

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

**ÇEŞİTLİ miRNA BELİRTEÇLERİNİN KANIN
İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILABİLME
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuba GÜREL

**ADLİ BİLİMLER DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşe SERİN**

ADANA-2025

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

**ÇEŞİTLİ miRNA BELİRTEÇLERİNİN KANIN
İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILABİLME
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuba GÜREL

**ADLİ BİLİMLER DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşe SERİN**

ADANA – 2025

KABUL VE ONAY

Adli Bilimler Anabilim Dalı

Doktora Programı çerçevesinde yürütölmüş olan

“Çeşitli miRNA Belirteçlerinin Kanın İdentifikasyonunda Kullanılabilme Potansiyelinin Araştırılması”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak edilmiştir.

Tarihi: / / 2025

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Ayşe SERİN

Çukurova Üniversitesi

Başkan

Prof. Dr. Behnan ALPER

Çukurova Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Hülya Yükseloğlu

İstanbul Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Nursel Bilgin

Mersin Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Kenan Kaya

Çukurova Üniversitesi

Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sunay FIRAT

Bağımlılık ve Adli Bilimleri Enstitü Müdürü

ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Bağımlık ve Adli Bilimler Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

• Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim./....../20...

İMZA
Adı Soyadı
Tuba GÜREL

TEŞEKKÜR

Bilgi, birikim ve tecrübesiyle tezin bütün aşamalarında sonsuz destek olan ve her aşamada yol gösteren tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe SERİN'e,

Bilimsel hazırlık aşamasında ve laboratuvar çalışmalarında, zaman gözetmeksizin yardımına koşan, hiçbir desteğini esirgemeyen, sonsuz sabır ve anlayış gösteren Öğr. Gör. Dr. Hüsniye CANAN ve Mustafa Ürün AY'a,

Eğitim ve tez dönemim içerisinde gösterdikleri ilgi ve destekleri için Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr. Kenan KAYA ile öğretim üyeleri Prof. Dr. Behnan ALPER, Prof. Dr. Necmi ÇEKİN'e,

Doktora eğitiminin bana kazandırdığı ablam ve arkadaşım Hacer

Bana her zaman maddi ve manevi destek olan anneme ve babama, varlığıyla hayatımın rengi ve neşesi kızım FERİDE'ne

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYANI	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanın Biyolojik Özellikleri	3
2.2. Kanın Tanımlanması	4
2.3. miRNA'nın tarihçesi	10
2.4. miRNA'ların İsimlendirilmesi	10
2.5. Mikrorna'nın Oluşum ve Etki Mekanizması	11
2.6. Mikro RNA'ların fonksiyonları	14
2.6.1. Sinir sistemi ve miRNA'lar	15
2.6.2. Dolaşım sistemi ve miRNA'lar	15
2.6.3. Sindirim sistemi ve miRNA'lar	15
2.6.4. Üreme sistemi ve miRNA'lar	16
2.6.5. Kanseri ve miRNA'lar	16
2.6.6. Bağışıklık ve miRNA'lar	17
2.6.7. Biyobelirteç olarak miRNA'lar	17
2.7. miRNA Tespiti	19
2.7.1. Mikroarray Analizi	19
2.7.2. RNA-Seq	21
2.7.3. RT-qPCR	25
2.7.4. Northern Blot	26
2.7.5. In Situ Hibridizasyon	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Gereçler	28
3.1.1. Kullanılan Cihaz, Malzemeler ve Kitler	28

3.1.1.1. Cihazlar.....	28
3.1.1.2. Kitler ve Malzemeler	28
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Örnek Alma ve Uygun Koşulların Oluşturulması.....	29
3.2.1.1. Örnek Alma	29
3.2.1.2 Uygun Koşulların Oluşturulması.....	29
3.2.2. RNA İzolasyonu.....	30
3.2.3. RNA kantitasyonu	32
3.2.4. cDNA sentezi	33
3.2.5. Real Time PCR	34
4. BULGULAR.....	37
4.1. SNORD48 Ct	38
4.2. miR144 Ct.....	40
4.3. miR451 Ct.....	41
4.4. miR16 Ct.....	42
5. TARTIŞMA	43
EKLER	65
Ek-1 :Etik Kurul Kararı	65
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No:

Sayfa No:

Şekil 2.1. miRNA'nın biyogenezi ve oluşum mekanizması ²⁹	12
Şekil 2.2. Gen ekspresyonun şekil üzerinde gösterimi ³¹	13
Şekil 2.3. miRNA'ların hücre dışı ortama salınması ³²	14
Şekil 2.4. RNA-seq analizi genel şema ⁷¹	22
Şekil 2.5. RNA-seq kütüphane hazırlığının şematik gösterimi ⁷¹	24
Şekil 3.1. Filtre kağıdı üzerine oluşturulan kan örnekleri	30
Şekil 3.2. RNA ekstraksiyonunda kullanılan silika bazlı mini spin kolon örneği.....	31
Şekil 3.3. Santrifüj Cihazı	32
Şekil 3.4. Qubit® Fluorometer cihazı	33
Şekil 3.5. Analizde kullanılan Thermocycler Cihazı.....	34
Şekil 3.6. Analizde kullanılan ABI 7500 Real Time PCR cihazı.....	35
Şekil 4.1. SNORD48 Ct düzeyinin farklı koşullara göre değerlendirilmesi.	39
Şekil 4.2. miR144 Ct düzeyinin farklı koşullara göre değerlendirilmesi	40
Şekil 4.3. miR451 Ct düzeyinin farklı koşullara göre değerlendirilmesi.	41
Şekil 4.4. miR16 Ct düzeyinin farklı koşullara göre değerlendirilmesi.	42

TABLÖLER LİSTESİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 2.1. Kanın tanımlanmasında kullanılabilecek potansiyel RNA belirteçleri ¹⁴	9
Tablo 2.2. Bazı kanser tiplerinin tanısında kullanılabilecek miRNA'lar ⁵⁰	17
Tablo 2.3. Başlıca RNA-seq Platformları ve Genel Özellikleri.	23
Tablo 2.4. miRNA tespit yöntemlerinin karşılaştırılması ⁷²	27
Tablo 3.1. miRCURY LNA PCR Parametresi (Qiagen. miRCURY LNA miRNA PCR Handbook, 2020)	35
Tablo 4.1. miR451, miR-144 ve miR16 ile SNORD48'in farklı ortam koşullarında bekletilen kanlekelerinden elde edilen ifade düzeyleri (Ct değeri)	37
Tablo 4.2. SNORD48 ve üç farklı MiRNA'nın minimum, maksimum ve ortalama Ct değerleri.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
cDNA	: Complementary/Copy (Tamamlayıcı/Kopya) Deoksiribonükleik Asit
Ct	: Cycle Threshold
G	: Gravite
Ng	: Nanogram
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Çoklu Zincir Reaksiyonu)
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Çoklu Zincir Reaksiyonu)
Pg	: Pikogram
PSA	: Prostate Specific Antigen (Prostat Spesifik Antijen)
Rfu	: Relative Fluorescent Unit (Relatif Floresan Ünitesi)
STR	: Short Tandem Repeats (Kısa Ardışık Tekrarlar)
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromol
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
ncRNA	: Non coding (Kodlamayan) Ribonükleik Asit
tRNA	: Transfer Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
lncRNA	: Long Non Coding (Uzun Kodlamayan) Ribonükleik Asit
sncRNA	: Short Non Coding (Kısa Kodlamayan) Ribonükleik Asit
snoRNA	: Small Nucleolar (Küçük Nüleolar) Ribonükleik Asit
snRNA	: Small Nuclear (Küçük Nüklear) Ribonükleik Asit
piRNA	: Piwi-Interacting (Piwi Etkileşimli) Ribonükleik Asit
nt	: Nükleotid
NGS	: New Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)
ml	: Mililitre
UTR	: Untranslated Region (Okunmayan Bölge)
UV	: Ultra Viole

ÖZET

ÇEŞİTLİ miRNA BELİRTEÇLERİNİN KANIN İDENTİFİKASYONUNDA KULLANILABİLME POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Adli bilimler açısından suç mahallinde bırakılan vücut sıvılarının kaynağının belirlenmesi olay yerinin yeniden yapılandırılması için önemlidir. Vücut sıvısı tanımlamaya yönelik klasik ve literatürlerde belirtilen yöntemler incelendiğinde (özellikle seroloji tabanlı yöntemler), bu yöntemlerin numune tüketimi, yoğun çalışma, zaman kaybı, değişken sıcaklıklara duyarlılık ve özgüllük gibi çeşitli sınırlamalara sahip oldukları görülür. Kimliklendirme açısından DNA temelli yaklaşımlar öne çıkarken, olay yerini yeniden canlandırmak için gerekli parametrelerden biri olan vücut sıvısı/dokusu identifikasyonunda RNA temelli yaklaşımlar ön plandadır. Literatür incelendiğinde “mikro RNA” moleküllerinin degradasyon etkenlerine karşı daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Bu özellikleriyle adli bilimler açısından önemli bir potansiyele sahiptirler. Ancak literatür kapsamında miRNA stabilitesi üzerine yeterli çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı oda sıcaklığı (22-25°C) ile -20°C’de bekletilen kan lekelerinde miR-144, miR-451, miR-16 miRNA’ları ile SNORD48’in zamana bağlı stabilitesini araştırmaktır. Bu amaçla 6 farklı gönüllüden alınan kan örnekleri belirlenen koşullarda 16 aya kadar saklanmıştır. Ardından biyolojik örneklerde sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kan belirteci olarak miRNA-144, miRNA-451 ve miRNA-16 miRNA’ları ile internal kontrol olarak SNORD48 kullanılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen miRNA ekspresyon seviyelerinin istatistiksel değerlendirmeleri SPSS version 27 ile yapılmıştır. Betimsel analizler ve görselleştirmeler için rstatics ve ggplot2 paketleri kullanılmıştır.

Çalışmada taze kan örneklerinde elde edilen Ct değerleri oda sıcaklığı (22-25°C) ve -20°C’de bekletilen örneklerden elde edilen Ct değerleri ile karşılaştırıldığında; test edilen her üç miRNA ifade düzeyinin 8. aydan sonra azaldığı, özellikle 16 aya kadar bekletilen örneklerde bu düzeyin daha da düştüğü ve taze örneklerle karşılaştırıldığında ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğu görülmüştür. Kontrol gen olarak kullanılan SNORD48’in ise test edilen ortam koşullarındaki ifade düzeyleri arasında anlamlı farklılıklar oluşmadığı ve adli amaçlı miRNA analizinde referans gen olarak kullanılabileceği saptanmıştır.

Bu sonuçlar seçilen miRNA’ların -20°C’de stabil kalmasına karşın, oda sıcaklığında zamana bağlı stabilitesinin önemli ölçüde bozulduğunu, olumsuz çevresel koşullara maruz kalmış adli kan örneklerinin tanımlanmasında dikkatle kullanılması gerektiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Adli, RNA degradasyonu, miRNA, kan identifikasyonu, miRNA stabilitesi

ABSTRACT

INVESTIGATION of THE POTENTIAL of VARIOUS microRNA (miRNA) BIOMARKERS of THE IDENTIFICATION of BLOOD

In the context of forensic science, identifying the source of body fluids left at a crime scene is crucial for reconstructing the events that took place. Traditional and literature-based methods for body fluid identification-particularly serology-based techniques-are often limited by factors such as sample consumption, labor intensity, time requirements, varying sensitivity levels, and lack of specificity. While DNA-based methods are prominent in personal identification, RNA-based approaches have gained importance in the identification of body fluid types, which is a key parameter for crime scene reconstruction. Literature reviews indicate that microRNAs are more resistant to degradation and exhibit greater stability under environmental stressors. These characteristics suggest that microRNAs hold significant potential in forensic applications. However, comprehensive studies on miRNA stability in forensic contexts remain limited.

The aim of this study was to investigate the time-dependent stability of miR-144, miR-451, and miR-16 miRNAs, as well as SNORD48, in blood stains stored at room temperature (22–25°C) and at –20°C. For this purpose, blood samples were collected from six different volunteers and stored for up to 16 months under defined conditions. Subsequently, RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) were performed on the biological samples. In the study, miR-144, miR-451, and miR-16 miRNAs were used as target markers, while SNORD48 was used as an internal control. Statistical evaluations of the miRNA expression levels obtained at the end of the study were conducted using SPSS version 27. Descriptive analyses and visualizations were performed using the R packages rstats and ggplot2.

When the Ct values obtained from fresh blood samples were compared with those stored at room temperature (22–25°C) and –20°C, it was observed that the expression levels of all three miRNAs significantly decreased after the 8th month. This decrease was more pronounced in samples stored for up to 16 months and was statistically significant compared to fresh samples. Significant statistical differences were observed between the expression levels, particularly for the internal control SNORD48, depending on the storage conditions. These results indicate that SNORD48 a reliable reference gene for miRNA analysis in degraded samples.

Although the selected miRNAs remained stable at –20°C, the results indicate that in case of storage at room temperature, miRNA expression is negatively affected due to degradation or exposure to environmental factors. Therefore, careful consideration should be given to the use of blood samples in miRNA analysis and identification processes.

Keywords: Forensic, RNA degradation, miRNA, blood identification, miRNA stability

1. GİRİŞ

Adli bilimler, suçun çözümünde bilimsel yöntemlerin uygulanmasını sağlayarak adaletin sağlanmasına katkı sunan bir multidisipliner alandır¹. Bu alanda, olay yerinin rekonstrüksiyonu ve vücut sıvılarının analizi önemli bir rol oynamaktadır². Olay yeri rekonstrüksiyonu, suçun nasıl gerçekleştiğini anlamak için olay yerinin detaylı bir şekilde yeniden oluşturulmasını içerir³. Bu süreç, fiziksel kanıtların toplanması, analizi ve yorumlanması aşamalarını kapsar. Vücut sıvıları, özellikle kan, semen, tükürük ve idrar, suç mahallinde önemli bilgiler sunar⁴. Bu sıvıların analizi, suçlunun kimliğinin belirlenmesine, olayın zamanlamasına ve kurbanın durumuna dair önemli ipuçları sağlar. Örneğin, kan lekeleri, kurbanın pozisyonu ve olayın zamanlaması gibi faktörler, suçun dinamiklerini aydınlatılabilir⁵. Ayrıca, olay yerinin düzeninin ve kanıtların konumunun doğru bir şekilde belgelenmesi, gelecekteki soruşturmalar için önemli bir referans oluşturur³. Bu süreçte olay yerinde bulunan vücut sıvılarının tanımlanması da olay yerinin yeniden canlandırılmasına önemli katkı sunabilir^{6,7}.

Kan, semen, tükürük ve idrar gibi sıvılar, suç mahallinde bulunan biyolojik örneklerdir. Bu sıvıların analizi hem kurbanın hem de şüphelinin kimliğinin belirlenmesine yardımcı olur. Olay yerinde bulunan kan örneklerinde, DNA analizleri ile bireylerin kimliği belirlenebilir iken vücut sıvılarının analizi, aynı zamanda olayın niteliği ve zamanlaması hakkında bilgi verebilmektedir. Örneğin, kanın varlığı bir yaralama ya da cinayet olayına dair ipucu ortaya koyabilirken, kanın koagülasyonu, olayın ne zaman gerçekleştiğine dair ipuçları sunabilir^{8,9}.

Bu nedenle kan örneklerinin identifikasyonu, adli bilimlerde önemli bir aşamadır. Adli amaçlı kanın tanımlanmasında kullanılan geçmişten günümüze çeşitli klasik ve güncel yöntemler bulunmaktadır. Hemoglobin ve hemoglobin türevlerinin gösterilmesine dayalı klasik yöntemlerde hemoglobin varlığı serolojik, immünolojik ve immunokromotik yöntemlerle araştırılmaktadır. Çok uzun süredir kullanımda olan klasik yöntemler hızlı, hassas, uygulama kolaylığı olması ve uzun süreli deneyim avantajı nedeniyle halen rutinde yaygın olarak kullanılmaktadır^{1,9,10}.

Bununla birlikte, bu testlerin çapraz reaksiyon, düşük tekrarlanabilirlik ve yanlış pozitiflik gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Ayrıca özellikle olay yerinde az veya eser miktarda bulunan biyolojik delillerin analizinde işlevsiz kalmaktadır⁹. Günümüzde

mRNA ve miRNA analizine dayalı güncel vücut sıvı tanımlayıcıları ile bu sorunların üstesinden gelebilme potansiyeli bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda doku/vücut sıvılarının ayrımının yapılabileceği doku spesifik mRNA/miRNA belirteçlerinin varlığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda ayrıca olay yerinden elde edilen az ve/veya eser miktardaki örneklerin hem kimliklendirme açısından DNA analizlerinin hem de vücut sıvısının belirlenmesi açısından mRNA/miRNA analizlerinin aynı anda yapılabileceği de ortaya koyulmuştur. Böylece delil materyalinden örnek kaybı azaldığından minimum örnekten maksimum verim alabilme olanağı doğmuştur^{11,12}. RNA temelli analizlerin avantajlarının yanı sıra, bazı dezavantajlarının da bulunduğu rapor edilmiştir. Özellikle güneş ışığı, nem, yüksek sıcaklık, yağmur gibi çevresel etkenlere maruz kalan biyolojik materyallerde hedef RNA moleküllerinin stabilitesi bozulmaktadır. Bu olumsuz koşullardan doğal olarak moleküler büyüklüğü miRNA moleküllerine göre daha büyük olan mRNA'lar daha fazla etkilenmekle birlikte miRNA molekülleri de etkilenmektedir. Bu nedenle adli amaçlı kullanılacak bu tip belirteçlerin rutin adli kullanıma geçmeden önce zamana ve çeşitli çevresel koşullara dayanıklılığının deneysel olarak test edilmesi gerekmektedir¹³.

Bu nedenle bu çalışmada kan belirteci olarak kullanılabileceği bildirilen miRNA belirteçlerinden miR-451, miR-144 ve miR-16'nın oda sıcaklığı (22-25°C) ve -20°C'de 16 aya kadar saklanmış kan örneklerinde stabilitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanın Biyolojik Özellikleri

Kan, adli biyolojide en önemli biyolojik delillerden biridir. Vücut ağırlığının yaklaşık %7-8'ini oluşturan kan, temel olarak **plazma**, **eritrositler (alyuvarlar)**, **lökositler (akyuvarlar)** ve **trombositlerden (plateletler)** meydana gelir.

Plazma, %90'ı sudan oluşan, protein, elektrolit, hormon ve atık maddeler gibi çözülmüş moleküller içeren kanın sıvı kısmıdır. Hücrelerin taşınması ve homeostazın sağlanmasında rol oynar.

Eritrositler, oksijen taşıyan hücrelerdir. İçerdikleri **hemoglobin**, hem oksijen bağlayarak yaşam fonksiyonlarını sürdürür hem de kan lekesi analizlerinde temel hedef moleküldür. Hemoglobin sayesinde kan tespiti için renk reaksiyonları veren birçok test geliştirilebilmiştir (örneğin Kastle-Meyer testi).

Lökositler, bağışıklık sisteminin çekirdekli hücreleridir. Çekirdek içermeleri nedeniyle DNA kaynağı olarak önemli delil sağlarlar. DNA profili çıkarma işlemlerinde bu hücreler kritik rol oynar.

Trombositler, pıhtılaşma mekanizmalarında yer alır. Çekirdeksiz olmaları nedeniyle DNA içermezler, ancak pıhtı oluşumu nedeniyle kanın yayılım biçimini etkileyebilirler.

Kan, aynı zamanda **kan lekesi desen analizi (bloodstain pattern analysis)** ile olay yeri yeniden yapılandırılmasında da kullanılır. Damlama yönü, hızı, açısı ve hacmi gibi faktörler, fiziksel olay akışına dair bilgi verir.

Adli biyoloji açısından, kan sadece DNA kaynağı değil, aynı zamanda olay yeri analizlerinde yönlendirici kanıttır. Ayrıca güncel teknolojilerle RNA temelli analizler de yapılmakta; örneğin mRNA veya miRNA kullanılarak kanın varlığı ya da doku tipi saptanabilmektedir.

Adli bilimlerde kanın identifikasyonu, özellikle cinayet, saldırı ve cinsel suçlar gibi vakalarda delil niteliği taşır. Kanın varlığının tespiti ve kaynağının belirlenmesi, adli soruşturmaların yönlendirilmesinde hayati bir rol oynar. Geleneksel yöntemlerden modern moleküler tekniklere kadar birçok yaklaşım, kan identifikasyonu için kullanılmaktadır¹⁴. Morfolojik inceleme, immünolojik inceleme, mRNA incelemesi ve miRNA incelemesi gibi yöntemlerin güncel uygulamaları, avantajları ve dezavantajları

karşılaştırmalı olarak ele alınacaktır.

2.2. Kanın Tanımlanması

Kan, insan vücudunun temel bileşenlerinden biridir ve birçok alanda önemli bir role sahiptir. Kanın doğru şekilde tanımlanması ve analiz edilmesi, tıp, adli bilimler, kan bağışısı süreçleri ve diğer birçok alanda hayati öneme sahiptir.

Kanın identifikasyonu için birçok farklı yöntem mevcuttur. Bu yöntemler arasında kan grubu tespiti, DNA analizi, kan hücrelerinin morfolojik özelliklerinin incelenmesi ve immünolojik testler bulunmaktadır.

Kanın doğru biçimde tanımlanması ve analiz edilmesi, çeşitli disiplinlerde kritik öneme sahiptir. Tıbbi alanda, doğru kan grubunun belirlenmesi ve uyumlu kan transfüzyonlarının yapılması, hastaların hayatını kurtarabilir. Ayrıca, kan örneklerinden elde edilen DNA analizi, genetik hastalıkların tanısında ve kişisel tanı tıbbında kullanılabilir¹⁵.

