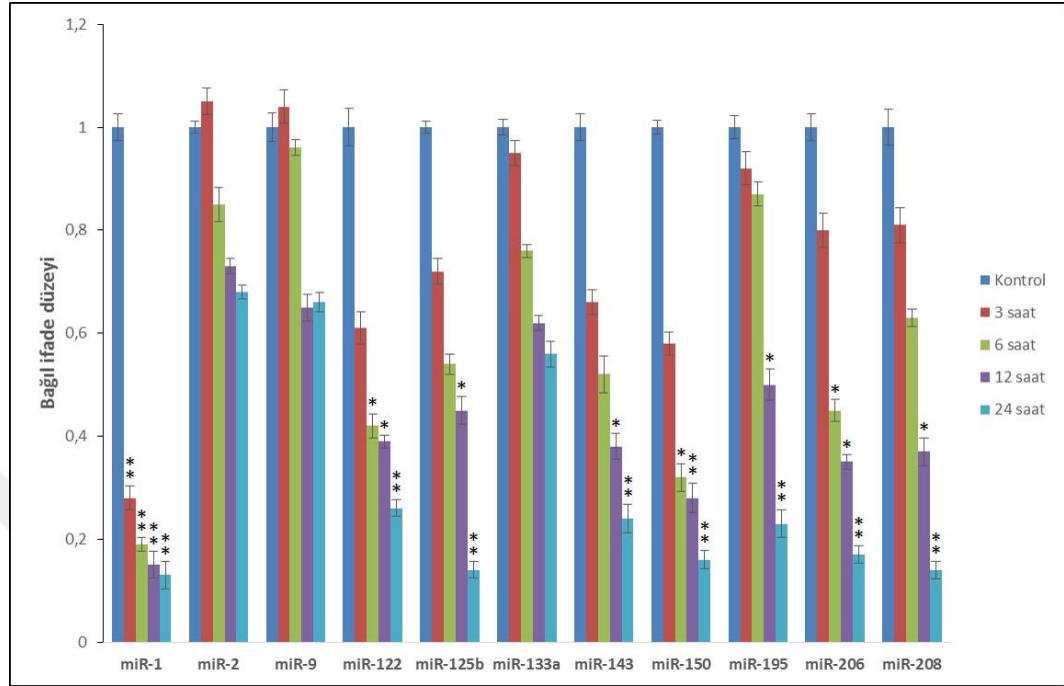
4. BULGULAR

Postmortem interval gruplarından miR-1, miR-2, miR-9, miR-122, miR-125b, miR-133a, miR-143, miR-150, miR-195, miR-206 ve miR-208 genlerinin ifade düzeylerine bakıldığında, ölüm sonrası 3, 6, 12 ve 24 saat gruplarında kontrol grubuna kıyasla azalma görülmüştür.

Postmortem 3. saat grubunda tüm miRNA'ların ifade düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülürken, miR-2, miR-9, miR-122, miR-125b, miR-133a, miR-143, miR-150, miR-195, miR-206 ve miR-208 ifade düzeylerindeki azalmanın anlamlı olmadığı ($p>0.05$), miR-1 ifade düzeylerindeki azalmanın ise anlamlı olduğu ($p<0.05$) görülmüştür.

Postmortem 6. saat grubunda tüm miRNA'ların ifade düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülürken, miR-2, miR-9, miR-125b, miR-133a, miR-143, miR-195 ve miR-208 ifade düzeylerindeki azalmanın anlamlı olmadığı ($p>0.05$), miR-1, miR-122, miR-150, miR-195 ve miR-206 ifade düzeyleindeki azalmanın ise anlamlı olduğu ($p<0.05$) görülmüştür.

Postmortem 12. ve 24. saat gruplarında tüm miRNA'ların ifade düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülürken, miR-2, miR-9 ve miR-133a ifade düzeylerindeki azalmanın anlamlı olmadığı ($p>0.05$), miR-1, miR-122, miR-125b, miR-143, miR-150, miR-195, miR-206 ve miR-208 ifade düzeylerindeki azalmanın ise anlamlı olduğu ($p<0.05$) görülmüştür (Şekil 1).



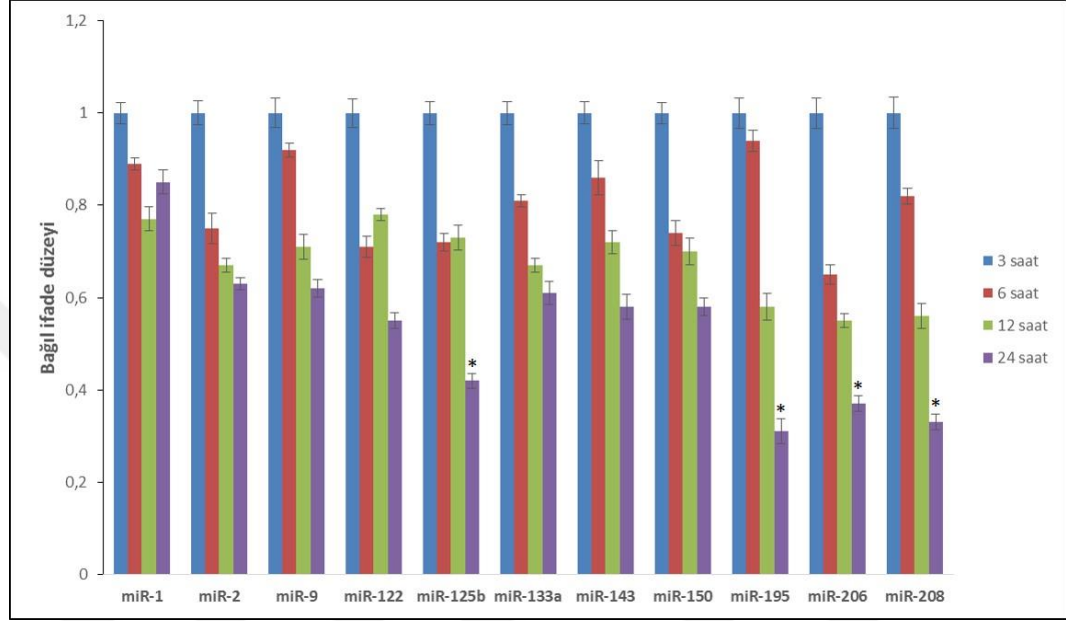
Şekil 1. Kontrol ve postmortem interval (3, 6, 12 ve 24 saat) gruplarında ilgili miRNA'ların bağıl ifade düzeyleri (Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Gösterilen sonuçlar üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. qPCR ile saptanan seçili miRNA'ların ifade düzeyleri RNU6B'ye göre normalize edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. qPCR, kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu; RNU6B, U6 small nuclear)

Postmortem interval gruplarından miR-1, miR-2, miR-9, miR-122, miR-125b, miR-133a, miR-143, miR-150, miR-195, miR-206 ve miR-208 genlerinin ifade düzeylerine bakıldığında, ölüm sonrası 6, 12 ve 24. saat gruplarında, ölüm sonrası 3. saat grubuna kıyasla azalma görülmüştür.

Postmortem 6. ve 12. saat gruplarında tüm miRNA'ların ifade düzeylerinin ölüm sonrası 3. saat grubuna kıyasla azaldığı görülürken, bu azalışın anlamlı olmadığı ($p > 0.05$) belirlenmiştir.

Postmortem 24. saat grubunda tüm miRNA'ların ifade düzeylerinin ölüm sonrası 3. saat grubuna kıyasla azaldığı görülürken, miR-1, miR-2, miR-9, miR-122, miR-133a, miR-143, ve miR-150 ifade düzeylerindeki azalmanın anlamlı

olmadığı ($p>0.05$), miR-125b, miR-195, miR-206 ve miR-208 ifade düzeylerindeki azalmanın anlamlı olduğu ($p<0.05$) görülmüştür. (Şekil 2).