Adli bilimlerde, kanın identifikasyonu, suç mahalli delillerinin incelenmesi ve suçluların tespiti için önemlidir. Örneğin, bir suç mahallinde bulunan kan örneği, DNA analizi kullanılarak şüphelilerle eşleştirilebilir ve suçun çözülmesine yardımcı olabilir⁹.

2.2.1 Adli Amaçlı Kan Tespiti İçin Kullanılan Geleneksel Yaklaşımlar

Adli biyolojide, kanın tespiti olay yeri incelemesi ve failin tanımlanması açısından kritik öneme sahiptir. Bu amaçla kullanılan serolojik testler hem klasik hem de modern moleküler yöntemleri kapsar. Kanın tanımlanmasında kullanılan serolojik testler ön tarama ve doğrulama testleri olmak üzere ikiye ayrılır¹⁴.

1. Ön Tarama Testleri

Ön tarama testler, kanın varlığına dair hızlı ve duyarlı tarama sağlar ancak başka maddelerle çapraz reaksiyon verebildikleri için yalancı pozitif riski taşır. Genellikle olay yerinde uygulanır ve pozitif bulgular laboratuvar doğrulama testleriyle desteklenmelidir. Ön tarama testleri oksidasyon redüksiyon reaksiyonuna dayalı renk testleri ve kemilüminesans testlerden oluşmaktadır¹⁴.

A. Oksidasyon-Redüksiyon Esaslı Renk Testleri

Bu testlerde, kanın içindeki hemoglobin demirinin peroksidaz benzeri aktivitesi

temel alınır. Hidrojen peroksit varlığında renk değişimi gözlenir¹⁴.

- **Kastle-Meyer (Fenolftalein) Testi:** Renk göstergesi olarak alkali ortamda fenolftalein kullanılır. Hemoglobin varlığında pembe renk oluşur. En yaygın kullanılan testtir. 1:10.000 oranında seyreltik kanı bile saptayabilir. Ancak bazı sebzelerin suyu ve metal yüzeyler yalancı pozitifliğe neden olabilir.
- **Leucomalachite Green (LMG):** Hemoglobinle yeşil-mavi renk verir. Kullanımı kolay ve maliyeti düşüktür.
- **Benzidin ve türevleri:** Geçmişte yaygın olarak kullanılan bu yöntem, kanserojen etkileri nedeniyle günümüzde kullanım dışı bırakılmıştır.

B. Kemilüminesans ve Floresan Testleri

Bu testler, kanla temas ettiğinde ışık yayan kimyasal reaksiyonlara dayanır¹⁴.

- **Luminol:** En çok bilinen kemilüminesans ajandır. Demir varlığında mavi ışık yayar. Karartılmış ortamlarda kullanılır ve kan silinmiş olsa dahi tespit edebilir. Ancak çamaşır suyu, pas ve bazı temizlik ürünleri de yalancı pozitiflik yaratabilir.
- **Bluestar®:** Luminol'e benzer ama daha güçlü ışık verir, fotoğraf çekimi daha uygundur. Luminol'ün sınırlamalarını büyük ölçüde aşar.
- **Fluorescein:** Peroksit ile aktifleşir ve UV altında parlama yapar. Kanın akış yönünü ve sürüklenme izlerini ortaya çıkarmada etkilidir.

2. Doğrulayıcı Testler

Pozitif ön tarama testlerinden sonra uygulanan bu testler, kanın varlığını ve bazen insan kaynaklı olup olmadığını doğrular. Yargı süreçlerinde kabul gören kanıtlar arasında yer alırlar¹⁴.

A. Kristalizasyon Testleri (Mikrokrizal Testler)

Bu klasik testler, kanın içindeki hem moleküllerinin kristalleşme özelliğinden faydalanır.

- **Takayama Kristal Testi:** Glukoz çözeltisi ve alkali ortamda pembe renkli kristaller oluşur. Mikroskopla incelenerek pozitiflik doğrulanır. Bir dönem yaygın olarak kullanılan bir testtir.
- **Teichmann Testi:** Asetik asit ve tuzla yapılan testte kahverengi demir-porfirin kristalleri oluşur. Daha az duyarlıdır.

Avantajları düşük maliyet ve kolay uygulama olsa da taze kanla daha iyi sonuç verir, bozulmuş örneklerde duyarlılığı düşer¹⁴.

B. İmmünolojik (Antijen–Antikor) Testler

Bu testler, yalnızca insan kanını tespit etmeyi amaçlar. Hemoglobine özgü antikorlarla çalışırlar¹⁴.

- **Immunokromatografik testler (örneğin Hexagon OBTI):** Kanda insan hemoglobini varsa test çizgisi oluşur. Tek kullanımlık kitler hâlinde sunulur, olay yerinde bile uygulanabilir.

C. Spektrofotometrik ve Mikroskobik Analizler

- **Spektrofotometri:** Hemoglobin ve türevlerinin ışık absorpsiyon eğrileri temel alınarak kan varlığı doğrulanabilir.
- **Mikroskopi:** Kan lekelerinden hücre kalıntıları ve hem pigmenti direkt olarak gözlenebilir. Ancak yapısal bozulma varsa duyarlılığı azalır¹⁴.

Kan Tespitinde Kullanılan Yeni Nesil Yöntemler- RNA Bazlı Yaklaşımlar

Adli biyolojide vücut sıvılarının doğru bir şekilde tanımlanması, olay yeri analizlerinde şüpheli, mağdur ve mekan arasındaki bağlantıyı kurmak açısından kritik öneme sahiptir. Kan lekeleri genellikle olay yerinde en sık rastlanan biyolojik materyallerden biridir. Ancak bu lekelerin gerçekten kana ait olup olmadığını

belirlemek, klasik kimyasal testlerle her zaman güvenilir sonuçlar vermez. Bu nedenle moleküler biyolojiye dayanan yeni yöntemler, özellikle mRNA ve miRNA temelli yaklaşımlar, adli bilimlerde önemli bir yere sahip olmaya başlamıştır.

Son yıllarda RNA bazlı testler de adli biyolojiye entegre olmuştur. Özellikle **mRNA ve miRNA belirteçleri**, mevcut vücut sıvısının türünün ve kaynağının belirlenmesinde kullanılmaktadır¹⁴.

1. mRNA (Messenger RNA) Temelli Yöntemler

mRNA, DNA'dan transkribe edilen ve protein sentezinde görev alan kodlayıcı RNA'ları temsil eder. Her hücre tipi, kendine özgü bir gen ekspresyon profiline sahip olduğu için, belirli mRNA'lar sadece belli hücrelerde veya vücut sıvılarında bulunur. Bu özellik, mRNA'ları **doku ve vücut sıvısı özgül biyobelirteçler** haline getirir¹⁴.

Kan identifikasyonunda kullanılabileceği belirtilen belirteçlerden birkaçı aşağıda belirtilmiştir:

- **ALAS2 (5-aminolevulinate synthase 2):** Bu gen, sadece eritroid hücrelerde eksprese edilir ve hem sentezinin ilk basamağında görev alır. Bu yüzden, ALAS2 transkriptinin tespiti, doğrudan eritrositlerin ve buna bağlı olarak kanın varlığına işaret eder.
- **HBB (Hemoglobin Subunit Beta):** Hemoglobinin β -zincirini kodlar ve sadece olgun kırmızı kan hücrelerinde eksprese edilir. HBB varlığı da güçlü bir kan göstergesidir.
- **GYP A (Glycophorin A):** Eritrosit zarına özgü transmembran proteinini kodlar. İnsan kan hücrelerine spesifik olması nedeniyle hem tür tanımlaması hem de kan doğrulaması için kullanılır.

Bu mRNA'ların kullanımı genellikle **ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)** veya **gerçek zamanlı PCR (qPCR)** işlemi uygulanabileceği gibi, hedef mRNA belirteçlerine spesifik floresan işaretli primerler ile son nokta PCR işlemi de yapılabilir. Bu yöntemlerle kanın varlığı yüksek özgüllük ve duyarlılıkla belirlenebilir. Ayrıca mRNA profili sayesinde **kan lekesinin hangi canlıya ait olduğu** (örneğin insan mı hayvan mı) da ayırt edilebilir¹⁴.

mRNA'ya dayalı yaklaşımların doku özgüllüğü, insan-hayvan kanı ayırt edici özelliği ve taze örneklerde güvenle kullanılabileceği gibi avantajları bildirilirken, ısı, sıcaklık, UV, enzimatik degradasyon gibi çevresel etkilere karşı duyarlı olması nedeniyle eski olay yeri örneklerinde kullanımının sınırlı olabileceği belirtilmektedir¹⁴.

2. miRNA (MicroRNA) Temelli Yöntemler

miRNA'lar, yaklaşık 18–24 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan, gen ekspresyonunu düzenleyen küçük RNA molekülleridir. Spesifik hücre ve doku tiplerinde eksprese edilen miRNA'lar, özellikle adli analizlerde mRNA'lara kıyasla birkaç önemli avantaja sahiptir.

miRNA'ların özellikle bozulmuş örneklerde kan tespiti açısından büyük potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir. Küçük yapıları ve çift zincirli RNA'yı parçalayabilen ribonükleaz (RNaz) enzimlerine karşı görece dirençleri, onları çevresel olarak zorlu örneklerde bile analiz edilebilmesine olanak tanımaktadır. Adli amaçlı vücut sıvılarında miRNA kullanımının potansiyel avantaj ve dezavantajları altta aktarılmıştır: Avantajları: miRNA'lar çok küçük boyutlara sahip oldukları için bozulmaya karşı oldukça dirençlidirler. Formalinle sabitlenmiş doku örneklerinden dahi izole edilebilirler. mRNA'ya kıyasla daha kararlı olup çevresel stres faktörlerine karşı dayanıklıdır. Dezavantajları: miRNA'ların spesifiklik düzeyi mRNA kadar net değildir; çünkü bazı miRNA'lar farklı sıvılarda da bulunabilir. Ayrıca, diğer doku ve sıvılarda çapraz ekspresyon riski bulunmaktadır.

Kan için aday miRNA belirteçlerinden birkaçı şunlardır:

- **miR-451:** En çok eritrositlerde eksprese edilen miRNA'dır. miR-451, kan tespiti için kullanılan en güçlü miRNA belirteçlerinden biridir. Aynı zamanda kan lekesinin zamanla bozulma derecesine karşı dirençlidir.
- **miR-144:** Hematopoietik kök hücreler ve kırmızı kan hücrelerinde yüksek oranda bulunur. miR-451 ile kullanıldığında kanın tanımlanmasında özgüllüğü artırır.
- **miR-16:** Her ne kadar çok sayıda hücrede eksprese edilse de kandaki bolluğu nedeniyle genellikle referans miRNA olarak kullanılır. Diğer

miRNA ekspresyon düzeylerini normalize etmek için uygundur.

Yapılan çalışmalarda kanın tanımlanmasında kullanılabilecek potansiyel mRNA ve miRNA belirteçleri Tablo 2.1’de aktarılmıştır.

Tablo 2.1.Kanın tanımlanmasında kullanılabilecek potansiyel RNA belirteçleri¹⁴

Belirteç	Tip	Tanımlanan Doku / Vücut Sıvısı	Fonksiyonu / Ekspresyon Özelliği	Adli Kullanım Amacı	Avantajlar	Dezavantajlar
ALAS2	mRNA	Kan (eritrosit)	Hem sentezinde görevli; eritroid hücrelere özgü	Kanın varlığını doğrulamak	Yüksek özgüllük	RNA bozulmasına duyarlı
GYPA	mRNA	Kan hücreleri (eritrosit zarı)	Glikoforin A proteini kodlayan gen	İnsan kanı tanımlaması	İnsan spesifik	mRNA bozulabilir
HBB	mRNA	Kan (hemoglobin β alt birimi)	Hemoglobin yapısında bulunur	Kanın genetik temelli doğrulanması	Yüksek sinyal	Bozulmaya duyarlı
SPTBN1	mRNA	Kan	Hücre iskelet proteini	Kan belirteci olarak destek	Spesifiklik orta	Farklı dokularda da görülebilir
miR-451	miRNA	Kan (eritrosit)	Eritrositlerde yüksek oranda bulunur	Kan lekesi tespiti ve yaş tayini	Küçük, stabil molekül	Diğer hücrelerde düşük miktarda olabilir
miR-144	miRNA	Kan / hematopoietik doku	Hematopoietik ekspresyon, eritrosit ile bağlantılı	Kan spesifikliği için destek belirteç	Stabil ve kan seçici	Diğer dokularla çapraz ekspresyon ihtimali
miR-16	miRNA	Kan, plazma	Çoklu hücre tiplerinde referans gen olarak kullanılır	Normalize etme, kontrol olarak kullanılır	Çok stabil, referans belirteç	Kan dışı dokularda da var
SNORD48	snoRNA	Tüm hücreler	Küçük nükleolar RNA; gen ekspresyon düzeylerini normalize eder	Kontrol geni / internal referans	Çok stabil, RNA tahlillerinde yaygın	Doku spesifikliği yok

Gelişen teknolojilerle birlikte klasik serolojik testlerin yerini daha spesifik ve moleküler tabanlı testlerin alması beklenmektedir. Ancak hâlen sahada ve laboratuvarında, fenolftalein ve luminol gibi klasik testler kullanılmaya devam etmektedir.

2.3. miRNA'nın tarihçesi

miRNA'lar yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda küçük kodlama yapmayan tek iplikli RNA molekülleridir. miRNA'nın 5' uçlarında bir üridin bulunmaktadır ve 3' uçları mRNA'nın çevrilmemiş bölgeleri ile kısmen tamamlayıcıdır. miRNA, Argonaute (AGO) protein kompleksi ile beraber mRNA'nın deadenilasyonu, degradasyonu veya translasyonun baskılanmasına neden olmaktadır¹⁶.

Günümüzde hemen hemen tüm hayvan model sistemlerinde tespit edilen miRNA ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'da gözlenmiştir¹⁷. İkinci miRNA 2000 yılında keşfedilmiştir ve türler arasında korunduğu bulunmuştur¹⁸. Bu bulgu, miRNA keşif çalışmalarını hızlandırmıştır ve kısa süre sonra *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* ve insan genomlarında çok daha fazla miRNA bulunmuştur^{17,19,20} ve canlılarda en çok bulunan küçük RNA'dır. Organizmada bulunan miRNA sayıları organizmanın karmaşıklığı ile ilişkilendirilmiştir²¹. Memeli miRNA'larının tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'unu düzenlediği bilinmektedir²². Birden fazla miRNA'nın aynı mRNA'yı hedeflemesi nedeniyle miRNA ve mRNA ekspresyon düzeyleri arasında doğrusal bir korelasyon gözlemlenmektedir²³.

2.4. miRNA'ların isimlendirilmesi

Bir miRNA adının ilk üç harfi, bulunduğu türleri göstermektedir. Örneğin, insan, fare ve sıçan miRNA'ları sırasıyla hsa-, mmu- ve rno- şeklinde adlandırılacaktır. Bilgiler, 'mir' veya 'miR'deki 'r' harfinin büyük / küçük olmasıyla kodlanmaktadır. Örneğin, hsa-mir- gibi küçük harfli bir 'r' ile etiketlenmiş bir sekans, birincil transkriptin miRNA genine ve / veya tahmin edilen stem-loop kısmına karşılık gelmektedir. Büyük bir 'R', hsa-miR ise olgun miRNA'ları göstermektedir.

Genlerin sahip olduğu tanımlayıcı adların aksine, miRNA'lar basitçe sıralı olarak adlandırılmaktadır. Örneğin, son yayınlanan yeni insan miRNA'sı hsa-miR-400 ise, bir sonraki yayınlanan insan miRNA'sı hsa-miR-401 olarak adlandırılır. Bununla birlikte, fareden bir miRNA, hsa-miR-400 ile aynı sekansta bulunursa, şimdiye kadar sadece 200 fare miRNA atanmış olsa bile, mmu-miR-400 olarak adlandırılacaktır.

Bunlara ek olarak miRNA'lar dizinin hangi ucunda bulunduğuna göre isimlendirilmektedir. Örneğin, 3'miRNA hsa-miR-400-3p ve 5'miRNA hsa-miR-400-5p olarak adlandırılacaktır. Yakından ilişkili miRNA'ları belirtmek için ada daha fazla

son ek eklenebilmektedir. Örneğin, hsa-miR-XXa ve hsa-miR-XXb, sadece bir veya iki nükleotit farklı dizilere sahip miRNA'ları gösterecektir. Aynı olan, ancak farklı genlerden kopyalanan ve dolayısıyla farklı bir öncü sekansa sahip olgun miRNA sekanslarını göstermek için numaralandırılmış bir son ek atanabilmektedir. Bunun bir örneği, hsa-miR-XX-1 ve hsa-miR-XX-2 olarak adlandırılan özdeş olgun miRNA'lardan işlenmiş miRNA'lar hsa-mir-XX-1 ve hsa-mir-XX-2 şeklinde adlandırılmaktadır²⁴.

Yukarıdaki kuralların istisnaları vardır. Örneğin, bitkiler ve viral miRNA'lar biraz farklı adlandırma kurallarına sahiptir. Ayrıca, bazı miRNA'lar let-7 ve lin-4 gibi tarihsel nedenlerle sayısal olmayan isimlerini korumuştur. Bu nedenlerden dolayı, isimlerinden alıntı yapmak yerine miRNA erişim numaraları her zaman sabit kalır, bu nedenle daha iyi bir referans görevi görmektedirler²⁴.

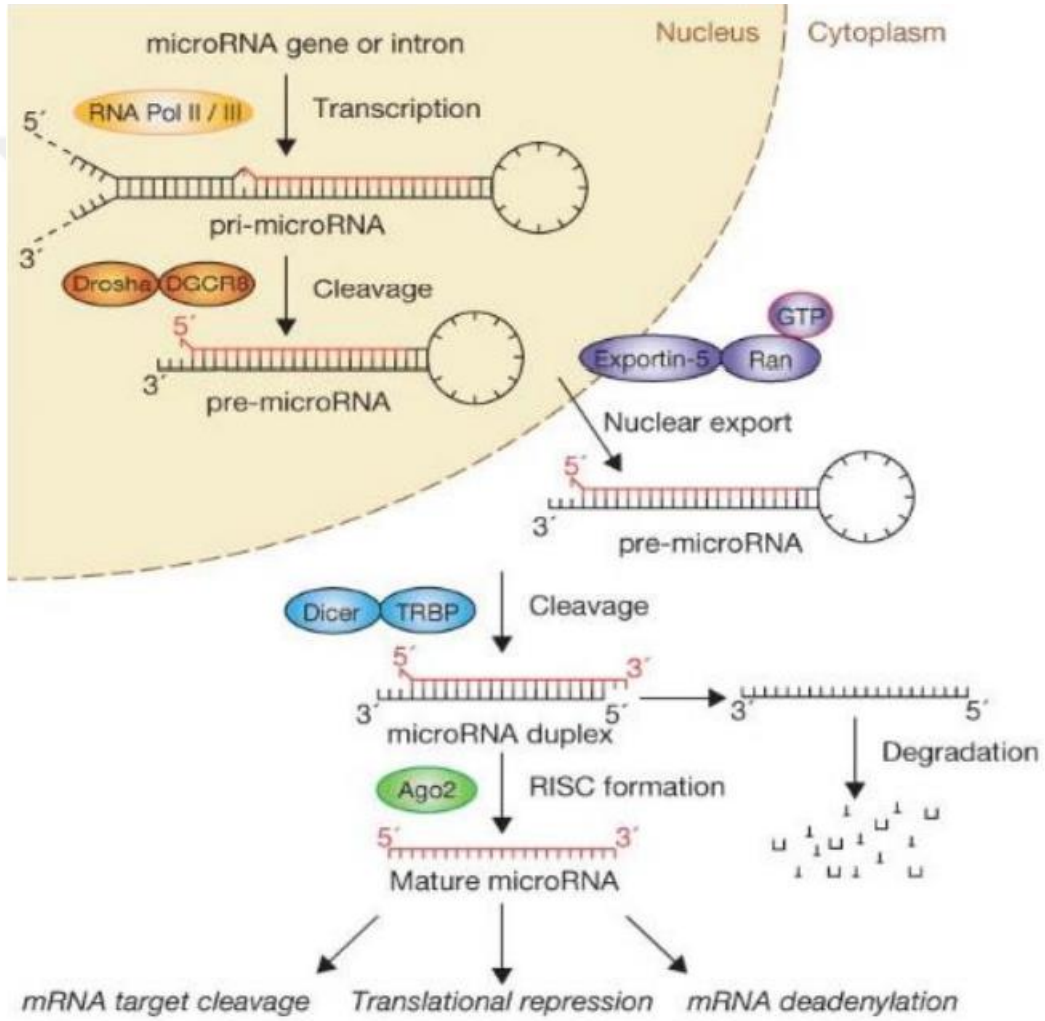
2.5. Mikrorna'nın Oluşum ve Etki Mekanizması

miRNA'lar üç aşamalı ardışık bir süreç sonucunda oluşur.

1. miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu şekillenir.
2. Pri-miRNA'lar nükleus içerisinde prekürsör miRNA (Pre-miRNA)'lara dönüştürülür.
3. Pre-miRNA'lar sitoplâzma içerisinde olgunlaşmış miRNA'lara dönüştürülür²⁵. miRNA'lar ilk olarak kromozomlardan RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlenirler. Pri-miRNA adı verilen bu miRNA birkaç kb (kilobaz) uzunluğundadır. Cap (şapka) ve Poly (A) kuyruğuna sahip olup Hairpin (saç tokası) şeklindedir. Pri-miRNA'lar nükleusta, microprocessor (mikroişlemci) kompleksi olarakta adlandırılan ve bir endonükleaz olan drosha ve bunun kofaktörü olan pasha (DGCR8) tarafından kesime uğrar. Böylece pri-miRNA'nın hairpin yapısındaki iki başı tarafından kesilir ve 60-120 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA oluşturulur²⁶. Daha sonrasında bu pre-miRNA sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada RNAaz III enzimlerinden endonükleaz Dicer protein kompleksi ile kesime uğratılır. Bu kesim sonucunda 18-24 nükleotid

uzunluğunda çift zincirli miRNA oluşturulur²⁷.

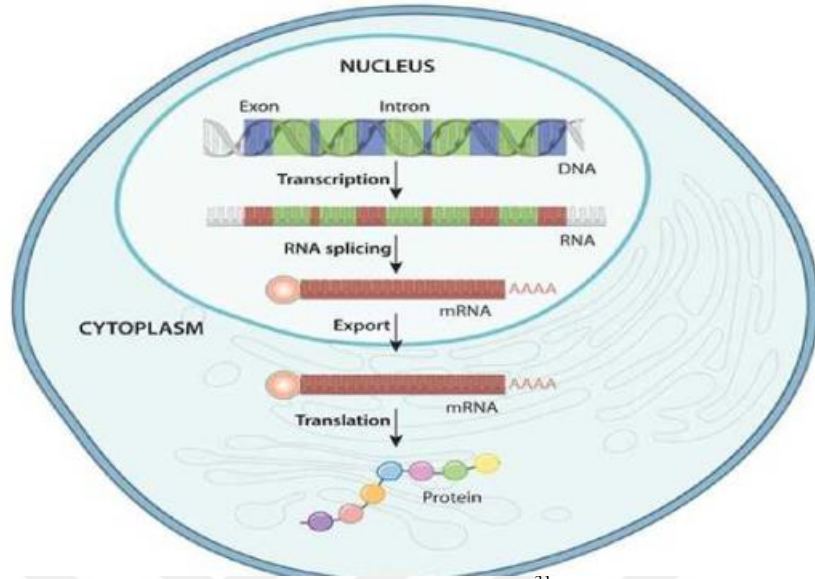
Oluşturulan bu çift iplikli yapı daha sonra helikaz enzimi vasıtası ile açılır ve RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RISC) olarak adlandırılan Argonaute 2 (AGO2) ailesi proteinlerinden oluşan kompleks bir yapıya katılır. Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Sonuç olarak yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda olgunlaşmış miRNA’lar oluşturulmuş olur²⁸.



Şekil 2.1. miRNA'nın biyogenezi ve oluşum mekanizması²⁹.

DNA üzerinde bulunan genlerin kodlanarak hazır hale gelmiş bilgiyi protein gibi işlevsel mekanizmalara dönüştürmesi gen ifadesi veya gen ekspresyonu olarak adlandırılır. Şekil 2.2 de gösterilmiştir. Genel olarak ökaryotik organizmalarda gen ekspresyonunun düzenlenmesi transkripsiyon ve tranlasyon adı verilen iki aşamada

gerçekleşir. Transkripsiyon aşamasında DNA’da var olan bilgi RNA mesajlarına dönüştürülür. Translasyon aşamasında ise bu mesajlar işlenerek aktif hale gelir³⁰.



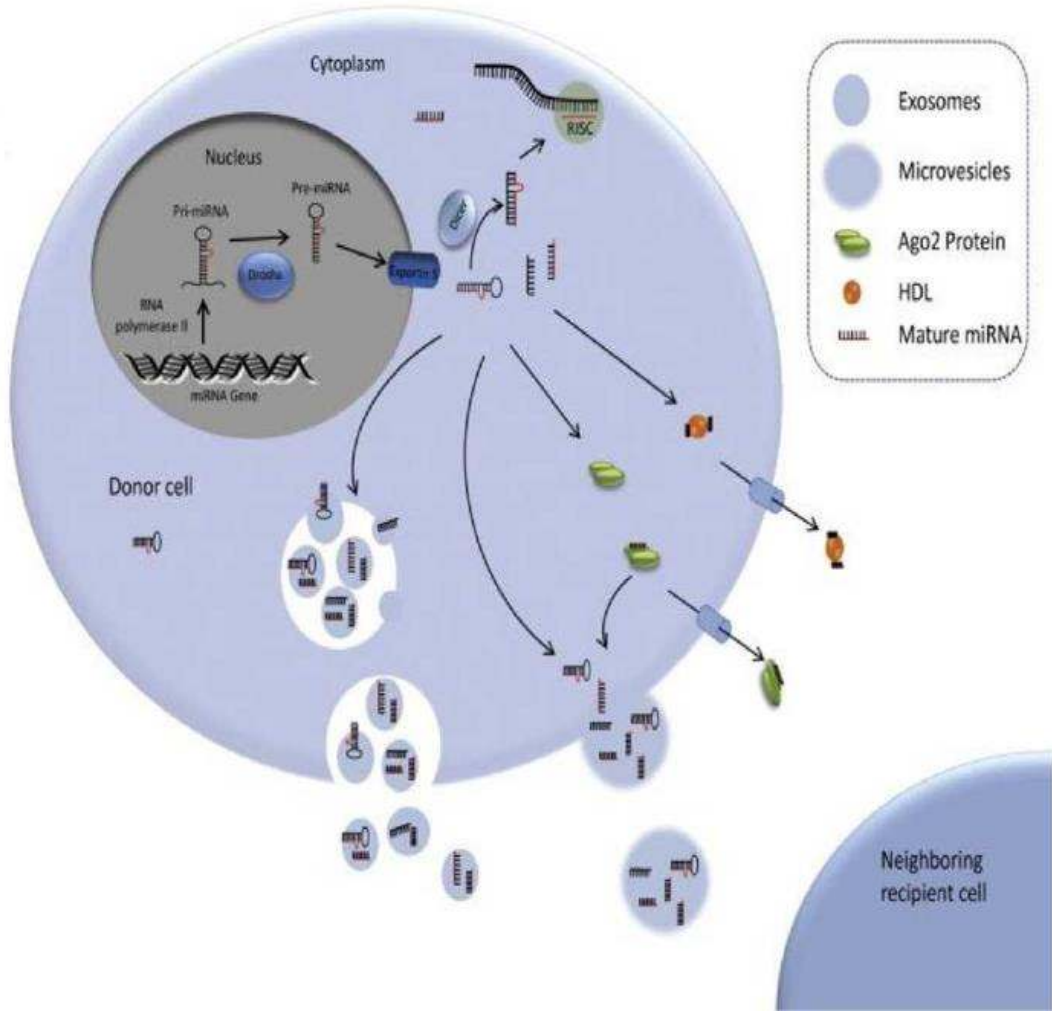
Şekil 2.2. Gen ekspresyonun şekil üzerinde gösterimi³¹

Olgunlaşmasını tamamlamış miRNA’lar gen ekspresyonunda iki esas mekanizma ile etkilerini gösterirler;

1. mRNA’nın yıkımı
2. Translasyonel baskılama

Olgun miRNA’ya bağlı olan RISC ile hedef seçilen mRNA da tam eşleşme ve bütünleyicilik sağlanıyorsa mRNA’nın poly(A) kuyruğu deadenilasyona uğrar bu da RNA’nın yıkımı ile sonuçlanır. Şekil 2.3 de gösterilmiştir. RISC ile hedef mRNA arasında tam bir eşleşmenin olmadığı ve komplementerlik durumunun düşük olduğu durumlarda mRNA’nın şapka yapısının değişmesine bağlı olarak translasyonun başlaması baskılanmış olur²².

Yine miRNA’da bulunan RISC’ in bağlanılan mRNA’ da oluşturduğu etki ile polipeptid zincirleri proteolize uğrayabilir. RISC bağlandığı mRNA’dan ribozomların erken ayrılmasını ve peptid sentezinin yavaşlamasını sağlayabilmektedir²².



Şekil 2.3. miRNA'ların hücre dışı ortama salınması³²

2.6. Mikro RNA'ların fonksiyonları

miRNA'ların çoğunluğu hücre içerisinde bulunmaktadır. Ancak dolaşımdaki miRNA'lar veya hücre dışı miRNA'lar olarak adlandırılan kan, göz yaşı, tükürük, bos sıvısı ve süt gibi farklı vücut sıvılarında görev alan miRNA'lar da mevcuttur³³. Bu miRNA'lar bazı vücut sıvılarının içeriğinde bulunan RNaz gibi enzimlerin zararlı etkilerinden korunmak için eksozomlar gibi lipid yapısına sahip mikroveziküllerin içerisinde paketlenmişlerdir. Bazı miRNA'larda bu etkilerden korunmak için HDL gibi lipoproteinlerle birleşerek çeşitli kompleks yapılar oluşturmuştur³⁴.

miRNA'lar hem gelişimsel dönemde hem de hücresel süreçlerde gen ekspresyon mekanizmasının düzenlenmesinde etkilerini gösterirler. Etkilerini gen ekspresyonunu aktive ederek veya baskılayarak oluşturabilir. Dolayısıyla miRNA'lar hücre proliferasyonu, hücre bölünmeleri, doku gelişimi, apoptozis, DNA onarımı, immün

yanıt ve viral enfeksiyonlar gibi geniş bir etki alanı içerisinde fonksiyon gösterirler³⁵. miRNA'ların etkili olduğu bazı alanlar şunlardır;

2.6.1. Sinir sistemi ve miRNA'lar

Fiore ve ark.³⁶, miRNA'ların sinir sisteminde oldukça bol sayıda bulunduğunu beynin gelişimi, nöronlardaki farklılaşma, sinaps oluşumu ve nöronlarda ilerleyen kayıplara ve yapısal bozulmalarda neden olan bazı hastalıkların biyolojik fonksiyonlarında önemli rollerinin olduğunu belirtmişlerdir³⁷.

Çalışmalar miRNA'ların yalnızca embriyonik kök hücrelerin hayatta kalması ve farklılaşması için gerekli olmadığını, aynı zamanda olgun nöronların hayatta kalmasını ve işlevlerini sürdürmede de önemli bir rol oynadığını göstermiştir³⁸.

2.6.2. Dolaşım sistemi ve miRNA'lar

Scalbert ve ark.³⁹, miRNA'ların, kardiyovasküler sistemdeki gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli roller oynadığını belirterek, sinyal yollarının kontrolünde ve biyolojik süreçlerinde önemli etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca miRNA'ların hücre büyümesi, kasılma ve elektrik iletkenliği ile ilgili genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla kalpte önemli rollerinin olduğunu bildirmişlerdir. Shoeibi⁴⁰ miRNA'ların, hücre içerisinde kolesterol birikiminde ve ateroskleroza yol açan atardamar yangılarında oldukça önemli fonksiyonlarının olduğunu bildirerek, miRNA'ların, ateroskleroz hastalığının gelişmesinde ve büyümesindeki süreçler üzerinde bilgi edinebilmeyi ve hastalığın tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

2.6.3. Sindirim sistemi ve miRNA'lar

Saito ve ark.⁴¹ miRNA'ların gastrointestinal tümör oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayabildiğini, bazı miRNA'ların gastrointestinal kanserlerde aşağı regüle edildiğini ve bunların tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini bildirmişlerdir.

O'hara ve ark.⁴², (2009) miRNA'ların sindirim sistemi hastalıklarına yaklaşımlarda klinik değere sahip olabileceğini belirterek, hastalıklı dokulardan alınan miRNA profillerinin analizi, primeri bilinmeyen bir tümörün kökenini tanımlamasına veya iyi huylu lezyonların kötü huylu lezyonlardan ayırt edilmesine olanak tanıyarak

tanıya yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir.

2.6.4. Üreme sistemi ve miRNA'lar

Yu ve ark.⁴³, (2005) miRNA'ların oosit olgunlaşması, luteum gelişimi ve erken embriyo gelişimi gibi fizyolojik süreçleri düzenlediğini bildirmişlerdir.

Chakrabarty ve ark.⁴⁴, (2007) miRNA'ların gebeliğin meydana gelmesi ve sürdürülebilmesi süreçlerinde önemli rol oynadığını, miRNA'ların; uterusda gebelik sürecinde implantasyon dönemlerinin oluşumunda, plasentanın oluşum ve gelişimi sırasında etkin olduklarını belirtmişlerdir.

Duica ve ark.⁴⁵, (2020) miRNA 125b, miRNA 145, miRNA 21 ve miRNA 155'in jinekolojik kanserlerde ve meme kanserlerinde çok önemli rollere sahip olduğunu belirterek, bu miRNA'ları kanserin oluşum mekanizmasında merkezi oyuncular olarak tanımlamıştır.

2.6.5. Kanser ve miRNA'lar

Hastalıklar arasında miRNA ile ilişkisi ilk belirlenen ve en fazla çalışmanın yapıldığı alan kanser olmuştur. Calin ve ark.⁴⁶, (2002) miRNA'yı kansere bağlayan ilk çalışmayı yapmışlardır. Bu çalışmada kronik lenfositik lösemi'li (KLL) hastalardan alınan kan örneklerinde miRNA 15 ve miRNA 16'nın ekspresyonu analiz edilmiş, bu oran normal doku veya lenfositlerle karşılaştırıldığında her iki miRNA'nında olmadığı veya aşağı regüle edildiğini ortaya koymuşlardır.

Ray⁴⁷ (2019) yaptığı çalışmada miRNA'ların tümör biyolojisinde anahtar rol oynayarak, onkojenik veya tümör baskılayıcı olarak işlev gördüklerini belirtmiştir. miRNA'ların kanserlerde hücre içi sinyal yollarının ana düzenleyicileri olduğunu onkojenik veya tümör baskılayıcı etkilerini bu sinyal yolları üzerinden sağladığını bildirmişlerdir. Onkojenik olarak etki gösteren miRNA'ların temel işlevi tümör baskılayıcı genlerin mRNA'larının ortadan kaldırılması iken tümör baskılayıcı miRNA'ların işlevinin ise onkojenik etki gösteren genlerin mRNA'larının yıkımını gerçekleştirdiğini tespit etmiştir.

Chen ve ark.⁴⁸, (2015) yaptıkları çalışmada miRNA'ların kanserlerde tümör baskılayıcı veya onkojen olarak etki ettiğini, bunu sinyal yollarını düzenleyerek gerçekleştirdiklerini bildirmişler.

He ve ark.⁴⁹, (2015) hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik olarak işlev görebilen miRNA'ların mide, yumurtalık ve pankreas kanseri ile lenfoma ve melanom gibi birçok kanser vakasında ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Bazı kanser tiplerinin tanısında kullanılabilecek miRNA'lar Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Bazı kanser tiplerinin tanısında kullanılabilecek miRNA'lar⁵⁰

Kanser tipi	MiRNA	Örnek	Seviye
Akciğer kanseri	miR-21, miR-205, miR-30d, miR-24	Serum	Artar
	miR-155, miR-197, miR-182	Serum	Artar
	Let-7f, miR-30e-3p,	Plazma	Azalı
	miR-361-3p, miR-625	Plazma	Azalı
	miR-1254, miR-574-5p	Serum	Artar
	miR-21, miR-126, miR-210, miR-486-5p	Serum	Artar
	miR142-3p, miR-29b	Serum	Artar
Meme kanseri	Let-7b, Let-7g, miR-18b	Plazma	Artar
	miR-122	Serum	Artar
	miR-155	Serum	Artar
	miR-21	Serum	Artar
	miR-125b	Serum	Artar
	miR-10b, miR-17, miR-34a, miR-93, miR155	Serum	Artar
	miR-10b, miR-373, miR-214	Plazma	Artar
Prostat kanseri	miR-210	Plazma	Artar
	miR-141	Serum	Artar
	miR-1290	Serum	Artar
	miR-375, miR-141	Serum	Artar
	miR-221	Serum	Artar
	miR-375, miR-378, miR-141 miR-409-3p	Serum	Artar
	miR-29a, miR-92	Plazma	Artar
Kolonorektal kanseri	miR-601, miR-760	Plazma	Azalı
	miR-200c	Serum	Artar
	miR-18a, miR-29a	Serum	Artar
	miR-141	Plazma	Artar
	miR-20a, miR-130, miR-145, miR-372	Serum	Artar

2.6.6. Bağışıklık ve miRNA'lar

O'Connell ve ark.⁵¹, (2010) miRNA'ların hem doğal bağışıklık hem de sonradan kazanılmış bağışıklık sistemlerinin hücrelerinde benzersiz ifade profillerine sahip olduğunu, hücre gelişimi ve işlevinin düzenlenmesinde çok önemli rollere sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Xiao ve ark.⁵², (2009) miRNA'ların, memelilerin bağışıklık sisteminde kritik bir düzenleyici olarak bulunduğunu ve bağışıklık mekanizmasında miRNA'ların kaybı veya genetik olarak kaybolmasının bağışıklık gelişimini ciddi bir şekilde tehlikeye atacağını, otoimmünite ve kanser gibi bağışıklık bozukluklarına yol açabileceğini bildirmişlerdir.

2.6.7. Biyobelirteç olarak miRNA'lar

miRNA'ların bu önemli fonksiyonları onların birçok alanda araştırma konusu olmasına neden olmuştur. Özellikle miRNA'ların normal olmayan miktarları birçok

hastalığın tanısında ve patogeneğinde önem arz eder. Kardiyovasküler hastalıklardan kanserin patogeneğine ve daha birçok sayılamayan hastalıkta miRNA'lar biyobelirteç olarak da kullanılabilirler⁵³.

miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımları ilk defa Lawrie ve ark.⁵⁴, (2008) tarafından kan serumunda yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur. Daha sonraları özellikle süt, tükürük ve diğer vücut sıvılarında bulunan miRNA'ların tespitleri yapılmıştır⁵⁵.

miRNA'ların kan, idrar, süt ve diğer vücut sıvılarından alınan sıvı biyopsiler aracılığıyla kolaylıkla ekstrakte edilebilmesi, bu sıvılara kolay erişim sağlaması, hastalığın ilerleyişine bağlı olarak seviyelerinin değişmesi ve bu değişiklikleri hassas bir şekilde yansıtabilmesi; ayrıca kanser evrelerinin ayrımında kullanılabilmesi, miRNA'ları ideal bir biyobelirteç olarak öne çıkarmaktadır⁵⁶.

Kanın identifikasyonunda ve adli bilimler açısından stabilite çalışmalarında öne çıkan miRNA belirteçleri, özellikle dokuya özgü ekspresyon profilleri, yüksek stabilite ve bozulmaya karşı dirençleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Bu miRNA'lar, adli tıpta kanın diğer vücut sıvılarından ayırt edilmesinde ve uzun süreli stabil kalabilmeleri nedeniyle özellikle önemlidir. İşte bu alanda öne çıkan bazı miRNA belirteçleri: miR-451, miR-16, miR-486, miR-144, miR-92a, miR-21, miR-150

Özellikleri

- Kan örneklerinden yüksek düzeyde eksprese edilebilirler.
- Eritrositlerde yoğun olarak bulunurlar.
- Diğer vücut sıvılarına kıyasla kan için oldukça spesifiktirler.
- RNaz enzimlerine karşı yüksek direnç gösterirler.
- Bozulmaya karşı dirençlidirler.
- Kan identifikasyonunda kullanılan diğer miRNA'larla kombinasyon halinde kullanılabilirler.

Stabilite Çalışmalarında Öne Çıkan Bulgular:

- miRNA'lar, RNaz enzimlerine karşı yüksek direnç gösterir ve bu özellikleri nedeniyle adli tıpta uzun süreli saklama koşullarında bile bozulmadan kalabilir¹².
- Özellikle miR-451, miR-486 ve miR-144 gibi miRNA'lar, kan örneklerinde yüksek stabilite gösterir ve bu nedenle adli bilimlerde güvenilir belirteçler olarak kabul edilir^{57,58}.
- miRNA'ların stabilitesi, örneklerin dondurularak saklanması veya oda sıcaklığında uzun süre bekletilmesi gibi farklı koşullarda bile korunabilir⁵⁹.

Kan identifikasyonunda öne çıkan miRNA belirteçleri, özellikle yüksek stabilite ve dokuya özgü ekspresyon profilleri nedeniyle adli bilimlerde büyük potansiyele sahiptir. miR-451, miR-16, miR-486, miR-144, miR-92a, miR-21 ve miR-150 gibi miRNA'lar, kan identifikasyonu için en umut verici belirteçler arasında yer alır. Bu miRNA'lar, adli vakalarda kanın diğer vücut sıvılarından ayırt edilmesinde ve uzun süreli stabil kalabilmeleri nedeniyle özellikle önemlidir. Ancak, bu belirteçlerin adli bilimlerde yaygın kullanımı için daha fazla araştırma ve standardizasyon gereklidir.

2.7. miRNA Tespiti

Bir numuneden ekstrakte edildikten sonra miRNA'lar çeşitli yollarla ölçülebilir. Kullanılan yöntemlerden biri olan mikroarray analizi, RNA-seq, Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR), northern blot ve in situ hibridizasyondur. Hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın, başka bir tekniği kullanarak sonuçların doğrulanması önerilmektedir⁶⁰.

2.7.1. Mikroarray Analizi

Oligo mikroarray teknolojisi, nükleik asitlerin Watson-Crick baz eşleştirme doğası üzerine kuruludur. Sentezlenmiş antisens proplar tespit edilir ve tespit cihazı kullanılarak platform sabitlenir⁶¹. Mikroarray tabanlı teknikler, aynı anda çok sayıda miRNA'yı tarayabildikleri için miRNA profili oluşturmak için caziptirler. Mikroarray

teknolojisi ilk olarak 1995 yılında⁶², cam veya kuvars destek platformuna önceden tespit edilmiş oligo problemlerin paralel olarak birden fazla hibridizasyon gerçekleştirme kabiliyetine dayanarak geliştirilmiştir⁶³⁻⁶⁵.