Şekil 2. Postmortem interval (3, 6, 12 ve 24 saat) gruplarında ilgili miRNA'ların bağıl ifade düzeyleri (Veriler ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Gösterilen sonuçlar üç bağımsız deneyi temsil etmektedir. qPCR ile saptanan seçili miRNA'ların ifade düzeyleri RNU6B'ye göre normalize edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. qPCR, kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu; RNU6B, U6 small nuclear)

5. TARTIŞMA

Adli Tıp uygulamalarında PMI'nın doğru bir şekilde belirlenmesi kritik öneme sahiptir. Ölüm zamanını belirlemek medeni hukuk ve ceza hukuku soruşturmaları açısından değerlidir (126). Bu nedenle PMI'yı belirlemek için güvenilir ve tekrarlanabilir yöntemlere ihtiyaç vardır. PMI'nın doğru tayin edilebilmesi için ölümden sonra zaman içinde sabit değişim gösteren bir parametre gerekmekte olup, bu durum postmortem nükleik asit degradasyonu ile uyumludur (100). miRNA'lar özellikle kararlılıkları ve belirgin degradasyon paterni göstermeleri nedeniyle PMI tayini için değerli biyobelirteçler olarak öne çıkmaktadır (129). Bu literatür bilgisi ışığında, çalışmamızda, kalp dokusunun miRNA degradasyon modelini kullanarak PMI tayini için standartlaştırılmış bir hayvan deneyi modeli oluşturduk.

Hayvan deneyi modelleri, büyük örneklem yapılmasına, daha fazla deney grubu oluşturulmasına, deney koşullarının kontrol altında tutulmasına, daha uzun ve kesin PMI değerlendirmelerine ve yüksek düzeyde standartlaştırmaya olanak sağladıkları için avantajlıdır. Öte yandan, hayvanlarda analiz edilen doku miktarı insanlara göre önemli ölçüde daha azdır. Ayrıca, agoni, hipoksi veya koma gibi ölüm öncesi koşullar ve postmortem değişiklikler miRNA'ları önemli ölçüde etkileyebilecek olmasına rağmen, söz konusu koşullar hayvan deney ortamlarında standardize edilebilmektedir (166). Lv ve arkadaşları PMI tayininde RNA degradasyonunun kullanıldığı hayvan modelleri üzerinde geliştirilen deneysel verilerin insan örnekleri üzerinde doğrulandığı bir dizi çalışmada, hata payları

açısından hayvan ve insan dokularının birbirine yakın olduğunu belirtmişlerdir (159, 167).

Hayvan deneylerinde çeşitli ötenazi yöntemleri kullanılmaktadır. CO₂ inhalasyonu ve ketamin/ksylazin infüzyonu, laboratuvar hayvanlarının ötenazisi için kullanılan en yaygın yöntemlerdir (168). Ancak, CO₂ inhalasyonu ile ilgili etik kaygılar dikkate alındığında çalışmamızda ketamin/ksylazin infüzyonu ile ötenazi yöntemi tercih edilmiştir (169).

miRNA'ların stabilitesi analiz edildiği dokuya bağlı olarak değişmektedir, bazı miRNA'lar uzun süreler boyunca ve farklı dokularda stabil kalırken, diğerleri daha hızlı degrade olabilmektedir. Bu nedenle hedef dokuya uygun miRNA'yı seçmek gerekmektedir (164). RNA'nın ölüm sonrası stabilitesi beyin, kalp ve iskelet kası dokusunda yüksekken, ribonükleaz açısından zengin organlar olan pankreas ve karaciğer dokusunda düşüktür (102). PMI tayininde miRNA kullanan çalışmalarda karaciğer, iskelet kası, kan, kemik, kalp, deri, tükürük, semen, beyin, akciğer, vitröz hüner, lenf ve böbrek dokuları kullanılmıştır (164). Mevcut literatürde kalp, beyin ve iskelet kası dokularının PMI analizi için en iyi dokular olduğu sonucuna varılmıştır (158). Sampaio Silva'nın çalışmasında kalpten elde edilen RNA, ölümden 11 saat sonrasında bile 7'nin üzerindeki RQI değeriyle gösterilmiş olup, kalp dokusunun ölümden sonra son derece stabil olduğu sonucuna varılmıştır (100). Çalışmamızda kalp dokusu, stabilitesi ve çevresel faktörlerden korunuyor olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Moleküler biyolojinin gelişmesiyle birlikte, RT-qPCR yöntemi hassasiyeti ve özgüllüğü sayesinde PMI araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hiroshi Inoue'nun raporuna göre, RT-qPCR otopsi örneklerinden elde edilen dokularda mRNA düzeyinin analizinde güvenilir bir yöntemdir (99). Gen ekspresyonunun nicel olarak ölçülmesinde altın standart kabul edilir. Çalışmamızda hedef miRNA ekspresyonlarının değerlendirilmesinde qPCR yöntemi kullanılmıştır.

Moleküler biyolojide, hedef genin düzeyi endojen referans olarak kullanılan bir housekeeping gen ile normalize edilir (170). Normalizasyon, deneysel PMI tayini için RT-qPCR analizinin değerlendirilmesinde önemli bir adımdır. Normalizasyonun amacı, biyolojik olarak anlamlı değişiklikleri maskeleyebilen veya olduğundan daha yüksek çıkmasına neden olan veri varyasyonunu en aza indirmek ve böylece ölçümlerin doğruluğunu artırmaktır(161). Housekeeping genler tüm hücrelerde stabil bir şekilde ifade edilir (171). Zhang ve arkadaşlarının PMI tayininde 109 otopsi olgusunun kalp, beyin, böbrek ve deri doku örneklerinden elde edilen RNA'lar üzerinde yaptıkları çalışmada, geleneksel olarak kullanılan mRNA'lar (GAPDH, β -actin), 18S-rRNA ve U6 snRNA'nın insan kalp, beyin, böbrek ve deri dokularında güvenilir belirteçler oldukları, miRNA'ların (miR-1, miR-9, miR-194-1 ve miR-203) endojen kontrol genleri olarak kullanılmasının uygun olmadığı belirtilmiştir (106). U6 snRNA, miRNA çalışmalarında sıklıkla endojen kontrol geni olarak seçilmiştir (172-175). U6 snRNA, kısa saç tokası (hairpin) yapısında olması ve parçalanmasını sağlayacak nükleaz enzimlerinin bulunmaması nedenleri ile son derece stabildir (176).

Literatürde yer alan çok sayıda çalışmada, insan, fare ve rat modellerinden elde edilen çeşitli doku ve biyolojik sıvılar kullanılarak PMI ile ilişkili en uygun hedef biyobelirteçlerin tanımlanması amaçlamıştır (145). Referans biyobelirteçlerin aksine, ideal bir hedef biyobelirteçin, üzerinde çalışılan değişkene karşı duyarlı bir ekspresyon değişimi göstermesi beklenir. Bu doğrultuda, PMI tayini için uygun bir hedef biyobelirteç, postmortem geçen süreye bağlı olarak ekspresyon düzeyinde düzenli, istatistiksel olarak anlamlı ve ölçülebilir bir değişiklik sergilemelidir. Hedef biyobelirteçte gözlenen ekspresyon varyasyonunun büyüklüğü ve istatistiksel anlamlılığı arttıkça, söz konusu biyobelirteçin PMI tayininde kullanışlılığı ve güvenilirliği de o ölçüde artmaktadır (177).