Mikroarray teknolojisinin uygulanması, miRNA'ların çeşitli özellikleri yüzünden oldukça zordur. Bu özelliklerin başında miRNA'ların kısa uzunluğu gelmektedir. Özgüllükten ödün vermeden maksimum bağlanma afinitesi ile optimize edilmiş hibridizasyon koşullarında problemleri bulmak oldukça zordur. Ayrıca problemlerin karşılıklı geniş erime sıcaklığı (T_m) aralığı bulunmaktadır. Probun tasarımı sadece miRNA'nın özgül dizisine bağlı olmalıdır, bu da her prob-miRNA etkileşimi için farklı bir erime sıcaklığı gerektirir. Birçok farklı miRNA, tek bir nükleotit kadar az farklılık gösteren benzer sekansları paylaşan ailelere aittir. Bu sorunları çözmek için, DNA bazlı problemlere kıyasla daha uygun hibridizasyon özellikleri gösteren birkaç nükleik asit analogu ortaya çıkmıştır. Peptid nükleik asitler (PNA)⁶⁶ ve kilitli nükleik asitler (LNA) dahil olmak üzere bazı analoglar klasik mRNA mikroarrayler de kullanılmıştır. Ayrıca karışık LNA / DNA ile modifiye edilmiş problemlerinin uygulanması tarif edilmiş ve bu problemlerin geleneksel DNA bazlı miRNA dizilerine kıyasla üstün hassasiyet sağladığı bildirilmiştir^{67,68}.

Dizideki nokta yoğunluğunun artırılması aynı anda analiz edilebilecek gen sayısının artmasını sağlamıştır^{63,66}. Bir array platformunda nükleik asitlerin tespiti için üç temel teknoloji kullanılmaktadır. İlk yöntem, genellikle özel diziler için tercih edilir ve üzerinde değiştirilmemiş oligonükleotitlerin cam slaytlara bağlanması esasına dayanır⁶⁹. İkinci yöntem ise yine cam slaytlar kullanmakla birlikte, prob dizileri slayt yüzeyinde fotokimyasal olarak sentezlenir; bu sayede, ilk yöntemle kıyasla çok daha fazla sayıda prob yerleştirilmesi mümkün olur³⁷. Üçüncü teknoloji ise, prob sayısı milyonları bulabilmekte ve bu yöntem, diğerlerine göre daha yüksek çözünürlük ve kapsama alanı sunmaktadır⁶⁵. İlk iki yöntemde, her bir cam slayt farklı renklerle işaretlenmiş iki örneğin karşılaştırılmasına olanak verirken, üçüncü yöntemde ise her slayt yalnızca tek bir örnekle hibritize edilmekte ve tek renk hibridizasyonu kullanılmaktadır. miRNA mikroarray teknikleri, aynı anda çok sayıda miRNA'nın incelenebilmesine olanak sağlaması nedeniyle geniş çapta benimsenmiştir⁷⁰.

2.7.2. RNA-Seq

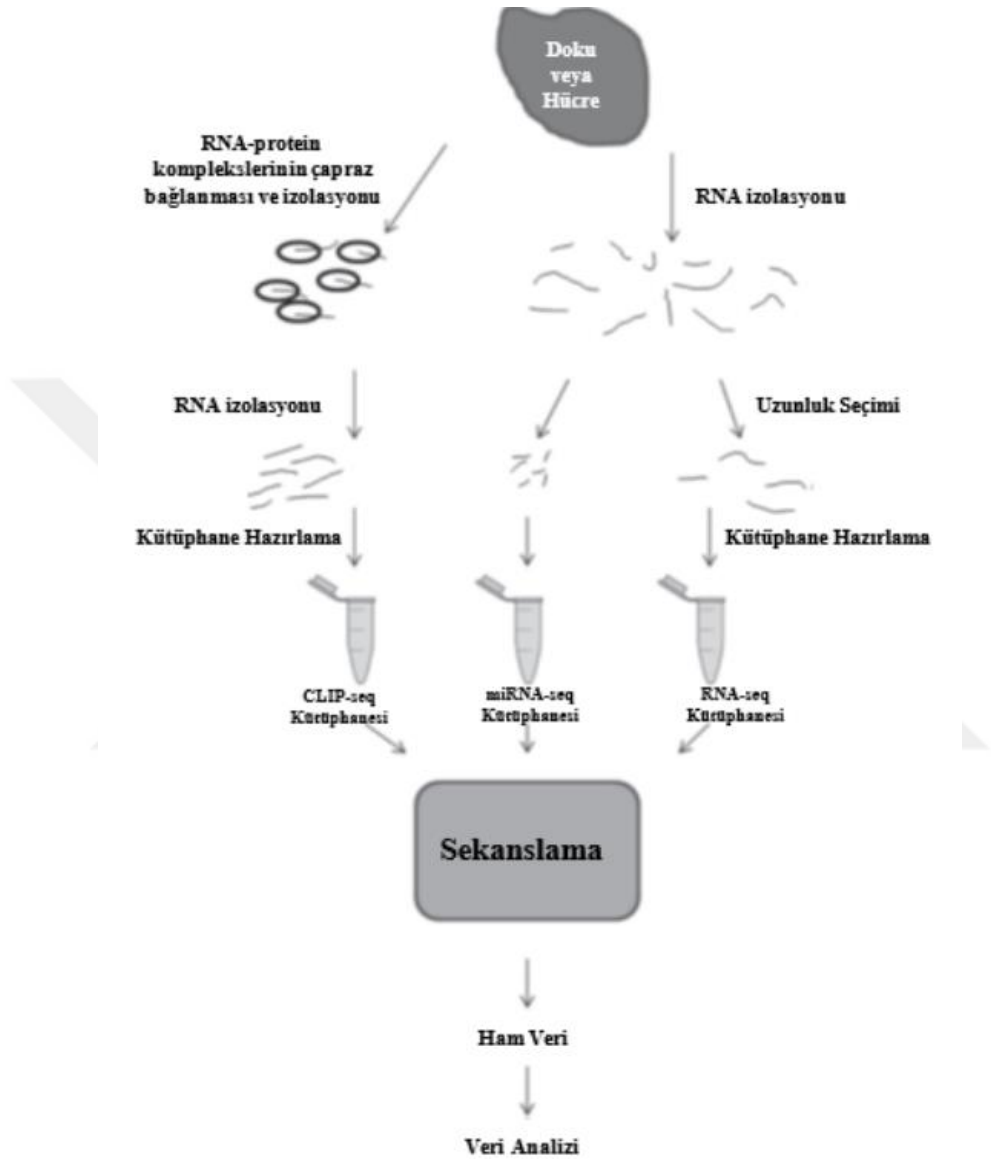
RNA-seq, biyolojik örneklerdeki RNA dizilerini ve varlığını belirlemek için deneysel yöntemlerin ve hesaplama yöntemlerinin bir birleşimidir. Deneysel yöntemler, RNA'nın hücre, doku veya hayvan örneklerinden izole edilmesini, örneklerde RNA türlerini temsil eden kütüphanelerin hazırlanmasını, kütüphanenin kimyasal sekanslanmasını ve daha sonra biyoinformatik veri analizini içerir. RNA-seq analizinin mikroarray yönteminden farkı, mevcut RNA-seq platformlarının yüksek verimi, yeni teknolojilerin sağladığı hassasiyet ve yeni transkriptleri, gen modellerini ve küçük kodlanmayan RNA türlerini keşfetme yeteneğidir⁷¹.

RNA-seq yöntemleri, sekanslama teknolojisindeki gelişmeler ile türetilmiştir. Birinci nesil yüksek verimli sekanslama NGS'i ifade eder. Bu yöntem nükleik asit fragman uzunluklarını çözmek için kapiller elektroforezi kullanır; standart bir çalışmada 96'lı kapiller sistem kullanıldığından yaklaşık 100 000 baz dizisi veren 600-1000 bazlık dizi uzunlukları çalışılabilir. NGS olarak da bilinen ikinci nesil sekanslama, benzer olarak sentez bazlı sekanslama yöntemini kullanır ancak paralel biçimde gerçekleştirilir. Böylece tek bir çalışmadaki dizileme sayısı milyonları bulabilmektedir. Standart bir NGS çalışması, 600 milyar baz dizisi bilgisi sağlayan, 100 nükleotidin 6000 milyon kere dizilemesinden oluşabilir. Üçüncü nesil dizileme, sentez bazlı sekanslama ve paralel sekanslamayı kullanmasına ek olarak DNA veya RNA moleküllerini sekanslayabilir. Üçüncü nesil dizileme platformları, çalışma başına daha az dizileme reaksiyonuna sahiptir, ancak reaksiyon başına sekans uzunluğu 1500 nükleotid uzunluğuna kadar çıkabilir⁷¹.

RNA-seq analizinden elde edilen veriler, çalışılan hücrelerdeki protein kodlayan yeni transkriptlerin keşfini ve belli bir durumda değişen ekspresyon verilerini sağlayabilir. Örneğin normal ve kanser hücrelerindeki gen ekspresyon farklılıklarına veya beyin gelişimi sırasında düzenlenen genlere ait veriler bu yöntem ile elde edilebilir⁷¹.

RNA-seq teknolojileri, zayıf olan gen bilgisi için artan beklentiler yaratmıştır. RNA-seq platformlarından elde edilen yeni veriler; yeni gen yapılarını ve bilinmeyen genleri tanımlamıştır. Ayrıca kısa ve uzun kodlama yapmayan transkriptlere veri sağlamıştır⁷²⁻⁷⁵. RNA-seq çalışmaları, sınırlı transkript dizisi bilgisine sahip birçok yeni tür için büyük miktarda veri sağlamıştır. RNA-seq iş akış şeması Şekil 2.4.'de

gösterilmiştir. Şemanın başlangıcı laboratuvar adımlarını gösterirken, alt kısım veri işleme ve analiz adımlarını göstermektedir. RNA-seq üç temel aşamadan oluşmaktadır; kütüphane hazırlama, sekanslama, veri analizi⁷¹.



Şekil 2.4. RNA-seq analizi genel şema⁷¹

Kütüphane Hazırlama

Sekanslamadan önce, örneklerdeki tüm miRNA molekülleri cDNA'ya çevrilmektedir. Bu adım, miRNA molekülleri sekanslanamadığı için gerçekleştirilir, DNA'lar daha stabil olmaları nedeniyle sekanslanabilir. Kütüphane hazırlamanın iki temel amacı vardır: ilki, örneklerdeki miRNA popülasyonunu doğru ve eksiksiz şekilde temsil etmek; ikincisi ise miRNA moleküllerini DNA'ya dönüştürmektir. Her miRNA

sekanslama platformu (örneğin, Illumina, Solid, Ion Torrent) kendi özel protokolüne sahiptir. Her ticari platform için kütüphane protokolleri, kitleri ile birlikte şirketlerin web sitelerinde mevcuttur ve Tablo 2.3.'de gösterilmiştir. Çalışmanın amacına göre hangi platformun kullanılacağı belirlenir⁷¹.

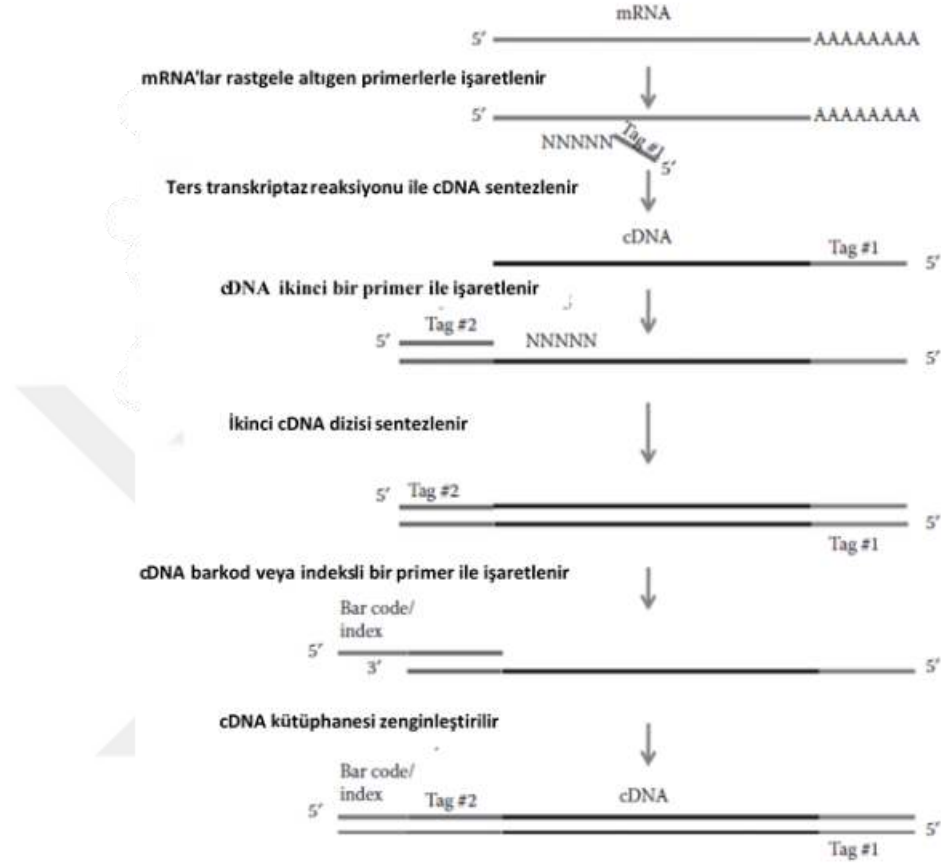
Tablo 2.3. Başlıca RNA-seq Platformları ve Genel Özellikleri.

Platform	Sekanslama Tespit Kimyası Kimyası		Web Sitesi
Illumina	Sentez bazlı sekanslama	Floresan	www.illumina.com
SOLID	Sentez bazlı sekanslama	Floresan	www.invitrogen.com
Roche 454	Sentez bazlı sekanslama	Luminesans	www.454.com
Ion Torrent	Sentez bazlı sekanslama	Proton salımı	www.iontorrent.com
Pacific Biosciences	Sentez bazlı tek molekül Real-time Floresan		www.pacificbiosciences.com
Oxford Nanopore	Sekanslama Sentez bazlı tek molekül www.nanoporetech.com sekanslama	Pordan geçen nükleotid başına düşen elektrik akımı farkı	

RNA-seq Illumina platformu için örnek kütüphane hazırlama adımları şu şekildedir (Şekil 2.6.)⁷¹;

Uygulamaya ve platforma bağlı olarak 1-10 µg (mikrogram) saf, sağlam ve kalite kontrol aşamasını geçmiş miRNA elde edilir. miRNA total RNA'dan ayrılır. Fragmentasyon reaktifi ile inkübasyon yoluyla miRNA parçalara ayrılır. Bu işlem, miRNA'yı çok sayıda küçük parçaya böler. Parçalanmış miRNA'lar rastgele altıgen primerlerle işaretlenir. Ters transkriptaz reaksiyonu ile parçalanmış miRNA'lar cDNA'ya çevrilir. cDNA nükleotidlerden, enzimlerden, tampon çözeltilerden ve RNA'dan arındırılır. Saflaştırılmış cDNA üzerinde uç onarımı gerçekleştirilir. cDNA'nın 3' ucu adenilatlanır. cDNA'nın her iki ucuna adaptörler bağlanarak kütüphane oluşturulur. Kütüphane PCR amplifikasyonu ile zenginleştirilir. Bu aşamada adaptörlerden gelen diziler primer olarak kullanılır. PCR ile zenginleştirilmiş, adaptörle bağlanmış, uçtan onarılan cDNA saflaştırılır. Bu aşamada, örneklerdeki orijinal miRNA'ları temsil eden kütüphane elde edilmiş olur. Şekil 2.5'de gösterilmiştir. Kütüphane kalite kontrol aşamasından geçerek doğrulanır. Bu işlem kütüphanede bulunması gereken genlerin PCR ile çoğaltılması ile, kütüphanedeki cDNA'nın nicel ölçümü ile veya Biyoanalizör cihazında poliakrilamid jel elektroforezi veya kapiller elektroforez ile kütüphanenin bolluğu ve boyut dağılımı görselleştirilerek yapılır.

Kütüphane normalize edilir ve havuz oluşturulur. Kütüphane sekanslamaya gönderilir (Illumina, Solid, 454, vb.).



Şekil 2.5. RNA-seq kütüphane hazırlığının şematik gösterimi⁷¹

Sekanslama

Çalışılan platforma göre farklı sekanslama stratejileri mevcuttur. Bu platformlardan en bilinenleri Illumina, SOLID, Roche 454, Ion Torrent, Pacific Biosciences ve Nanopore teknolojileridir.

Illumina platformu, sentez bazlı sekanslama stratejisini kullanan en popüler platformdur. Kütüphaneler oluşturulduktan sonra, cDNA adaptör dizileri ile tamamlayıcılığa dayalı tek molekül hibridize eden akış hücresinden geçirilir. Adaptörün her iki ucunda tutulan hibrit diziler akış hücresi tarafından bir köprü olarak çoğaltılır. Bu yeni oluşturulan diziler, akış hücresine yakın bir yerde hibritlenir ve birçok döngüden sonra akış hücresinin bir bölgesi, orijinal cDNA'nın birçok kopyasını içerir. Bu süreç küme üretimi olarak bilinir. Kümeler oluşturulduktan ve cDNA'nın bir zinciri

çıkartıldıktan sonra, reaktifler sentez bazlı sekanslama gerçekleştirmek için akış hücresinden geçirilir. Sentez bazlı sekanslama, her sentez döngüsünde bir floresan sinyal ile işaretlenmiş adenin, guanin, sitozin veya timin olabilen tek bir nükleotidin eklenmesinin görüntülendiği bir reaksiyonu tanımlar. Oluşturulan cDNA kümesine karşılık gelen, akış hücresinde belirli bir konumda ekleme dizisinin yeniden sentezlenmesi, orijinal cDNA parçasının nükleotid dizisini verir⁷¹.

Sentez döngü sayısı, 50 nükleotitten 150 nükleotide kadar olabilir. Sekanslamanın gerçekleştirilebileceği iki mod vardır. Sekanslama cDNA'nın bir ucunda gerçekleştirilirse tek okuma modu, iki uçundan gerçekleştirilirse çift uçlu okuma modu adı verilir. Okuma türü ve uzunluğu için kısaltmalar kullanılır; tek okuma 50 nükleotid için SR50 veya çift uçlu okuma 100 nükleotid için PE100. Her döngü, kullanılan reaktiflerin yıkanmasını ve yeni reaktiflerin eklenmesini gerektirdiğinden tek bir sekanslama çalışması cihaz modeline ve sekanslama uzunluğuna bağlı olarak 3 ila 12 gün sürebilir.

Veri Analizi

Bu aşama sekanslamanın en karmaşık kısmıdır. RNA-seq analizinden milyonlarca okuma verisi elde edilmektedir. RNA-seq, gen ve varyantlarının keşfi, ekspresyon analizi ve füzyon genlerin tespiti gibi pek çok uygulama alanına sahip güçlü bir teknolojidir. Sonuç olarak, birçok veri analizi yolu mevcuttur ve bunları tek bir analiz iş akışı şemasında ele almak mümkün değildir. Veri analizi adımları, belirli veri formatlarına ve harici dosyalara ihtiyaç duyabilecek ayrı programlar tarafından gerçekleştirilir. RNA-seq veri analizinde her analiz adımı için birçok alternatif program mevcuttur. Bu programlara örnek olarak Unix, R, Galaxy (galaxyproject.org/)⁷⁶ ve Chipster (chipster.csc.fi)⁷⁷ verilebilir. Bu programlardan ham RNA-seq verilerinden çalışma sonuçlarına kadar her şey elde edilebilir.

2.7.3. RT-qPCR

RT-qPCR, miRNA ifadesini doğrulamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Küçük boyutları nedeniyle geleneksel qPCR, olgun miRNA'larda çalışmaz. Bu nedenle, ters transkripsiyon ve amplifikasyon gerçekleştirilmeden önce miRNA'lar uzatılmalıdır. Bu iki yöntem ile gerçekleştirilebilir: poli (A) yöntemi ve stem loop

yöntemi. İlk yöntem, tüm miRNA'ların 3' ucuna ortak bir poli (A) kuyruğu ekler, ardından miRNA'yı cDNA'ya transkribe etmek için evrensel bir primer kullanır. cDNA, miRNA'ya özgü bir ileri primer ve bir poli (A) ters primer kullanılarak amplifiye edilir. Kantifikasyon, BrightGreen veya SYBR Green gibi araya giren floresan boya kullanılarak ölçülür⁷⁸. İkinci yöntem, cDNA'ya transkribe etmek için ilgilenilen miRNA'ya özgü stem loop primeri kullanır. Amplifikasyon bir miRNA'ya özgü ileri primer ve stem loop ters primeri kullanılarak gerçekleştirilir. Miktar belirleme, TaqMan floresan probu kullanılarak ölçülür⁷⁹.

Diğer tekniklerle karşılaştırıldığında miRNA qPCR, niceliksel ve oldukça hassas olma avantajına sahiptir. Bununla birlikte, bir seferde yalnızca birkaç miRNA ölçülebilir, bu nedenle qPCR büyük ölçekli çalışmalar için uygun değildir. Ayrıca, miRNA'nın uzunluğu, yalnızca bir veya iki nükleotid kadar farklılık gösteren miRNA'ları ayırt etmenin zor olabileceği anlamına gelir. Kilitli nükleik asitler gibi yeni teknolojiler, miRNA'ların özgünlüğünü iyileştirmek için geliştirilmiştir⁸⁰.

2.7.4. Northern Blot

Northern blot, bir örnekte RNA'nın (veya izole mRNA'nın) saptanmasıyla gen ekspresyonunu incelemek için moleküler biyoloji araştırmalarında kullanılan bir tekniktir^{81,82}. Northern blot analizi ile farklılaşma, morfogenez ve anormal veya hastalıklı koşullar sırasında belirli gen ekspresyon seviyelerini belirleyerek yapı ve fonksiyon üzerinde hücresel kontrolü gözlemlemek mümkündür⁸³. Northern blot analizi, ilgilenilen miRNA'ların birikim seviyelerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Poliakrilamid jel elektroforezi ile birleştirilen bu teknik, hedef miRNA'ların ekspresyon özelliklerinin incelenmesine, boyutlarının belirlenmesine ve öngörülen miRNA'ların validasyonuna izin vermektedir.

Northern blotting, RNA örneklerini boyutlarına göre ayırmak ve hedef dizinin bir kısmını veya tamamını tamamlayan bir hibridizasyon probu ile elektroforez kullanımını içermektedir. "Northern blotting" terimi aslında RNA'nın elektroforez jelinden membrana aktarımını ifade eder; ancak tüm uygulama bu şekilde ifade edilmektedir⁸⁴.

2.7.5. In Situ Hibridizasyon

In situ hibridizasyon, bir hücre veya doku içindeki miRNA ekspresyonunu

görselleştirmek için kullanılır⁸⁵. miRNA'ların saptanması için kullanılan yöntemde; hücre veya doku içeren slaytlar hazırlanır, RNA sabitlenir, hedef miRNA'ya hibridize olacak etiketli bir prob eklenir, probalar radyoaktif, floresan veya kromojen olarak etiketlenebilir. Daha sonra slaytlar yıkanır ve örnek görselleştirilir.

Düşük miktartlı miRNA'ların saptanmasına izin veren bir dizi amplifikasyon adımı da yönteme eklenebilir. Sekans amplifikasyonu, özel probalar kullanıldığında bir Rolling Circle Amplification aracılığıyla yapılabilir. Alternatif olarak, çok sayıda etiketli ikincil probun her bir spesifik birincil proba bağlanmasına dayanan dallı DNA teknikleri kullanılabilir⁸⁶.

miRNA Tespit Tekniklerinin Karşılaştırılması

En yaygın miRNA tespit tekniklerinden bazılarının avantajları ve dezavantajları Tablo 2.4'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 2.4. miRNA tespit yöntemlerinin karşılaştırılması ⁷².

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Mikroarray	İki durum arasındaki miRNA ifadesindeki göreceli değişikliği verir. Büyük ölçekli tarama sağlar.	Kantitatif değildir.
RNA-seq	Mevcut tüm kısa RNA'lar için dizi bilgisi verir. Baz dizilerini verir. Büyük miktarlarda RNA çalışılabilir.	Analizi karmaşıktır.
RT-qPCR	Bir miRNA'nın miktarı belirlenir. Hassasiyeti yüksektir. Kantitatifdir.	Küçük ölçeklidir.
Northern Blot	Bir miRNA'nın varlığı veya yokluğu tespit edilir. Basit ve ucuzdur. Önceleri olgun miRNA'dan ayırır.	Büyük miktarda RNA gerektirir. Küçük ölçeklidir.
In situ Hibridizasyon	Bir miRNA'nın hücrelerde ve dokularda lokalizasyonunu verir. miRNA'yı lokalize edebilir.	Kantitatif değildir. Küçük ölçeklidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, Çukurova Üniversitesi Etik Kurulu'nun 10.09.2021 tarihli ve 114 sayılı toplantısında (Karar No: 42) alınan onay ile bilimsel çalışmalarda kullanılmasına onam veren 6 kişiden alınan kan örnekleri kullanılmıştır. RNA izolasyonunu takiben Qubit florometrik yöntemle RNA miktar tayini yapıldı. Örneklerden alınan 5 ng RNA ile ters transkriptaz PCR ve sonrasında cDNA ürünleri SYBR Green'e dayalı Gerçek Zamanlı kantitatif PCR yöntemi ile çoğaltıldı. İşlem sonrası oluşan ürünlerin istatistiksel analizi ve hesaplamaları için SPSS 27.versiyon, betimsel analizler ve görselleştirmeler için rstatics ve ggplot2 paketlerinden kullanılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihaz, Malzemeler ve Kitler

3.1.1.1. Cihazlar

- Qubit® fluorometer
- Beckman Coulter Microfuge 20R Soğutmalı Santrifüj Cihazı
- IKAMAG KS125 Basic karıştırıcı
- BioSan Vortex V-1 Plus
- Veriti 96-Well Thermal Cycler PCR Cihazı
- ABI 7500 Real Time PCR Cihazı
- Eppendorf Mikropipet

3.1.1.2. Kitler ve Malzemeler

- miRNeasy Mini kit ekstraksiyon kiti
- Quant-iT™ RNA Assay Kit
- miRCURY LNA SYBR Green PCR Kiti miRCURY LNA RT Kiti
- Whatman filtre kağıdı

- Pipet ucu (10, 100, 200 ve 1000 µl)
- 500 µl Eppendorf tüp
- 1.5 ml steril tüp
- PCR plate
- Rack
- Klorofom
- Etanol

3.2. Yöntem

Çalışma süreci örnek alma, RNA izolasyonu, RNA kantitasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR aşamalarından oluşmaktadır.

3.2.1. Örnek Alma ve Uygun Koşulların Oluşturulması

3.2.1.1. Örnek Alma

Birbirinden bağımsız 6 kişiden kan örnekleri alınarak her bir kişiden alınan örnekler kendi içerisinde 5 gruba ayrılmıştır. Örneklerin bir kısmı hemen çalışmaya alınarak bir kısmı da oda koşullarında 8 ve 16 ay bekletilmek üzere kaldırılmış ve geriye kalan örneklerde -20 °C’de 8 ve 16 ay bekletilmeye alınmıştır.

3.2.1.2 Uygun Koşulların Oluşturulması

Alınan kan örneklerinin, iki farklı ortamda muhafazası sağlanmıştır.

1. Enjektör yardımı ile alınan örnekler EDTA’lı mor tüplere aktarılmıştır. Bir kısmı hemen çalışmak üzere ayrılmış, bir kısmı 1.5 mL’lik epondorf tüplere aktarılmıştır. Epondorf tüplerdeki kanlar mikropipet ile filtre kağıdı üzerine 10 mikrolitrelik lekeler oluşturulmuş ve lekeler kuruduktan sonra ağartılmamış zarflara konularak oda sıcaklığında ışık görmeden muhafaza edilmiştir. (Şekil 3.1)
2. EDTA’lı tüpte kalan kısımda epondorf tüplere aktararak -20°C’de muhafaza etmek için kaldırılmıştır.



Şekil 3.1. Filtre kağıdı üzerine oluşturulan kan örnekleri

3.2.2. RNA İzolasyonu

Kan örneklerinden RNA izolasyonu miRNeasy kiti ile yapılmıştır. Ekstraksiyon aşamaları şu şekildedir;

1. 100 μ l kan üzerine 700 μ l **QIAzol Lizis Reaktifi** eklendikten sonra oda sıcaklığında 10 dk shaker üzerinde bekletilmiştir.
2. Örneklerin üzerine 140 μ l kloroform eklendi ve 15 saniye kuvvetlice sallayarak iyice karıştırılan örnekler oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletilmiştir.
3. 12.000 g'de 15 dakika (4°C'de) santrifüj yapılarak, faz oluşumu sağlanmıştır.
4. Santrifüj sonucunda 3 faz oluştu. En üstteki RNA içeren şeffaf fazın tamamı pipetle çekilerek (350 μ l) yeni bir 1.5 ml eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 525 μ l %100 etanol eklendi. Birkaç kez pipetle çek-bırak yapılarak iyice karıştırılmıştır.
5. 700 μ l örneği 2 ml'lik kite ait toplama tüpü üzerindeki RNeasy Mini spin kolona ekleyip 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra altta kalan sıvı döküldü. 2 tekrar sonunda tüm örnek spin kolondan geçirilmiştir.
6. RNeasy Mini spin kolona 700 μ l RWT tampon çözeltisi eklenip 8000 g'

de 15 saniye santrifüj yapıp altta kalan sıvı dökülmüştür.

7. RNeasy Mini spin kolona 500 µl RPE tampon çözeltisi eklenip 15 saniye santrifüj yapılmış ve altta kalan sıvı dökülerek tekrar 500 µl RPE eklenerek 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra RNeasy Mini spin kolonu alttaki tüpten etanol bulaştırmadan kaldırılmıştır.
8. RNeasy Mini spin kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 1 dakika boyunca 12.000 g' de santrifüj edilmiştir. (Şekil 3.3)
9. RNeasy Mini spin kolonunu tekrardan başka bir 1.5 ml' lik tüpe aktarıp 30 µl RNaz free su eklenip 8000 g' de 1 dakika santrifüj edilmiş ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. RNA ekstraksiyonunda kullanılan silika bazlı mini spin kolon örneği



Şekil 3.3. Santrifüj Cihazı

3.2.3. RNA kantitasyonu

Kantitasyon analizi **Quant-iT™ RNA Assay Kiti** ile yapılmıştır. Kantitasyon aşamaları şu şekildedir;

1. Çalışılacak olan her bir örnek için 1 µl Quant-iT™ RNA reagent ve 199 µl Quant-iT™ RNA buffer karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.
2. Çalışma solüsyonundan her bir örnek için 198 µl yeni ependorf tüplerine aktarılmıştır.
3. 2 µl RNA ekstraktı hazırlanan tüplere eklendi ve yavaşça karıştırılmıştır.
4. Qubit® Fluorometer cihazı (Şekil 3.4) kullanılarak total RNA miktarı belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Qubit® Fluorometer cihazı

3.2.4. cDNA sentezi

cDNA sentezinde **QIAGEN miRCURY LNA RT Kiti** kullanılmıştır. cDNA sentez aşamaları şu şekildedir;

Örnekler 5 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde ayarlandı ve her bir örnek için;

1. 2 µl 5x miRCURY SYBR® RT reaksiyon tamponu.
2. 4.5 µl RNase Free Water
3. 1 µl 10x miRCURY RT Enzim karışımı
4. 0.5 µl UniSp6 RNA spike-in
5. 2 µl şablon RNA' dan eklenerek toplam hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır ve PCR cihazında uygun program başlatılmıştır. 60 dakika 42°C' de ve 95 °C' de 5 dakika PCR cihazında inkübe edilmiştir. (Şekil 3.5)
6. Son olarak hızlıca 4 °C' de soğutuldu ve cDNA aşaması tamamlanmıştır.



Şekil 3.5. Analizde kullanılan Thermocycler Cihazı

3.2.5. Real Time PCR

QIAGEN miRCURY LNA SYBR Green PCR Kiti Real Time PCR

Ön Hazırlık

1. Kullanılan primerlerin sulandırılması için 220 μ l nükleaz free su eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir.
2. cDNA' ya çevrilen 10 μ l'lik örnekler 590 μ l RNase free su eklenerek 1/60 oranında dilüe edilmiştir.

Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Her bir örnek için;

3. 5 μ l miRCURY LNA SYBR Green Master Mix
4. 0.05 μ l ROX referans boyası
5. 1 μ l PCR primer Mix
6. 3 μ l şablon cDNA 1/60 dilüe
7. 1 μ l RNaz free su eklenerek toplam hacim 10 μ l' ye tamamlanmıştır.

8. Hazırlanan çözeltilerden 10 µl PCR plate kuyucuklarına yüklenilmiş ve cover yapıştırılmış, santrifüj yapılmış ve ABI 7500 Real Time PCR cihazında (Şekil 3.6) uygun program, Tablo 3.1'e göre ayarlanmıştır. PCR döngüsü başlatılmıştır.



Şekil 3.6. Analizde kullanılan ABI 7500 Real Time PCR cihazı

Tablo 3.1. miRCURY LNA PCR Parametresi (Qiagen. miRCURY LNA miRNA PCR Handbook, 2020)

Adım	Süre	Sıcaklık
PCR başlangıç ısıl aktivasyonu	2 dakika	95°C
• Denatürasyon	10 saniye	95°C
• Eşleşme / Uzama	60 saniye	56°C
Döngü Sayısı	40* döngü	
Erime Eğrisi Analizi		60–95°C

İstatistiksel Analiz

Her bir miRNA (miR144, miR451 ve miR16) ve SNORD48'in Ct düzeylerinin farklı koşullarda istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olup olmadığını belirlemek için Friedman testi gerçekleştirilmiştir. Yüksek Ct düzeyleri hedef molekülün başlangıç

miktarının düşük olduğu, ekstraksiyon sırasında kayıplar yaşandığı ya da başka olumsuzluklar yaşandığı anlamına gelebilir. Bu bağlamda taze örneklerle kıyasla anlamlı derecede daha yüksek Ct düzeyi tespit edilen koşullarda bu çalışma kapsamında ele alınan miRNA belirteçlerinin kanın identifikasyonunda kullanılma potansiyeli de düşüktür. Burada parametrik olmayan bir anlayışının benimsenmesinin temel nedeni her bir koşulda analiz edilen kan örneği sayısının düşük olmasıdır (N=6).

Friedman testinin tercih edilmesinin temel nedeni ise aynı bireylerden alınan kan örneklerinin farklı koşullar altında ve farklı zamanlarda tekrarlayan bir anlayışla CT düzeylerinin belirlenmiş olmasıdır. Etki büyüklüğü istatistiği olarak Kendall W istatistiği hesaplanmıştır⁸⁷. Ayrıca Friedman testi ile koşullar arasında anlamlı farklılık tespit edildiğinde Wilcoxon işaretli sıralar testi ile ikili karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. İkili karşılaştırmalarda hata olasılığını .05 ile sınırlandırmak için Bonferroni düzeltmesi gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada üç farklı miRNA'nın (miR144, miR451 ve miR16) ve SNORD48'in (endojen gen) adli amaçlı olarak kanın tanımlanmasında kullanılıp kullanılmayacağını test etmek için farklı sıcaklık koşullarında zamana bağlı stabilitesi araştırılmıştır. Bu amaçla beş farklı koşulda (taze kan, Oda sıcaklığı 8 ay, -20°C'de 8 ay, Oda sıcaklığı 16 ay ve -20°C 16 ay) saklanan kan örneklerinde miR144, miR451 ve miR16 ile endojen gen SNORD48'in ifade düzeyleri incelenmiştir. Tablo 4.1'de miR451, miR-144 ve miR16 ile SNORD48'in farklı ortam koşullarında bekletilen kan lekelerinden elde edilen ifade düzeyleri (Ct değeri) aktarılmıştır.

Tablo 4.1. miR451, miR-144 ve miR16 ile SNORD48'in farklı ortam koşullarında bekletilen kanlekelerinden elde edilen ifade düzeyleri (Ct değeri)

	SNORD48	miR16	451	144
Taze örnek 1	21,33	18,03	11,02	12,22
Taze örnek 2	20,99	19,29	11,01	12,95
Taze-4	20,45	18,39	11,62	12,85
Taze-5	21,14	19,02	12,64	13,94
Taze-6	22,27	20,011	13,48	13,46
Sample 1-20-8ay	20	19,56	11,65	13,07
Sample 2-20-8ay	22,38	20,02	13,7	13,34
sample 3_-20-8ay	20,44	20,28	11,83	14,35
sample 4-20-8ay	21,09	21,64	12,11	14,51
Sample 5-20-8ay	21,33	19,91	12,21	12,86
sample 6-20-8ay	20,43	22,72	11,96	14
Sample 1_-20-16ay	21	20,56	12,65	14,07
sample 2_-20-16ay	21,38	21,02	12,7	13,99
Sample 3_-20-16ay	21,44	21,28	12,83	14,12
sample 4-20-16ay	22,09	20,64	12,97	14,06
sample 5_-20-16ay	20,33	20,91	12,56	13,86
sample 6_-20-16ay	20,43	21,72	11,98	14,15
sample 1-Oda-8ay	20,33	21,03	11,82	15,22
sample 2-Oda-8ay	18,99	20,29	14,01	13,95
sample 3-Oda-8ay	19,3	20,39	12,62	13,85

Tablo 4.1. miR451, miR-144 ve miR16 ile SNORD48'in farklı ortam koşullarında bekletilen kanlekelerinden elde edilen ifade düzeyleri (Ct değeri) (devamı)

	SNORD48	miR16	451	144
sample 4i-Oda-8ay	19,14	20,02	12,64	13,94
sample 5 8ay-Oda	23,27	20,81	16,48	14,46
sample 6-8ay-Oda	23,11	20,19	16,1	14,17
ample 1Oda-16ay	21,3	20,55	14,71	14,82
sample 2-Oda-16ay	19,85	20,66	13,67	15,74
sample 3-Oda-16ay	20,16	20,41	12,56	14,81
sample 4-Oda-16ay	19,55	20,18	15,74	15,8
sample 5-oda-16 ay	20,02	21,01	14,7	13,95
sample 6-Oda-16 ay	19,14	20,02	16,64	13,94

SNORD48 ile miR144, miR451 ve miR16'nın farklı sıcaklıklarda zamana bağlı ifade düzeylerini gösteren minimum, maksimum ve ortalama Ct değerleri Tablo 4.2'de sunulmuştur.

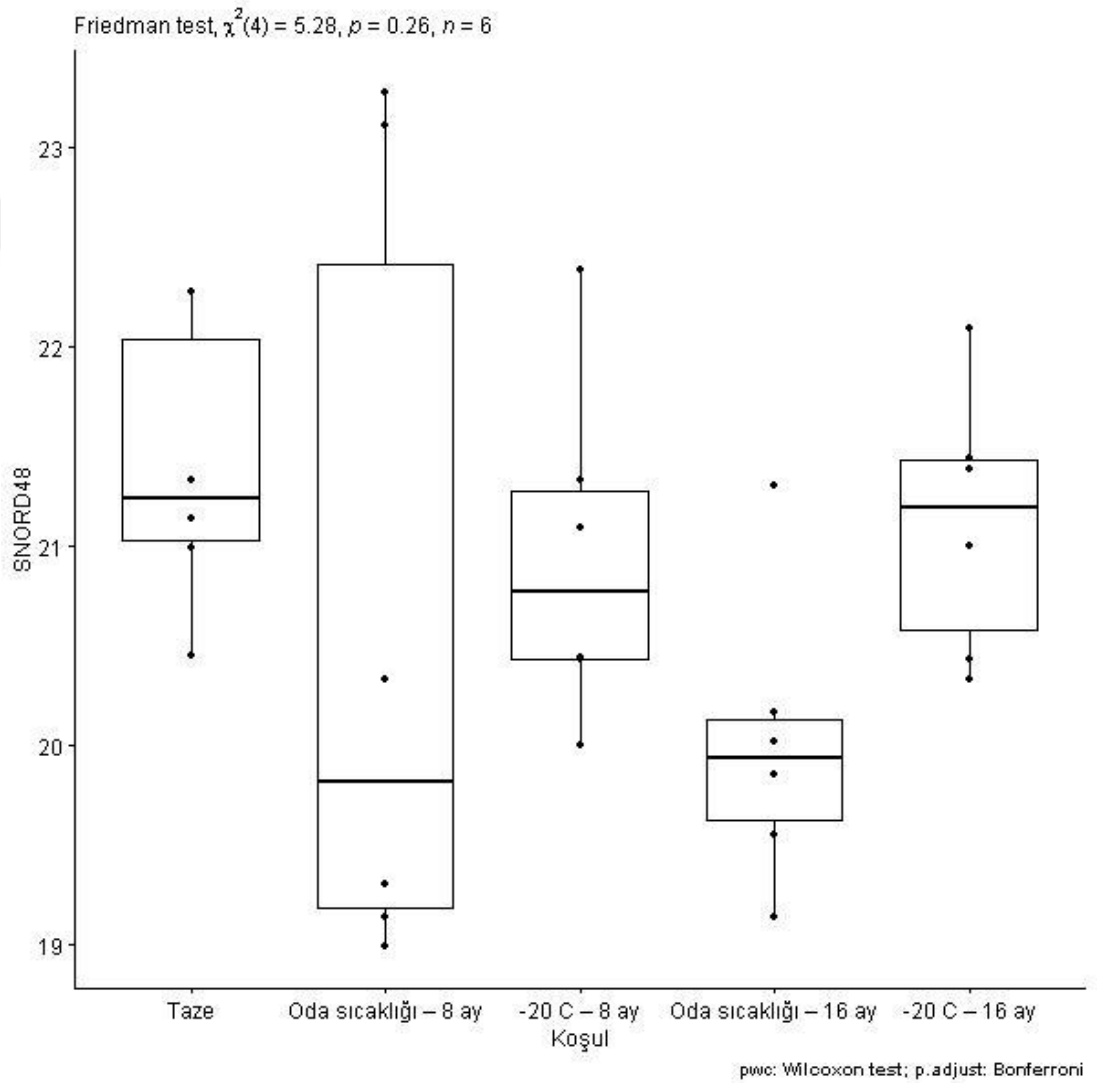
Tablo 4.2.SNORD48 ve üç farklı MiRNA'nın minimum, maksimum ve ortalama Ct değerleri.