Tez çalışmamızda, literatürde kalp dokusu ile ilişkili olduğu bildirilen, 25 °C'lik oda sıcaklığında, 24 saatlik PMI süresince rat kalp dokusundan elde edilen miR-1, miR-2, miR-9, miR-122, miR-125b, miR-133a, miR-143, miR-150, miR-195, miR-206 ve miR-208'lerin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler, U6 snRNA endojen referans geni kullanılarak normalize edilmiş ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Deneysel çalışma kapsamında laboratuvar hayvanları beş gruba ayrılmış; ilk grup kontrol grubu olarak belirlenmiş ve ölüm anında (0. saat) kalp dokusu örnekleri alınmıştır. Diğer dört gruptan sırasıyla postmortem 3, 6, 12 ve 24. saatlerde kalp dokusu örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen örnekler, qPCR yöntemi ile analiz edilerek, seçilen miRNA'ların zamana bağlı ekspresyon profilleri belirlenmiştir. Analiz sonuçları, ölüm sonrası geçen süre arttıkça incelenen tüm miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde genel bir azalma eğilimi olduğunu göstermektedir.

Postmortem 3. saat grubunda, incelenen tüm miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla azalma eğilimi gözlenmiş, ancak yalnızca miR-1'deki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Postmortem 6. saat grubunda, miR-1, miR-122, miR-150, miR-195 ve miR-206 ekspresyon düzeylerindeki azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmış ($p<0,05$), diğer miRNA'larda gözlenen değişiklikler ise anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır ($p>0,05$). 12. ve 24. saat gruplarında ise miR-1, miR-122, miR-125b, miR-143, miR-150, miR-195, miR-206 ve miR-208'in ekspresyon düzeylerinde anlamlı azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna karşın miR-2, miR-9 ve miR-133a'nın ekspresyon düzeylerinde azalma olmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızın sonuçları postmortem 3. saatte miR-1'in ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu göstermiş olup, bu durum miR-1'in postmortem biyolojik süreçlere yüksek duyarlılık gösterdiğini, postmortem 3. saate kadar olan PMI tayininde güvenilir bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızın sonucu ile uyumlu olarak Zhao ve arkadaşları, miR-1'in kardiyak doku bütünlüğü ile doğrudan ilişkili olduğunu, iskemi, hipoksi ve benzeri stres durumlarında ekspresyon düzeyinin hızla azaldığını (178), bu özellikleri nedeniyle miR-1'in, postmortem erken dönemde PMI tayininde potansiyel bir moleküler biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir. Ancak çalışmamızın ortaya koyduğu sonuç ile çelişen şekilde, literatürde miR-1'in kardiyak dokuda oldukça stabil bir ekspresyon profiline sahip olduğu, farklı PMI sürelerine ve değişen sıcaklık koşullarına karşı direnç gösterdiği

ve bu nedenle postmortem ileri dönemlerde bile güvenilir bir referans biyobelirteç olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir(159, 179).

Çalışmamızda değerlendirilen miRNA'lardan biri olan miR-122, literatürde genellikle hepatik dokuya özgü bir biyomolekül olarak tanımlanmakla birlikte (179), kalp dokusunda yapılan çalışmalarda miR-122 ekspresyon düzeylerinde gözlenen anlamlı azalma, bu miRNA'nın sadece karaciğer değil, kardiyak doku özelinde de PMI tayininde kullanılabilecek potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini ortaya koymaktadır (180). Tu ve arkadaşlarının 25 °C'de saklanan kalp, karaciğer ve iskelet kası dokularında gerçekleştirdikleri deneysel çalışmada, miR-122'nin kalp dokusunda yüksek stabilite gösterdiği, ancak iskelet kasında belirgin şekilde downregülasyona uğradığı ve karaciğerde ise nispeten daha kararlı bir ekspresyon düzeyine sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, başka bir çalışmada, miR-122'nin karaciğerde yüksek sıcaklık koşullarında (≥ 35 °C) 4. günden itibaren bozulmaya başladığı ve bu nedenle sadece 5S rRNA'nın karaciğer için güvenilir bir referans belirteç olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir (159). Bu bulgular, miR-122'nin farklı doku tiplerinde ve çevresel koşullarda değişken stabilite profili sergileyebileceğini ve bu durumun PMI tayini açısından dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Ayrıca, RT-qPCR analizleri, miR-122'nin rat ve insan dokularında türler arası korunumlu yapısını ortaya koymuş olup, belirli şartlar altında referans ya da hedef gen olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu miRNA'nın sıcaklık gibi çevresel faktörlere karşı duyarlılığı, özellikle karaciğer dokusunda kullanımını sınırlayabilirken, kardiyak dokuda belirli PMI aralıklarında değerli bir hedef biyobelirteç olma potansiyelini desteklemektedir.

Çalışmamızın sonuçları, postmortem 6, 12 ve 24. saatlerde miR-122 seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğunu göstermiş olup, miR-122'nin postmortem 6. saate kadar kalp dokusunda saptadığımız stabilitesinin, erken postmortem dönemde PMI tayininde güvenilir bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın sonuçları, miR-150, miR-195 ve miR-206'nın ekspresyon düzeylerinde postmortem 6. saatten itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana geldiğini göstermiştir. Bu durum miR-122 gibi miR-150, miR-195 ve miR-206'nın postmortem 6. saate kadar kalp dokusunda saptadığımız stabilitesinin de, erken postmortem dönemde PMI tayininde güvenilir bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu, Singh ve arkadaşlarının artan PMI ile birlikte insan kalp dokusunda miR-195 ve miR-206'nın anlamlı düzeyde degradasyon gösterdiğini ortaya koyan çalışmalarıyla uyumludur (181). Ancak Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, miR-206'nın postmortem ilk 24 saat boyunca stabil kaldığını, ancak 24. saatten itibaren ekspresyon düzeylerinde azalma eğilimi gösterdiğini, öte yandan miR-195'in postmortem 24. saat sonrasında dahi ekspresyon düzeyinde artış izlendiğini bildirmişlerdir (182).

Çalışmamızda, postmortem 12. saatten sonra miR-125b, miR-143 ve miR-208 ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. Bu durum miR-125b, miR-143 ve miR-208'in postmortem 12. saate kadar olan PMI tayininde güvenilir bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Guardado-Estrada ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, rat iskelet kaslarında postmortem 24. saatte miR-125b'nin downregülasyona uğradığını göstermişlerdir (183).

Çalışmamızın sonuçları, miR-2, miR-9 ve miR-133a ekspresyon düzeylerinde postmortem 24 saatte bile istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmediğini göstermiş olup, bu durum miR-2, miR-9 ve miR-133a'nın ileri postmortem dönemde bile PMI tayininde güvenilir bir referans biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızın bulgularına benzer şekilde, Montanari ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, miR-9'un postmortem 6 günün, miR-133a'nın postmortem 5 günün üzerinde stabil kaldığını belirtmişlerdir (177). Lv ve arkadaşları, miR-133a'nın kardiyak dokuda 144 saate kadar stabil kaldığını (159), Tu ve arkadaşları, miR-133a'nın hem kalp hem de iskelet kası dokularında postmortem 8. güne kadar kararlılığını koruduğunu (180), Li ve arkadaşları rat kalp dokusunda miR-2'nin ekspresyon düzeylerinin ölümden sonraki 120 saate kadar stabil seyrettiğini bildirmişlerdir (184).