Markır	Koşul	Min	Max	Q1	Medyan	Q3
SNORD48	Taze	20.45	22.27	21.03	21.24	22.04
	Oda sıcaklığı 8 ay	18.99	23.27	19.18	19.82	22.41
	-20 °C 8 ay	20.00	22.38	20.43	20.76	21.27
	Oda sıcaklığı 16 ay	19.14	21.3	19.62	19.93	20.12
	-20 °C -16 ay	20.33	22.09	20.57	21.19	21.42
miR144	Taze	12.22	13.94	12.88	13.10	13.40
	Oda sıcaklığı 8 ay	13.85	15.22	13.94	14.06	14.39
	-20 °C – 8 ay	12.86	14.51	13.14	13.67	14.26
	Oda sıcaklığı 16 ay	13.94	15.8	14.16	14.81	15.51
	-20 °C – 16 ay	13.86	14.15	14.01	14.06	14.11
miR451	Taze	11.01	13.48	11.17	11.99	12.57
	Oda sıcaklığı 8 ay	11.82	16.48	12.62	13.32	15.58
	-20 °C – 8 ay	11.65	13.70	11.86	12.04	12.19
	Oda sıcaklığı 16 ay	12.56	16.64	13.93	14.7	15.48
	-20 °C – 16 ay	11.98	12.97	12.58	12.68	12.8
miR16	Taze	18.03	21.21	18.55	19.16	19.83
	Oda sıcaklığı 8 ay	20.02	21.03	20.22	20.34	20.7
	-20 °C – 8 ay	19.56	22.72	19.94	20.15	21.3
	Oda sıcaklığı 16 ay	20.02	21.01	20.24	20.48	20.63
	-20 °C – 16 ay	20.56	21.72	20.71	20.96	21.22

4.1. SNORD48 Ct

Farklı ortam koşullarındaki SNORD48 Ct düzeylerinin değerlendirilmesi için

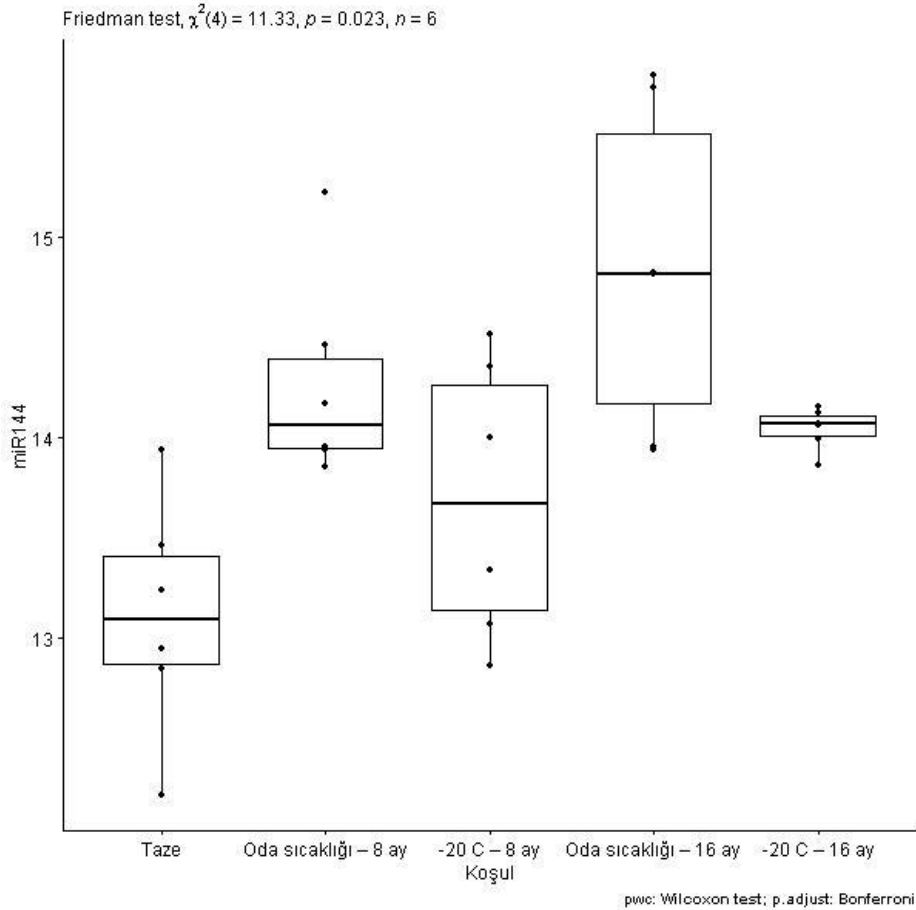
Friedman testi ve ikili karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Friedman testi sonuçlarına göre farklı ortam koşulları arasında anlamlı Ct düzeyi farklılığı tespit edilmemiştir ($\chi^2(4) = 5.28, p = .260$). Etki büyüklüğü istatistiği Kendall W = .22'ye göre çalışmada ele alınan koşulların, SNORD48 Ct düzeyi üzerinde küçük bir etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılabilir. Söz konusu analiz sonuçları Şekil 4.1'de görselleştirilmiştir.



Şekil 4.1. SNORD48 Ct düzeyinin farklı koşullara göre değerlendirilmesi.

4.2. miR144 Ct

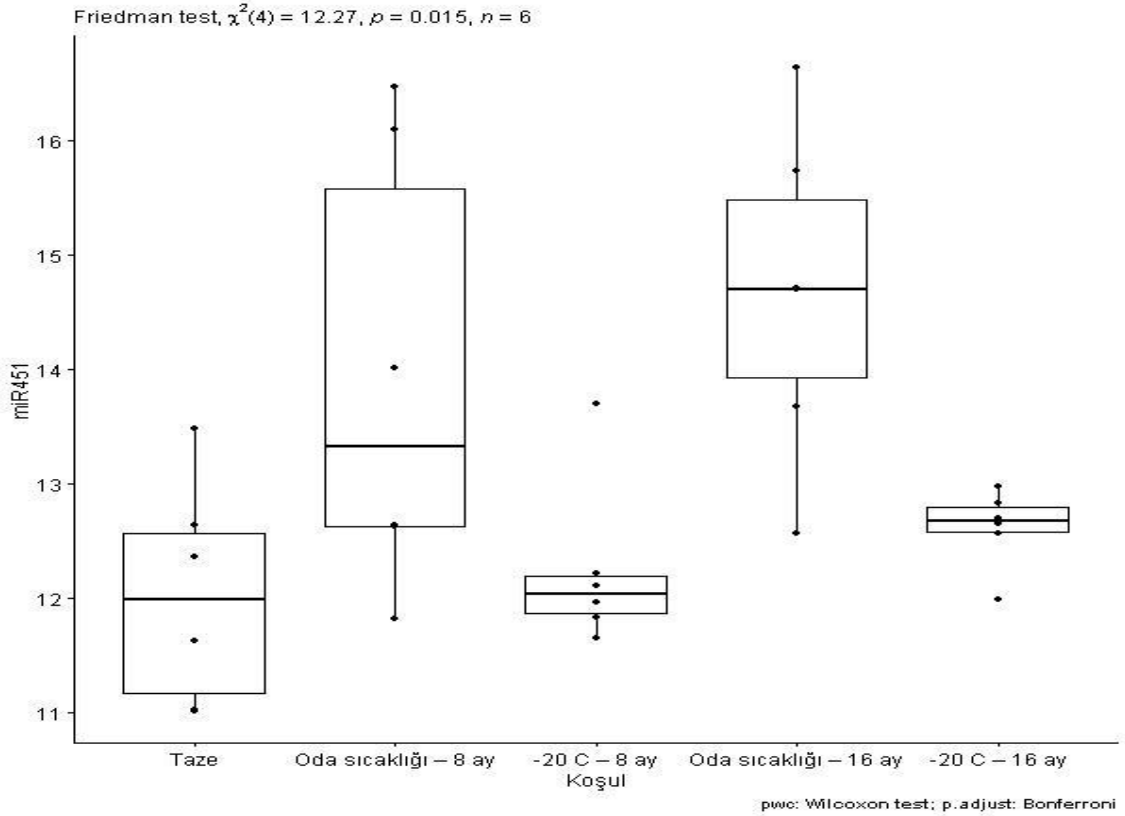
miR144 Ct düzeylerinin farklı koşullarda değerlendirilmesi için Friedman testi ve ikili karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Friedman testi sonuçlarına göre farklı koşullarda anlamlı Ct düzeyi farklılığı tespit edilmiştir ($\chi^2(4) = 11.33, p = .023$). Etki büyüklüğü istatistiği Kendall W = .47'ye göre çalışmada ele alınan koşulların miR144 Ct düzeyi üzerinde orta düzeyde bir etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılabilir. İkili karşılaştırmalar ile farklılığın kaynağı araştırıldığında oda sıcaklığında 16 ay bekletilen örneğin miR144 Ct düzeyinin taze örneğe kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=.019$). Bu sonuca göre oda sıcaklığında 16 ay bekletilen kan örneğinin adli amaçlı olarak tanımlanmasında miR144'ün ayırt edici belirteç olarak kullanılma potansiyeli düşüktür. Diğer ikili karşılaştırmalar ile anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Söz konusu analiz sonuçları Şekil 4.2'de görselleştirilmiştir.



Şekil 4.2. miR144 Ct düzeyinin farklı koşullara göre değerlendirilmesi

4.3. miR451 Ct

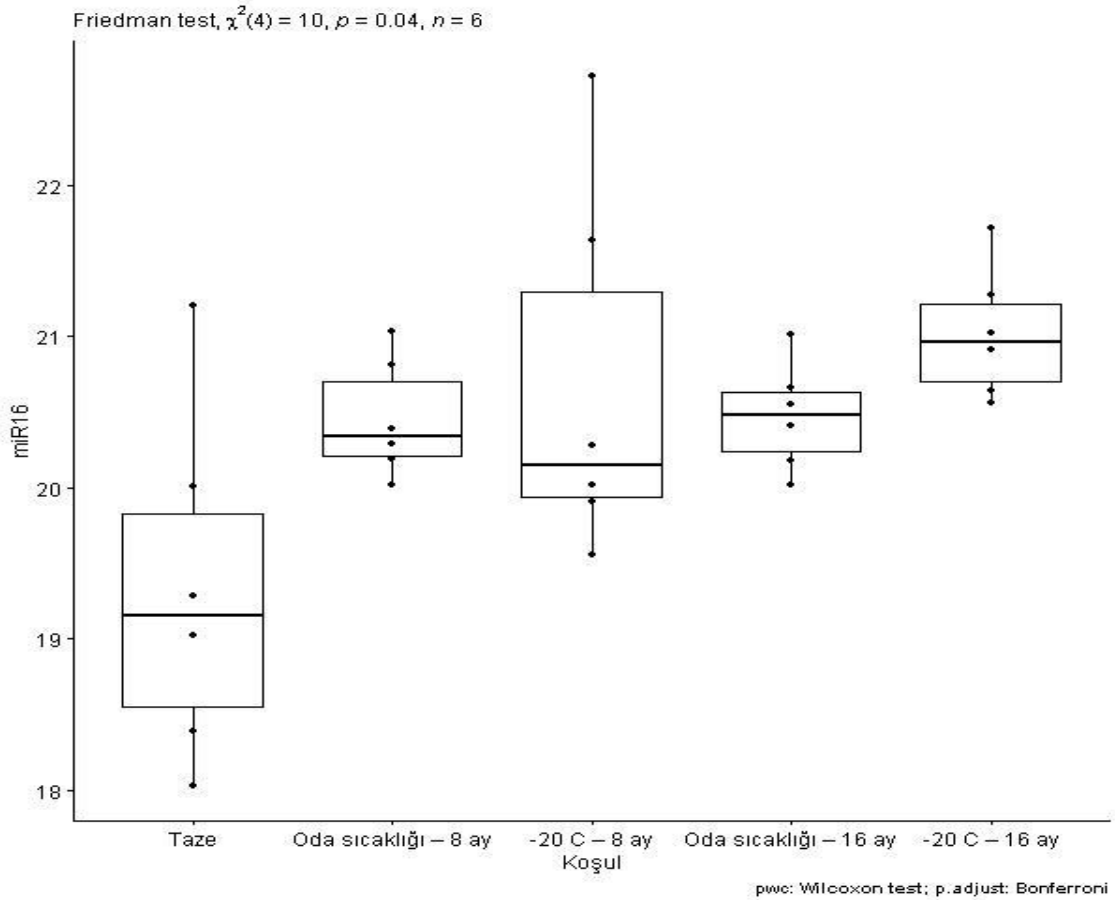
miR451 Ct düzeylerinin farklı koşullarda değerlendirilmesi için Friedman testi ve ikili karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Friedman testi sonuçlarına göre farklı koşullarda anlamlı Ct düzeyi farklılığı tespit edilmiştir ($\chi^2(4) = 12.27, p = .015$). Etki büyüklüğü istatistiği Kendall W = .55'e göre çalışmada ele alınan koşulların miR451 Ct düzeyi üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılabilir. Gerçekleştirilen ikili karşılaştırmaların 4'ünde; Taze ile Oda Sıcaklığı 8 ay ($p=.018$) arasında, Taze ile Oda Sıcaklığı 16 ay ($p=.011$) arasında, -20 °C 8 ay ile Oda Sıcaklığı 8 ay ($p=.018$) arasında ve -20 °C 8 ay ile Oda Sıcaklığı 16 ay ($p=.011$) arasında Bonferroni düzeltmesi öncesi anlamlı miR451 Ct düzeyi anlamlı farklılık tespit edilmiştir ancak Bonferroni düzeltmesi sonucunda elde edilen p değerlerinin tamamı .05'in üzerinde bulunmuştur. Diğer ikili karşılaştırmalar ile anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Her ne kadar grup farklılığı Friedman testi ile tespit edilmiş olsa da bu farklılığın kaynağını tespit etmek mümkün olmamıştır. Söz konusu analiz sonuçları Şekil 4.3'de görselleştirilmiştir.



Şekil 4.3. miR451 Ct düzeyinin farklı koşullara göre değerlendirilmesi.

4.4. miR16 Ct

miR16 Ct düzeylerinin farklı koşullarda değerlendirilmesi için Friedman testi ve ikili karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Friedman testi sonuçlarına göre farklı koşullarda anlamlı Ct düzeyi farklılığı tespit edilmiştir ($\chi^2(4) = 10.00, p = .040$). Etki büyüklüğü istatistiği Kendall W = .42'ye göre çalışmada ele alınan koşulların miR16 Ct düzeyi üzerinde orta düzeyde bir etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılabilir. İkili karşılaştırmalar ile farklılığın kaynağı araştırıldığında -20 °C sıcaklık da 16 ay bekletilen örneğin miR16 Ct düzeyinin taze örneğe kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=.019$). Bu sonuca göre -20 °C sıcaklık da 16 ay bekletilen kan örneğinin adli amaçlı olarak tanımlanmasında miR16'nın ayırt edici belirteç olarak kullanılma potansiyeli düşüktür. Diğer ikili karşılaştırmalar ile anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Söz konusu analiz sonuçları Şekil 4.4'te görselleştirilmiştir.



Şekil 4.4. miR16 Ct düzeyinin farklı koşullara göre değerlendirilmesi.

5. TARTIŞMA

Adli bilimlerde moleküler biyolojik tekniklerin gelişmesiyle birlikte, olay yerinde elde edilen biyolojik örneklerin analizinde sadece DNA değil, RNA bazlı belirteçlerin de kullanımı önem kazanmaktadır. Özellikle mikroRNA'lar (miRNA'lar), kısa ve kodlamayan RNA molekülleri olarak, doku ve vücut sıvısı tanımlamasında umut vaat eden biyomoleküller haline gelmiştir^{58,88}. Bunun temel nedeni, miRNA'ların yapısal olarak küçük olmaları, ribonükleazlara karşı daha dayanıklı olmaları ve bazı örneklem koşullarında yüksek stabilite göstermeleridir. Ancak, bu moleküllerin adli amaçlı kullanılabilirliği, yalnızca taze örneklerdeki başarılarıyla değil, aynı zamanda farklı çevresel ve depolama koşullarındaki dayanıklılıklarıyla da belirlenmelidir⁸⁹⁻⁹¹.

Bu çalışmada, üç farklı miRNA (miR-144, miR-451, miR-16) ve bir endojen kontrol geni olan SNORD48'in farklı saklama koşullarında kan örneklerinden elde edilen Ct düzeylerinin analizi yapılmıştır. Bu analiz, söz konusu moleküllerin zamana ve çevresel faktörlere karşı dayanıklılıklarını değerlendirerek adli biyolojik örneklerde güvenilir bir belirteç olarak kullanılabilirliklerini ortaya koymayı amaçlamaktadır.

Ct değeri, kantitatif PCR (qPCR) deneylerinde hedef genin amplifikasyonunun başladığı döngüyü ifade eder. Bu bağlamda, daha düşük Ct değerleri, daha yüksek miktarda hedef RNA'nın başlangıçta mevcut olduğunu gösterir. Dolayısıyla, bir miRNA'nın ya da referans genin Ct değerindeki artış, zamanla degradasyon ya da ekspresyon azalmasını yansıtabilir⁹². Bu nedenle Ct düzeylerinin stabilitesi, bir molekülün adli kullanıma uygunluğunu belirlemede kritik bir ölçüttür.

Bu tartışma bölümünde ilk olarak referans gen olarak yaygın kullanılan SNORD48'in değerlendirmesi yapılacaktır. Ardından sırasıyla miR-144, miR-451 ve miR-16'nın sonuçları analiz edilecek, depolama koşullarının etkisi yorumlanacak ve mevcut literatürle karşılaştırmalar sunulacaktır.

SNORD48 (aynı zamanda RNU48 veya U48 olarak da bilinir), küçük nükleolar RNA (snoRNA) ailesine ait bir moleküldür ve sıklıkla miRNA ekspresyon analizlerinde referans (endogenous control) gen olarak kullanılmaktadır⁹³. Bunun temel nedeni, SNORD48'in hücresel süreçler sırasında oldukça stabil ekspresyon sergilemesi ve birçok doku tipinde benzer seviyelerde bulunmasıdır. Ancak bu stabilitenin, uzun süreli saklama koşullarında da korunup korunmadığı adli bilimler açısından önemli bir

tartışma konusudur. Çalışma kapsamında, SNORD48'in farklı koşullarda gösterdiği Ct değerleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Friedman testi sonucunda anlamlı bir fark saptanmamıştır ($\chi^2(4) = 5.28$, $p = .260$). Bu bulgu, farklı sıcaklık ve sürelerde saklanan örneklerde SNORD48'in Ct düzeyinde kayda değer bir değişim olmadığını göstermektedir. Etki büyüklüğünün (Kendall's W = 0.22) düşük olması da bu sonucu desteklemektedir. Bu durum, SNORD48'in farklı koşullarda stabil kaldığını ve bu nedenle uygun bir referans gen adayı olduğunu göstermektedir. Veriler incelendiğinde SNORD48'in Ct değerlerinin, taze örneklerde ortalama 21.24 civarındayken, diğer koşullarda bu değer çok fazla sapmadığı gözlemlenmiştir. Örneğin -20°C'de 16 ay saklanan örneklerde medyan Ct değeri 21.19 olarak bulunmuştur. Bu değer, referans genin zamanla bozulmaya karşı oldukça dirençli olduğunu göstermektedir.

Adli örnekler çoğu zaman olay yerinde günlerce hatta aylarca çevresel koşullara maruz kalmakta, bu da biyolojik materyalin bozulmasına neden olmaktadır. Bu bağlamda SNORD48'in zamana ve sıcaklığa karşı gösterdiği direnç, adli örneklerde normalize edici gen olarak kullanılmasını destekler niteliktedir⁹⁴. Özellikle adli analizlerde miRNA'ların kantitatif değerlendirilmesi sırasında normalize edici bir referans genin stabil olması, hatalı yorumların önlenmesi açısından kritik öneme sahiptir.

Literatürde de benzer bulgular rapor edilmiştir. Peltier ve Latham (2008)⁹³, SNORD48'in çeşitli insan dokularında oldukça stabil ekspresyon sergilediğini ve miRNA çalışmalarında referans gen olarak güvenle kullanılabileceğini bildirmiştir. Ayrıca Kroh et al. (2010)⁹⁵, SNORD48'in plazma ve serum örneklerinde stabil kaldığını göstermiştir ki bu, kan örnekleri üzerinde yapılan bu çalışmayla uyumludur.

Ancak bazı çalışmalar, özellikle ekstrem çevre koşullarında (yüksek sıcaklık, UV ışınları, mikrobiyal kontaminasyon) SNORD48'in bozulabileceğini ve bu durumda alternatif referans genlere ihtiyaç duyulabileceğini belirtmiştir⁹⁶. Bu nedenle SNORD48'in her zaman ve her örnek tipi için tek başına yeterli olamayabileceği, ancak kontrollü koşullarda oldukça güvenilir olduğu sonucuna varılabilir.

miR-144, eritropoez ve hematopoietik sistem ile ilişkili olarak ifade edilen, kırmızı kan hücrelerinde bol miktarda bulunan bir mikroRNA'dır. Başta hematolojik hastalıklar, oksidatif stres yanıtı ve inflamasyon süreçlerinde rol oynadığı gösterilmiştir^{59,97}. Bu bağlamda, özellikle kan örneklerinin tanımlanmasında miR-144,

özgüllüğü ve yüksek ekspresyon seviyesi nedeniyle adli bilimlerde öne çıkan aday belirteçlerden biri olarak değerlendirilmektedir (Zubakov et al., 2010).

Çalışma kapsamında miR-144'ün farklı depolama koşullarına maruz bırakılan kan örneklerindeki Ct düzeyleri incelendiğinde, Friedman testi anlamlı bir grup farklılığı ortaya koymuştur ($\chi^2(4)=11.33$, $p = .023$). Bu sonuç, farklı koşullarda saklanan örneklerde miR-144 ekspresyonunun önemli ölçüde değiştiğine işaret etmektedir. Etki büyüklüğü ise Kendall's W = 0.47 olarak bulunmuş ve bu da koşulların miR-144 Ct düzeyi üzerinde **orta düzeyde etkili** olduğunu göstermektedir.

İkili karşılaştırmalarda dikkat çeken bulgu, **oda sıcaklığında 16 ay boyunca saklanan örneklerde**, taze örneklerle kıyaslandığında anlamlı derecede daha yüksek Ct değeri (daha düşük miRNA miktarı) saptanmasıdır ($p = .019$). Bu durum, miR-144'ün uzun süreli oda sıcaklığı koşullarında degradasyona uğradığını, yani stabilitesini kaybettiğini göstermektedir.

Diğer koşullar arasında (özellikle -20°C 'de saklanan örneklerle karşılaştırıldığında), anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu da düşük sıcaklıkta saklamanın miR-144'ün korunmasına katkı sunduğunu göstermektedir.

Bu bulgular adli bilimlere açısından önemli çıkarımlar içermektedir. Özellikle miR-144'ün kan özgüllüğü yüksek bir belirteç olması nedeniyle vücut sıvısı tanımlamada kullanılması önerilmektedir^{58,98}. Ancak, bu çalışmada elde edilen veriler göstermektedir ki **miR-144 sadece taze veya -20°C gibi kontrollü koşullarda saklanan örneklerde güvenilir bir belirteç olarak kullanılabilir.**

Oda sıcaklığında uzun süre bekletilen örneklerde molekülün bozulması, yanlış negatif sonuçlara veya miktarının olduğundan daha düşük tahmin edilmesine yol açabilir. Bu durum, özellikle örneğin olay yerinde günler veya aylar boyunca çevresel koşullara maruz kalması halinde, miR-144 kullanım güvenilirliğini azaltmaktadır.

Benzer bulgular literatürde de gözlemlenmiştir. Wang ve ark. (2014)⁵⁹, miR-144'ün hücre dışı ortamlarda sıcaklık ve zaman etkisiyle stabilitesini kaybedebileceğini bildirmiştir. Ayrıca Kirschner ve ark. (2011)⁹⁹, miRNA'ların çevresel degradasyon karşısında gösterdiği dayanıklılığın, molekülün nükleotid dizisi, ikincil yapısı ve bağlandığı protein komplekslerine bağlı olduğunu vurgulamıştır. miR-144 bu yönüyle, yüksek özgüllüğüne rağmen stabilite açısından sınırlılıklara sahiptir.

Zubakov ve ark. (2010)¹², miR-144'ün kan örneklerinde yüksek düzeyde ifade

edildiğini ve diğer vücut sıvılarında düşük düzeylerde bulunduğunu rapor etmiştir. Bu özellik, miR-144'ü kan tanımlamasında uygun olduğunu ifade etmişlerdir. miR-144'ün 5 farklı vücut sıvısında ifade düzeyinin araştırıldığı bir tez çalışmasında da miR-144'ün test edilen kan, menstrüel kan, semen, tükürük ve vajinal sekresyon içinde ekspresyon seviyesi en yüksek olan biyolojik sıvının kan olduğu gösterilmiştir¹⁰⁰.

Ancak Wang ve ark. (2014)⁵⁹, miR-144'ün özellikle sıcaklığa karşı duyarlı olduğunu ve ekspresyon düzeyinin 37°C'de birkaç gün içerisinde azaldığını göstermiştir. Bu bulgu, mevcut çalışmada oda sıcaklığında 16 ay boyunca saklanan örneklerde gözlenen Ct artışıyla tutarlıdır.

Ayrıca Kirschner ve ark. (2011)⁹⁹, miR-144 gibi eritrosit kaynaklı miRNA'ların hemolize karşı hassas olabileceğini ve bu nedenle çevresel faktörlerden kolay etkilenebileceğini vurgulamıştır. Bu bilgiler, çalışmadaki bulgunun literatürle güçlü bir uyum içerisinde olduğunu ve miR-144'ün olumsuz çevre koşullarına maruz kalan örneklerde ilerleyen zamana bağlı olarak sınırlı güvenilirlik sunabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, olay yerinde bulunan bir biyolojik örnekte düşük miR-144 seviyesi, sadece degradasyona değil, bireyin hematolojik geçmişine de bağlı olabileceğinden, miR-144'ün tek başına değil, diğer miRNA'lar ve referans genlerle birlikte değerlendirilmesi gerekir.

miR-451, eritroid hücre serilerinde yüksek düzeyde ifade edilen, kan ve özellikle kırmızı kan hücresi kökenli örneklerde güçlü bir ekspresyona sahip olan mikroRNA'lardan biridir. Bu özellikleri nedeniyle adli moleküler biyoloji çalışmalarında kanın tanımlanması için özgül bir biyobelirteç olarak önerilmiştir^{12,101}. miR-451'in ekspresyonu özellikle olgun eritrositlerde belirgindir ve diğer vücut sıvılarında bulunma olasılığı düşüktür; bu da onu, yüksek duyarlılık ve özgüllük aranan adli testlerde öne çıkaran bir özelliktir^{98,100}.

Çalışmanın bulgularına göre miR-451'in farklı saklama koşullarındaki Ct düzeyleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($\chi^2(4) = 12.27, p = .015$). Bu bulgu, farklı koşulların miR-451 ekspresyon düzeyi üzerinde kayda değer bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Etki büyüklüğü ise Kendall's W = 0.55 olup bu da büyük düzeyde bir etkiyi işaret eder.

Fakat anlamlılık Bonferroni düzeltmesi uygulandıktan sonra ortadan kalkmıştır. İlk analizde dört ikili karşılaştırma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur:

- Taze örnek ile oda sıcaklığı 8 ay ($p = .018$)
- Taze örnek ile oda sıcaklığı 16 ay ($p = .011$)
- -20°C 8 ay ile oda sıcaklığı 8 ay ($p = .018$)
- -20°C 8 ay ile oda sıcaklığı 16 ay ($p = .011$)

Ancak Bonferroni düzeltmesi sonrası bu p değerleri .05'in üzerine çıkmış ve anlamlılık düzeyini kaybetmiştir. Bu durum, verilerdeki genel varyasyonun istatistiksel olarak dikkat çekici olduğunu ancak çoklu karşılaştırma düzeltmesi sonrası bu farklılıkların daha dikkatli yorumlanması gerektiğini göstermektedir.

Verilerden çıkarılabilecek en önemli yorumlardan biri, oda sıcaklığında saklanan örneklerde miR-451'in Ct düzeylerinde kayda değer bir artış olduğudur. Ct değerindeki bu artış, miR-451 molekülünün zamanla degradasyona uğradığını ve ekspresyonunun azaldığını göstermektedir. Özellikle 16 ay boyunca oda sıcaklığında saklanan örneklerde median Ct değerinin yaklaşık 14.7 olması, taze örneklerdeki medyan değerden (11.99) belirgin şekilde yüksektir.

Bu sonuçlar, miR-451'in oldukça umut vaat eden bir belirteç olduğunu ancak sadece taze ya da uygun koşullarda (örn. -20°C) saklanan örneklerde güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir. Adli uygulamalarda olay yeri örneklerinin sıklıkla günler veya aylar boyunca çevresel etkilere maruz kaldığı düşünüldüğünde, miR-451'in özellikle uzun süre oda sıcaklığına maruz kalmış örneklerde kullanımının dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Iroanya ve ark. (2022)¹⁰² ise simüle edilmiş adli koşullarda miR-451'in ısı ve zaman etkisiyle değişiklik gösterebildiğini, ancak -20°C ve -80°C 'de saklanan örneklerde stabil kaldığını göstermiştir. Bu bulgu, mevcut çalışmada da doğrulanmıştır. Özellikle -20°C 'de saklanan örneklerde Ct düzeyleri korunmuş, oda sıcaklığında saklananlarda ise belirgin bir artış gözlemlenmiştir.

Wang ve ark. (2019)¹⁰¹ ise miR-451'in 37°C 'de birkaç gün içerisinde ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığını, bu nedenle dış ortama maruz kalan örneklerde dikkatli değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamıştır.

Öte yandan, miR-451'in Ct değerlerindeki artış, hem taze hem de dondurulmuş örneklerde oldukça sınırlı düzeyde kalmıştır. -20°C 'de saklanan örneklerde Ct değerleri

taze örnekler ile neredeyse aynıdır. Bu bulgu, düşük sıcaklık koşullarında miR-451'in stabil kaldığını ve bu koşullarda kullanılabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir¹⁰².

Bu bağlamda, miR-451'in adli biyolojik örneklerde güvenilir bir kan belirteci olarak değerlendirilmesi mümkündür ancak bu değerlendirme, örneğin bulunduğu koşulların detaylı şekilde analiz edilmesiyle desteklenmelidir.

Zubakov ve ark. (2010)¹² tarafından yapılan çalışmada, miR-451'in vücut sıvılarının ayırt edilmesinde yüksek özgüllüğe sahip olduğu ve özellikle kan için güvenilir bir belirteç olarak öne çıktığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, Courts ve Madea (2010)⁹⁸, miR-451'in tükürük ve diğer vücut sıvılarında da düşük düzeylerde saptanabileceğini, ancak bu sinyalin kan örneklerindeki kıyasla çok zayıf olduğunu vurgulamıştır. Bu durum, molekülün tanınabilir özgüllüğünü artırsa da, çevresel faktörlere karşı dayanıklılığı sınırlı kalabilmektedir.

Buna paralel olarak Iroanya ve ark.¹⁰¹, miR-451'in 37°C'de birkaç gün içinde ekspresyon seviyesinde azalma gösterdiğini, buna karşın -20°C ve -80°C koşullarında stabil kaldığını göstermiştir. Bu sonuç, mevcut çalışmanın bulgularıyla doğrudan uyumludur.

Ek olarak, miR-451'in ikincil yapısının açıkta kalan bölgelerinin ribonükleaz saldırılarına karşı nispeten hassas olması, molekülün özellikle ılık veya sıcak çevrelerde bozulmasını hızlandırabilir⁹⁹. Bu durum, oda sıcaklığında saklanan örneklerde Ct değerindeki artışı moleküler düzeyde açıklamaktadır.

miR-16, çok sayıda insan dokusunda yaygın şekilde ifade edilen ve hücresel proliferasyon, apoptozis ve siklin regülasyonu gibi temel biyolojik süreçlerde görev alan oldukça konservatif bir mikroRNA'dır⁴⁶. Lenfoid hücrelerde yüksek düzeyde ifade edilmesiyle bilinen miR-16, normalize edici referans miRNA olarak da önerilmiştir¹⁰³. Bununla birlikte, miR-16'nın kan hücrelerinde yüksek miktarda bulunması, onu adli biyolojik örneklerde kan tanımlaması için potansiyel belirteç olarak ön plana çıkarmaktadır^{58,98}.

Adli bilimlerde miR-16'nın zaman, sıcaklık ve çevresel faktörlere karşı gösterdiği dayanıklılık, kullanılabilirliğinin sınırlarını belirleyen temel faktörlerden biridir. Chen ve ark. (2005)⁷⁹, miR-16'nın plazma ve serum örneklerinde stabil olduğunu, bu nedenle normalize edici gen olarak tercih edilebileceğini bildirmiştir. Ancak McDonald ve ark.

(2011)¹⁰⁴, hemoliz durumlarında miR-16 seviyesinin ciddi şekilde artabileceğini ve bu durumun analizleri etkileyebileceğini ifade etmiştir.

Mevcut çalışmada miR-16, -20°C'de 16 ay boyunca saklandığında bile Ct düzeyinde anlamlı bir artış göstermiştir. Bu bulgu, miR-16'nın uzun vadede dondurulmuş ortamda bile bozulabileceğini göstermektedir. Bu açıdan, SNORD48 kadar stabil bir referans gen olmadığı ve yüksek güven gerektiren adli analizlerde dikkatli değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılabilir.

Çalışma sonuçları genel olarak literatürle büyük oranda örtüşmektedir. Tüm moleküller için çevresel faktörlerin – özellikle zaman ve sıcaklık – belirleyici olduğu, moleküler degradasyonun miRNA'ların kullanım potansiyelini doğrudan etkilediği görülmektedir. Bu nedenle, miRNA'ların adli kullanımında yalnızca ekspresyon düzeyi değil, aynı zamanda stabilite profili de belirleyici kriter olmalıdır.

Bu çalışmanın en belirgin güçlü yönlerinden biri, örneklerin beş farklı koşul altında değerlendirilmiş olmasıdır. Taze, oda sıcaklığı 8 ay, oda sıcaklığı 16 ay, -20°C 8 ay ve -20°C 16 ay gibi zamana ve sıcaklığa bağlı farklı saklama senaryoları, gerçek olay yeri koşullarını modelleyebilme açısından oldukça kıymetlidir. Literatürde birçok miRNA çalışması sadece taze örneklerle veya kısa süreli koşullarla sınırlı kalırken^{79,98} bu çalışmanın zamana yayılan kapsamlı tasarımı, miRNA stabilitesi üzerine derinlemesine analiz imkânı sunmaktadır.

Sadece hedef miRNA'ların değil, aynı zamanda normalize edici referans gen olan SNORD48'in de aynı koşullarda değerlendirilmesi, çalışmayı özgün kılmaktadır. Çünkü birçok adli miRNA çalışması yalnızca hedef moleküller üzerine odaklanmakta ve referans genin stabilitesini göz ardı etmektedir⁹². Bu çalışmada hem SNORD48'in hem de miR-144, miR-451 ve miR-16'nın incelenmesi, normalize edilmemiş sonuçların yorumlanmasında hata payını azaltmak açısından önemli bir metodolojik avantajdır.

Çalışmada farklı koşullarda değerlendirilen örnek sayısının istatistiksel analizler için yeterli olduğu belirtilmekle birlikte, biyolojik replikasyonların sayısına dair daha fazla bilgi verilmemiştir. Özellikle insan kaynaklı örneklerde bireysel varyasyon yüksek olduğundan, farklı bireylerden alınan örneklerin dahil edilmesi bulguların genellenebilirliği açısından daha güçlü sonuçlar sağlayabilirdi¹⁰⁴. Bu eksiklik, bulguların bireyler arası farklardan ziyade yalnızca koşul etkisine odaklandığını göstermektedir.

Çalışmada miR-16'nın Ct düzeyleri farklı koşullarda analiz edildiğinde, Friedman testi istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ortaya koymuştur ($\chi^2(4)=10.00$, $p = .040$). Etki büyüklüğü *Kendall's W* = 0.42 olarak hesaplanmış ve bu da koşulların miR-16 düzeyleri üzerinde orta düzeyde bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

İkili karşılaştırmalarda, özellikle -20°C'de 16 ay saklanan örneklerin Ct değerlerinin, taze örneklerle göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p = .019$). Bu durum, -20°C'de uzun süreli saklama koşullarının bile miR-16 üzerinde zamanla degradasyon etkisi oluşturduğunu göstermektedir. Diğer koşullarda ise anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Tanımlayıcı verilere bakıldığında da bu eğilim net şekilde görülmektedir. Taze örneklerde medyan Ct değeri 19.16 iken, -20°C'de 16 ay boyunca saklanan örneklerde bu değer 20.96'ya yükselmiştir. Bu, miR-16'nın düşük sıcaklıkta bile zamanla stabilitesini kısmen kaybettiğine işaret etmektedir.

Bu bulgular, miR-16'nın yüksek ekspresyonuna ve potansiyel tanısal gücüne rağmen, özellikle uzun süreli saklama koşullarında güvenilirliğinin azalabileceğini ortaya koymaktadır. -20°C gibi kontrollü koşullarda bile degradasyon gözlenmiş olması, miR-16'nın özellikle olay yerinden elde edilen eski örneklerde kullanımını sınırlandırabilir.

Bununla birlikte, diğer sıcaklık koşullarında – örneğin 8 aylık -20°C ve 8 aylık oda sıcaklığı koşullarında – anlamlı bir bozulma gözlemlenmemiştir. Bu da kısa sürede (yaklaşık 8 aya kadar) miR-16'nın stabil kalabildiğini, fakat 16 ay gibi daha uzun sürelerde stabilitesini koruyamayabileceğini göstermektedir.

miR-16'nın bu özelliği, özellikle olay zamanlaması bilinen kriminal olaylarda zaman tahmini yapılmasına yönelik çalışmalarla birleştirildiğinde faydalı olabilir¹⁰⁵. Örneğin, miR-16'nın belirgin şekilde bozulmuş olması örneğin olay yerinde uzun süre kaldığını gösterebilir.

Literatürde miR-16'nın stabilitesine dair farklı sonuçlar bildirilmektedir. Chen ve ark. (2005)⁷⁹, miR-16'nın hem doku hem de plazma örneklerinde oldukça stabil olduğunu belirtmiş ve bu nedenle normalize edici kontrol olarak önermiştir. Ancak, McDonald ve ark. (2011)¹⁰⁴ gibi bazı çalışmalar, miR-16'nın hemoliz gibi teknik değişkenlerden ciddi şekilde etkilendiğini ve dış ortamlarda stabilitesinin beklenenden düşük olabileceğini vurgulamıştır.

Adli bilimler alanının da yapılan çalışmalar, miR-16'nın özellikle kan örneklerinde tanımlayıcı olarak kullanılabileceğini ancak tek başına değil, diğer miRNA'lar ve referans genlerle birlikte değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır^{58,98}.

Bir diğer önemli husus da miR-16'nın birçok hücre türünde ifade edilmesi nedeniyle özgüllük sorunu yaratabileceğidir. Kan dışı örneklerde de düşük düzeyde bulunabildiği için, miR-144 ve miR-451 gibi daha özgül belirteçlerle birlikte kullanılması önerilmektedir¹².

Adli biyolojik örneklerin analizi, çoğu zaman örneklerin olay yerinde uzun süre bekletilmesi, uygun olmayan sıcaklıklara maruz kalması veya çevresel faktörlerden etkilenmesi gibi dezavantajlı durumlar altında gerçekleştirilir. Bu nedenle, adli amaçla kullanılacak moleküler belirteçlerin çevresel faktörlere karşı dayanıklılığı son derece önemlidir^{106,107}. Bu çalışmada, 5 farklı koşulda (Taze, Oda Sıcaklığı 8 Ay, -20°C 8 Ay, Oda Sıcaklığı 16 Ay, -20°C 16 Ay) saklanan kan örneklerinde SNORD48 ve üç miRNA'nın (miR-144, miR-451, miR-16) Ct düzeyleri incelenmiş, zaman ve sıcaklığın etkileri sistematik olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma yalnızca kan örneklerine odaklanmış olup, diğer vücut sıvılarındaki miRNA stabilitesi değerlendirilmemiştir. Oysa adli olay yerlerinde sadece kan değil, semen, tükürük, idrar, vajinal sıvı gibi farklı biyolojik materyallerle de karşılaşılır⁵⁸. Literatürde farklı vücut sıvılarında aynı miRNA'nın ekspresyon düzeylerinin ve stabilitesinin değişebileceği bildirilmiştir¹². Bu nedenle bulgular, diğer vücut sıvılarına doğrudan genellenemez.

Ct düzeylerinin zamanla artmasının RNA degradasyonu ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır. Ancak bu çalışmada RNA bozunmasını açıklayacak moleküler mekanizmalara (örneğin nükleaz aktivitesi, bağlayıcı proteinlerin rolü, ikincil yapı çözülmesi) dair analizler yapılmamıştır. Bu da degradasyonun nedenini yalnızca fenomenolojik olarak değil, biyokimyasal düzeyde de açıklayabilmeyi sınırlandırmaktadır⁹⁹.

Bu çalışma, miRNA'ların adli bilimlerde potansiyel kullanımını değerlendiren kapsamlı deneysel analizlerden biridir. Beş farklı saklama koşulu altında (taze, oda sıcaklığı 8 ay, -20°C 8 ay, oda sıcaklığı 16 ay, -20°C 16 ay) SNORD48 ve üç farklı miRNA (miR-144, miR-451, miR-16) için elde edilen Ct verileri, moleküler stabilitenin zaman ve sıcaklıkla nasıl etkilendiğini açık biçimde ortaya koymuştur. Bulgular, adli

biyolojik örneklerin değerlendirilmesinde yalnızca hedef moleküllerin ekspresyon seviyesinin değil, bu moleküllerin çevresel stres faktörlerine karşı gösterdikleri direnç düzeylerinin de dikkate alınması gerektiğini göstermiştir^{12,98}.

Bu bağlamda SNORD48, çalışmada en stabil molekül olarak öne çıkmış, farklı koşullarda anlamlı değişim göstermemiştir. Bu da SNORD48'in normalize edici referans gen olarak adli RNA analizlerinde güvenilir biçimde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır^{93,95}.

miR-451, kan için özgül bir belirteç olarak literatürdeki yüksek potansiyelini doğrular nitelikte başarılı performans göstermiştir; ancak bu performans, saklama koşullarına duyarlılık nedeniyle yalnızca kısa süreli ya da -20°C gibi düşük sıcaklıkta muhafaza edilen örneklerde geçerlidir¹⁰¹. Benzer şekilde miR-144 ve miR-16 da belirli koşullarda değerli belirteçler olabilirken, uzun süreli ve/veya sıcak ortam maruziyetlerinde güvenilirliklerini kaybetmişlerdir.