6. SONUÇ

Bu çalışmada, PMI tayinine yönelik olarak kalp dokusundaki belirli miRNA'ların ifade düzeylerindeki değişimlerin analiz edilmesi amaçlanmış ve U6 snRNA referans geni kullanılarak normalize edilen miR-1, miR-2, miR-9, miR-122, miR-125b, miR-133a, miR-143, miR-150, miR-195, miR-206 ve miR-208'in ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, PMI uzadıkça bu miRNA'ların çoğunun ifade düzeylerinde genel bir azalma olduğunu ve bu azalmanın bazı miRNA'lar için istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir.

Özellikle miR-1, miR-122, miR-195 ve miR-206'nın postmortem erken ve orta dönemlerde anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların, zamanla düzenli şekilde degradasyona uğraması, onları PMI tayininde potansiyel hedef biyobelirteçler haline getirmektedir. Bununla birlikte, miR-2, miR-9 ve miR-133a gibi bazı miRNA'ların stabil ekspresyon düzeyleri, bu moleküllerin ileri postmortem dönemde bile PMI tayininde güvenilir biyobelirteçler olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, mevcut literatürle de uyumlu olup, özellikle kalp dokusunda miRNA temelli PMI tayininin güvenilirliğini desteklemektedir.

Adli nitelikli bir ölüm olayında Cumhuriyet Savcılarının otopsi kararı alırken Adli Tıp Uzmanlarından öğrenmeyi hedefledikleri en önemli konu ölüm sebebi olup ardından PMI tayini gelmektedir. 21. yüzyılın ortalarına gelmekte olduğumuz bu günlerde, adli soruşturma açısından bu kadar önemli olan bir konuda, Adli Tıp Uzmanlarının ölü lekeleri, ölü katılığı ve varsa çürüme bulguları gibi, oluşmaları ve devamlılıkları pek çok faktöre bağlı olarak değişen bulgulara

dayanarak yaptıkları PMI tayini çok geniş bir zaman aralığı belirtmekten öteye gidememekte, bu durum gerek adli makamları gerekse de mesleki olarak kendilerini tatmin etmemektedir. Son derece önemli bir boşluk içeren bu alanda, deneysel aşamada kalmış, henüz rutine girememiş olan tez çalışmamızın da içinde bulunduğu çalışmalar, miRNA gibi biyobelirteçlerin postmortem degradasyonunun tespitine dayalı PMI tayininin, geleneksel yöntemlerle karşılaştırılmayacak ölçüde ümit verici olduğunu, Ülkemizde yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekliliğini göstermektedir.

Çalışmamızın en güçlü yönlerinden biri, literatürde kardiyak doku ile ilişkilendirilen birçok miRNA'nın dahil edilmesi ve analizlerin qPCR gibi güvenilir bir yöntemle gerçekleştirilmiş olmasıdır. Çalışmamızın temel kısıtlılıkları arasında, farklı sıcaklık koşullarında miRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin değerlendirilmemiş olması, sadece rat kalp dokusunun incelenmiş olması, deney süresinin postmortem 24 saatlik zaman aralığını kapsamaması, daha uzun süreli postmortem dönemlerde meydana gelebilecek ekspresyon değişimlerinin değerlendirilmemesi ve elde edilen bulguların deney hayvanları üzerinde değerlendirilmiş olup insan doku örnekleri ile doğrulanmaması sayılabilir. Bu nedenle, çalışmadan elde edilen verilerin geçerliliğinin artırılması adına, ilerleyen çalışmalarda farklı dokular, çevresel koşullar ve insan örneklerinin de dahil edildiği kapsamlı doğrulama çalışmalarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKÇA

1. Bernat JL. The definition and criterion of death. *Handb Clin Neurol*. 2013;118:419-35.
2. Adli Tıp Ders Kitabı. İstanbul2011.
3. Saukko P, Knight B. Knight's forensic pathology: CRC press; 2015.
4. Goila AK, Pawar M. The diagnosis of brain death. *Indian J Crit Care Med*. 2009;13(1):7-11.
5. Polat MO, Inanıcı, M. A., Aksoy, M. E. Adli Tıp Ders Kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 1997.
6. Maeda H, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Michiue T. Significance of postmortem biochemistry in determining the cause of death. *Leg Med (Tokyo)*. 2009;11 Suppl 1:S46-9.
7. Madea B. Handbook of Forensic Medicine. Germany: John Wiley & Sons, Ltd.; 2014.
8. DiMaio D, DiMaio VJM. Forensic Pathology, Second Edition: Taylor & Francis; 2001.
9. Marshall TK, Hoare FE. The use of the body temperature in estimating the time of death. *Journal of Forensic Science* 1962.
10. Althaus L, Henssge C. Rectal temperature time of death nomogram: sudden change of ambient temperature. *Forensic Sci Int*. 1999;99(3):171-8.
11. Henssge C, Althaus L, Bolt J, Freisleder A, Haffner HT, Henssge CA, et al. Experiences with a compound method for estimating the time since death. II. Integration of non-temperature-based methods. *Int J Legal Med*. 2000;113(6):320-31.
12. Huxley HE, Hanson J. The structural basis of the contraction mechanism in striated muscle. *Ann N Y Acad Sci*. 1959;81:403-8.
13. Hall J. E. GAC. Guyton and Hall textbook of medical physiology 12th ed. ed: Saunders/Elsevier; 2011.
14. J. K. Prescription: Medicide-The Goodness of Planned Death: Prometheus Books; 1991.

15. Brody H. Kevorkian and assisted death in the United States. *Bmj*. 1999;318(7189):953-4.
16. Madea B. Estimation of The Time Since Death 4th Edition ed. Madea B, editor: CRC Press; 2023.
17. Casper JL, Liman K. *Practisches Handbuch der gerichtlichen Medicin*: August Hirschwald; 1876.
18. Madea B. Methods for determining time of death. *Forensic Sci Med Pathol*. 2016;12(4):451-85.
19. Sturmer WQ. The vitreous humour: postmortem potassium changes. *Lancet*. 1963;1(7285):807-8.
20. Sturmer WQ, Gantner GE, Jr. THE POSTMORTEM INTERVAL. A STUDY OF POTASSIUM IN THE VITREOUS HUMOR. *Am J Clin Pathol*. 1964;42:137-44.
21. Zilg B, Bernard S, Alkass K, Berg S, Druid H. A new model for the estimation of time of death from vitreous potassium levels corrected for age and temperature. *Forensic Sci Int*. 2015;254:158-66.
22. Madea B, Henssge C, Hönig W, Gerbracht A. References for determining the time of death by potassium in vitreous humor. *Forensic Sci Int*. 1989;40(3):231-43.
23. Madea B, Herrmann N, Henbge C. Precision of estimating the time since death by vitreous potassium--comparison of two different equations. *Forensic Sci Int*. 1990;46(3):277-84.
24. Muñoz JI, Suárez-Peñaranda JM, Otero XL, Rodríguez-Calvo MS, Costas E, Miguéns X, et al. A new perspective in the estimation of postmortem interval (PMI) based on vitreous. *J Forensic Sci*. 2001;46(2):209-14.
25. Muñoz Barús JI, Suárez-Peñaranda J, Otero XL, Rodríguez-Calvo MS, Costas E, Miguéns X, et al. Improved estimation of postmortem interval based on differential behaviour of vitreous potassium and hypoxanthine in death by hanging. *Forensic Sci Int*. 2002;125(1):67-74.
26. McCleskey BC, Dye DW, Davis GG. Review of Postmortem Interval Estimation Using Vitreous Humor: Past, Present, and Future. *Acad Forensic Pathol*. 2016;6(1):12-8.

27. Rognum TO, Hauge S, Oyasaeter S, Saugstad OD. A new biochemical method for estimation of postmortem time. *Forensic Sci Int.* 1991;51(1):139-46.
28. Madea B, Kreuser C, Banaschak S. Postmortem biochemical examination of synovial fluid--a preliminary study. *Forensic Sci Int.* 2001;118(1):29-35.
29. V P, Vidua RK, Kumar A, P P, Keche AS, Sahoo N, et al. Estimation of Time Since Death Using Biochemical Markers in Synovial Fluid. *Am J Forensic Med Pathol.* 2023.
30. Spitz WV, Fisher RS. *Medicolegal Investigation Of Death.* 2nd Edition ed. Springfield, IL: Charles C Thomas; 1980.
31. Adelson L. *Pathology of Homicide.* Springfield, IL: Charles C Thomas; 1974.
32. Byrd JH, Castner JL. *Forensic Entomology, The Utility of Arthropods in Legal Investigations:* CRC Press; 2001.
33. Anderson G, VanLaerhoven S. Initial Studies on Insect Succession on Carrion in Southwestern British Columbia. *Journal of Forensic Sciences.* 1996;41(4):617-25.
34. Archer MS. Annual variation in arrival and departure times of carrion insects at carcasses: implications for succession studies in forensic entomology. *Australian Journal of Zoology.* 2003;51:569-76.
35. Grassberger M, Frank C. Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central European urban habitat. *J Med Entomol.* 2004;41(3):511-23.
36. Watson EJ, Carlton CE. Insect succession and decomposition of wildlife carcasses during fall and winter in Louisiana. *J Med Entomol.* 2005;42(2):193-203.
37. Eberhardt TL, Elliot DA. A preliminary investigation of insect colonisation and succession on remains in New Zealand. *Forensic Sci Int.* 2008;176(2-3):217-23.
38. Wang J, Li Z, Chen Y, Chen Q, Yin X. The succession and development of insects on pig carcasses and their significances in estimating PMI in south China. *Forensic Sci Int.* 2008;179(1):11-8.
39. Houck MM, Siegel JA. *Fundamentals of Forensic Science.* 2nd Edition ed 2009.

40. Smith KE, Wall R. The use of carrion as breeding sites by the blowfly *Lucilia sericata* and other Calliphoridae. *Med Vet Entomol*. 1997;11(1):38-44.
41. TAO SM. A COMPARATIVE STUDY OF THE EARLY LARVAL STAGES OF SOME COMMON FLIES*. *American Journal of Epidemiology*. 1927;7(6):735-61.
42. Arnott S, Turner B. Post-feeding larval behaviour in the blowfly, *Calliphora vicina*: effects on post-mortem interval estimates. *Forensic Sci Int*. 2008;177(2-3):162-7.
43. Lowne B. The Anatomy, Physiology, Morphology and Development of the Blow-fly. LONDON: Porter, R.H.; 1890.
44. Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R, Hall MJ. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Sci Med Pathol*. 2011;7(4):379-92.
45. Adams ZJ, Hall MJ. Methods used for the killing and preservation of blowfly larvae, and their effect on post-mortem larval length. *Forensic Sci Int*. 2003;138(1-3):50-61.
46. Shewell GE. Blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark, by Knut Rognes. *Fauna Entomologica Scandinavica* Vol. 24. 1991. E. J. Brill/Scandinavian Science Press Ltd. Leiden. 272 pages. 1 colour plate. 685 figures. Hard cover, cloth. Price 140 NLG. *Insect Systematics & Evolution*. 1991;22:364-.
47. Smith KGV. A Manual of Forensic Entomology: Trustees of the British Museum (Natural History); 1986.
48. Wallman JF, Adams MA. Molecular Systematics of Australian Carrion-breeding Blowflies of the Genus *Calliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Australian Journal of Zoology*. 1997;45:337-56.
49. Reibe S, Schmitz J, Madea B. Molecular identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) from Germany. *Parasitol Res*. 2009;106(1):257-61.
50. Francesconi F, Lupi O. Myiasis. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(1):79-105.
51. Wehner R, Gehring W. *Zoologie*. Germany 2013.
52. Grassberger M, Reiter C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the

isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci Int.* 2001;120(1-2):32-6.

53. Pechal JL, Crippen TL, Tarone AM, Lewis AJ, Tomberlin JK, Benbow ME. Microbial community functional change during vertebrate carrion decomposition. *PLoS One.* 2013;8(11):e79035.
54. Metcalf JL, Wegener Parfrey L, Gonzalez A, Lauber CL, Knights D, Ackermann G, et al. A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *Elife.* 2013;2:e01104.
55. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486(7402):207-14.
56. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2009;19(12):2317-23.
57. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007;449(7164):804-10.
58. Moitas B, Caldas IM, Sampaio-Maia B. Microbiology and postmortem interval: a systematic review. *Forensic Sci Med Pathol.* 2024;20(2):696-715.
59. Singh B, Minick KJ, Strickland MS, Wickings KG, Crippen TL, Tarone AM, et al. Temporal and Spatial Impact of Human Cadaver Decomposition on Soil Bacterial and Arthropod Community Structure and Function. *Front Microbiol.* 2017;8:2616.
60. Cobaugh KL, Schaeffer SM, DeBruyn JM. Functional and Structural Succession of Soil Microbial Communities below Decomposing Human Cadavers. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130201.
61. Hyde ER, Haarmann DP, Lynne AM, Bucheli SR, Petrosino JF. The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. *PLoS One.* 2013;8(10):e77733.
62. Carter DO, Yellowlees D, Tibbett M. Temperature affects microbial decomposition of cadavers (*Rattus rattus*) in contrasting soils. *Applied Soil Ecology.* 2008;40(1):129-37.
63. Teo CH, Pawita AH, Khairul O, Atiah Ayunni AG, Noor Hazfalinda H. Post mortem changes in relation to different types of clothing. *Malays J Pathol.* 2013;35(1):77-85.

64. Hawksworth DL, Wiltshire PE. Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic Sci Int.* 2011;206(1-3):1-11.
65. Finley SJ, Benbow ME, Javan GT. Microbial communities associated with human decomposition and their potential use as postmortem clocks. *Int J Legal Med.* 2015;129(3):623-32.
66. Gilbert JA, Meyer F, Antonopoulos D, Balaji P, Brown CT, Brown CT, et al. Meeting report: the terabase metagenomics workshop and the vision of an Earth microbiome project. *Stand Genomic Sci.* 2010;3(3):243-8.
67. Project EM. The Earth Microbiome Project is a systematic attempt to characterize global microbial taxonomic and functional diversity for the benefit of the planet and humankind. 2025 [Available from: <https://earthmicrobiome.org/>].
68. VanInsberghe D, Hartmann M, Stewart GR, Mohn WW. Isolation of a substantial proportion of forest soil bacterial communities detected via pyrotag sequencing. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(6):2096-8.
69. Carter DO, Yellowlees D, Tibbett M. Moisture can be the dominant environmental parameter governing cadaver decomposition in soil. *Forensic Sci Int.* 2010;200(1-3):60-6.
70. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2761-4.
71. Wooley JC, Godzik A, Friedberg I. A primer on metagenomics. *PLoS Comput Biol.* 2010;6(2):e1000667.
72. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(20):6955-9.
73. Schloss PD, Gevers D, Westcott SL. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS One.* 2011;6(12):e27310.
74. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* 2007;69(2):330-9.
75. Lutz H, Vangelatos A, Gottel N, Osculati A, Visona S, Finley SJ, et al. Effects of Extended Postmortem Interval on Microbial

Communities in Organs of the Human Cadaver. *Front Microbiol.* 2020;11:569630.