Veriler bütüncül olarak değerlendirildiğinde, en stabil molekülün SNORD48 olduğu açıkça görülmektedir. Farklı koşullarda SNORD48'in Ct düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmamış ($p = .260$) ve etki büyüklüğü düşük kalmıştır (Kendall's $W = .22$). Bu sonuç, SNORD48'in düşük sıcaklıkta da oda sıcaklığında da zamanla önemli bir degradasyona uğramadığını göstermektedir. Bu bulgu, referans gen olarak yaygın şekilde kullanılan SNORD48'in adli örneklerde normalize edici gen olarak kullanılabilirliğini desteklemektedir^{93,95}.

miR-144 için oda sıcaklığında 16 ay bekletilen örneklerde anlamlı Ct artışı gözlenmiş ve bu artış taze örneklerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = .019$). Bu, miR-144'ün özellikle uzun süreli oda sıcaklığı maruziyetine duyarlı olduğunu ve bu koşullarda güvenilir bir belirteç olarak değerlendirilemeyeceğini göstermektedir. Literatürde benzer şekilde, miR-144'ün dış çevresel etkilere karşı kısmen duyarlı olduğu ve yüksek sıcaklıkta stabilitesini kaybettiği bildirilmiştir⁵⁹.

miR-451'de ise genel anlamda grup farklılığı tespit edilmiş ($p = .015$, $W = .55$), ancak Bonferroni düzeltmesi sonrası ikili karşılaştırmalarda anlamlılık ortadan kalkmıştır. Bu, genel bir eğilim olmasına rağmen varyasyonun daha çok grup içinde dalgalanmaya bağlı olduğunu düşündürmektedir. Yine de oda sıcaklığında saklanan örneklerde Ct artışı belirgindir, bu da uzun süreli çevresel maruziyetin molekülü

etkilediğini gösterir. Bu bulgu, miR-451'in değeri yüksek olmasına rağmen saklama koşullarına dikkat edilmesi gerektiğini ortaya koyar^{101,102}.

miR-16'da ise en dikkat çekici bulgu, -20°C'de 16 ay bekletilen örneklerde bile Ct değerinde anlamlı artış gözlenmiş olmasıdır ($p = .019$). Bu durum, miR-16'nın stabilitesinin mutlak olmadığını ve zamanla, hatta düşük sıcaklıkta bile degradasyona uğrayabileceğini göstermektedir. Literatür bu konuda çelişkili bilgiler sunsa da bazı çalışmalar miR-16'nın özellikle hücre dışı ortamda hemoliz ve saklama koşullarından etkilendiğini bildirmiştir¹⁰⁴.

Tüm moleküller için ortak eğilim, -20°C'de saklanan örneklerin oda sıcaklığında saklanana göre daha stabil kaldığıdır. Oda sıcaklığında 8 ve 16 ay boyunca saklanan örneklerde genel olarak Ct değerlerinde artış saptanırken, dondurulmuş örneklerde bu artış daha sınırlıdır. Bu durum, adli moleküler analizlerde saklama sıcaklığının kritik bir değişken olduğunu göstermektedir.

Zubakov ve ark. (2010)¹², miRNA'ların yapısal olarak daha küçük ve çift zincirli segmentlere sahip olmaları nedeniyle, mRNA'lara kıyasla daha stabil olduklarını belirtse de, özellikle çevresel RNaz'lara ve sıcaklık değişimlerine karşı uzun süreli korunmalarının garanti edilmediğini vurgulamıştır.

Sonuç olarak seçilen her üç aday miRNA belirtecinin de farklı ortam koşullarını içeren çeşitli zaman aralıklarında saklanan kan lekelerinde zamana bağlı olarak stabilitesini kısmen kaybettiği, bu nedenle bu belirteçlerin analiz sonuçlarının güvenilir olabilmesi için adli laboratuvarlarda biyolojik örneklerin saklanma koşulları ve sürelerine dikkat edilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Bu veri adli laboratuvarlarda örneklerin mümkün olan en kısa sürede dondurularak saklanması önerisini desteklemektedir¹⁰². Bu durum ayrıca, olay yerinden toplanan adli biyolojik örneklerde yapılacak miRNA'ya dayalı analizlerde biyolojik materyalin bulunduğu çevresel koşullar ve olay yerine bırakılma sürelerinin göz önünde bulundurulması gerektiğini de göstermektedir. Bunun yanında, bu çalışmada miRNA'ların farklı ortam koşullarını içeren farklı zaman aralıklarında saklanan örneklerdeki degradasyon seviyelerinde farklılıklar nedeniyle, literatürde vücut sıvılarının tanımlanmasına dayalı analizlerde yalnızca tek miRNA'ya dayalı sonuçlar yerine aynı biyolojik örnek üzerinde birden fazla özgül miRNA'nın eş zamanlı olarak değerlendirilmesi gerektiği önerileri de desteklenmektedir^{12,58}. Ayrıca, aday referans gen SNORD48'in zamana ve sıcaklık

değişimine kısmen dirençli olması nedeniyle kan lekelerinin tanımlanmasında referans gen olarak kullanılmasının uygun olacağı izlenmiş olup, bu bulgu da mevcut literatür ile tutarlılık göstermiştir⁹².



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonuçları, miRNA'ların ve referans genlerin adli örneklerde kullanılabilirliği açısından bazı temel çıkarımlar sağlamaktadır:

1. Referans gen olarak kullanılabilirliği araştırılan **SNORD48**'in oda sıcaklığında ve -20°C'de 16 aya kadar saklanan örneklerde stabilitesini koruduğu, bu nedenle adli amaçlı kan lekeleri tanımlanırken bu belirtecin referans gen olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.
2. Aday kan belirteci olarak seçilen **miR-451**'in taze örneklerle derin dondurucuda 16 aya kadar saklanan kan örneklerinde stabil kalması bu koşulları taşıyan örneklerde kullanılabileceğini; ancak oda sıcaklığında 8 ay ve üzeri bekletilmiş örneklerde stabilitesini kaybettiğinden, değerlendirmenin bu grupta dikkatle yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.
3. Aday kan belirteci olarak seçilen ikinci aday belirteç **miR-144**'ün 16 ay ve üzeri sürelerde oda sıcaklığında bozulma eğiliminde olduğu; bu nedenle adli amaçlı kan lekelerinin tanımlanması amacıyla kullanımının sınırlı kalabileceği saptanmıştır.
4. Aday kan belirteci olarak seçilen üçüncü aday belirteç **miR-16**'nın ise 16 aylık süre sonunda -20°C'de bile degradasyon seviyesinin diğer iki aday belirtece kıyasla daha yüksek olması nedeniyle adli kullanımının daha da sınırlı kalacağı izlenmiştir.

Sonuç olarak adli analizlerde olay yerinden elde edilen biyolojik örneklerin güvenilirliği, yalnızca kullanılan teknikle değil, biyolojik materyalin **çeşitli ortam koşullarında stabil kalabilme süresine de bağlıdır**. Bu nedenle, adli amaçlı vücut sıvılarının tanımlanmasında kullanılacak moleküler belirteçlerin seçiminde, örneğin geçmişi ve maruz kaldığı koşulların dikkate alınması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Saferstein, Richar. & Roy, Tiffany. *Revel Access Code for Criminalistics*. (2020).
2. James, S. H. ., Nordby, J. J. . & Bell, Suzanne. *Forensic Science : An Introduction to Scientific and Investigative Techniques, Fourth Edition*. (CRC Press, 2014).
3. Lee, H. C. ., Palmbach, Timothy. & Miller, M. T. . *Henry Lee's Crime Scene Handbook*. (Elsevier Academic Press, 2007).
4. Houck, M. M. . *Forensic Biology*. (Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016).
5. James, S. H., Kish, P. E. & Sutton, T. P. *Principles of Bloodstain Pattern Analysis*. (CRC Press, 2005). doi:10.1201/9781420039467.
6. Liu, Z. *et al.* A Comprehensive Characterization of Small RNA Profiles by Massively Parallel Sequencing in Six Forensic Body Fluids/Tissue. *Genes (Basel)* **13**, 1530 (2022).
7. Fujimoto, S. *et al.* Distinct spectrum of microRNA expression in forensically relevant body fluids and probabilistic discriminant approach. *Sci Rep* **9**, 14332 (2019).
8. Houck, M. M. . & Siegel, J. A. . *Fundamentals of Forensic Science*. (Academic Press, 2011).
9. Butler, J. M. . *Advanced Topics in Forensic DNA Typing : Interpretation*. (Academic Press, 2015).
10. Houck, M. M. . & Siegel, J. A. . *Fundamentals of Forensic Science*. (Elsevier Science, 2010).
11. Fujimoto, S. *et al.* Distinct spectrum of microRNA expression in forensically relevant body fluids and probabilistic discriminant approach. *Sci Rep* **9**, 14332 (2019).
12. Zubakov, D. *et al.* MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med* **124**, 217–226 (2010).
13. Haas, C., Hanson, E., Kratzer, A., Bär, W. & Ballantyne, J. Selection of highly specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of blood. *Forensic*

- Sci Int Genet* **5**, 449–458 (2011).
14. Li, Richard. *Forensic Biology*. (CRC Press, Taylor & Francis Group, 2015).
 15. Tortorano, A. M. *et al.* Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **23**, 317–322 (2004).
 16. Wu, L., Fan, J. & Belasco, J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 4034–4039 (2006).
 17. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
 18. Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901–906 (2000).
 19. Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G. & Bartel, D. P. An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (1979) **294**, 858–862 (2001).
 20. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* (1979) **294**, 853–858 (2001).
 21. Friedländer, M. R. *et al.* Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol* **15**, R57 (2014).
 22. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **9**, 102–114 (2008).
 23. Sætrom, P. *et al.* Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res* **35**, 2333–2342 (2007).
 24. Bernardo, B. C., Charchar, F. J., Lin, R. C. Y. & McMullen, J. R. A MicroRNA Guide for Clinicians and Basic Scientists: Background and Experimental Techniques. *Heart Lung Circ* **21**, 131–142 (2012).
 25. Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S. & Enright, A. J. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* **36**, D154–D158 (2007).

26. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* **18**, 3016–3027 (2004).
27. Zhang, H. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* **21**, 5875–5885 (2002).
28. Gunel, T., Kazem Hosseini, M., Gumusoglu, E., Dolekcap, I. & Aydinli, K. Future Perspective of Preeclampsia by miRNA. *Global Journal of Human Genetics & Gene Therapy*. **2**, 68–78 (2015).
29. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* **11**, 228–234 (2009).
30. Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 121–127 (2004).
31. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/gene-expression-14121669/>. (2024).
32. Soheli, M. H. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences* **10**, 175–186 (2016).
33. Shen, J., Stass, S. A. & Jiang, F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett* **329**, 125–136 (2013).
34. Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D. & Wang, K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **717**, 85–90 (2011).
35. Bertoli, G., Cava, C. & Castiglioni, I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* **5**, 1122–1143 (2015).
36. Fiore, R., Khudayberdiev, S., Saba, R. & Schratt, G. MicroRNA Function in the Nervous System. in 47–100 (2011). doi:10.1016/B978-0-12-415795-8.00004-0.
37. Liu, N.-K. & Xu, X.-M. MicroRNA in central nervous system trauma and degenerative disorders. *Physiol Genomics* **43**, 571–580 (2011).
38. Glynn, C. L. Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA* **26**, 1–9 (2020).
39. SCALBERT, E. & BRIL, A. Implication of microRNAs in the cardiovascular system. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 181–188 (2008).

40. Shoeibi, S. Diagnostic and theranostic microRNAs in the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Physiologica* **228**, (2020).
41. Saito, Y., Suzuki, H. & Hibi, T. The role of microRNAs in gastrointestinal cancers. *J Gastroenterol* **44**, 18–22 (2009).
42. O'Hara, S. P., Mott, J. L., Splinter, P. L., Gores, G. J. & LaRusso, N. F. MicroRNAs: Key Modulators of Posttranscriptional Gene Expression. *Gastroenterology* **136**, 17–25 (2009).
43. Yu, Z., Raabe, T. & Hecht, N. B. MicroRNA Mirn122a Reduces Expression of the Posttranscriptionally Regulated Germ Cell Transition Protein 2 (Tnp2) Messenger RNA (mRNA) by mRNA Cleavage1. *Biol Reprod* **73**, 427–433 (2005).
44. Chakrabarty, A. *et al.* MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 15144–15149 (2007).
45. Duică, F. *et al.* MiRNAs: A Powerful Tool in Deciphering Gynecological Malignancies. *Front Oncol* **10**, (2020).
46. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 15524–15529 (2002).
47. Ray, S. K. . *Neuroblastoma : Molecular Mechanisms and Therapeutic Interventions*. (Academic Press, an imprint of Elsevier, 2019).
48. Chen, Z. *et al.* MiR130b-Regulation of PPAR γ Coactivator- 1 α Suppresses Fat Metabolism in Goat Mammary Epithelial Cells. *PLoS One* **10**, e0142809 (2015).
49. He, Y. *et al.* Current State of Circulating MicroRNAs as Cancer Biomarkers. *Clin Chem* **61**, 1138–1155 (2015).
50. Çınar, İ. & Dursun, H. G. miRNA Biogenesis and Functions on Cancer Pathogenesis. *Sakarya Medical Journal* **6**, 64–71 (2016).
51. O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A. & Baltimore, D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* **10**, 111–122 (2010).
52. Xiao, C. & Rajewsky, K. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. *Cell* **136**, 26–36 (2009).

53. Qian, Y., Feldman, E., Pennathur, S., Kretzler, M. & Brosius, F. C. From Fibrosis to Sclerosis. *Diabetes* **57**, 1439–1445 (2008).
54. Lawrie, C. H. *et al.* Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* **141**, 672–675 (2008).
55. Weber, J. A. *et al.* The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem* **56**, 1733–1741 (2010).
56. Condrat, C. E. *et al.* miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* **9**, 276 (2020).
57. Hanson, E. K. & Ballantyne, J. RNA Profiling for the Identification of the Tissue Origin of Dried Stains in Forensic Biology. *Forensic Sci Rev* **22**, 145–57 (2010).
58. Hanson, E. K., Lubenow, H. & Ballantyne, J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem* **387**, 303–314 (2009).
59. Wang, Z., Luo, H., Pan, X., Liao, M. & Hou, Y. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet* **6**, 419–423 (2012).
60. Baker, M. MicroRNA profiling: separating signal from noise. *Nat Methods* **7**, 687–692 (2010).
61. KRICHEVSKY, A. M., KING, K. S., DONAHUE, C. P., KHRAPKO, K. & KOSIK, K. S. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* **9**, 1274–1281 (2003).
62. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science* (1979) **270**, 467–470 (1995).
63. Dalma-Weiszhausz, D. D., Warrington, J., Tanimoto, E. Y. & Miyada, C. G. [1] The Affymetrix GeneChip® Platform: An Overview. in 3–28 (2006). doi:10.1016/S0076-6879(06)10001-4.
64. Kreil, D. P., Russell, R. R. & Russell, S. [4] Microarray Oligonucleotide Probes. in 73–98 (2006). doi:10.1016/S0076-6879(06)10004-X.
65. Wolber, P. K., Collins, P. J., Lucas, A. B., De Witte, A. & Shannon, K. W. [2] The Agilent In Situ-Synthesized Microarray Platform. in 28–57 (2006).

doi:10.1016/S0076-6879(06)10002-6.

66. Gershon, D. More than gene expression. *Nature* **437**, 1195–1196 (2005).
67. Castoldi, M. *et al.* A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* **12**, 913–920 (2006).
68. Castoldi, M., Benes, V., Hentze, M. W. & Muckenthaler, M. U. miChip: A microarray platform for expression profiling of microRNAs based on locked nucleic acid (LNA) oligonucleotide capture probes. *Methods* **43**, 146–152 (2007).
69. Hughes, T. R., Hiley, S. L., Saltzman, A. L., Babak, T. & Blencowe, B. J. [14] Microarray Analysis of RNA Processing and Modification. in 300–316 (2006). doi:10.1016/S0076-6879(06)10014-2.
70. de Planell-Saguer, M. & Rodicio, M. C. Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin Biochem* **46**, 869–878 (2013).
71. Korpelainen, E., Tuimala, J., Somervuo, P., Huss, M. & Wong, G. *RNA-Seq Data Analysis*. (Chapman and Hall/CRC, 2014). doi:10.1201/b17457.
72. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**, 57–63 (2009).
73. Wilhelm, B. T. *et al.* Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* **453**, 1239–1243 (2008).
74. Nagalakshmi, U. *et al.* The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science (1979)* **320**, 1344–1349 (2008).
75. Sultan, M. *et al.* A Global View of Gene Activity and Alternative Splicing by Deep Sequencing of the Human Transcriptome. *Science (1979)* **321**, 956–960 (2008).
76. Goecks, J., Nekrutenko, A. & Taylor, J. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol* **11**, R86 (2010).
77. Kallio, M. A. *et al.* Chipster: user-friendly analysis software for microarray and other high-throughput data. *BMC Genomics* **12**, 507 (2011).
78. RAYMOND, C. K., ROBERTS, B. S., GARRETT-ENGELE, P., LIM, L. P. & JOHNSON, J. M. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA* **11**, 1737–1744 (2005).

79. Chen, C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **33**, e179–e179 (2005).
80. Kauppinen, S., Vester, B. & Wengel, J. Locked Nucleic Acid: High-Affinity Targeting of Complementary RNA for RNomics. in 405–422 (2006). doi:10.1007/3-540-27262-3_21.
81. Alberta, Bruce. *et al. Molecular Biology of the Cell*. (2008).
82. Kevil, C. G. *et al.* An Improved, Rapid Northern Protocol. *Biochem Biophys Res Commun* **238**, 277–279 (1997).
83. Schlamp, K. , W. A. , K. M. , M. T. , G. P. R. , & T. A. BlotBase: A northern blot database. *Gene* **427**, 47–50 (2008).
84. Trayhurn, P. Northern blotting. *Proceedings of the Nutrition Society* **55**, 583–589 (1996).
85. Urbanek, M., Nawrocka, A. & Krzyzosiak, W. Small RNA Detection by in Situ Hybridization Methods. *Int J Mol Sci* **16**, 13259–13286 (2015).
86. Babapoor, S. *et al.* microRNA in situ hybridization for miR-211 detection as an ancillary test in melanoma diagnosis. *Modern Pathology* **29**, 461–475 (2016).
87. Tomczak, M. , & T. E. The need to report effect size estimates revisited. An overview of some recommended measures of effect size. *Trends Sport Sci* **21**, 19–25 (2014).
88. Zubakov, D. *et al.* MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med* **124**, 217–226 (2010).
89. Mayes, C., Houston, R., Seashols-Williams, S., LaRue, B. & Hughes-Stamm, S. The stability and persistence of blood and semen mRNA and miRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples. *Leg Med* **38**, 45–50 (2019).
90. Li, Z. *et al.* mRNA and microRNA stability validation of blood samples under different environmental conditions. *Forensic Sci Int Genet* **55**, 102567 (2021).
91. Zhao, C. *et al.* The persistence and stability of miRNA in bloodstained samples under different environmental conditions. *Forensic Sci Int* **318**, 110594 (2021).
92. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F. & Roy, N. Van. *Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging*

of Multiple Internal Control Genes.

<http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034> (2002).

93. Peltier, H. J. & Latham, G. J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* **14**, 844–852 (2008).
94. Masè, M. *et al.* Selection of reference genes is critical for miRNA expression analysis in human cardiac tissue. A focus on atrial fibrillation. *Sci Rep* **7**, 41127 (2017).
95. Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S. & Tewari, M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* **50**, 298–301 (2010).
96. Mraz, M. *et al.* miR-150 influences B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1. *Blood* **124**, 84–95 (2014).
97. Jia, H., Li, Z., Liu, C. & Cheng, Y. Ultrasensitive Detection of microRNAs by Exponential Isothermal Amplification. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 5498–5501 (2010).
98. Courts, C. & Madea, B. Micro-RNA – A potential for forensic science ? §. *Forensic Sci Int* **203**, 106–111 (2010).
99. Kirschner, M. B. *et al.* Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma. *PLoS One* **6**, e24145 (2011).
100. Altmeyer, L., Baumer, K. & Hall, D. Differentiation of five forensically relevant body fluids using a small set of microRNA markers. *Electrophoresis* **45**, 1785–1795 (2024).
101. Wang, T., Wu, F. & Yu, D. miR-144/451 in hematopoiesis and beyond. *ExRNA* **1**, 16 (2019).
102. Iroanya, O. O., Olutunde, O. T., Egwuatu, T. F. & Igbokwe, C. Stability of selected microRNAs in human blood, semen and saliva samples exposed to different environmental conditions. *Forensic Sci Int* **336**, 111338 (2022).
103. Chen, C. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **33**, e179–e179 (2005).
104. McDonald, J. S., Milosevic, D., Reddi, H. V, Grebe, S. K. & Algeciras-

- Schimnich, A. Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges. *Clin Chem* **57**, 833–840 (2011).
105. Na, J.-Y. Estimation of the post-mortem interval using microRNA in the bones. *J Forensic Leg Med* **75**, 102049 (2020).
106. Bauer, M., Polzin, S. & Patzelt, D. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Sci Int* **138**, 94–103 (2003).
107. Bauer, M., Gramlich, I., Polzin, S. & Patzelt, D. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Leg Med* **5**, 220–227 (2003).



EKLER

Ek-1 :Etik Kurul Kararı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı		Tarih
114		10 Eylül 2021

KARAR NO 42– Adli Tıp Anabilim Dalı’nda, Prof. Dr. Ayşe Serin yönetiminde, Tuba Gürel tarafından yürütülmesi öngörülen, “Çeşitli miRNA Belirteçlerinin Kanın İdentifikasyonunda Kullanılabilme Potansiyelinin Araştırılması” başlıklı doktora tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	Prof Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Davut Alptekin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyoistatistik Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Doç Dr Zehra Hatipoğlu Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı	
	Doktor Öğretim Üyesi Yasemin Saygıdeğer Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Av Simay Sönmezateş Hukukçu Üye	
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	Toplantıya Katılmadı

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

ÖZGEÇMİŞ

Tuba Gürel; İlköğretimini Kırıkhan'da Beş Temmuz İlköğretim Okulları'nda, lise öğretimini ise Kırıkhan Yabancı Dil Ağırlıklı Okulları'nda tamamladıktan sonra 2011 yılında Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Biyolog olarak mezun olmuştur.

Adıyaman Üniversitesi, Pedagojik Formasyon Eğitimi 2014 yılında bitirmiştir.

Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladığı Yüksek Lisans eğitimini *“Elazığ Ters Lalesinin Doku Kültürü Yöntemiyle Üretilmesi”* başlıklı teziyle 2016 yılında tamamlamıştır.

2018 yılında bahar dönemi Çukurova Üniversitesi, Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Bilimler Anabilim Dalında özel öğrenci olarak eğitimini tamamlamıştır.

2018 yılında Çukurova Üniversitesi, Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü, Adli Bilimler Anabilim Dalında Doktora eğitimine başlamıştır.