76. Hanssen EN, Liland KH, Gill P, Snipen L. Optimizing body fluid recognition from microbial taxonomic profiles. *Forensic Sci Int Genet.* 2018;37:13-20.
77. Ventura Spagnolo E, Stassi C, Mondello C, Zerbo S, Milone L, Argo A. Forensic microbiology applications: A systematic review. *Legal Medicine.* 2019;36:73-80.
78. Oliveira M, Amorim A. Microbial forensics: new breakthroughs and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(24):10377-91.
79. DeBruyn JM, Hauther KA. Postmortem succession of gut microbial communities in deceased human subjects. *PeerJ.* 2017;5:e3437.
80. Ashe EC, Comeau AM, Zejdlik K, O'Connell SP. Characterization of Bacterial Community Dynamics of the Human Mouth Throughout Decomposition via Metagenomic, Metatranscriptomic, and Culturing Techniques. *Front Microbiol.* 2021;12:689493.
81. Adserias-Garriga J, Quijada NM, Hernandez M, Rodríguez Lázaro D, Steadman D, Garcia-Gil LJ. Dynamics of the oral microbiota as a tool to estimate time since death. *Molecular Oral Microbiology.* 2017;32(6):511-6.
82. Zhang Y, Pechal JL, Schmidt CJ, Jordan HR, Wang WW, Benbow ME, et al. Machine learning performance in a microbial molecular autopsy context: A cross-sectional postmortem human population study. *PLoS One.* 2019;14(4):e0213829.
83. Dell'Aquila M, De Matteis A, Scatena A, Costantino A, Camporeale MC, De Filippis A. Estimation of the time of death: where we are now? *Clin Ter.* 2021;172(2):109-12.
84. Jeffreys AJ, Brookfield JF, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature.* 1985;317(6040):818-9.
85. Perry WL, 3rd, Bass WM, Riggsby WS, Sirotkin K. The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. *J Forensic Sci.* 1988;33(1):144-53.
86. Bär W, Kratzer A, Mächler M, Schmid W. Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci Int.* 1988;39(1):59-70.

87. Williams T, Soni S, White J, Can G, Javan GT. Evaluation of DNA degradation using flow cytometry: promising tool for postmortem interval determination. *Am J Forensic Med Pathol.* 2015;36(2):104-10.
88. Liu L, Shu X, Ren L, Zhou H, Li Y, Liu W, et al. Determination of the early time of death by computerized image analysis of DNA degradation: which is the best quantitative indicator of DNA degradation? *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2007;27(4):362-6.
89. Johnson LA, Ferris JA. Analysis of postmortem DNA degradation by single-cell gel electrophoresis. *Forensic Sci Int.* 2002;126(1):43-7.
90. Zheng J, Li X, Shan D, Zhang H, Guan D. DNA degradation within mouse brain and dental pulp cells 72 hours postmortem. *Neural Regen Res.* 2012;7(4):290-4.
91. Itani M, Yamamoto Y, Doi Y, Miyaishi S. Quantitative analysis of DNA degradation in the dead body. *Acta Med Okayama.* 2011;65(5):299-306.
92. Xiong P, Guo P, Zhang J. [Raman micro spectroscopic analysis of relationship between DNA degradation in tissue cells and postmortem interval]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi.* 2010;30(6):1511-5.
93. Zhan L, Zhao ZQ, Shan YW. [Estimation of postmortem intervals by using terminal deoxynucleotidyl transferase]. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2005;21(2):113-4.
94. Tozzo P, Scrivano S, Sanavio M, Caenazzo L. The Role of DNA Degradation in the Estimation of Post-Mortem Interval: A Systematic Review of the Current Literature. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10).
95. Green RL, Roinestad IC, Boland C, Hennessy LK. Developmental validation of the quantifiler real-time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples. *J Forensic Sci.* 2005;50(4):809-25.
96. Mansour H, Krebs O, Pinnschmidt HO, Griem N, Hammann-Ehrt I, Püschel K. Factors affecting dental DNA in various real post-mortem conditions. *Int J Legal Med.* 2019;133(6):1751-9.

97. Larkin B, Iaschi S, Dadour I, Tay GK. Using accumulated degree-days to estimate postmortem interval from the DNA yield of porcine skeletal muscle. *Forensic Sci Med Pathol*. 2010;6(2):83-92.
98. Scrivano S, Sanavio M, Tozzo P, Caenazzo L. Analysis of RNA in the estimation of post-mortem interval: a review of current evidence. *International Journal of Legal Medicine*. 2019;133(6):1629-40.
99. Inoue H, Kimura A, Tuji T. Degradation profile of mRNA in a dead rat body: basic semi-quantification study. *Forensic Sci Int*. 2002;130(2-3):127-32.
100. Sampaio-Silva F, Magalhães T, Carvalho F, Dinis-Oliveira RJ, Silvestre R. Profiling of RNA degradation for estimation of post mortem [corrected] interval. *PLoS One*. 2013;8(2):e56507.
101. Young ST, Wells JD, Hobbs GR, Bishop CP. Estimating postmortem interval using RNA degradation and morphological changes in tooth pulp. *Forensic Sci Int*. 2013;229(1-3):163.e1-6.
102. Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet*. 2007;1(1):69-74.
103. Vennemann M, Koppelkamm A. mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Sci Int*. 2010;203(1-3):71-5.
104. Tao L, Ma J, Han L, Xu H, Zeng Y, Yehui L, et al. Early postmortem interval estimation based on Cdc25b mRNA in rat cardiac tissue. *Leg Med (Tokyo)*. 2018;35:18-24.
105. Koppelkamm A, Vennemann B, Fracasso T, Lutz-Bonengel S, Schmidt U, Heinrich M. Validation of adequate endogenous reference genes for the normalisation of qPCR gene expression data in human post mortem tissue. *Int J Legal Med*. 2010;124(5):371-80.
106. Zhang H, Zhang P, Ma KJ, Lv YH, Li WC, Luo CL, et al. The selection of endogenous genes in human postmortem tissues. *Sci Justice*. 2013;53(2):115-20.
107. Elghamry HA, Mohamed MI, Hassan FM, Abdelfattah DS, Abdelaal AG. Potential use of GAPDH m-RNA in estimating PMI in brain tissue of albino rats at different environmental conditions. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 2017;7(1):24.
108. Kennedy D. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. XXV: Biological Clocks. JSTOR; 1962.

109. Wager-Smith K, Kay SA. Circadian rhythm genetics: from flies to mice to humans. *Nature genetics*. 2000;26(1):23-7.
110. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health*. 2001;25(2):85-93.
111. de Mairan J-J. Observation botanique. Histoire de l'Académie Royale des Sciences Paris. 1729.
112. Klein DC, Moore RY, Reppert SM. Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock: Oxford University Press; 1991.
113. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R-i, Ueda M, et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 2000;288(5466):682-5.
114. Takahashi JS. The 50th anniversary of the Konopka and Benzer 1971 paper in PNAS: "Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(39).
115. Schibler U. The daily timing of gene expression and physiology in mammals. *Dialogues Clin Neurosci*. 2007;9(3):257-72.
116. Kimura A, Ishida Y, Hayashi T, Nosaka M, Kondo T. Estimating time of death based on the biological clock. *Int J Legal Med*. 2011;125(3):385-91.
117. Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Ishigami A, Yamamoto H, Kuninaka Y, et al. Application and limitation of a biological clock-based method for estimating time of death in forensic practices. *Sci Rep*. 2023;13(1):6093.
118. Arendt J. Shift work: coping with the biological clock. *Occupational Medicine*. 2010;60(1):10-20.
119. Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Eto T, Misu H, et al. Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(2):329-35.
120. Wu YH, Fischer DF, Kalsbeek A, Garidou-Boof ML, van der Vliet J, van Heijningen C, et al. Pineal clock gene oscillation is disturbed in Alzheimer's disease, due to functional disconnection from the "master clock". *Faseb j*. 2006;20(11):1874-6.
121. Li JZ, Bunney BG, Meng F, Hagenauer MH, Walsh DM, Vawter MP, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(24):9950-5.

122. Mikami H, Terazawa K, Takatori T, Tokudome S, Tsukamoto T, Haga K. Estimation of time of death by quantification of melatonin in corpses. *Int J Legal Med.* 1994;107(1):42-51.
123. Vollmers C, Schmitz RJ, Nathanson J, Yeo G, Ecker JR, Panda S. Circadian oscillations of protein-coding and regulatory RNAs in a highly dynamic mammalian liver epigenome. *Cell Metab.* 2012;16(6):833-45.
124. Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, et al. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev.* 2009;23(11):1313-26.
125. Corradini B, Alù M, Radheshi E, Gabbolini V, Ferrari F, Santunione AL, et al. Estimation of the time of death through the analysis of clock miRNAs expression in blood and vitreous humor. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 2015;5:e204-e6.
126. Pozhitkov AE, Noble PA. Gene expression in the twilight of death: The increase of thousands of transcripts has implications to transplantation, cancer, and forensic research. *Bioessays.* 2017;39(9):1700066.
127. Ferreira MT, Cunha E. Can we infer post mortem interval on the basis of decomposition rate? A case from a Portuguese cemetery. *Forensic science international.* 2013;226(1-3):298. e1-. e6.
128. Vass AA. The elusive universal post-mortem interval formula. *Forensic science international.* 2011;204(1-3):34-40.
129. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
130. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
131. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993;75(5):855-62.
132. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research.* 2009;19(1):92-105.
133. Griffiths-Jones S, Saini H, van Dongen S, Enright A. miRBase: tools for microRNA genomics. *NAR* 36. Database Issue), D154–D158 <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>. 2008.

134. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007;318(5858):1931-4.
135. Chandrasekaran AR, Punnoose JA, Zhou L, Dey P, Dey BK, Halvorsen K. DNA nanotechnology approaches for microRNA detection and diagnosis. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(20):10489-505.
136. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*. 2007;116(3):258-67.
137. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev*. 2011;91(3):827-87.
138. Akar T, Saglam ASY, Göçün PU, Alp E, Konac E, Menevşe A. Evaluation of apoptotic caspase levels in estimation of the wound age. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2018;43(2):126-33.
139. Oehmichen M. Vitality and time course of wounds. *Forensic science international*. 2004;144(2-3):221-31.
140. Betz P. Histological and enzyme histochemical parameters for the age estimation of human skin wounds. *International Journal of Legal Medicine*. 1994;107:60-8.
141. Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Kimura A, Kawaguchi T, Hama M, et al. Immunohistochemical analysis on MMP-2 and MMP-9 for wound age determination. *International journal of legal medicine*. 2015;129:1043-8.
142. Muciaccia B, Sestili C, De Grossi S, Vestri A, Cipolloni L, Cecchi R. Are mast cells implicated in asphyxia? *International journal of legal medicine*. 2016;130(1):153-61.
143. De Simone S, Giacani E, Bosco MA, Vittorio S, Ferrara M, Bertozzi G, et al. The Role of miRNAs as New Molecular Biomarkers for Dating the Age of Wound Production: A Systematic Review. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:803067.
144. Lang H, Zhao F, Zhang T, Liu X, Wang Z, Wang R, et al. MicroRNA-149 contributes to scarless wound healing by attenuating inflammatory response. *Mol Med Rep*. 2017;16(2):2156-62.
145. Rocchi A, Chiti E, Maiese A, Turillazzi E, Spinetti I. MicroRNAs: An Update of Applications in Forensic Science. *Diagnostics (Basel)*. 2020;11(1).

146. Aunin E, Broadley D, Ahmed MI, Mardaryev AN, Botchkareva NV. Exploring a Role for Regulatory miRNAs In Wound Healing during Ageing: Involvement of miR-200c in wound repair. *Sci Rep*. 2017;7(1):3257.
147. Li D, Wang A, Liu X, Meisgen F, Grünler J, Botusan IR, et al. MicroRNA-132 enhances transition from inflammation to proliferation during wound healing. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(8):3008-26.
148. Li H, Chang L, Du WW, Gupta S, Khorshidi A, Sefton M, et al. Anti-microRNA-378a enhances wound healing process by upregulating integrin beta-3 and vimentin. *Molecular Therapy*. 2014;22(10):1839-50.
149. Li N, Du Q, Bai R, Sun J. Vitality and wound-age estimation in forensic pathology: review and future prospects. *Forensic sciences research*. 2020;5(1):15-24.
150. Ibrahim SF, Ali MM, Basyouni H, Rashed LA, Amer EAE, Abd El-Kareem D. Histological and miRNAs postmortem changes in incisional wound. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 2019;9(1):37.
151. Neri M, Fabbri M, D'Errico S, Di Paolo M, Frati P, Gaudio RM, et al. Regulation of miRNAs as new tool for cutaneous vitality lesions demonstration in ligature marks in deaths by hanging. *Sci Rep*. 2019;9(1):20011.
152. Hamza M, Sankhyan D, Shukla S, Pandey P. Advances in body fluid identification: MiRNA markers as powerful tool. *Int J Legal Med*. 2024;138(4):1223-32.
153. An J-H, Shin K-J, Yang W-I, Lee H-Y. Body fluid identification in forensics. *BMB reports*. 2012;45(10):545-53.
154. Liu Y, He H, Xiao Z-X, Ji A, Ye J, Sun Q, et al. A systematic analysis of miRNA markers and classification algorithms for forensic body fluid identification. *Briefings in Bioinformatics*. 2020;22(4).
155. Omelia EJ, Uchimoto ML, Williams G. Quantitative PCR analysis of blood-and saliva-specific microRNA markers following solid-phase DNA extraction. *Analytical biochemistry*. 2013;435(2):120-2.

156. El-Mogy M, Lam B, Haj-Ahmad TA, McGowan S, Yu D, Nosal L, et al. Diversity and signature of small RNA in different bodily fluids using next generation sequencing. *BMC genomics*. 2018;19:1-24.
157. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Analytical biochemistry*. 2009;387(2):303-14.
158. Cianci V, Mondello C, Sapienza D, Guerrera MC, Cianci A, Cracò A, et al. microRNAs as New Biomolecular Markers to Estimate Time since Death: A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2024;25(17).
159. Lv Y-H, Ma J-L, Pan H, Zeng Y, Tao L, Zhang H, et al. Estimation of the human postmortem interval using an established rat mathematical model and multi-RNA markers. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*. 2017;13(1):20-7.
160. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics*. 2013;54:391-406.
161. Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of experimental botany*. 2009;60(2):487-93.
162. Chervoneva I, Li Y, Schulz S, Croker S, Wilson C, Waldman SA, et al. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC bioinformatics*. 2010;11:1-15.
163. Trotter SA, Brill Ii LB, Bennett Jr JP. Stability of gene expression in postmortem brain revealed by cDNA gene array analysis. *Brain research*. 2002;942(1-2):120-3.
164. Pasaribu RS, Auerkari EI, Suhartono AW, Auerkari P. A small RNA, microRNA as a potential biomolecular marker to estimate post mortem interval in forensic science: a systematic review. *Int J Legal Med*. 2023;137(5):1313-25.
165. Han L, Zhang H, Zeng Y, Lv Y, Tao L, Ma J, et al. Identification of the miRNA-3185/CYP4A11 axis in cardiac tissue as a biomarker for mechanical asphyxia. *Forensic Science International*. 2020;311:110293.
166. Nagy C, Maheu M, Lopez JP, Vaillancourt K, Cruceanu C, Gross JA, et al. Effects of postmortem interval on biomolecule integrity in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2015;74(5):459-69.

167. Ma J, Pan H, Zeng Y, Lv Y, Zhang H, Xue A, et al. Exploration of the R code-based mathematical model for PMI estimation using profiling of RNA degradation in rat brain tissue at different temperatures. *Forensic Sci Med Pathol*. 2015;11(4):530-7.
168. Shomer NH, Allen-Worthington KH, Hickman DL, Jonnalagadda M, Newsome JT, Slate AR, et al. Review of Rodent Euthanasia Methods. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2020;59(3):242-53.
169. Derakhshanfar A, Kian M, Dehghan Z, Valizadeh A, Moayedi J. Comparison of the effects of two methods of euthanasia on post mortem changes in rats: histopathological and molecular findings. *Comparative Clinical Pathology*. 2022;31(5):815-26.
170. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med*. 2003;9(5):189-95.
171. Heinrich M, Lutz-Bonengel S, Matt K, Schmidt U. Real-time PCR detection of five different "endogenous control gene" transcripts in forensic autopsy material. *Forensic Sci Int Genet*. 2007;1(2):163-9.
172. Chen P-S, Su J-L, Cha S-T, Tarn W-Y, Wang M-Y, Hsu H-C, et al. miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(9).
173. Lardizábal MN, Nocito AL, Daniele SM, Ornella LA, Palatnik JF, Veggi LM. Reference genes for real-time PCR quantification of microRNAs and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. *PloS one*. 2012;7(5):e36323.
174. Tea M, Michael MZ, Brereton HM, Williams KA. Stability of small non-coding RNA reference gene expression in the rat retina during exposure to cyclic hyperoxia. *Mol Vis*. 2013;19:501-8.
175. Lv Y-H, Ma J-L, Pan H, Zhang H, Li W-C, Xue A-M, et al. RNA degradation as described by a mathematical model for postmortem interval determination. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 2016;44:43-52.
176. Burke JE, Sashital DG, Zuo X, Wang YX, Butcher SE. Structure of the yeast U2/U6 snRNA complex. *Rna*. 2012;18(4):673-83.
177. Montanari E, Giorgetti R, Busardò FP, Giorgetti A, Tagliabracci A, Alessandrini F. Suitability of miRNA assessment in postmortem

interval estimation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021;25(4):1774-87.

178. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature*. 2005;436(7048):214-20.
179. Li W-C, Ma K-J, Lv Y-H, Zhang P, Pan H, Zhang H, et al. Postmortem interval determination using 18S-rRNA and microRNA. *Science & Justice*. 2014;54(4):307-10.
180. Tu C, Du T, Shao C, Liu Z, Li L, Shen Y. Evaluating the potential of housekeeping genes, rRNAs, snRNAs, microRNAs and circRNAs as reference genes for the estimation of PMI. *Forensic Sci Med Pathol*. 2018;14(2):194-201.
181. Singh P, Ali W, Sandhu S, Mishra S, Singh US, Verma AK, et al. Post-mortem interval estimation using miRNAs of road traffic accident cases: A forensic molecular approach. *Sci Justice*. 2023;63(4):485-92.
182. Wang H, Mao J, Li Y, Luo H, Wu J, Liao M, et al. 5 miRNA expression analyze in post-mortem interval (PMI) within 48h. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2013;4(1):e190-e1.
183. Guardado-Estrada M, Cárdenas-Monroy CA, Martínez-Rivera V, Cortez F, Pedraza-Lara C, Millan-Catalan O, et al. A miRNome analysis at the early postmortem interval. *PeerJ*. 2023;11:e15409.
184. Li WC, Ma KJ, Zhang P, Wang HJ, Shen YW, Zhou YQ, et al. [Estimation of postmortem interval using microRNA and 18S rRNA degradation in rat cardiac muscle]. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 2010;26(6):413-7.

8. ÖZET

POSTMORTEM İNTERVAL TAYİNİNDE RAT KALP DOKULARINDAN miRNA EKSPRESYONLARININ ANALİZİ

Bu tez çalışmasında, postmortem interval (PMI) tayininde miRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmada, farklı postmortem zaman noktalarında (0, 3, 6, 12 ve 24. saat) rat kalp dokularından elde edilen miR-1, miR-2, miR-9, miR-122, miR-125b, miR-133a, miR-143, miR-150, miR-195, miR-206 ve miR-208 ekspresyon düzeyleri, qPCR yöntemi ile değerlendirilmiş ve U6 snRNA geni referans olarak kullanılarak normalize edilmiştir. Elde edilen bulgular, postmortem sürenin uzamasına paralel olarak çoğu miRNA’da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle miR-1, miR-122, miR-195 ve miR-206, erken postmortem dönemde anlamlı degradasyon göstermiş ve PMI tayininde kullanılabilecek potansiyel hedef biyobelirteçler olarak değerlendirilmiştir. Buna karşın, miR-2, miR-9 ve miR-133a’nın ekspresyonlarında anlamlı değişiklik gözlenmemiş olup, bu moleküller ileri postmortem dönemlerde referans gen olarak kullanılabilirlik açısından dikkate değerdir. Çalışma, miRNA temelli PMI tayininin geleneksel yöntemlere alternatif oluşturabileceğini göstermekte olup, geniş kapsamlı ve farklı doku, sıcaklık ve insan örneklerini içeren ileri araştırmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Postmortem interval, miRNA, adli tıp

Sayfa Adedi: 95

Danışman: Prof. Dr. Taner AKAR

9. ABSTRACT

ANALYSIS OF miRNA EXPRESSIONS IN RAT CARDIAC TISSUES FOR THE ESTIMATION OF POSTMORTEM INTERVAL

In this thesis, the potential use of miRNA expression level changes as biomarkers in estimating the postmortem interval (PMI) was investigated. Expression levels of miR-1, miR-2, miR-9, miR-122, miR-125b, miR-133a, miR-143, miR-150, miR-195, miR-206, and miR-208 were analyzed using qPCR in rat heart tissues collected at 0, 3, 6, 12, and 24 hours postmortem. Normalization was performed using U6 snRNA as the reference gene. The results revealed a statistically significant decrease in the expression levels of most miRNAs as the PMI extended. Specifically, miR-1, miR-122, miR-195, and miR-206 showed marked degradation in the early postmortem period and were considered promising biomarker candidates for postmortem interval estimation. In contrast, miR-2, miR-9, and miR-133a exhibited stable expression, indicating their potential as reliable reference genes even in later postmortem periods. This study suggests that miRNA-based PMI estimation may offer a reliable alternative to traditional methods and highlights the need for further comprehensive studies involving multiple tissues, environmental variables, and human samples.

Key words: Postmortem interval, miRNA, forensic medicine

Page Number: 95

Advisor: Prof. Dr. Taner AKAR

10. EKLER



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-715956
Konu : Değerlendirme ve Onay

03.08.2023

Sayın Prof. Dr. Taner AKAR
Adli Tıp Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Taner AKAR, Atiye Seda SAĞLAM YAR ve Nur Fatma ÖZTÜRK'ten oluşan, G.Ü.ET-23.075 kod numaralı ve "*Postmortem İnterval Tayininde Rat Kalp Dokularından miRNA Ekspresyonlarının Analizi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-23.075 and entitled "*Determination of Postmortem Interval in Rat Cardiac Cells Depending on miRNA Expression* " is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 30+5 (5 adedi ön çalışma)

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN

Kurul Başkanı Ek:1 Liste

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Belge Doğrulama Kodu :BSAF72UTL3 Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys>