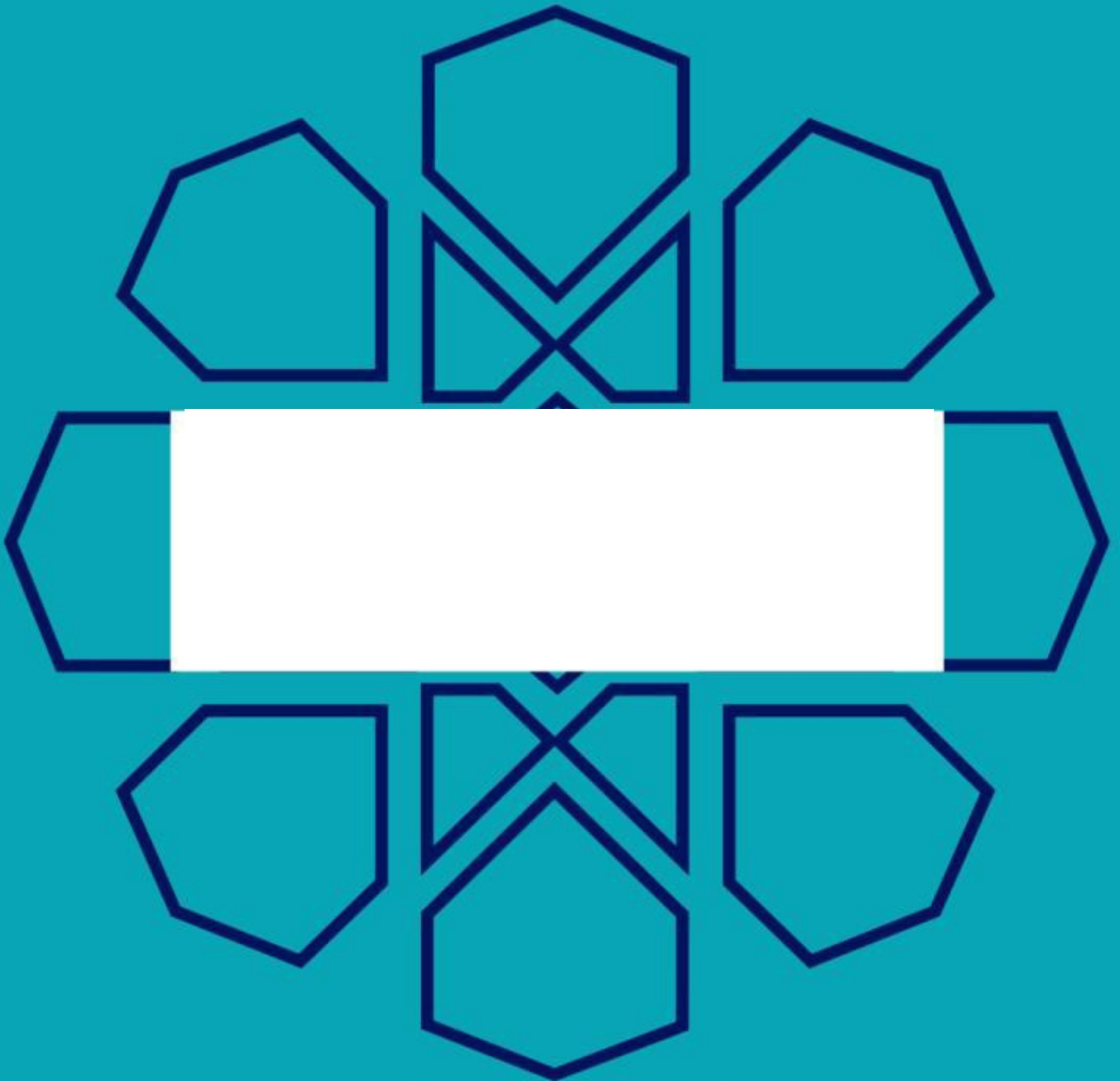




T.C.
Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü



Yüksek Lisans Tezi



**SUÇ MAHALLERİNDE KAN VARLIĞININ TESPİTİNDE
KULLANILAN BİR KEMİLÜMİNESANT BİLEŞİK
OLAN LUMİNOL'UN İN-VİTRO SİTOTOKSİK VE
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melika BEKTAŞ HORTOĞLU



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SUÇ MAHALLERİNDE KAN VARLIĞININ TESPİTİNDE KULLANILAN BİR
KEMİLÜMİNESANT BİLEŞİK OLAN LUMİNOL'UN İN-VİTRO
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melika BEKTAŞ HORTOĞLU

Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KRİMİNALİSTİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2016

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Melika BEKTAŞ HORTOĞLU tarafından hazırlanan “Suç mahallerinde kan varlığının tespitinde kullanılan bir kemilüminesant bileşik olan luminol'un in-vitro sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kriminalistik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Başkan : Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Belgin İZGİ
Uludağ Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Kriminalistik Anabilim Dalı

İmza

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gökçe Taner
Bursa Teknik Üniversitesi, Doğa Bilimleri
Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi
Biyomühendislik Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü
28.07.2016

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

29.07.2016
İmza

Melika BEKTAŞ HORTOĞLU

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SUÇ MAHALLERİNDE KAN VARLIĞININ TESPİTİNDE KULLANILAN BİR
KEMİLÜMİNESANT BİLEŞİK OLAN LUMİNOL'UN İN-VİTRO SİTOTOKSİK VE
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Melika BEKTAŞ

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kriminalistik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tolga ÇAVAS

Ölümlerle sonuçlanan veya sadece yaralanmanın gerçekleştiği her türlü şiddet olayında olay yerinde eser miktarda dahi olsa kan izine rastlamak mümkündür. Kan lekeleri olayların aydınlatılmasında en önemli biyolojik delillerdir. Kan izinin oluşum şekline göre olayın nasıl ve tam olarak hangi noktada meydana geldiğini anlamak mümkündür. Aynı zamanda yapılan incelemeler sonucu bulunan kandan izole edilen DNA sayesinde kesin sonuçlarla faileri bulmak mümkün hale gelmektedir.

Olay yerindeki en önemli bulgulardan biri gözle görülmeyen ama aslında ortamdaki en önemli DNA kaynağı olan silinmiş kanlardır. Suçlular tarafından delilleri yok etmek adına silinerek temizlendiği düşünülen kan, olay yeri ekibinin luminol uygulaması ile kolaylıkla tespit edilebilmektedir.

Bu çalışmada cinayat veya ağır yaralama gibi suçların aydınlatılmasında ortamdaki silinmiş kanların görülmesini sağlayan Luminol'un BEAS-2B insan bronş epitel hücre hattındaki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır.

Luminol'un sitotoksik etkilerini belirlemek için Klonojenik Test, genotoksik etkilerini tespit etmek için ise Komet testi uygulanmıştır. Luminol için oluşturulan deney grupları Kontrol, H₂O₂, 16,5 µM, 33 µM, 66 µM, 132 µM, 264 µM, 528 µM ve 1056 µM şeklindedir.

Genel olarak Luminol'un hem sitotoksik hem de genotoksik etkileri uygulanan dozun artması ile artmıştır fakat en yüksek iki doz olan 528 µM ve 1056 µM dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05). Klonojenik test sonucuna göre BEAS-2B sağlıklı akciğer hücrelerinde luminol için IC₅₀ değeri 153,378µM, R² = 0,972 olarak bulunmuştur. Bu durum olay yeri ekibi tarafından spreylenerek uygulanan Luminol'un oldukça yüksek toksisiteye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Luminol, Kemilüminesans, Sitotoksikite, Genotoksikite, Beas-2B hücreleri, Kolonojenik Testi, Komet testi.

2016, ix + 69 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

EVALUATION OF THE IN-VITRO CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF LUMINOL, A CHEMILUMINESCENT COMPOUND USED TO DETERMINE THE PRESENCE OF BLOOD IN CRIME SCENES

Melika BEKTAŞ

Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Criminalistics

Supervisor: Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ

Even in slightly trace amount of blood can be found in crime scene which belongs any kind of violence from injury to resulting in death. Blood stains are the most important biological evidence to solving the incident. As the Formation of blood type its possible to understand exactly how and where the case occurred. Isolated DNA from Blood makes possible to find perpetrators with high success rate.

Deleted bloods are the most important findings in crime scene to reach DNA. Crime scene investigators can easily detect cleaned blood by Luminol.

In this study cytotoxic and genotoxic effects of Luminol has been tested on BEAS-2B human bronchial epithelial cells.

Clonogenic Test is used to determine the cytotoxic effects while Comet test is used to determine the genotoxic effects of Luminol. Control, H₂O₂, 16,5 µM, 33 µM, 66 µM, 132 µM, 264 µM, 528 µM ve 1056 µM were our experiment groups.

Overall Luminol both cytotoxic and genotoxic effects also increased with the increase of the dose, but no statistically significant difference between the two highest doses, which are 528 µM and 1056 µM dose, was detected ($p > 0.05$).

According to Clonogenic Test results, Luminol values for BEAS-2B healthy human bronchial epithelial cells are IC₅₀ = 153,378µM, R₂ = 0,972.

The results of this study indicate that Luminol, which is sprayed to find cleaned blood evidence by the crime scene investigators, has quite high toxicity.

Keywords: Luminol, Cytotoxicity, Chemiluminescence, Genotoxicity, Beas- 2B cells, Clonogenic Assay, Komet Assay.

2016, ix + 69 pages

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ'a,

Tez konumun şekillenmesinde her türlü öneri ve desteği sağlayan, bilgi ve başarılarıyla bana ışık olan sevgili bölüm başkanım Prof. Dr. Belgin İZGİ'ye,

Bu süreçte ilgisi ve pozitif enerjisi ile her zaman bana destek olan sevgili hocam Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ'a

Tez deneylerimde, deneyimlerimden ve yardımlarımdan faydalandığım, deney aşamasında yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen sevgili arkadaşım Doç. Dr. Özgür VATAN'a

Deney aşamasında yardımcı olan sevgili arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Huzeyfe HURİYET'e,

Tüm bu zahmetli süreçte destek ve yardımlarını devamlı üzerimde hissettiğim, evlatları olmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum sevgili babam Osman BEKTAŞ, annem Nurten BEKTAŞ'a ve her zaman iyi ki var dediğim canım kardeşim Orhan BEKTAŞ'a,

Her an yanımda olup bu süreçte sevgisi ve ilgisi ile bana destek olmak için elinden geleni yapan biricik eşim Caner HORTOĞLU'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Olay ve Olay Yeri.....	4
2.2. Olay Yeri İnceleme Yöntemleri.....	5
2.2.1. Şerit Metodu.....	6
2.2.2. Izgara Metodu.....	7
2.2.3. Spiral Metodu.....	7
2.2.4. Bölge Metodu.....	8
2.2.5. Tekerlek Metodu.....	8
2.3. Bulgu ve Delil Kavramları.....	9
2.3.1. Kimyasal Deliller.....	10
2.3.2. Fiziksel Deliller.....	10
2.3.3. İz deliller.....	11
2.3.4. Belge Delilleri.....	11
2.3.5. Ses-Görüntü-Data delilleri (Dijital Deliller).....	11
2.3.6. Biyolojik Deliller.....	11
2.3.6.1. Biyolojik Delillerin Toplanması.....	13
2.3.6.2. Kontaminasyon.....	16
2.4. DNA.....	16
2.4.1. DNA Profili.....	18
2.4.2. Biyolojik Delillerden DNA İzolasyonu.....	21
2.4.3. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu).....	22
2.5. Kan.....	23
2.5.1. Kan Lekeleri.....	29
2.5.2. Silinmiş Kan Lekeleri.....	32
2.6. Luminol.....	33
2.7. Sitotoksisite Testleri.....	35
2.7.1. Klonojenik Test.....	35
2.8. Genotoksisite Testleri.....	36
2.8.1. Komet Testi.....	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler.....	38
3.2. Kullanılacak Hücre Hatları.....	40
3.2.1. Bu hücre hatlarında Kullanılacak Hücre Kültürü Şartları.....	40
3.2.2. Hücrelerin Pasajlanma Prosedürü.....	40
3.3. Test edilen Kimyasal.....	41

3.4.	Klonojenik Test.....	42
3.5.	Komet Testi.....	43
4.	BULGULAR.....	46
4.1.	Klonojenik Test Bulguları.....	46
4.2.	Komet Testi Bulguları.....	49
4.2.1.	Kuyruk Uzunluğu Bulguları.....	50
4.2.2.	Kuyruk %DNA Bulguları.....	51
4.2.3.	OTM (Olive Kuyruk Momenti) Bulguları.....	53
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	54
	KAYNAKLAR.....	62
	ÖZGEÇMİŞ.....	68



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
H	Hidrojen
Fe	Demir
mg	Miligram
mL	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
$^{\circ}\text{C}$	Derece Santigrad
V	Volt
O	Oksijen
mA	Miliamper

Kısaltmalar**Açıklama**

DMSO

Dimetil Sülfoksit

DNA

Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA

Etilen Diamin Tetra Asetikasit

EtOH

Etanol

LMA

Low Melting Agarose

OTM

Olive Tail Moment

PBS

Phosphate Buffered Saline



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Şerit arama metodu.....	6
Şekil 2.2.	Izgara Arama Metodu.....	7
Şekil 2.3.	Spiral Arama Metodu.....	7
Şekil 2.4.	Bölge arama metodu.....	8
Şekil 2.5.	Tekerlek arama metodu.....	8
Şekil 2.6.	İnsan genom organizasyonu.....	17
Şekil 2.7.	Kanın yapısı.....	23
Şekil 2.8.	Kanın içeriği.....	24
Şekil 2.9.	Akyuvar çeşitleri.....	25
Şekil 2.10.	Hemoglobin molekülü.....	28
Şekil 2.11.	Luminol'un çalışma prensibi.....	33
Şekil 2.12.	Luminol Uygulanmış Olay Yeri Örnekleri.....	34
Şekil 2.13.	Komet Testi Sonucunun Şematik Gösterimi.....	37
Şekil 2.14.	Komet Testi Sonucu Fragmentlerine Ayrılmış Hücrenin Kafa Ve Kuyruk Bölümleri.....	37
Şekil 3.1.	Luminol Blood Detection Reagent Spray Kiti, Tri-Tech Forensics.....	41
Şekil 4.1.	Luminol ile 24 saat muamele edilmiş BEAS 2B hücreleri koloni oluşumları. Üst soldan itibaren Pozitif kontrol, Büyüme kontrol, Solvent kontrol, 16,5 µM, 33 µM. Alt soldan itibaren 66 µM, 132 µM, 264 µM, 528 µM, 1056 µM.....	46
Şekil 4.2.	Klonojenik test ile luminolun etkileri belirlenen BEAS-2B hücre hatlarında %canlılık dağılım grafiği.....	47
Şekil 4.3.	BEAS-2B hücrelerinde Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranlarının çubuk grafik ile gösterilmesi.....	48
Şekil 4.4.	Komet testi preparatlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri (X20).....	49
Şekil 4.5.	BEAS-2B hücre hattında Komet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların kuyruk uzunluğunun ve standart hataların çubuk grafik ile gösterilmesi.....	51
Şekil 4.6.	BEAS-2B hücre hattında Komet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların kuyruk %DNA'larının ve standart hataların çubuk grafik ile gösterilmesi.....	52
Şekil 4.6.	BEAS-2B hücre hattında Komet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların Olive kuyruk momentlerinin ve standart hataların çubuk grafik ile gösterilmesi.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1.	Olay yerinde bulunan delil üzerindeki DNA'nın olası yeri ve kaynağı.....	12
Çizelge 3.1.	Çalışmalarda kullanılan ekipman.....	38
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....	39
Çizelge 3.3.	Flasklara eklenmesi gereken kimyasallar ve miktarları.....	41
Çizelge 3.4.	Klonojenik testinde kullanılan dozlar.....	43
Çizelge 3.5.	Komet testinde kullanılan dozlar.....	45
Çizelge 4.1.	Komet testinden elde edilen ortalama değerler. K.U.: Kuyruk uzunluğu (μm), K.%DNA: Kuyruk %DNA miktarı, OTM: Olive kuyruk momenti, SS: Standart sapma.....	50

1.GİRİŞ

Birçok adli vakadaki olay yeri incelemenin vazgeçilmez kanıtları parmak izi ve kan izleridir. Bir olay mahallinde kan izlerini arayan polisler bazı kimyasallar kullanarak kan izlerini bulmaya çalışırlar. Bir amin türevi olan Luminol, olay yerindeki eser miktardaki ve hatta temizlenmiş olan kan izlerini bile bulduğunda bulunan kan ile tepkimeye girerek mavi-yeşil renkli ışık saçan kimyasal bir bileşiktir.

Luminol ilk kez 1902 yılında Almanya'da sentezlenmiştir. Teknik adı 3-aminofitalhidrazit olan bu molekül, Luminol adını 1920'li yılların sonunda almıştır. Adli olaylarda kullanımı 1937'de gündeme gelen Luminol'ün, 1942'de bilim insanları tarafından adli vakalarda kan tespitinde kullanılması tavsiye edilmiştir.

Luminol, bir maddeyle tepkimeye girerek ışık saçma olayında yalnız değildir, kimyagerler bu özelliklere sahip pek çok madde keşfetmiştir. Luminol örneğinde olduğu gibi bir tepkime sonucu ışık saçılmasına kimyasal ışıldama (kemilüminesans), ışık saçan maddeye de kemilüminisant denir. Ekzotermik tepkimelerde enerji ısı olarak, kimyasal ışıldamada ise ışık olarak açığa çıkar. Isı olmadan açığa çıkan görünür ışıklara soğuk ışık denir. Işık saçılması sadece cansız ortamlarda gerçekleşmez, ateşböceği gibi bazı canlılar da benzer şekilde ışık saçar. Canlılardaki bu olaya ise biyoışıldama (biyolüminesans) denir.

Kemilüminisant bir kimyasal olan Luminol, özellikle bir cinayet sonrası ortamdan yok edilmek istenen kan izlerini tespit etmek için kullanılır. Luminol o kadar etkilidir ki ortamda milyonda bir oranında kan bulursa dahi bunu tespit edebilir. Bu nedenle bir suç sonrası, suçlu kanı ne kadar temizlese de ortamda büyük olasılıkla Luminol tarafından tespit edilebilecek kadar kan kalır. Bununla birlikte luminol sıkıldıktan sonra gözlenen her ışıldama ışığı ortamda kan olduğunu ispatlamaz. Çünkü tükürük, pas, irin gibi maddeler; elma, kayısı, yaban turpu, şalgam, soğan gibi sebze ve meyvelerdeki enzimler; bakır, potasyum permanganat, pas, iyot gibi inorganik maddeler de Luminol ile pozitif sonuç verir yani ışıldama gözlenebilir. Ayrıca kan lekesi varsa bunun insana mı yoksa bir başka canlıya mı ait olduğunu, insana aitse kime ait olduğunu belirlemek

için Luminol testinden sonra DNA testi gibi tamamlayıcı testlerin yapılması gerekmektedir.

Silinmiş kan lekelerinin tespiti için Luminol kullanan olay yeri ekipleri her uygulamada, Luminol çözeltisini spreylemeye hazır hale getirirken ve spreyleme sırasında bu kimyasala solunum yoluyla defalarca kez maruz kalmaktadırlar. Ancak, luminol'un sitotoksik ve genotoksik etkileri yeterince araştırılmadığı için karsinojenik etkileri net olarak bilinmemektedir.

Solunum yolu ile alınan toksik maddeler akciğer dokusunda bozulmalara ve sonucunda da akciğer kanserine sebep olabilmektedir. Akciğer kanseri, akciğer dokularındaki hücrelerin kontrolsüz çoğaldığı bir hastalıktır. Bu kontrolsüz çoğalma, hücrelerin çevredeki dokuları sararak veya akciğer dışındaki organlara yayılmaları ile (metastaz) sonuçlanabilir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre akciğer kanseri tüm dünyada kanser türleri arasında, erkeklerde en sık ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türüdür (http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_en.pdf, 2004) ve tüm dünyada her yıl yaklaşık 1,3 milyon ölüme neden olmaktadır (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, 2008). Akciğer kanseri birçok faktöre bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu nedenler arasında; genetik faktörler (Gorlova ve ark. 2007), radon gazı (Catelinois ve ark. 2006), asbest (O'Reilly ve ark. 2007) ve hava kirliliği (Kabir ve ark. 2007) gibi faktörler sorumlu tutulmaktadır. Son araştırmaların ışığında, akciğer kanseri riskini artıran en önemli faktör kanserojen maddelerin uzun süre boyunca solunumundan kaynaklanmaktadır. Kronik kanserojen madde maruziyeti sonucunda genetik yapıda hasar oluşmaktadır. Hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdeki hasar, kanser oluşumundaki temel unsurdur (http://www.toraks.org.tr/kisokulu4-ppt-pdf/Tuncay_Goksel.pdf, 2004)

Sitotoksik maddeler, hücreye toksik şekilde etki edip hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran maddelerdir. Sitotoksisite araştırmalarında kullanılan yöntemlerin başında klonojenik test , XTT, M30, M65 ve oksidatif hasarların belirlenmesine olanak sağlayan ROS testleri gelmektedir. Genotoksik kelimesi DNA'ya zarar vererek kansere neden olabilecek genetik hasarlara yol açabilen fiziksel ve

kimyasal etmenleri tanımlamak için kullanılır. Genotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda ise mikronükleus, komet ve γ -H2AX testleri sıklıkla kullanılmaktadır.

Tez çalışmasında olay yeri inceleme ekiplerinin silinmiş kan lekelerini tespit etmek için kullandığı Luminol'ün, çözeltiyi hazırlarken ve spreyleme sırasında bu kimyasala solunum yolu ile maruz kalan kişilerin akciğer epitel hücrelerinde yol açabileceği olası sitotoksik ve genotoksik etkileri, BEAS-2B insan akciğer epiteli üzerinde in vitro test yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Sitotoksik etkilerin analizi için Klonojenik testi, tek iplik DNA kırıklarının belirlenmesi için alkali komet testi uygulanmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Olay ve Olay Yeri

Olay sözlük anlamı olarak doğa güçleri veya insan davranışı sonucu ortaya çıkan, oluşan durumdur. Suç kavramı üzerinden tanımlandığında ise olay; belirli bir zaman ve mekânda gerçekleşmiş olan, suç olup olmadığı henüz kesinlik kazanmamış vakalar olarak tanımlanmaktadır. Emniyet Genel Müdürlüğü Olay Yeri İnceleme ve Kimlik Tespit Birimleri Yönetmeliği 4. Maddesine göre; Olay, kanunlarda açıkça suç olduğu belirtilen fiil ve hareketlerin belirli bir zaman ve mekânda gerçekleşmesidir. Olay bir süreçtir ve bu süreci sadece olayın meydana geldiği yer olarak nitelendirmek doğru değildir. Olay fiilin işlendiği yerde başlayıp, failin gidebileceği yerleri içine alan geniş bir kavramdır.

Olay yeri, olayın işleniş tarzının, mağdur ve suç sanıklarının ilişkisinin saptanabildiği dinamik bölge, olayın başlangıcı, takibi ve sonucunda geçtiği alanları kapsamaktadır. Olayın işleniş tarzını, yöntemini, faillerin kaçış yolunu, uğradığı yerleri ve olaya ait iz ve bulguları içerir.

01.08.2008 tarihli EGM Olay Yeri İnceleme ve Kimlik Tespit Birimleri Yönetmeliği'nin 4üncü maddesine göre olay yeri inceleme; meydana gelen bir olayın aydınlatılması amacıyla, olay yerinde delil niteliği taşıyabilecek her türlü iz, eser ve emarenin bilimsel ve teknik yöntemler kullanılarak araştırılması, elde edilen bulguların tespiti, kayıt altına alınması ve dokümantasyonu, toplanması, muhafazası ve ilgili yerlere gönderilmesi işlemlerini kapsayan soruşturma süreci olarak tanımlanmaktadır.

Emniyet Genel Müdürlüğü Olay Yeri İnceleme ve Kimlik Tespit Birimleri Yönetmeliği 4. Maddesinde Olay yeri;

- 1) Olayın meydana geldiği yeri,
- 2) Olayın işleniş tarzının, fail ve mağdurun birbiriyle ilişkisinin saptanabildiği yerler ile maddî delillerin tespit edilebileceği dinamik alanları kapsar.

Bu kapsamda olayın taraflarının bedenleri ve elbiseleri ile olay sonrasında kullandıkları yerler (ev, işyeri, araç vb) değerlendirilmelidir. Olaylar çok dar bir alanda başlayıp bitmiş olabileceği gibi çok geniş alanlara yayılmış olabilecektir. Olayın etkisinin görüldüğü yerler olay yeri kavramı içerisinde değerlendirilmektedir.

Yani kısaca olay yeri, suçun davranışa dönüştüğü yerde başlayıp failin gidebileceği yerleri içeren, dinamik bir alandır (Fisher BAJ. 2004).

Olay yeri inceleme; delil araştırması, delil tespiti ve delil toplama işlemidir. Olay yeri incelemesi sadece fiilen işlenmiş suçlarla veya meydana gelen olaylarla ilgilidir. Şüpheli üzerine yapılacak delil araştırması bir olay yeri incelemesi değil, adli aramadır. Olay yeri incelemesi, suçun veya masumiyetin ispatı amacıyla gerçekleştirilir. Ceza Muhakemesi Kanunu'nun 160'ncü maddesine göre olay yeri incelemeye, şüphelinin aleyhine ve lehine olan delilleri toplamak, şüphelinin haklarını korumak, yükümlülüğü getirilmiştir. Dolayısıyla olay yeri incelemesi, sadece bir suça ilişkin delil elde etmek amacıyla gerçekleştirilemez. Suç olgusunun gerçekleşip gerçekleşmediği, meydana gelen vakanın bir suç mu yoksa kaza mı olduğu, suçun öngörülen şekliyle gerçekleşmediği (cinayet/intihar) ve fiilin gerçekte kim tarafından, nerede ve ne zaman gerçekleştiğine dair maddi gerçeğin ortaya çıkarılabilmesi, olay yeri incelmelerinin temel hedefleri arasındadır. Olay yeri incelemesi, kriminal soruşturmanın ilk ve en önemli basamağını teşkil eder. Failin kim olduğunu, zaman ve mekan ilişkisinde açıklamaya çalışır. Olay yeri incelemesi bir çeşit delil araştırmasıdır (Karakuş ve Ünal 2013).

2.2. Olay Yeri İnceleme Yöntemleri

Değişim Prensipli'ne göre bir yerden geçen bir kişi oraya kendinden izler bırakır veya oradaki izlerin gittiği başka yerlere taşınmasına sebep olur. Suç soruşturmasının başarıyla sonuçlanması için olay yeri hiç bir ayrıntıyı atlamadan en ince ayrıntısına kadar incelenmelidir. Tüm delillerin toplanması için farklı araştırma metodları uygulanmaktadır ve olayın durumuna göre seçilecek araştırma metodu uzman ekip tarafından kararlaştırılır (Kaygısız 2003).

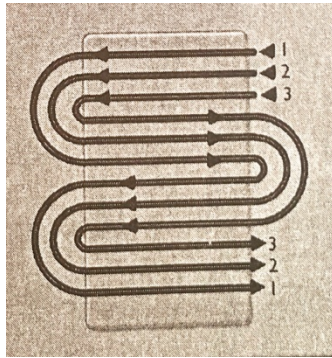
Olay yeri inceleme belirli bir disiplin çerçevesinde uygulanmaktadır ve yapılması gerekenler sırasıyla şu şekildedir:

- a)Delil araştırması ve delil tespiti
- b)Delillerin tescili, kayıt ve dokümantasyonu
 - 1.Fotoğraf çekimi
 - 2.Video kamera çekimi
 - 3.Kroki
 - 4.Tutanak/rapor hazırlama
- c)Delillerin toplanması
- d)Delillerin muhafazası
- e)Delillerin ilgili yerlere gönderilmesi

Sistematik olarak olay yerinde delil araştırması temel olarak 5 metot uygulanarak yapılmaktadır. Olay yerinin durumuna, olayın türüne, özelliklerine, hava şartlarına ve personel durumuna göre uzman ekip hangi metodun kullanılacağına karar vermektedir.

2.2.1. Şerit Metodu

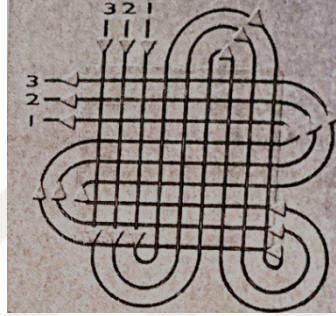
Genellikle açık alanlarda meydana gelen olaylardaki tarama yöntemidir fakat bazı durumlarda kapalı alanlarda da uygulanır. Olay yerinin geniş bir alan olması durumunda şerit metodu kullanılır. Personel sayısına olay yerinin büyüklüğüne göre uzman karar verir. Personel belirli aralıklarla yan yana dizilerek olay yerini şerit şeklinde aynı anda aramaya başlamaktadır.



Şekil 2.1. Şerit arama metodu (Karakuş ve Ünal 2013).

2.2.2. Izgara Metodu

Olay yeri çok geniş bir alana yayılmışsa ve çok ufak delillerin detaylı bir şekilde aranması gerekiyorsa bu yöntem kullanılır. Çift yönlü bir tarama olduğundan çok daha hassas bir yöntemdir. Izgara metodunda olay yeri uzman ekip tarafından hem kuzey-güney doğrultusunda hem de doğu-batı istikametinde taranır böylece olay yeri iki kez gözden geçirilmiş ve daha detaylı aranmış olmaktadır.



Şekil 2.2. Izgara Arama Metodu (Karakuş ve Ünal 2013).

2.2.3. Spiral Metodu

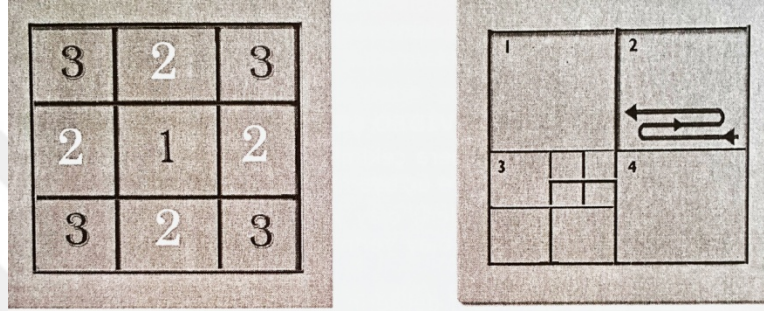
Bomba ve patlama olaylarında spiral metodu kullanılmaktadır. Olay yeri merkezden dışa doğru genişleyerek veya dıştan merkeze doğru daralan bir şekilde aranır. Tek kişi tarafından kolaylıkla yapılabilen bu arama yönteminde bazen peşpeşe birkaç personel de görev alabilmektedir.



Şekil 2.3. Spiral Arama Metodu (Karakuş ve Ünal 2013).

2.2.4. Bölge Metodu

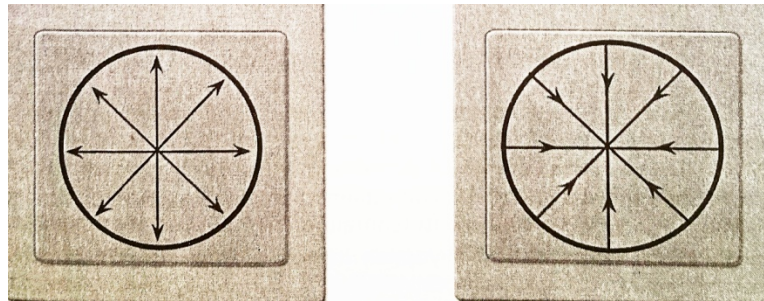
Olay yerinin kare veya dikdörtgen olduğu durumlarda bölge metodu kullanılmaktadır. Olay yerinin çok geniş alana yayıldığı veya ev gibi kapalı alanlarda olduğu durumlarda bu yöntem tercih edilmektedir. Olay yeri personel sayısına veya aramadaki hassasiyete göre bölgelere ayrılır ve her bölge ya aynı yöntemle ya da farklı yöntemlerle aranmaktadır.



Şekil 2.4. Bölge arama metodu (Karakuş ve Ünal 2013).

2.2.5. Tekerlek Metodu

Olay yerinin daire veya oval şekilde olduğu durumlarda bu yöntem kullanılır. Genellikle bomba olaylarında tercih edilir. Personelin kararına göre ya merkezden dışa ya da dıştan içe tarama yapılmaktadır.



Şekil 2.5. Tekerlek arama metodu (Karakuş ve Ünal 2013).

2.3. Bulgu ve Delil Kavramları

Olay yerinden elde edilen ve herhangi bir hukuki nitelik taşımayan her türlü materyale bulgu denilmektedir. Bulgular laboratuvarda işlem görmemiş veya görse dahi mahkemece henüz delil kabul edilmemiş materyal, iz, eser, emare, ve belgelerdir.

Delil; yol gösteren, kılavuz, belge, şahit'' anlamlarına gelen bir kelimedir. Türk Dil Kurumu, delili, "İnsanı aradığı gerçeğe ulaştırabilecek iz, emare" olarak tanımlamıştır (TDK. 2002). Hukukta, kanıt; eski dilde ise kılavuz, rehber anlamında kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan anlamı ise bir hukuki sorunu çözmeye, suç filini ispatlamaya yarayan, hukuka aykırı bir şekilde elde edilmemiş her türlü maddi ve sözlü bulguya delil denir (Max 2007).

Polisin Adli Görevlerinin Yerine Getirilmesinde Delillerin Toplanması, Muhafazası ve İlgili Yerlere Gönderilmesi Hakkında Yönetmelik'e göre; meydana gelen bir suçun aydınlatılması ve suç sanıklarının tespitine yarayan her türlü ispat vasıtalarına delil denilmektedir. Maddi delil ise; itiraf ve şahadet dışında kalan suç veya suç sanıklarıyla ilgili mahkemece kabul edilen, maddi (fiziki) bir yapıya sahip, canlı veya cansız, dokunulabilen her türlü materyal olarak tanımlanmaktadır (Anonim 1983).

Laboratuvara gelen her delil, ancak doğru ve kabul görmüş bilimsel tekniklerle değerlendirilip yorumlandığında, mahkemelerde delil niteliği kazanır (Kalfoglu ve ark. 2002).

Edmund Locard'ın da dediği gibi;

"Her delil bir bulgudur ancak her bulgu bir delil değildir".

Adli bilimler olay yerinde başlar çünkü adli soruşturmanın en önemli unsurlarından biri olan olay yerinin incelenmesi ancak doğru gerçekleştirildiğinde, adli olayların çözülmesinde doğru sonuca ulaşılır (James SH. ve ark. 2003).

Temel olarak deliller; beyan deliller ve maddi (fiziksel) deliller olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Beyan deliller, olayla ilgisi olduğu delil olarak kabul edilmiş kişilerin sözlü olarak verdiği bilgilerdir.

Maddi deliller ise kendi içinde biyolojik deliller, kimyasal deliller, fiziksel deliller, iz deliller, belge delilleri, ses-görüntü-data delilleri (dijital deliller) olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

2.3.1. Kimyasal Deliller

Olay yerinden elde edilen yanıcı, patlayıcı ve tehlikeli maddeler, uyutucu ve uyuşturucular, zehirler, boya, lif, plastik, yapıştırıcı, metal ve toprak gibi kimyasal inceleme yapılması gereken tüm delillere kimyasal deliller denilmektedir.

Kimyasal delillerin içeriğindeki kimyasal bileşenler nitel ve nicel analizlerle tespit edilir. Nitel analiz maddenin içeriğindeki bileşenlerin tanımlanmasına, nicel analiz ise bu bileşenlerin miktarlarının belirlenmesine denir. Kriminal laboratuvarı kimyasal incelemeler birimlerinde bu analizler genellikle gaz kromatografisi (GC), gaz kromatografisi - kütle spektroskopisi (GC-MS), head space gaz kromatografisi (HS-GC), fourier transform kızılötesi spektrofotometrisi (FT-IR), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HP-LS), taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik absorpsiyon spektrofotometrisi (AAS) ve X-ışınli floresans spektrometrisi (XRF) ile yapılmaktadır.

2.3.2. Fiziksel Deliller

Ateşli silahlar ve bunların fişekleri, kovanları ve çekirdekleri birer fiziksel delildir. Olay yerinde bulunan kovanlar incelendiğinde hangi silaha ait olduğu kısa bir sürede tespit edilebilir. Bunların yanında Bıçak, olayda kullanılan aletler, cam ve cam kırıkları da fiziksel delillerdir. Kısacası birçok nesne ve eşya üzerinde delil bulundurabilir veya kendileri delil olabilir.

2.3.3. İz deliller

Edmond Locard'ın "değişim prensibi" kriminalistik alanının en yaygın varsayıdır. Bu varsayıma göre her fail suç mahaline birtakım izler bırakır ve buradan da kendisine bulaşan izleri üzerinde taşıyarak başka yerlere götürebilir. Locard bu prensibini;

"Her temas iz bırakır"

sözyle açık ve kesin bir şekilde belirtmiştir.

Parmak ve avuç izi izleri, baskı izleri, araç lastik izleri, diş izi, kulak izi ve alet izleri iz deliller arasında sayılmaktadır.

2.3.4. Belge Delilleri

Olay yerinden elde edilen veya bir suçu ispat etmek için hukuki incelemeye alınmış üzerinde bilgi, sembol veya işaret taşıyan her türlü kağıt parçası, mendil, çek, senet, pasaport, kimlik, ehliyet, banka kartları ve tanıtım belgeleri belge deliller arasında sayılmaktadır.

2.3.5. Ses-Görüntü-Data delilleri (Dijital Deliller)

Dijital delil, bir hipotezi desteklemek veya çürütmek için güvenilir bilgiler içeren dijital verilerdir (Carrier 2005). Chisum'a göre "bir suçun nasıl olduğunu veya suçtaki kritik elemanları adresleyen teorileri destekleyen veya çürüten, bilgisayar sistemleri kullanılarak kayıt edilen veya iletilen veriler" olarak tanımlanmaktadır.

2.3.6. Biyolojik Deliller

Olay yerinde canlıların vücutlarından düşen, akan, kopan yada dökülen her türlü biyolojik maddelerdir. Olay yerlerinde kontaminasyondan en çok etkilenen delillerdir. Biyolojik delillerden olay yerlerinde en çok karşılaşılanları: kan ve kan lekesi, saç ve vücut kılları, tükürük ve tükürük lekesi, burun akıntısı, ter, idrar, gözyaşı, kusmuk,

sümük, meni, vajinal sıvı, doku, tırnaklar, dışkı, kepek ve deri döküntüleri, kemikler, dişlerdir. Hayvan artıkları ve bitki parçaları da biyolojik delil olarak kabul edilir.

Bu biyolojik delillerden en sık karşılaşılanı kandır (James 2005). Bunun sebebi birçok suçta şiddet ve yaralamanın gerçekleşmesidir, diğer bir sebep ise tükürük gibi diğer biyolojik materyallere göre kanın daha kolay görülebiliyor olmasıdır. Cinayet ve tecavüz olaylarının yaklaşık % 60'ında kan bulunmaktadır (Weedn ve ark 1998).

Biyolojik deliller çoğunlukla DNA içerdikleri için olay yerlerinden toplanmakta ve DNA analizi ile suç ve suçlunun belirlenmesinde kullanılmaktadırlar (Saferstain 2004). Biyolojik örnek denildiğinde DNA analizi için yeterli miktarda DNA eldesi sağlayabilen materyalden bahsedilmektedir. DNA analizindeki başarı örneklerin türüne, nasıl toplandığına, miktarına, paketlenme şekline ve delilin nasıl korunduğuna bağlıdır.

Çizelge 2.1. Olay yerinde bulunan delil üzerindeki DNA'nın olası yeri ve kaynağı (Çakır 2001).

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

Bir olay yerinden toplanan ve kriminal laboratuvarlarında DNA eldesinde en çok kullanılan hücreler beyaz kan hücreleri, sperm hücreleri, epitel hücreler ve saç folikül hücreleridir.

2.3.6.1 Biyolojik Delillerin Toplanması

Olay yeri incelemesi yapılırken olay yerinden biyolojik materyal toplanmasında oldukça hassas ve dikkatli davranılmalıdır. En ufak bir hata kontaminasyona veya DNA degradesiyonuna sebep olabilir bu da hatalı DNA raporu çıkmasına veya DNA analizinin yapılamamasına neden olmaktadır.

Suç mahalinde yürütülen işlemlerde maksimum koruma ve özenin gösterilmesi gereklidir bunun için de koruma kıyafetleri giyilmesi, eldiven, maske ve bone takılması gerekmektedir. Biyolojik delil toplamak için el feneri, uv ışık kaynağı, pens-makas, tek kullanımlık eldivenler, temiz kağıtlar ve poşetler, delil toplama zarfları ve kutuları, serum fizyolojik, pamuk veya eküvyon çubuk, %70lik alkol, temiz jilet-neşter-bisturi, steril tek kullanımlık şırınga, EDTA'lı tüp, steril bezler, steril saf su, flaster gibi birçok malzeme gerekmektedir.

Türk Ceza Muhakemesi Ceza Hukuku'na göre olay yerinden biyolojik delillerin toplanması şu şekilde olmalıdır:

- Her delilde ayrı eldiven kullanılmalıdır. Fiziksel temasta kontaminasyon, uygun pens kullanılarak ve eldiven giyilerek engellenebilir. Eldivenler her zaman giyilmeli ve sık sık değiştirilmelidir. Eğer eldivenler kontamine olursa derhal değiştirilmelidir.
- Deliller toplanırken aksırıp öksürmemelidir. Mutlaka maske takılmalıdır.
- Deliller toplanırken eli ağza, burna götürmemeli, sıvı bir içecek ya da sigara içilmemelidir.
- Deliller ayrı ayrı toplanmalıdır.
- Delilin nereden ve kimden alındığının kaydı tutulmalıdır.
- Mağdur ve sanığa ait örneklerin her seferinde birbiri ile teması önlenmelidir.
- Cinayet olaylarında maktulün defin işlemi gerçekleşmeden mukayese kan, kıl ya da doku örnekleri temin edilmelidir.

- Kişiyeye kan nakli yapılmış ise laboratuvarı bilgilendirilmeli ve hastaneden nakledilen kanın özellikleri temin edilmelidir.
- Her türlü delil için karşılaştırma örneği olarak sanık ya da mağdurdan kan, köklü kıl örneği ya da buccal swap (yanak içi sürüntü) alınıp laboratuvara gönderilmelidir.
- Makas, pens ve bıçak ağız gibi kullanılan aletler, her zaman her bir örnek alındıktan sonra %5'lik H₂O₂ (ya da alkol) ile tamamen temizlenmeli ve örnek alınmadan önce alkol aletten tamamen uzaklaştırılmalıdır.

Olay yerinden bulgu toplarken her biyolojik örnek için aynı yöntem kullanılmaz. Ortamın türüne ve alınan vücut sıvısının cinsine göre bu yöntemler değişkenlik gösterir.

Şahıslar üzerinden kan veya vücut sıvısı alınırken örnek halen sıvı ise gazlı bez veya swap çubuğa emdirilir. Leke kurumuşsa öncelikle serum fizyolojik ile sıvılaştırılır ve sonra gazlı bez ya da swap çubuğa emdirilir. Biyolojik örneklerin çoğunda olduğu gibi, bu örnekler de doğrudan güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde kuru ve serin ortamda kurutulur.

Vücut sıvıları veya kan örneği giysiler üzerinde bulunuyorsa ve ıslaksa öncelikle giysi kurutulmalı asla ıslak paketlenmemelidir ve her giysi ayrı kağıt delil zarfında olacak şekilde paketlenmelidir. Kurutma ve paketleme sırasında lekenin şeklinin bozulmamasına çok dikkat edilmelidir.

Üzerinde vücut sıvısı veya kan bulunan obje taşınabiliyorsa lekenin taşınma aşamasında sürtünmeden dolayı şeklinin bozulmasına sebebiyet vermemeye dikkat edilerek kriminal laboratuvarlarına taşınmalıdır. Burada dikkat edilmesi gereken husus obje üzerinde bulunan parmak izlerine herhangi bir zarar vermeden biyolojik incelemeyi yapmaktır. Objeye taşınmayacak kadar büyükse kurumuş lekenin fotoğrafı çekilip krokisi çizildikten sonra serum fizyolojik ile nemlendirilmiş swap çubuğu veya gazlı beze emdirilerek örnek alınır ya da lekenin bulunduğu kısım kesilebiliyorsa dikkatlice lekenin şekli bozulmadan kesilir ve uygun koşullarda laboratuvara taşınması sağlanır.

Vücut sıvılarının dışında olay yerinden birçok nesneden DNA elde etmek mümkündür. Bunlardan birisi de sigara izmaritidir. İzmaritte filtrenin ağız kısmına yakın kısmı DNA analizi için gereklidir. İzmaritler ıslaksa kurutulularak, çok sayıdaysa ayrı ayrı kağıt delil zarflarına toplanarak incelemeye gönderilmelidir. Çiğnenmiş sakızlar veya mektup zarfları ve pullar da önemli DNA kaynaklarıdır. Temiz pensler kullanılarak bu örnekler alınır ve kağıt zarfla analize gönderilir.

Tecavüz vakalarında prezervatifler şüpheliye ait meni bulundurabilecekleri için önemli deliller arasındadır. Elde edilen semen sıvı halde gönderilecekse mutlaka soğuk zincirle ama asla dondurulmadan en kısa zamanda incelenmek üzere gönderilmelidir. Örnek kuru olarak svap çubuğu ile gönderilecekse serin ve kuru ortamda paketlenerek gönderilmelidir. Tecavüz olaylarında mağdur şahsın anal, vajinal ve oral bölgelerinden svap kiti ile örnek alınır ve en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılır. Herhangi bir boğuşma sonucu tırnaklarda şüpheli kişinin epitel hücrelerinin bulunma olasılığının yüksek olması sebebiyle tırnak altlarında birikmiş dokular da önemli DNA kaynaklarıdır.

Giysiler üzerindeki ter örneklerini çıplak gözle görmek zordur fakat UV ışık altında sarı renk verirler. Ter örnekleri az miktarda DNA içerdikleri için analiz açısından çok uygun değildir fakat olayın çözümünde katkı sağlayabileceği için değerlendirilmektedir. Örnek hala nemliyse kurutulup kağıt zarfla taşınır.

Hırsızlık durumlarında sık rastlanan biyolojik delil kepektir. Hırsızın kullandığı bere, kar maskesi, eldiven veya atkılarda kepeğe rastlamak mümkündür. Kafatası derisindeki epitel hücrelerin ölmesiyle oluşan kepekler DNA analizi için elverişli örneklerdir. Hırsızlık veya boğuşma olaylarında rastlanan bir diğer örnek de gaitadır. Giysiler üzerinde veya olay yerinin herhangi bir yerinde örneğe rastlamak mümkündür. Giysiler üzerinde kuru haldeyse kağıt zarflar, başka bir yerde sıvı haldeyse plastik örnek toplama kaplarıyla analize gönderilmelidir.

Olay yerinde bulunabilecek kemik veya dokular önemli DNA kaynaklarıdır. Bu örnekler soğuk zincir ile en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılmalıdır.

Olay yerinde en önemli bulgulardan biri gözle görülmeyen ama aslında ortamdaki en önemli DNA kaynağı olan silinmiş kanlardır. Cinayet veya yaralama, yaralanma olaylarında meydana gelen kan lekeleri delilleri karartmak için silinir ve ilk incelemede olay yeri ekibi tarafından görünmesi engellenir. Fakat bu delilleri yok ettiğini düşünen şahısların bilmedikleri konu şudur ki olay yerindeki kanı ne kadar da silseler luminol adlı kimyasal olay yeri ekibi tarafından şüpheli bölgeye spreylendiğinde silinmiş kanlardan kalan eser miktardaki kanda bulunan demirle tepkimeye girerek ışıma vermektedir. Bu şekilde kan olan bölge tespit edilip oradan svap çubuğuyla alınan örnekler ile özel kitler kullanarak DNA analizi yapmak mümkündür.

2.3.6.2. Kontaminasyon

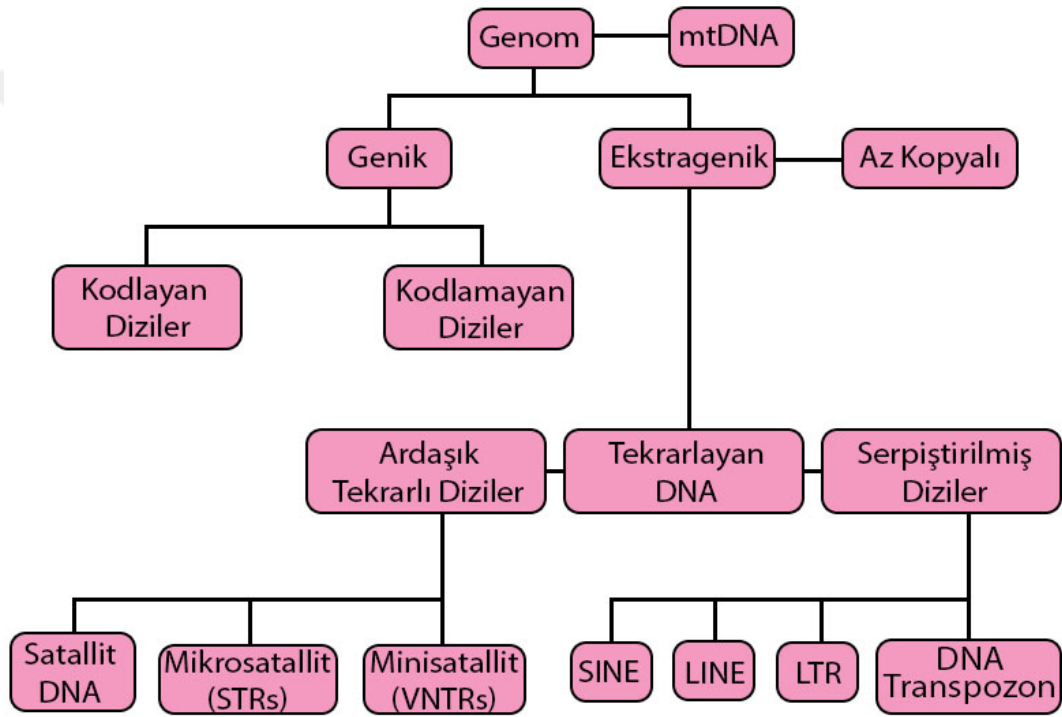
Temiz bir yüzeye, ortama veya dokuya, başka bir ortamdan kirliliğin taşınması sonucu oluşan bulaşmalara kontaminasyon denir. Adli bilimlerde ise delilden delile veya bir şahıstan delil üzerine bir başka DNA kaynağının aktarılmasına kontaminasyon denilmektedir ve delillerin toplanması, paketlenmesi veya taşınması sırasında herhangi bir dikkatsizlikte meydana gelebilir. Kontaminasyon personelden kaynaklanabileceği gibi aynı zamanda kullanılan alet ve gereçlerin steril olmamalarından veya delillerin birbirine temas etmeleri sonucu gerçekleşebilir.

2.4. DNA

Biyolojik delillerin incelemesinde temel amaç, canlıların genetik materyali olan deoksiribonükleik aside (DNA) ulaşmaktır (Kobilinsky ve ark. 2005). DNA bir organizmanın yaşaması ve çoğalması için gereken tüm bilginin depolandığı yerdir. DNA, 5 karbonlu bir şeker olan riboz, fosforik asit, adenin, timin, sitozin ve guanin bazlarından meydana gelen sarmal yapıda bir makromoleküldür (Watson ve ark. 1953).

Genom, bir organizmanın haploid genetik içeriği olarak tanımlanır ve her bir insan hücresinin çekirdeğinde tam genomun iki kopyası bulunmaktadır. İnsan genomu 23 kromozom içinde yer alan yaklaşık 3 milyar baz çiftinden oluşur. (Venter 2001)

İnsan Genom Projesi sayesinde genomun %99'luk bölümü raporlarla yayınlanmıştır. Protein sentezini kodlayan ve kontrol eden DNA bölgeleri gen olarak adlandırılırlar. Yaklaşık olarak 20-25 bin civarında olduğu tahmin edilen genler insan genomunun % 1.5'lük kısmını kapsamaktadır. Bu bölge genom organizasyon şemasında Genik DNA'nın kodlayan diziler kısmında bulunmaktadır. Kodlamayan diziler %23,5 oranındayken genomun %75'lik kısmı az kopyalı veya tekrarlayan dizilerden meydana gelen Ekstragenik DNA'dan oluşmaktadır. Tekrarlayan diziler içinde bulunan ve insan genomun yaklaşık %5'ini oluşturan satellit DNA adlı araştırmalarda kullanılan bölgedir.



Şekil 2.6. İnsan genom organizasyonu.

DNA analizi yapmak için olay yerinden, mağdur ve sanıktan biyolojik örnekler alınıp olayla ilgisi olabilecek kişi ya da kişilerle karşılaştırılmalıdır. Bu örneklerden DNA izole edilir ve DNA molekülü üzerindeki belirli bazı bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu ile binlerce kez çoğaltıldıktan sonra görünür hale getirilir (Atasoy 2000).

Olay yerinden elde edilen biyolojik deliller üzerinde başarılı bir DNA analizi yapılması, hangi çeşit örneklerin toplandığına ve onların nasıl korunduğuna bağlıdır. Personel tarafından oluşturulabilecek en ufak bir kontaminasyon delilden DNA elde edilebilmesine engel olabilmektedir. Delile DNA bulaştırmak dışında personel kendisine delilden DNA bulaştırmamaya da dikkat etmelidir çünkü biyolojik materyaller Hepatit B ya da AIDS hastalığına yol açan HIV gibi tehlikeli ve ölüme neden olabilecek virüsler de içerebilirler (Gunn 2006).

2.4.1. DNA Profili

Tek yumurta ikizleri hariç, iki insanın aynı DNA profiline sahip olma olasılığı trilyonda birden azdır (Evelt ve ark. 1998). Aynı anne babadan meydana gelen kardeşlerde bile farklı nükleotid dizilişleri bulunmaktadır. Bu farklı dizilişler DNA şifresini oluşturur. İki insanın DNA dizisi yaklaşık olarak %99.5 oranında aynıdır, geriye kalan %0.5lik kısım insanlar arasında genetik çeşitliliği ve farklılığı sağlamaktadır. Bu tip DNA dizileri polimorfik DNA olarak isimlendirilir ve insanların tanımlanmasında kullanılan polimorfik DNA markırlarını oluştururlar.

DNA profili; insan hücrelerinden elde edilen ve insanlar arasındaki genetik çeşitliliği sağlayan genom bölgelerinin incelenmesi sonucu ortaya çıkan barkod benzeri adlandırmalardır (Karakuş ve ark. 2013). Adli bilimciler, bir suç mahalinde bulunmuş kan, meni, deri, tükürük veya saçta bulunan DNA'yı kullanarak bir failin kimliğini belirleyebilirler. Bu işleme genetik parmak izi çıkarma veya genetik profillemeye denir. DNA profillemesinde, tekrarlı diziler (mikrosatellit ve minisatellit) içeren DNA'nın değişken kısımlarının uzunlukları belirlenir, bunlar farklı insanlarda karşılaştırılır. Bu yöntem bir suçlunun tanınması için son derece güvenilir bir yöntemdir (Collins ve ark 1994). Fakat suç mahaline birden fazla kişinin DNA'sı bulaşmışsa bu kimlik belirleme karmaşıklaşabilir (Weir ve ark. 1997).

DNA polimorfizmleri kodlayıcı ve kodlayıcı olmayan polimorfizmler olmak üzere iki ana sınıfta toplanırlar. Özellikle kodlayıcı olmayan bölgelerdeki polimorfizmler, adli araştırmalarda önem taşımaktadır. Bunlar; VNTRs (variable number of tandem

repeats=değişken sayıda ardışık tekrarlar) olarak adlandırılan minisatellitler, STR (short tandem repeats=basit dizi tekrarları) olarak adlandırılan mikrosatellitler ile SNPs (single nucleotide polymorphism) yani tek nükleotit polimorfizmleridir.

Adli bilimlerde DNA düzeyindeki araştırma 1980 yılında Ray White tarafından VNTRs'lerin RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi) analizi ile yapılmıştır. RFLP analizinde DNA ekstre edildikten sonra restriksiyon enzimi ile kesilir ve agaroz jel elektroforezi uygulanır, southern blotlama ve prob hibridizasyonu sonucunda polimorfik lokuslar belirlenir. Ard arda dizilmiş siyah bantlar X-Ray filmine aktarıldığında gözle görünür sonuç elde edilmiş olur.

Genom projesinin yayınlanmasından çok daha önce öngörülerek araştırılan DNA profillemesi 1984'te Britanyalı genetikçi Sir Alec Jeffreys (Jeffreys ve ark. 1985) tarafından geliştirilmiş ve adli bilimde ilk defa 1988'de Enderby cinayetleri için Colin Pitchfork'un suçlu bulunmasında kullanılmıştır (Colin 2006).

RFLP analizinin degrade (bozulmuş) örneklerde başarılı sonuç vermemesi, analizlerin uzun sürmesi, radyoaktif madde kullanılması, fazla miktarda ve yüksek kalitede DNA örneğine ihtiyaç duyulmasından dolayı adli bilimlerde kullanımını oldukça zordur. 1990'lı yıllardan itibaren polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi RFLP yöntemine tercih edilir olmuştur. Daha sonra PCR tabanlı testlere yapılan çok sayıda iyileştirme ile adli topluluklar kısa tekrar dizileri (STR) üzerinde uzlaşma sağlanmıştır (Gill ve ark. 1985, Jeffreys 1987, Li ve Graur 1991, Budowle ve Beachtel 1990, Giusti ve Budowle 1995, Jackson ve ark. 2006, Hildebrand 2011).

STR'ler günümüzde adli vakalarda en çok kullanılan genetik polimorfizmdir. 1990'ların ortalarında ilk olarak bir vakada kullanılmış olup şu anda tüm dünyada neredeyse her adli genetik laboratuvarında kullanılmaktadırlar. Forensik vakalarda kullanılacak binlerce STR bulunmaktadır. STR'ler 22 otozomal kromozom ile X ve Y kromozomları dahil genom boyunca yayılmış durumdadırlar. Merkezi tekrar sayısı 1-6 arasında değişen ve 50-300 bp uzunluğa ulaşabilen bir yapıya sahiptirler. Teorik olarak mono-,

di-, tri-, tetra-, penta-, ve hegza- nükleotid tekrarları için sırasıyla 4, 16, 64, 256, 1024 ve 4096 olası motif vardır (Jin ve ark. 1994). Bununla birlikte mikrosatellitler ardışık şekilde tekrar ettiğinden bazı motifler diğerleriyle eşdeğerdir. Bu sebeple tetranükleotid tekrarları insan kimliklendirmesi için en çok kullanılan STR belirteçleridir (Buttler 2012).

STR'lerin PCR'da çoğaltılabilmesi yöntemi ile degrade örneklerde de çalışabilmek mümkün olmuştur. DNA incelemeleri minimal başlangıç örneği gerektirdiğinden olay yerinden alınan eser miktarlardaki materyallerin analizi ile sonuca varılabilir (Weedn V.W. ve Hicks J.W. 1998). Her insan annesinden ve babasından kalıtım yoluyla geçen bazı STR'lere sahiptir. Ancak hiç kimsenin sahip olduğu STR' ler ebeveynlerinin aynıdır değildir. Bir kişinin STR' lerinin sadece kendine özgü ve tek olması adli kimliklendirme ve babalık testi gibi durumlarda bilimsel belirteç olarak yardım sağlar. STR'lerin sayısız varyasyonları olduğundan iki farklı bireyin eşleşme şansı çok uzaktır (Buttler 2012) .

CODİS ulusal veri tabanı adı altında bir çalışma başlatılmış ve adli vakalarda incelenmek üzere en polimorfik bölgelerden oluşan STR lokusları belirlenmiştir. 13-14 Kasım 1997 tarihindeki STR projesi toplantısında 13 çekirdek STR lokusu geleceğin CODIS ulusal DNA veri tabanının temelini oluşturmak üzere seçilmiştir. Bu 13 CODIS çekirdek lokusları şu şekildedir: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 ve D21S11 (Butler 2006). Adli Bilimlerde kullanılacak STR bölgelerinin standardizasyonunu sağlamak için ticari girişimler sonucu standart STR kitleri üretilmiştir.

SNP'ler (Single Nucleotide Polymorphism) en basit yapıya sahip polimorfizm tipini oluşturmaktadırlar. DNA dizisindeki tek bir nükleotidin farklılığına dayanır. SNP'ler yüksek oranda polimorfik değildirler ve forensik genetik için ideal DNA polimorfizm özelliklerine sahip değildirler. mtDNA haricinde henuz SNP'ler forensik analizde yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu nedenle STR'ler ağırlıklı olarak kullanılmaya devam edilmektedir. SNP'lerin de ilerleyen zamanlarda kendilerine yer bulacağı öngörülmektedir.

DNA profili yalnız saldırı ve cinayetlerin aydınlatılmasında değil aynı zamanda babalık tayinlerinin ve akrabalık ilişkilerinin aydınlatılmasında da güvenilir bir yöntemdir (Açıkgöz 2002).

2.4.2. Biyolojik Delillerden DNA İzolasyonu

DNA, bir kişinin genetik bilgisinin tamamının yer aldığı temel yapı taşıdır. DNA kanda, spermde, deri hücrelerinde, doku ve organlarda, kasta, beyinde, kemikte, tükürükte, terde, idrarda, tırnakta, dışkıda, saçta kısacası vücudun her yerinde bulunur ve tamamen aynı yapıya sahiptir (Ludes ve ark. 2005).

Biyolojik örneklerde örneğin çeşidine göre değişik kimyasallar kullanılarak ayırma yöntemleri kullanılsa da temel prensip hepsinde aynıdır. Öncelikle hücre lizisi ile sonuçlanan hücre zarının yıkımı, sonrasında protein denaturasyonu, son olarak da DNA'nın denatüre olan protein ve diğer hücre bileşenlerinden ayrılması işlemi uygulanır.

Olay yerinden elde edilen kan hücreleri, epitel hücreler ve benzer birçok hücreye uygulanabilen en genel ayırma yöntemi Fenol-Kloroform yöntemi ile DNA izolasyonudur. Bu yöntemi uygularken Fenol-Kloroformun yüksek oranda toksik olduğu unutulmamalı ve uygun şartlar altında DNA izolasyon işlemi uygulanmalıdır.

Kan hücrelerinden DNA izole etmek için öncelikle Tris-EDTA çözeltisi ile eritrositler parçalanıp ortamdan uzaklaştırılır. Hücrelerin üzerine TE (Tris-EDTA), NaCl, SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ve Proteinaz K eklenip 1 gece lizis işlemine bırakılır. Bu aşamada hücre zarı ve diğer hücre bileşenlerinin parçalanması, proteinlerin çökmesi sağlanır. Ertesi gün hücre süspansiyonuna fenol-kloroform eklenir ve istenmeyen tüm bileşiklerin fenolle çökmesi sağlanırken, kloroformun oluşturduğu gradient farkı ile DNA'nın da fenolle çökmesi engellenir. İşlem birkaç defa tekrar edildikten sonra DNA içeren üst faza soğuk etanol eklenmesi sonucu DNA'nın hızlıca bir araya gelip çökmesi sağlanır.

Semen hücreleri veya kıl hücrelerine DNA izolasyon işlemi uygulanırken yöntem biraz farklılık gösterir. Sperm baş kısmında bulunan DNA akrozom tarafından çevrilmiş durumdadır. Akrozom yapısında bol miktarda, aralarında disülfid köprüleri bulunan sistein amino asidi bulunur. Spermatozoonlarda olduğu gibi saç gövdeleri de disülfid bağları açısından zengindirler. Proteinlerin yıkılmasında kullanılan enzim olan Proteinaz-K, disülfid bağlarını kıramaz. Bunun için ortama disülfid bağlarını kırabilen ve ekstraksiyonun etkinliğini arttıran bir madde olan DTT (dithioreitol) eklenir.

Diş veya kemik gibi sert dokuların DNA elde edebilmek için olay yerinden elde edilen sert dokulardan öncelikle etraflarındaki yumuşak dokular deterjan ile uzaklaştırılır, ardından da sodyumhipoklorite yatırılır ve son olarak da UV ışığa maruz bırakılırlar. Temizlik işlemini takiben, kemik/diş dokuları ezme veya sıvı nitrojenle parçalama yoluyla toz haline getirilir. Elde edilen tortu 0.5 M EDTA ile dekalsifiye edilir. Daha sonra DNA bilinen yöntemlerden biri ile ekstre edilir.

DNA izolasyonu için ticari kitler de bulunmaktadır. Forensik alanda kullanılmak üzere eser miktardaki örnekten bile DNA izole edebilecek çeşitli kitler mevcuttur. Örneğin, Luminol ile tespit edilen silinmiş kan lekelerinden elde edilen DNA miktarı klasik yöntemler uygulanmayacak kadar az olduğu için özel Forensik DNA İzolasyon Kitleri ile PCR için yeterli miktarda DNA elde etmek mümkündür.

2.4.3. PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

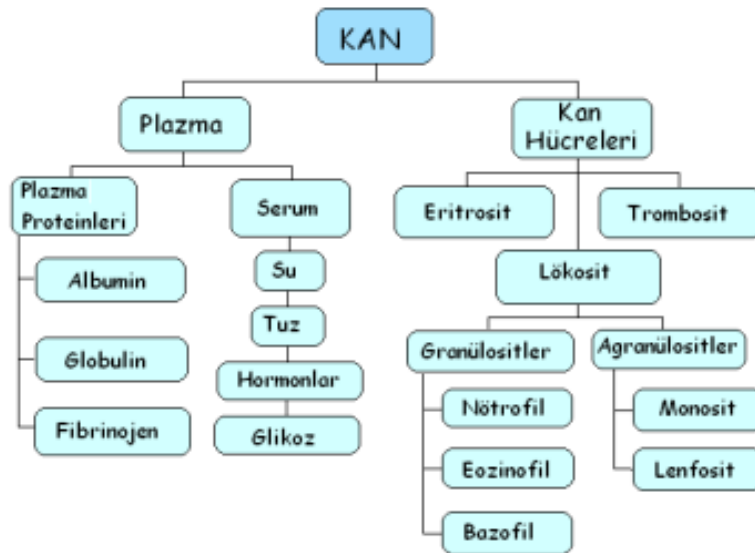
PCR hedef DNA dizilerinin in vitro olarak çoğaltılmasına olanak sağlayan bir tekniktir. Termal cyclus cihazı ve çoğaltılmak istenilen bölgeye özgün primerler kullanılarak DNA'nın milyonlarca kopyasının elde edilmesi işlemine DNA amplifikasyonu denilmektedir burada gerçekleşen reaksiyon da polimeraz zincir reaksiyonu olarak isimlendirilmiştir. Kalıp DNA, primerler, dNTP (deoksinükleotit trifosfat) karışımı, tampon çözelti, tuzlar ve DNA polimeraz enzimi PCR işleminin bileşenlerini oluşturmaktadır. Termal cyclus cihazına yerleştirilen bu karışım 3 aşamadan geçer, bunlar denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamalarıdır. Denatürasyon aşamasında 94-96°C'de birkaç dakika tutularak DNA'nın tek iplik formuna geçmesi sağlanır. Bağlanma

aşamasında 50-65°C'de birkaç dakika süresince primerlerin hidrojen bağları aracılığı ile kalıp DNA'ya bağlanması sağlanır. Son aşama olan Uzama ise 72°C'de gerçekleşir ve saniyede 60 baz olmak üzere her DNA primerine nükleotidlerin bağlanması sağlanır. Bu 3 aşamalı siklus en az 20 defa tekrar edildikten sonra yeterli miktarda DNA elde edilmiş olur. Bu klasik PCR prosedürüdür. Kriminal laboratuvarlarında Multipleks PCR analizi yapılmaktadır.

Multipleks (çoklu) PCR terimi birden fazla primer çifti kullanılan PCR'lar için kullanılmaktadır. Tekniğin hedefi, eş zamanlı olarak hedef DNA'nın birçok bölgesini çoğaltmaktır. Çoğaltılan bölgeler Genetik Analizator DNA Kapiller Elektroferez Sistemi ile yürütülür daha sonra oluşan yürüme modelleri GeneScan, GeneTyper ve GeneMapper gibi yazılım programları kullanılarak analiz edilir ve PCR ürünlerinin elektroferogram görüntüsü elde edilir. Son olarak Tiplendirme (STR profili belirleme) yapılarak analiz tamamlanır.

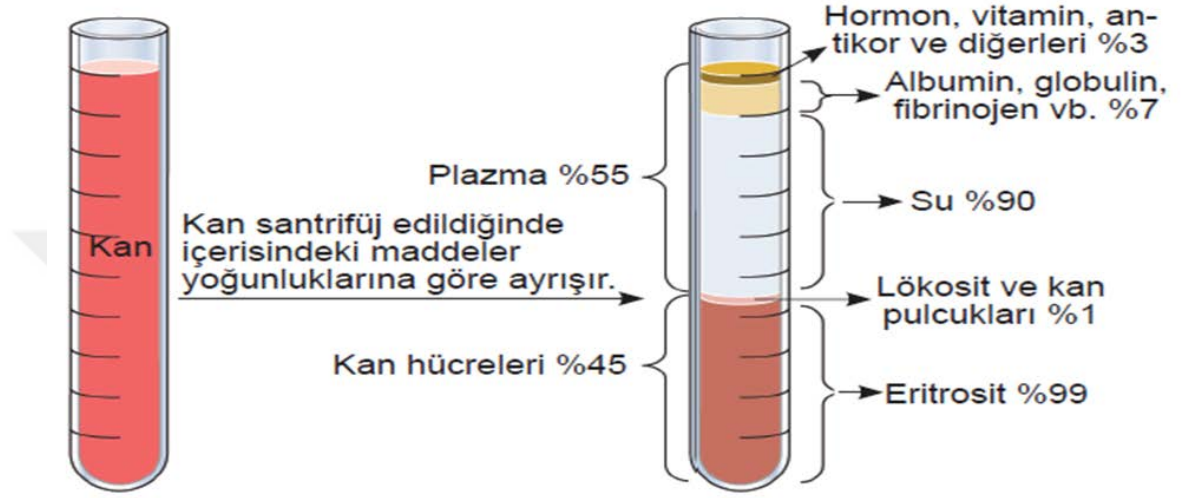
2.5. Kan

İnsan vücudunun toplam ağırlığının % 8'ni oluşturan kan, bir sıvı ortamdan (plazma) ve bu ortam içinde bulunan özelleşmiş hücrelerden oluşan, taşıyıcı ve koruyucu fonksiyonları olan kompleks bir sıvıdır. (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Kanın yapısı (Anonim-1 2015).

Erkeklerde ortalama 5-6, bayanlarda 4-5 litre kan bulunur ve kanın viskozitesi 4,4-4,7 arasında değişir. Kan, plazma ve kan hücresi olmak üzere iki kısımdan oluşur. Kanın ortalama % 55'ini kan plazması, % 45'ini kan hücreleri (şekilli elemanlar) oluşturur (Bevel ve ark. 2002)



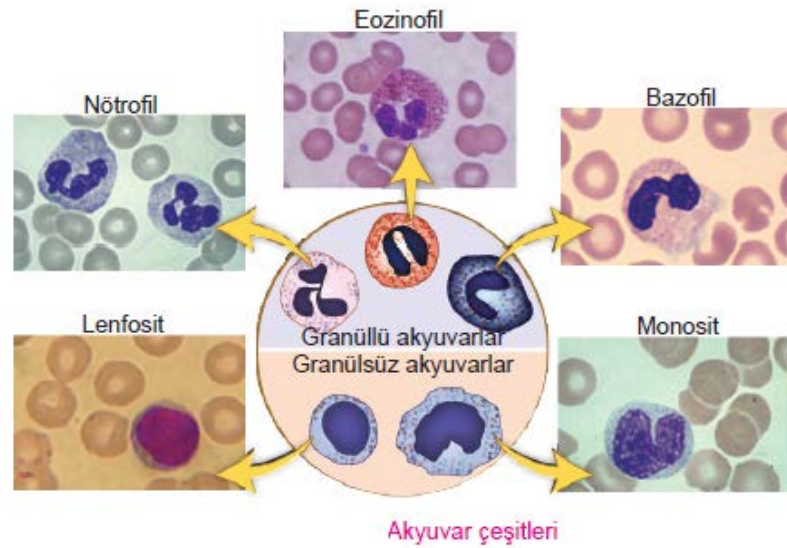
Şekil 2.8. Kanın içeriği (Anonim-2 2014).

Plazmanın % 90-92'si su, geri kalan bölümü ise organik ve inorganik maddeler olan plazma proteinleri, aminoasitler, karbonhidratlar, yağlar, hormonlar, üre, ürik asit, laktik asit, enzimler, antikorlar, sodyum, potasyum, iyot, demir, bikarbonat vb. elementlerden oluşur. Bu maddeler plazma ile dokuların ilgili yerlerine taşınmaktadır. Plazma proteinleri; albumin, globulin ve fibrinojendir. Albuminler; oluşturdukları ozmotik basınçla plazmadaki sıvının damar dışına kaçmasına engel olur. Globulinler; alfa, beta, gama globulinler olarak isimlendirilir ve antikor gibi görev yapar. Fibrinojenler; kanın pıhtılaşmasının son kademesinde gerekli proteinlerdir.

Kan hücreleri, kanın plazma dışında kalan kısmıdır. Kan hacminin yaklaşık % 45'ini oluşturur. Kan hücrelerinin, sıvı kısım olan plazmaya oranına hematokrit denir. Kan hücreleri eritrosit, lökosit ve trombosit olarak adlandırılır.

Trombosit veya kan pulcukları kan pıhtılarının oluşumunda görev alan hücre parçalarına verilen isimdir. Platelet olarak da adlandırılır. Kan pulcukları çok sayıda granül içeren renksiz hücre parçalarıdır. Eritrositler gibi çekirdeksiz ve disk şeklindedirler. Kanayan kanı durdurmasının yanı sıra herhangi bir damarın yaralanması ve zedelenmesi halinde yaralı damarın büzülmesi ve kan akışını yavaşlatma görevi de trombositlere aittir. Trombositin çalışma şekline gelince, herhangi bir bölgede yaralanma veya yırtılma olunca trombositler birbirlerine ve yaralı bölgeye yapışırlar ve burada bir duvar örer gibi yaralı bölgeyi kamufle ederler ve kanamayı durdururlar.

Akyuvarlar ya da lökosit olarak da adlandırılan kan hücreleri, kemik iliği, lenf bezleri, dalak ve timüs bezinde üretilir. Pigment kapsamadıklarından bunlara beyaz kan hücreleri de denir. Lökositler alyuvarlara göre daha büyük ve çekirdeklidir. Bağışıklık sisteminin önemli bir bölümünü oluştururlar. Organizmanın savunma sisteminin hareketli elemanları olan lökositler, organizmayı bakterilere, virüslere, parazitlere ve tümörlere karşı savunurlar. Lökositler çeşitli yollarla vücuda giren mikroorganizmaları, ölü doku artıklarını, yabancı partikülleri ya fagosite ederek ya da ürettikleri antikorlarla ve duyarlı lenfositlerle harap ederek ortadan kaldırmaya çalışır. Lökosit sayısının normalden daha az olmasına lökopeni, fazla olmasına lökositoz denir. Lökositler sitoplazmalarında granül olup olmamasına göre; granülositler ve agranülositler olarak iki gruba ayrılır.



Şekil 2.9. Akyuvar çeşitleri (Anonim-3 2015).

Granülositler yapılarında granül bulunur. Kırmızı kemik iliğinde üretilir. Bunlar nötrofil, eozinofil ve bazofiller olarak üç çeşittir.

Nötrofiller, insan kanında en fazla bulunan lökositlerdir. Çekirdekleri 3-5 lobdan oluşur. Mikroorganizmalara karşı koruyucu görev üstlenirler, fagositoz yetenekleri en güçlü olan granülositlerdir. Kan akımını terk ettikten sonra genişler, hareketlilik kazanırlar ve aktif fagositler haline gelirler, bu nedenle mikrofaj olarak ta adlandırılırlar. Nötrofillerin yaşam süreleri kısadır. Dolaşım kanındaki ömürleri 6-7 saattir sonra bağ dokusuna geçerler. Bağ dokusunda 1-4 gün yaşadıktan sonra görev yapsalar da yapmasalar da ölürlar. Dişilerde nötrofillerin nukleusunda lobların birinden küçük heterokromatik bir cisim uzanır. Bu inaktif X kromozomunu ifade eder. Barr cisimciği ya da drumstick adı verilir.

Eozinofillerin, çekirdekleri genellikle 2 lobludur. Antikor-antijen birliklerini tanır. Parazitik ve alerjik durumlarda sayısı artar. Kan akımını terk edebilir, yayılabilir ve bağ doku içinde yer değiştirebilirler, sınırlı fagositoz yaparlar.

Bazofiller çok nadir bulunurlar, çekirdek düzensizdir ve iyi ayırtedilemeyen 2 lobdan oluşur. Dolaşımı terk edebilirler ama dokularda ameboid hareket yetenekleri ve fagositoz yetenekleri sınırlıdır. Yapılarında bol miktarda antikoagülan madde olan heparin (pıhtılaşmayı önleyici), ayrıca histamin (damar genişletici) ve serotonin taşırlar.

Agranülositler; Lenfositler ve Monositler olmak üzere 2 türdür. Bunlar mononükleer lökositler adı da verilen hücrelerdir. Spesifik granülleri yoktur ama azürofilik granüller içerirler.

Monositler; lökositlerin % 7sini oluştururlar, dolaşımdaki fagositlerdir ve en büyük kan hücreleridir. Kemik iliğinde üretilirler. Çekirdekleri birer kenarından çukurlaşmıştır. Yaşlanan hücrelerde bu çukurluk artar. Monositler dokulara geçerek makrofaj adını alırlar. Monosit makrofajlar yabancı materyalin sindirilmesinde rol alırlar. Diğer bir görevi ise ölü dokuları temizlemektir. Çekirdekleri lenfosit kadar koyu boyanmaz.

Lenfositler, tek çekirdekli lökosit alt grubudur, lökositlerin yaklaşık %30-40'ını oluştururlar. Lenfositlerin %2 si dolaşımda bulunur, geri kalanı kan yapan organlarda ve bağ dokuda yerleşmiştir. 2 tip lenfosit vardır; T lenfositler (timus bezinden köken alırlar), B lenfositler (kemik iliğinden köken alır ve lenfoid dokularda olgunlaşırlar). Çekirdekleri yuvarlak, heterokromatik, mor menekşe boyanan hücrelerdir. Lenfositler, vücudun bağışıklık sisteminden sorumludurlar.

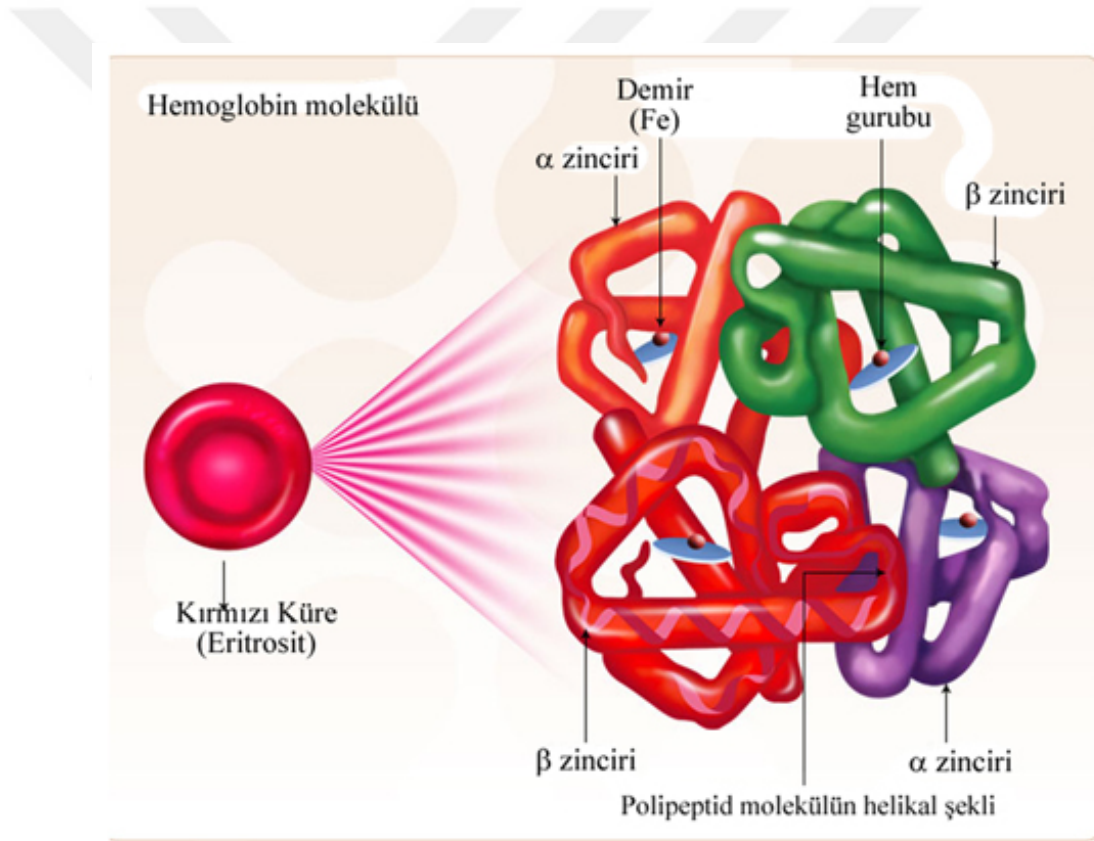
Olay yerinden elde edilen kan örneklerinden DNA elde edebilmek için çekirdekli hücreler lizise uğratarak DNA'ya ulaşılır. Degrade olmamış lenfositler, iyi bir DNA izolasyonu yapılabilmesini sağlamaktadır.

Kanın şekilli elemanlarının % 99 unu alyuvarlar oluşturur. Alyuvarların şekilleri disk şeklinde olup, çapları 6-8 mikronmetredir. Alyuvarların çekirdeği yoktur. Eritrositlerin sayıları; cinsiyet, yaş ve yaşanılan yerin yüksekliğine göre değişebilmektedir. Kandaki miktarı vücudun fazla oksijene gereksinim duyduğu hallerde veya havasında az oksijen bulunan yüksek rakımlarda artar, kansızlıkta ise azalır. Miktarın artmasına poliglobuli, azalmasına ise anemi adı verilir. Alyuvarların ömürleri 100-120 gün kadardır. Eritrositler; akciğer ve dokular arasında oksijen ve karbondioksit taşımakla görevlidirler, akciğerden aldıkları oksijeni dokulara dokulardan aldığı karbondioksiti akciğere getirir. Aşağı sınıf omurgalılarda (sürüngenler, amfibiler, balıklar ve kuşlar) alyuvarlar çekirdekli dirler. Memelilerde ise olgun alyuvarlar çekirdeksizdirler. Bu hücreler, kırmızı kemik iliğindeki gelişmeleri sırasında çekirdeklerini kaybederler. Bunun amacı, sitoplazmaya daha fazla hemoglobin sığdırmaktır. Hemoglobin eritrositlere kırmızı rengini veren moleküldür ve eritrositlerin renkleri içerdikleri hemoglobin miktarına bağlıdır. Hemoglobin oksijen bağlayarak onun kanda taşınmasını sağlar.

Sitoplazmayı dolduran hemoglobin maddesi demirli bir proteindir. Bu madde alyuvarın % 33'ünü oluşturur; gerisi sudur. Hemoglobin, globin denen kolloidal bir protein ile, hem adı verilen demirli bir pigmentten oluşmuştur. Hemoglobin, oksijeni kendisine gevşek bir şekilde bağlayarak dokulara oksijeni taşır (oksihemoglobin). Dokulardan akciğere taşınan karbondioksitin %15-30'u da yine hemoglobine direkt olarak gevşek

şekilde bağlanarak (karbaminohemoglobin) taşınır. Geriye kalanı ise bikarbonat formunda (karbonik anhidraz) taşınır. Hemoglobin, oksijen ve karbondioksitten başka karbonmonoksiti de bağlar. Ancak bu durumda karbonmonoksit hemoglobinden ayrılmaz; alyuvarlar oksijen taşıma güçlerini kaybederler ve hücreler oksijensizlikten ölürlür.

Her hemoglobin molekülü 4 polipeptid subuniti içerir, bunların her biri demir içeren “hem” grubuna sahiptir. Hemoglobin 4 hem zincirinin ($\alpha, \beta, \delta, \gamma$) bir araya gelmesiyle oluşur. Her bir hemoglobin molekülünde 4 demir atomu vardır ve dolayısıyla her bir hemoglobin 4 molekül oksijen (8 atom oksijen) bağlayabilir.



Şekil 2.10. Hemoglobin molekülü ([//www.iliknakli.com/tr/article/desc/17883/kan-nedir.html](http://www.iliknakli.com/tr/article/desc/17883/kan-nedir.html)).

Demir hemoglobin, myoglobin ve sitokrom gibi yapılar için önemlidir. Vücuttaki toplam demir 4-5 gramdır ve bunun % 65 i hemoglobinde bulunur.

2.5.1. Kan Lekeleri

Kan örnekleri, ölümle sonuçlansın ya da sonuçlanmasın her türlü şiddet suçunun araştırılmasında olay yerinde en sık rastlanan ve az miktarlarda dahi sonuca ulaşılmasını sağlayabilen önemli biyolojik delillerdendir. Ancak uygun olmayan koşullarda (nem, sıcak, kir, toprak ile temas) kalmış kan örneği bir günde bile bozularak delil özelliğini yitirebilir (Karakuş 2009). Olay yerinde bulunan bir delilin kan olup olmadığını anlamak için ön tarama testleri uygulanır. Örneğin pas lekesi ile kan lekesinin ayrımı için şu farkları bilmek gerekmektedir: Pas lekesi suda erimez, süzgeç kağıdı ıslatılıp lekeye sürüldüğünde, pas lekesi kağıda çıkmaz. Buna, Taylor izi negatiftir denir. Pas lekesi KOH'ta erimez, HCl'de erir. Bunlara benzer çeşitli ön tarama testlerinde pozitif sonuç verdiği için kan örneği olduğu tahmin edilen sıvılar, olay yerlerinden laboratuvara getirildikten sonra öncelikle materyalin kan olup olmadığı test edilir. Bu amaçla en sık kullanılan testler phenolphtalein ve leuco crystal violet testleridir (Kiely 2001).

Adler (Benzidin) Reaktif testinde kan lekesi üzerine reaktif damlatılınca yeşil renge döner, 10 dakika sonra mavi renk gözlenir. Uzun yıllar kriminal laboratuvarlarında kullanılan bu reaktifin toksik olduğu tespit edildikten sonra kullanımı yasaklanmış yerine tetrametilbenzidin kullanılmaya başlanmıştır.

Loko-Malaşit Reaktif damlatılan leke kan lekesi ise, bir dakika içinde mavi-yeşil renk meydana gelir ve bu renk 10 dakika sonra yeşil renge dönüşür.

Orthotolidin Testi'nde reaktif ile hidrojen peroksit karıştırılıp kan olduğu düşünülen ize damlatıldığında yeşil veya mavi rengin meydana gelmesi, pozitif sonuç olarak yorumlanır.

Kastle Mayer Reaktif kan olduğu düşünülen maddeye damlatılır ve üzerine hidrojen peroksit damlatılır. Bir kaç saniye içinde açık kırmızı-pembe renk meydana gelirse, sonuç pozitif olarak kabul edilir.

Luminol Testi ile koyu renk kıyafet veya eşyalardaki lekelerin kan olup olmadığı kolaylıkla anlaşılabilir. Karanlık odada otomizer ile spreylenen solüsyon parlak mavi bir görünümün ortaya çıkmasını sağlıyorsa, lekenin kan lekesi olduğunu gösterir.

Van Dean Raktifi lekeye uygulandığında mavi renk oluşuyorsa leke kan lekesidir.

Hemin Billurlarının Oluşturulması yöntemi birkaç farklı reaktif için kullanılır. Hemin billurlarının gözlenmesi pozitif sonuç kabul edilir. Benzer prosedürlerde farklı yöntemler kullanılarak mikroskopta gözlenen Hemokromojen kristalleri de lekenin kan lekesi olduğu sonucunu verir.

Lekenin spektroskopik muayenesi veya lekenin HPLC ile muayenesi yöntemleri de kan lekelerinin tespitinde kullanılan enstrümental metotlardır.

Olay yerinden elde edilen sıvının kan olduğu tespit edildikten sonraki adım insana mı hayvana mı ait olduğunu belirlemektir. Bunun için kuşların ve balıkların alyuvarlarının çekirdekli, insan ve memeli hayvan (deve hariç) alyuvarlarının ise, çekirdeksiz olduğunu bilgisinden yola çıkarak kan lekelerinden hazırlanan preparatlar, kan boyama metotları ile boyandığında alyuvarların çekirdeksiz oldukları tespit edilirse, insan kanı lekesi olduğu düşünülebilir.

Kanın insan kanı olduğunu belirledikten sonra erkeğe mi kadına mı ait olduğu boyanan kan preparatlarındaki nötrofillerin incelenmesi ile belirlenir. Kan kadına ait ise ve örnek homoliz olmamışsa nötrofil lokositlerin çekirdeklerinde Barr cisimciği (drumstick) görünür. Barr cisimciği dişi hücrelerine özgü ve çekirdek zarının yakınında bulunan kromatin kümesine verilen addır. Aslında Barr inaktif bir X kromozomudur.

Olay yeri incelemelerinde elde edilen kan örnekleri, olayın çözümü için 2 önemli ipucu vermektedir. Doğru alınan kan örnekleri sayesinde yapılan DNA analizi ile olaya karışan kişilerin kimliklendirmeleri yapılabilmektedir. Diğer bir önemi ise kan lekesi model analizini doğru yaparak olayın nasıl gerçekleştiğini anlayabilmek mümkündür.

Kan lekesi model analizi (Aşıcıoğlu 2004) ile olay yerindeki kan izlerinin şekline, çarpma açılarına, kan damlasının yönüne bakarak olayın tam olarak nerede gerçekleştiğini ve nasıl bir alet kullanıldığını tahmin etmek mümkündür.

Kan lekeleri oluşum mekanizmalarına göre 3'e ayrılır. Pasif kan lekeleri, yaralı bir elden damlayan kan damlaları ya da kişinin ölmeden önceki son pozisyonunda aldığı yaralardan sızan kanın oluşturduğu kan gölü şeklindeki lekelerdendir. Transfer kan lekeleri, kanlı bir elin veya kanla bulaşık saçın duvar, giysi vs. gibi herhangi bir yere sürülmesi sonucunda oluşan lekelerdir (Temas kan lekeleri). Projektil kan lekeleri ise arteriyel kanama veya kanlı bir aletin sallanması ile sıçrama sonucunda oluşan kan lekeleridir.

Kan damlasının hedefe çarptığı andaki açısına çarpma açısı adı verilir. Bu açı en küçük dar açı olan $1 C^{\circ}$ ile $90 C^{\circ}$ arasında değişebilmektedir. Çarpma açısı kan lekesi analizine matematik biliminin bir katkısı ile hesaplanabilmektedir. Buna ek olarak kan damlasının hedefe doğru izlediği yol ve hedefe çarpma sırasındaki yönünün gösterilmesi de kan lekesi model analizi ile sağlanır. Kan damlasının hedefe çarpması sırasında oluşan kuyruk damlanın seyir yönünü gösteren belirteçtir. Kan lekelerinin çarpma açıları dikkate alınarak geri gelinmesi ile birleşme noktasına gelinir. Birleşme noktası kan damlalarının geometrik olarak birbirine yaklaştıkları noktadır ve lekenin orijini olarak tanımlanır, olayın gerçekleştiği noktadır.

Kan lekelerinin şekilleri incelenerek oluşum hızları belirlenebilir, bu sayede de olayın nasıl bir alet ile gerçekleştiği yorumları yapılabilmektedir. Düşük hızda oluşan kan lekelerinde lekeyi oluşturan enerji en fazla $150 \text{ cm} / \text{sn}$ 'dir. Bu hız yaraya sebep olan aletin hızı olup çarpma sonucu oluşan lekenin hızı değildir. Sınırlı miktardaki bu enerji kanın küçük parçalara ayrılmasını engeller. Oluşan lekelerin boyutu geniş olup 4 mm ve üzeri çaptadırlar. Yer çekimi etkisi ile oluşan kan damlaları da düşük hızdaki kan lekelerindendir. Orta hızda oluşan kan lekelerinde lekenin oluşması için gereken enerji 150 ile $750 \text{ cm} / \text{sn}$ arasındadır. Oluşan lekelerin büyük bir çoğunluğunun çapı ise 1 ile 4 mm arasında değişmektedir ve model içerisinde daha büyük ya da daha küçük damlalara rastlanabilir. Yüksek hızda oluşan kan lekeleri 1 mm ya da daha küçük çaplı lekelerden

oluşur. Bu tür lekelerin oluşması için 3000 cm /sn veya daha yüksek enerjiye gereksinim vardır. Sıklıkla ateşli silah yaralanması ya da patlamalar sonrasında oluşurlar. Tipik olarak sprey boyalar ile boyanmış gibi bir görünüm oluşmaktadır.

Kan lekeleri olayların aydınlatılmasında çok önemli delillerdir. Olay yerindeki maddenin kan olduğunu anladıktan sonra kan model analizi yaparken ve oradaki kandan analiz yapılması için örnek alınırken kontaminasyon riskine karşı önlem alınmalı, kan uygun şartlarda alınıp paketlenmeli ve en kısa zamanda kriminal laboratuvarlarına ulaştırılmalıdır. Bu aşamalarda kanda meydana gelebilecek en ufak bir degradasyonun DNA parmakizi analizinin yapılmasına engel olabileceği unutulmamalıdır.

2.5.2. Silinmiş Kan Lekeleri

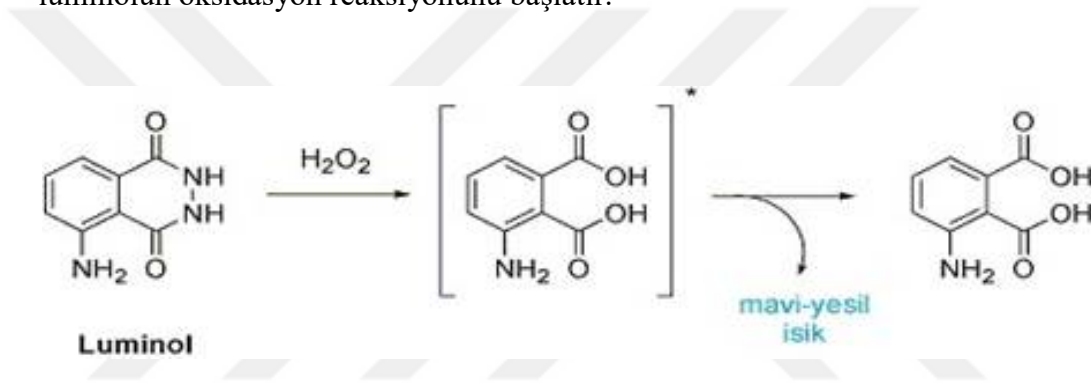
Kan izi olay yerinde en sık rastlanan biyolojik delildir. Yapılan DNA analizi sonucu %100 kesinlikle olay yerinden elde edilen kanın yapılan mukayeseler sonucunda kime ait olduğunu tespit etmek mümkündür. Bunu bilen failer olay yerinde delil bırakmamak için varsa ilk olarak kan lekelerini temizlerler. Ani gelişen olaylarda panik halindeki failer hızlı bir şekilde su yardımı ile parke, koltuk, duvar v.b. gibi yerlerden kanı silerek tüm kan izlerini yok ettiklerini düşünürler. Planlı yapılan cinayetlerde ise fail konu hakkında ön araştırma yapıp kan lekesinden tamamen kurtulabileceğini düşündüğü çeşitli kimyasallar ile kan izlerini silmektedir. Kendi kıyafetlerine veya aracına bulaşan ve kuruyan kan izlerinden de kurtulmanın yolunu bildiğini düşünen failer lekeye bazı kimyasallar uygulayıp lekenin çıktığını ve olayla olan tüm bağlantılarından kurtulduklarını düşünmektedirler.

Olay yerinde en önemli bulgulardan biri gözle görülmeyen ama aslında ortamdaki en önemli DNA kaynağı olan silinmiş kanlardır. Cinayet veya yaralama, yaralanma olaylarında meydana gelen kan lekeleri delilleri karartmak için silinir ve ilk incelemede olay yeri ekibi tarafından görünmesi engellenir. Fakat bu delilleri yok ettiğini düşünen şahısların bilmedikleri konu şudur ki olay yerindeki kanı ne kadar da silseler luminol adlı kimyasal olay yeri ekibi tarafından şüpheli bölgeye spreylendiğinde silinmiş kanlardan kalan eser miktardaki kanda bulunan demirle tepkimeye girerek ışımaya

vermektedir. Bu şekilde kan olan bölge tespit edilip oradan svap çubuğuyla alınan örnekler ile özel kitler kullanarak DNA analizi yapmak mümkündür.

2.6. Luminol

Luminol ilk kez 1902 yılında Almanya'da sentezlenmiştir. Teknik adı 3-aminofitalhidrazit olan bu molekül, Luminol adını 1920'li yılların sonunda almıştır. Luminolün ($C_8H_7O_3N_3$) en yaygın uygulama alanı, görünmesi oldukça zor olan veya temizlenme girişiminde bulunulmuş fakat hala eser miktarda ortamda bulunan kanın belirlenmesidir. Ortamda kan örneği varsa Fe (demir) atomu katalizör görevi yaparak luminolün oksidasyon reaksiyonunu başlatır.



Şekil 2.11. Luminol'un çalışma prensibi (Anonim-4 2008).

Luminol ile kan izinin belirlenmesi kimyasal mekanizması ise şu şekildedir: Bir molekül ya da iyondaki uyarılmış elektron veya elektronlar temel hale dönerken enerjilerini yayarlar ve bu enerji renk olarak görünebilir. Luminol hidrojen peroksit gibi yükseltgen (tepkime esnasında elektron alan tanecik) bir molekülün ve katalizörün (tepkimeyi hızlandıran tanecik) bulunduğu bazik bir ortamda mavimsi renkte ışık saçar. Bu tepkimeyi çeşitli metal iyonları katalizör olarak hızlandırabilir. Temel olarak hidrojen peroksit ile Luminol karışımı kendi kendine tepkimeye girmemekte bu nedenle de bir metal katalizörüne ihtiyaç duymaktadır. Kırmızı kan hücrelerimizde bulunan hemoglobindeki demir de bu etkiyi gösterir. Luminol maddesi, hidrojen peroksit ile birlikte kan olduğu tahmin edilen bölgeye sıkılır ve eğer kan kalıntıları varsa, kandaki hemoglobinin Fe²⁺ iyonları, Luminol'ün hidrojen peroksit ile yükseltgenmesi tepkimesini katalizleyip, Luminol'ün aminofitalata yükseltgenmesini sağlamaktadır.

Luminol'ün hidrojen peroksit ile tepkimesi sonucu oluşan aminofitalat uyarılmış (elektronlarından bir veya daha fazlası normalde bulunduğu enerji seviyesinden daha yüksek enerji seviyesinde olan tanecik) haldedir. Aminofitalattaki uyarılmış elektronlar temel hale dönerken fazla enerjilerini ışık olarak saçar (Şekil 2.11.). Bu ışık karanlık ortamda mavimsi renkte görünür ve bu da ortamdaki kan silinmiş olduğu için gözle görülmesi mümkün olmasa bile oluşan tepkime sonucu kanın varlığını ispat etmeye yardımcı olmaktadır. Kemilüminesans olarak bildiğimiz bu tepkime adli incelemelerde oldukça işe yaramaktadır.



Şekil 2.12. Luminol Uygulanmış Olay Yeri Örnekleri

Luminol uygulanmış taze kan örnekleri eski kan örneklerine kıyasla daha zayıf luminesans gösterir. Kuru ve yapısı bozulmuş kanlar da taze kana göre daha güçlü kemilüminesans reaksiyon göstermektedir. Ancak bunun da unutulmaması gerekir ki luminol sadece kana özgül bir kimyasal değildir ve bazı enzimler, okside edici ajanlar ve metaller ile de pozitif tepkime verebilir. Tecrübeli bir olay yeri araştırma uzmanı başka bir maddenin sebep olduğu ışımayı, kanın vermiş olduğu tepkimeden luminesans

rengine, luminesansın parlaklık derecesine ve ne kadar sürdüğüne dikkat ederek ayırt edebilir. (Karakuş ve ark. 2013)

2.7. Sitotoksitate Testleri

Sitotoksik maddeler, hücreye toksik şekilde etki edip hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran maddelerdir. Sitotoksitate araştırılmalarında kullanılan yöntemlerin başında klonojenik test , XTT, M30, M65 ve oksidatif hasarların belirlenmesine olanak sağlayan ROS testleri gelmektedir.

2.7.1. Klonojenik Test

Klonojenik test tek bir hücrenin in-vitro şartlarda hayatta kalıp üreme ve protein sentezleyebilme kabiliyetlerini koruyarak koloni oluşturabilmesine dayanmaktadır. Bu şekilde üreyen hücrelere klonojenik hücreler denilmektedir (Fabre ve ark. 2011).

Klonojenik test yönteminde en az 50 hücrenin bir arada olması bir koloni olarak kabul edilir, 50'den az hücre varsa ölü olarak kabul edilir ve değerlendirmeye alınmaz (Franken ve ark. 2006).

Radyasyonun hücreler üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde kullanılmaya başlanan klonojenik test, günümüzde daha çok klinik uygulamalardaki çeşitli ajanların sitotoksik etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır (Munshi ve ark. 2005).

Hücrelere sitotoksik etkisi araştırılmak istenen ajan ile belirlenen sürede muamele edildikten sonra, belli sayıki hücreler petrilere ekilerek inkübasyona bırakılır. Yaklaşık 10-14 gün sonunda petrilere oluşan koloniler fikse edilerek kristal viyole boyası ile boyanır.

Oluşan koloniler sayılarak % canlılık değerleri hesaplanır ve ajanın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi yorumlanır.

2.8. Genotoksisite Testleri

Genotoksik kelimesi DNA'ya zarar vererek kansere neden olabilecek genetik hasarlara yol açabilen fiziksel ve kimyasal etmenleri tanımlamak için kullanılır. Genotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda mikronükleus, komet ve γ -H2AX testleri sıklıkla kullanılmaktadır.

2.8.1. Komet Testi

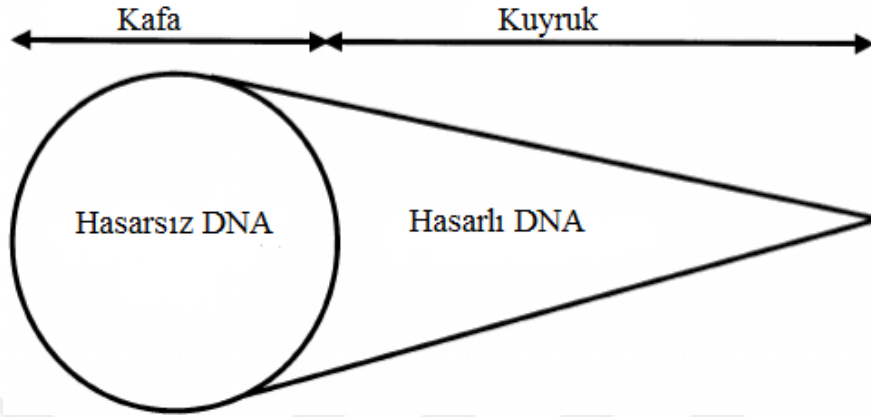
Tek hücre jel elektroforezi (SCG veya SCGE) olarak da bilinen Komet Testi basit, hızlı ve oldukça duyarlı bir yöntemdir. Farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitleri için uygulanabilmesinin yanısıra radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir.

Spesifik hücrelerde DNA hasarı İlk olarak 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından belirlenmiştir (Rydberg ve ark 1978). Daha sonra 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen Komet tekniği, nötral pH'daki lizis şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmektedir.

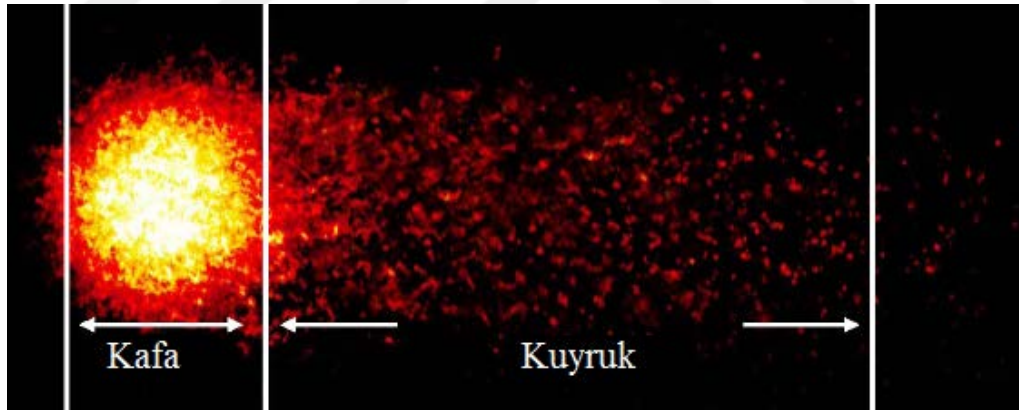
1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından protokolde bir takım değişiklikler yapılarak yöntem alkali (pH=13) koşullarında uygulanmıştır. Komet testi alkali koşullar altında uygulandığında DNA iplikleri birbirinden ayrılmakta ve tek iplik hasarların belirlenmesine olanak sağlamaktadır. (Pitarque ve ark. 1999; Çavaş ve Könen 2008). Günümüzde uygulanan "Comet Assay" Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan, tek ve çift zincir kırıkların tamamının tanımlanmasına olanak sağlayan yöntemdir (Singh ve ark. 1988).

Mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içine gömülen hücreler, zarların parçalanıp çekirdekte bulunan süperkoil DNA'nın serbestleşmesi için lizis işlemine tabi tutulur. Alkali ortamda süperkoil yapının gevşeyerek açılması ve kırıkların ortaya çıkması sağlandıktan sonra uygulanan elektroforezde kırılmış DNA zincirleri anoda doğru göçerek bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur (Green ve ark. 1996; Collins 2004).

DNA göçünün miktarı preparatların etidyum bromür ile boyanmasıyla oluşan floresansın yoğunluğunun floresans mikroskobu ile ölçülmesi sonucu belirlenir.



Şekil 2.13. Komet Testi Sonucunun Şematik Gösterimi (<https://www.researchgate.net/figure/12840158>).



Şekil 2.14. Komet Testi Sonucu Fragmentlerine Ayrılmış Hücrenin Kafa Ve Kuyruk Bölümleri (http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de/en/general_information/).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada olay yeri ekibinin suç mahalinde silinmiş kan izlerini tespit etmek amacıyla kullandığı Luminol'un BEAS-2B insan bronş epitel hücre hattında klonojenik testi ile sitotoksik etkileri gösterilmiştir. Luminol'un BEAS-2B hücre hattındaki genotoksik etkileri ise komet testi ile değerlendirilmiştir.

3.1. Kullanılan Ekipmanlar, Sarf Malzemeler

Tez deneyleri Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan hücre kültürü ve genetik toksikoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1'de, sarf malzemelerin adları, markaları ve katalog numaraları ise Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan ekipman

Ekipman	Marka/Model
Etüv	BINDER – CB 150
Soğutmalı Santrifüj	SIGMA – 2-16PK
Laminar flow	BINDER – CB 150
Hassas terazi	SHIMADZU – AUW220D
Kaba Terazi	RADWAG – WTB2000
Pastör fırını	Elektro.mag- M3025P
Inverted mikroskobu	SOIF
Flöresans mikroskobu	NIKON – ECLIPSE 80i
Işık mikroskobu	NIKON – ECLIPSE E100
Komet yazılımı	Kameram 21
Elektroforez güç kaynağı	PeqLab- Reqpover 300
Elektroforez tankı	Cleaver Scientific
Azot tankı	INT. CRYOGENICS – IC 20R
Ph metre	HANNA – HI 221
+4 buz dolabı	Regal

-20 derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
-80 derin dondurucu	ELCOLD
Canlı hücre sayım cihazı ve yazılımı	INNOVATIS – CEDEX XS
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	MTOPS – MS300HS

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Firma/ Katalog No
Serolojik pipet	COSTAR
Serolojik pipet tabancası	BIOHIT/ Midi Plus
Steril 15 mL lik tüpler	FALCON
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	CORNING
Steril petripler	FALKON
Mikropipet	
Canlı hücre sayım cihaz lamı	ROCHE – CEDEX SMART SLIDE
RPMI-1640 (500 mL)	LONZA/ BE12-115 F
Penisilin – Streptomisin	PANBIOTECH P06-07100
L-Glutamin (100 mL)	SIGMA/ G7513
Fetal Bovine Serum	PANBIOTECH/ P30-1985
Sodyum piruvat (100 mL)	PANBIOTECH
% 0,25 Tripsin-EDTA	GIBCO 1304898
DPBS	PANBIOTECH P04-36500
Etil alkol	SIGMA 32221
Metanol	MERCK 1060082500
NaCl	MERCK K 45393104 410
NaOH	SIGMA S8045
Triton X-100	SIGMA T8787
Lowmelting Agaroz	SIGMA A9539
Normal Agaroz	MERCK K33719436
DMSO	MERCK K40744143

Kristal viyole	MERCK 1159400100
Na ₂ EDTA	SIGMA E5134-500G
Tris	MERCK K40452787001
Triton-X-100	GERBU
Etidyum Bromür (EtBr)	SIGMA

3.2. Kullanılacak Hücre Hatları

Tez çalışmasında BEAS-2B sağlıklı insan bronşiyal epitel hücre hattı kullanılmıştır.

3.2.1. Bu hücre hatlarında Kullanılacak Hücre Kültürü Şartları

Hücre kültürü havalandırılmalı T75 flasklar içinde 37 °C ve %5 CO₂ ortama sahip inkübatörde yapılmıştır. Hücreler rutin olarak 3 günde bir beslenmiş ve % 85 doluluğa ulaştıklarında pasajlanmıştır. Dozlamalar havalandırılmalı T25 flasklar içinde kültüre alınan hücre setlerine uygulanmıştır. Klonojenik testi uygulanan hücreler steril petrilere inkübatörde büyümeye bırakılmıştır. Flasklara ve petrilere konulacak besiyeri: 15 mL fetal kalf serum + 2 mL L-glutamine, 50 µg/mL penisilin ve 50 µg/mL streptomisin RPMI-1640 Mediumu ile 100 mL'ye tamamlanarak steril Laminar Flow'da hazırlanmıştır.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanma Prosedürü

BEAS-2B hücrelerini pasajlamak için 15 mL steril tüpler, steril PBS çözeltisi, steril serolojik ve pastör pipetleri, Tripsin-EDTA çözeltisi, T-75 ve T-25 flasklar ile RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır.

Yeterli hücre miktarına ulaşan flasklardaki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır. Flasklardaki hücreler PBS ile yıkandıktan sonra PBS aspire edilmiştir. Flasklara uygun miktarlarda tripsin eklenerek hücrelerin zeminden ayrılması için birkaç dakika beklenip, gerektiğinde hafifçe flask dibine vurularak tüm hücrelerin kalkması sağlanmıştır ve inverted mikroskop ile hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir. Tripsin

reaksiyonunu durdurmak için kullanılan tripsin ile aynı miktarda besiyeri flasklara eklenmiştir. Flastaki hücre süspansiyonu steril serolojik pipet ile 15'lik steril tüpe aktarılıp 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Hücre pelletinin üzerinde 100 mL supernatant kalacak şekilde fazlası aspire edilmiştir. Pellet çözüldükten sonra toplam hücre sayısı belirlenir ve içinde besiyeri bulunan yeni flaska hesaplanan miktarda hücre eklenerek flask 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.3. Flasklara eklenmesi gereken kimyasallar ve miktarları

FLASKLAR	(D)PBS	TRİPSİN	BESİYERİ
T-12,5	1-2 mL	1 mL	2,5 mL
T-25	2-3 mL	2-3 mL	5 mL
T-75	5-6 mL	4-5 mL	10 mL

3.3. Test edilen Kimyasal

Bu çalışmada Tri-Tech Forensics markalı Luminol Blood Detection Reagent Spray Kiti kullanılmıştır. Olay yeri ekibi kit içindeki katı maddeyi sıvının içine karıştırdıktan sonra spreyleme başlığını takarak ürünü kullanıma hazır hale getirmektedir.



Şekil 3.1. Luminol Blood Detection Reagent Spray Kiti, Tri-Tech Forensics (<http://tritechforensics.com/store/product/luminol-blood-detection-reagent-spray/>).

Çalışmadaki deneylerde kullanılacak miktar belirlendikten sonra çözeltiler steril 15'lik tüplerde hazırlanıp hücre kültürlerine uygulanmıştır.

Uygun miktarı belirlemek için; spreylemeye hazır hale getirilmiş bir şişedeki bir fista çıkan miktar 200 µl olarak bulunmuştur. Çözeltinin konsantrasyonu 1471,46 µg olduğu için buradan yola çıkarak mL'de 1471,46 µg madde olmasına karar verilmiştir. Bu da yaklaşık olarak 8448 µM'lık doza eşittir. 0,054 g katı madde 6 mL sıvı madde içinde çözülüp luminol çözeltisi hazırlanmıştır. Flasklara dozlama yapacak miktarlar seyreltme oranları hesaplanarak belirlenmiştir. 16896 µM ile başlanan ön denemelerde dozun çok yüksek toksisiteye sahip olduğu görülmüş yapılan tekrarlar sonucu Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5.'te uygulanan dozlar belirlenmiştir.

3.4. Klonojenik Test

BEAS-2B hücreleri T-75 flasklarda büyütülmüş ve yeterli doluluğa ulaştığında pasajlanarak T-25 flasklara set kurulmuştur. Bu setlerdeki hücreler %80 doluluğa ulaştığında belirlenen konsantrasyondaki Luminol çözeltisi ile 37 °C ve %5 CO₂ ortama sahip inkübatörde 24 saat muamele edilmişlerdir. Pozitif kontrol olarak H₂O₂ çözeltisi (%35'lik ana stok çözeltisinden 6,318 µl H₂O₂ üzerine 4993,682 µl saf su eklenerek 5 mL'lik yeni stok çözeltisi hazırlanmıştır.), solvent kontrol olarak da hazırlanan luminol çözeltisindeki çözücü madde kullanılmıştır. Süre sonunda pasajlama prosedürüne uygun bir şekilde hücreler pasajlanıp hücre sayım cihazı ile canlı hücre miktarları belirlenmiştir.

50 µl hücre üzerine 50 µl tripan mavisi eklenmiştir. 100 µl'lik karışımdan 10 µl çekilerek cedex lamına yayılıp hücre sayımı bu şekilde yapılmıştır. Cihazın ölçtüğü toplam hücre miktarı, % canlılık ve canlı hücre oranlarına göre petrilere ekilecek hücre miktarları hesaplanmıştır. 60 mm'lik petrilere her petride 500 canlı hücre olarak şekilde 3 tekrarlı ekim yapıldıktan sonra petrilere 37°C ve %5 CO₂ ortama sahip inkübatöre kaldırılmıştır.

İnverted mikroskop ile kontrol edilen petrilerdeki koloniler belli büyüklüğe geldiğinde petriler kristal viyole boyası ile boyanmıştır. Bir hücre topluluğunun koloni sayılabilmesi için en az 50 hücrenin yanyana bulunması gerekmektedir. Kristal viyole boyasını hazırlamak için toz halindeki kristal viyole boyasından 0.5 g tartılarak üzerine 100 mL metanol eklenmektedir. Petrilerdeki besiyeri uzaklaştırılıp, petriler PBS ile yıkanmıştır, etanolle fikse edildikten sonra 5 dk kristal viyole boyası ile boyanmıştır.

Çizelge 3.4. Klonojenik testinde kullanılan dozlar

Dozlar

1056 µM	528 µM	264 µM	132 µM
66 µM	33 µM	16,5 µM	

Her bir petrideki 50 hücre ve üzerinde hücre bulunduran koloniler sayılarak sonuçlar tablo haline getirilmiştir.

Aşağıda belirtilen formül ile yüzde yaşayabilirlik oranı (sitotoksosite) hesaplanmıştır.

$$\text{Yaşayabilirlik (sitotoksosite)} = \frac{\text{Petri başıma düşen ortalama koloni sayısı}}{\text{Kontrol petrisindeki ortalama koloni sayısı}} \times 100$$

3.5. Komet Testi

Bu çalışmada T-25 flasklarda yeterli doluluğa ulaşan BEAS-2B hücrelerine belirlenen konsantrasyondaki Luminol çözeltisi ile muamele edilmiş sonrasında 37 °C ve %5 CO₂ ortama sahip inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak H₂O₂ çözeltisi (%35'lik ana stok çözeltisinden 6,318 µl H₂O₂ üzerine 4993,682 µl saf su eklenerek 5 mL'lik yeni stok çözeltisi hazırlanmıştır.), solvent kontrol olarak da hazırlanan luminol çözeltisindeki çözücü madde kullanılmıştır. 24 saatin sonunda hücreler pasajlanıp ve agarozla kaplı lamlara hücre + LMA süspansiyonu yayılmıştır.

Lamların agaroz jel ile kaplanması için 1 g normal melting agaroz 100 mL distile suda çözülerek %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Mikroskop lamları rodajlı kısımlarının yarısına kadar, kendileri için hazırlanan % 1'lik agaroz jel içine daldırılıp bir süre jelde bekletilmiştir. Sonra çıkarılıp altları temizlenip kurumaya bırakılmıştır. (Lamların deneyden 1 gün önce hazırlanması pratiklik sağlamaktadır.)

Pasajdan sonra elde edilen pellet çözülüp hücreler kullanıma hazır hale getirilmiştir. Hücreleri jel içine gömmek için, düşük erime noktası olan agaroz (LMA) kullanılarak jel hazırlanmıştır. Jeli hazırlamak için 0,065 gr LMA, 10 mL distile su içinde ısıtılarak çözülmüştür. Eppendorf tüplere 250 şer µL LMA aktarılmıştır ve bu eppendorf tüpler 37 °C de bekleyen sıcak su banyosuna yerleştirilmiştir. Tüpteki hücrelerden 100 µl çekilip 250 µl LMA bulunan eppendorflara aktarılmıştır. LMA ve hücre karışımı mikropipet yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Jel ve hücre karışımından 50 µl alınarak agaroz kaplı lam üzerine yayılmıştır ve üzeri lamelle kapatılıp +4°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda lamların üzerindeki lameller kaldırılıp, lamlar alüminyum folyo ile kaplanmış şalelere dizilmiştir. Şalelerin içine lizis tamponu eklenip lamlar şalelerin içinde +4°C'de 1 gece bekletilmiştir.

Lizis tamponu hazırlamak için 29,22 g NaCl, 7,44 g Na₂EDTA ve 0,24 g Tris 178 mL distile suda çözülüp NaOH ile pH=10'a ayarlanmıştır. Deneyden 30 dakika önce bu çözeltiye 2 mL Triton x100 ve 20 mL DMSO eklenmiştir.

1 gece lizis içinde bekletilen lamlar lizis tamponundan çıkarılıp Komet tankına dizilmiştir. DNA sarmallarının açılması için Komet tankı yürütme tamponu ile doldurulmuş ve lamlar bu tampon içinde 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda 25 volt, 300 amperde 30 dk yürütme işlemi yapılmıştır. Yürütme sonunda lamlar içerisinde nötralizasyon solüsyonu bulunan şale içine dizilmiş ve 5 dk karanlıkta bekletilerek nötralizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda şaleden çıkarılan lamlar soğuk distile su ile yıkanmış ve kurumaya beklenmiştir. Kuruyan lamlar soğuk etanolde 5 dk fikse edilmiştir.

Yürütme tamponunun soğuk olması gerekmektedir bu yüzden deneyden 1 gün önce hazırlanıp +4°C'de bekletilmiştir. Tamponu hazırlamak için 0,56 g Na₂EDTA ve 18 g NaOH 1,5 L distile suda çözülerek pH=13'e ayarlanmıştır.

Nötralizasyon solüsyonu için ise 4,85 g Tris 100 mL distile suda çözülerek HCl ile pH=7,5'e ayarlanmıştır.

Çizelge 3.5. Komet testinde kullanılan dozlar

Dozlar

1056 µM	528 µM	264 µM	132 µM
66 µM	33 µM	16,5 µM	

Komet lamalarının boyama işlemi:

Lamların boyama işlemi Etidyum Bromür ile yapılmıştır. 20 µg/mL konsantrasyonlu EtBr boya solüsyonundan enjektör ile 0,2 mL çekilip ve lamlara damlatılmıştır. Boya damlatıldıktan sonra lamlar lamellerle kapatılıp, fazlası dikkatlice akıtılıp mikroskopik inceleme için hazır hale getirilmiştir.

Komet lamalarının mikroskopik incelemesi:

Komet yönteminde sayım ve değerlendirme safhalarında NIKON marka ECLIPSE 80i model floresan mikroskop kullanılmıştır. Boyanan lamlar floresan mikroskopta incelenerek her lamdan 100 tane hücrenin kameram 21 programı ile fotoğrafı çekilmiş ve değerlendirmesi yapılmıştır. Bu çalışmada komet yazılımı ile Komet Yoğunluğu, Kuyruk % DNA ve Olive Kuyruk Momenti verileri değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programı ile yapılmıştır. Test 2 bağımsız tekrar halinde uygulanmıştır.

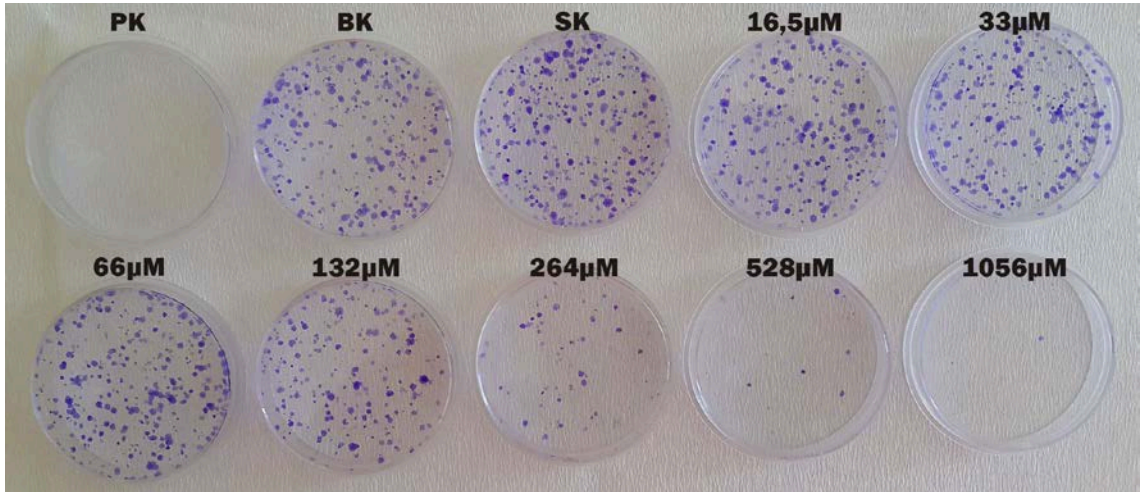
4. BULGULAR

Bu çalışmada Luminol'ün sitotoksik ve genotoksik etkileri, BEAS-2B insan akciğer epiteli üzerinde in vitro test yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Sitotoksik etkilerin analizi için Klonojenik testi, tek iplik DNA kırıklarının belirlenmesi için alkali Komet testi uygulanmıştır.

4.1. Klonojenik Test Bulguları

Çalışmada kullanılan Luminolün IC50 doz konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, BEAS-2B hücre hattı 0 μM , 16,5 μM , 33 μM , 66 μM , 132 μM , 264 μM , 528 μM ve 1056 μM konsantrasyonlarında luminol çözeltisi ile 24 saat süresince muamele edilerek klonojenik test uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak H₂O₂ kullanılmıştır. Solvent kontrol ise kullanılan hazır luminol kitindeki çözücü maddedir.

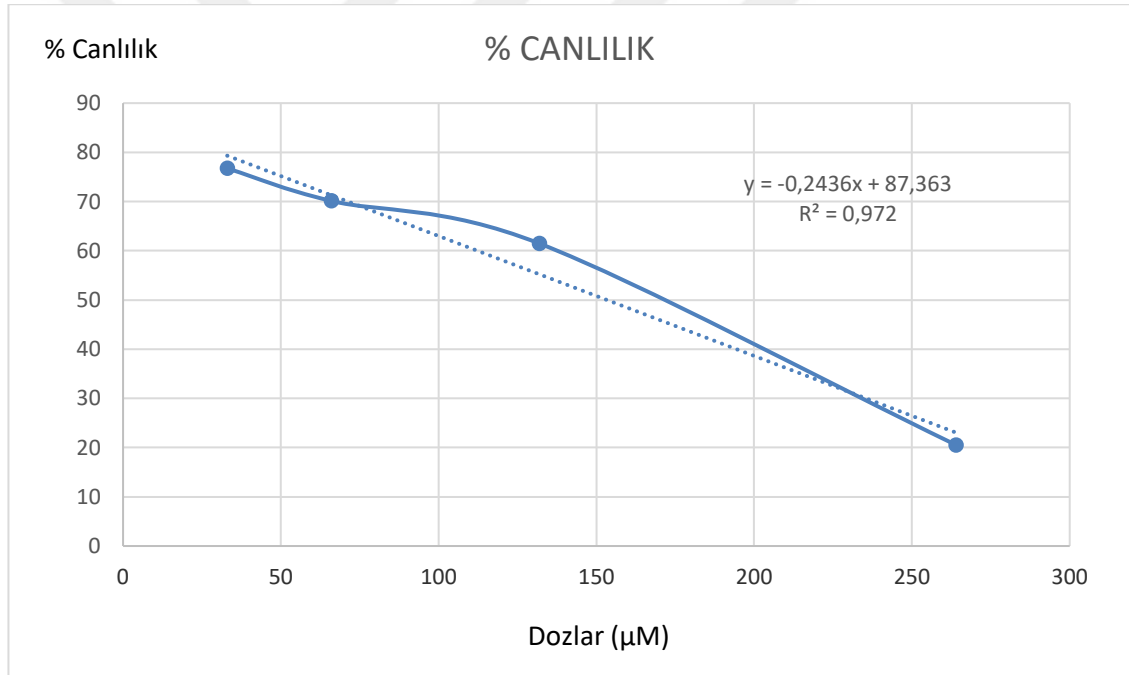
Luminolün çeşitli dozlarına maruz kalan BEAS 2B hücre hattındaki koloni oluşumları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Luminol ile 24 saat muamele edilmiş BEAS 2B hücreleri koloni oluşumları. Üst soldan itibaren Pozitif kontrol, Büyüme kontrol, Solvent kontrol, 16,5 μM , 33 μM . Alt soldan itibaren 66 μM , 132 μM , 264 μM , 528 μM , 1056 μM .

Klonojenik test sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında, her petriden en az 50 hücre içeren kolonilerin sayımı yapılmıştır. Elde edilen veriler kontrol grubu ile karşılaştırılarak test gruplarından elde edilen canlılık yüzdeleri belirlenmiştir. Ayrıca bu verilerden IC50 değeri ve R² değerleri excel programı kullanılarak hesaplanmıştır. BEAS-2B sağlıklı akciğer hücrelerinde luminol için IC50 değeri 153,38 µM, R² = 0,972 olarak bulunmuştur.

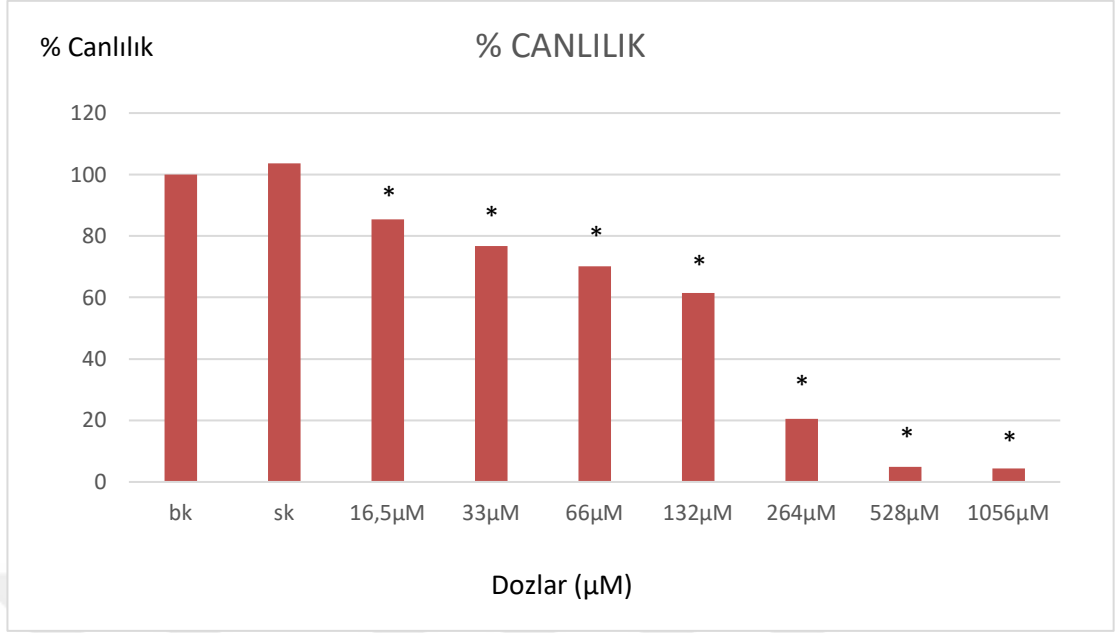
Çeşitli luminol dozlarına maruz kalan sağlıklı akciğer hücrelerine uygulanan klonojenik test sonucu elde edilen verilerden oluşturulan dağılım grafiği Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



IC50= 153,38 µM

Şekil 4.2. Klonojenik test ile luminolun etkileri belirlenen BEAS-2B hücre hatlarında %canlılık dağılım grafiği.

Klonojenik test uygulaması sonuçlarına göre test gruplarından elde edilen ortalama % canlılık oranları Şekil 4.3'te belirtilmiştir.



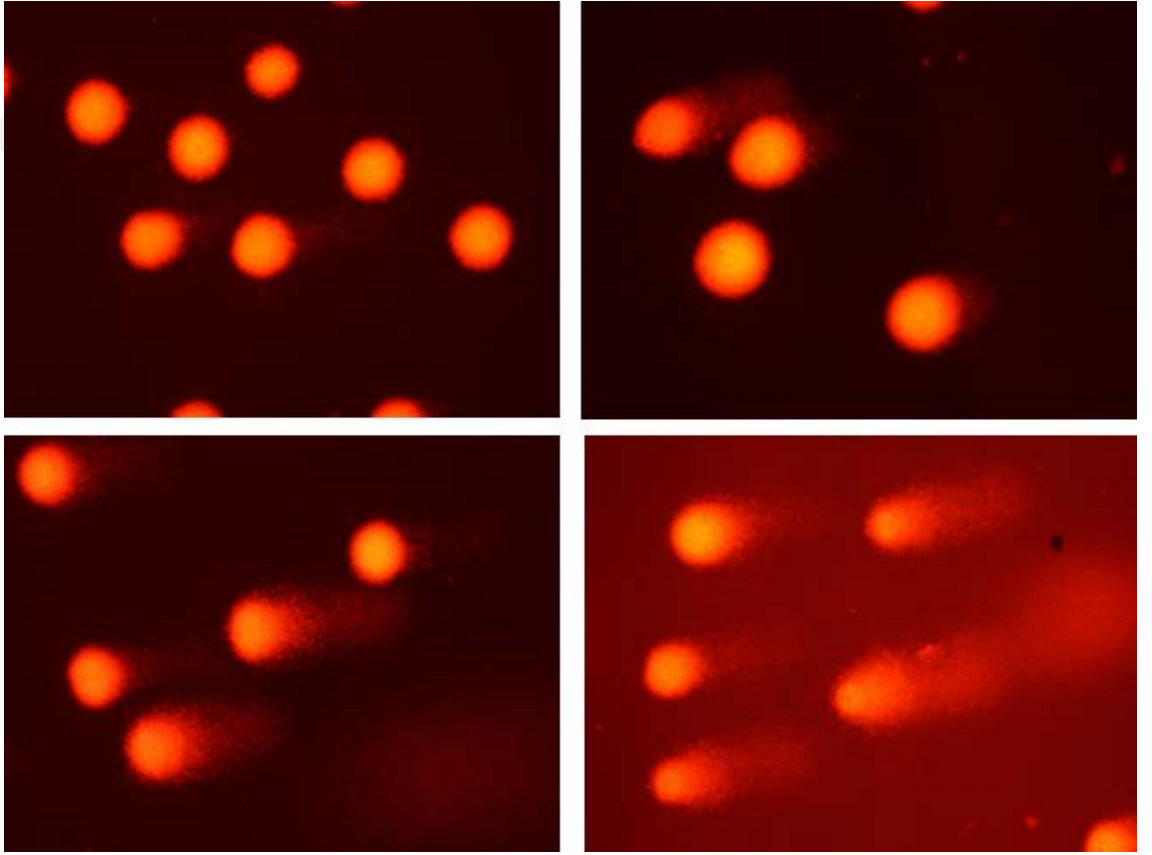
Şekil 4.3. BEAS-2B hücre hattına belirtilen dozlarda 24 saat muamele edilmesi sonucu Klonojenik Test ile elde edilen % canlılık oranları, büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır. *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$

Klonojenik testi bulgularının istatistiksel analizi SPSS programı Mann-Whitney U Testi ile yapılmıştır. Solvent kontrolün büyüme kontrol ile kıyaslanması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Ancak 16,5 µM, 33 µM, 66 µM, 132 µM, 264 µM, 528 µM ve 1056 µM dozlarının büyüme kontrol ile kıyaslanması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Uygulanan tüm dozlara kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile ikili kıyaslama yapıldığında en yüksek 2 doz olan 528 µM ve 1056 µM arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

4.2. Komet Testi Bulguları

Komet testi bulguları içerisinde Kuyruk uzunluğu (K.U.) (μm), Kuyruk %DNA (K.%DNA) ve Olive Kuyruk Momenti (OTM; Olive Tail Moment) parametreleri değerlendirilmiştir.

Komet testinde elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Komet testi preparatlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri (X20).

Komet testi sonucu elde edilen verilerin ortalama ve standart sapma değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Komet testinden elde edilen ortalama değerler. K.U.: Kuyruk uzunluğu (μm), K.%DNA: Kuyruk %DNA miktarı, OTM: Olive kuyruk momenti, SS: Standart sapma

	K.U \pm SS	K.%DNA \pm SS	OTM \pm SS
Büyüme Kontrol	6,04 \pm 2,25	3,48 \pm 1,91	0,81 \pm 0,41
Solvent Kontrol	7,71 \pm 2,07	6,13 \pm 5,93	1,36 \pm 0,55
Pozitif Kontrol	66,99 \pm 26,18	53,71 \pm 22,11	27,19 \pm 15,11
16,5 μM	17,32 \pm 10,65	10,23 \pm 6,98	3,19 \pm 3,09
33 μM	35,87 \pm 22,89	25,01 \pm 14,28	10,21 \pm 8,39
66 μM	53,21 \pm 30,56	42,55 \pm 21,44	20,81 \pm 15,76
132 μM	70,52 \pm 28,21	55,47 \pm 20,47	29,53 \pm 16,09
264 μM	86,49 \pm 25,47	59,39 \pm 17,83	36,06 \pm 14,82
528 μM	94,76 \pm 21,59	72,81 \pm 15,22	44,31 \pm 13,08
1056 μM	102,61 \pm 15,99	73,05 \pm 14,59	48,99 \pm 12,28

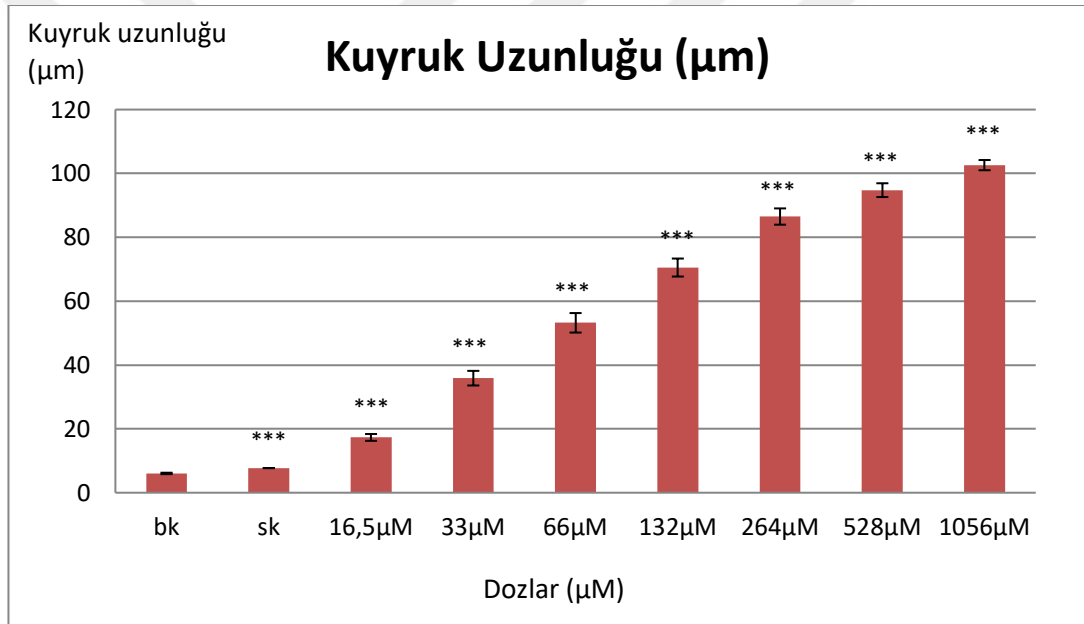
4.2.1. Kuyruk Uzunluğu Bulguları

Luminol ile BEAS-2B hücre hatlarına 0 μM , 16,5 μM , 33 μM , 66 μM , 132 μM , 264 μM , 528 μM ve 1056 μM konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk uzunluğu değerleri (μm) Şekil 4.5'te verilmiştir. K.U. değerlerinin istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kuyruk uzunluğu bakımından tüm doz grupları kendi aralarında karşılaştırılmış ve doz artışının kuyruk uzunluğu değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). Büyüme kontrol ve solvent kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,001$). En yüksek

iki doz olan 528 μM ve 1056 μM kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde 1056 μM dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değildir ($p=0.014$).

Büyüme Kontrol grubunda kuyruk uzunluğu değeri $6,04 \mu\text{m} \pm 2,25$ olarak belirlenmiştir. Solvent kontrol grubunda $7,71 \pm 2,07$, Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise $66,99 \pm 26,18$ olarak belirlenmiştir. 16,5 μM ; 33 μM ; 66 μM ; 132 μM ; 264 μM ; 528 μM ve 1056 μM uygulamalarında ise sırasıyla $17,32 \pm 10,65$; $35,87 \pm 22,89$; $53,21 \pm 30,56$; $70,52 \pm 28,21$; $86,49 \pm 25,47$; $94,76 \pm 21,59$ ve $102,61 \pm 15,99$ olarak belirlenmiştir.



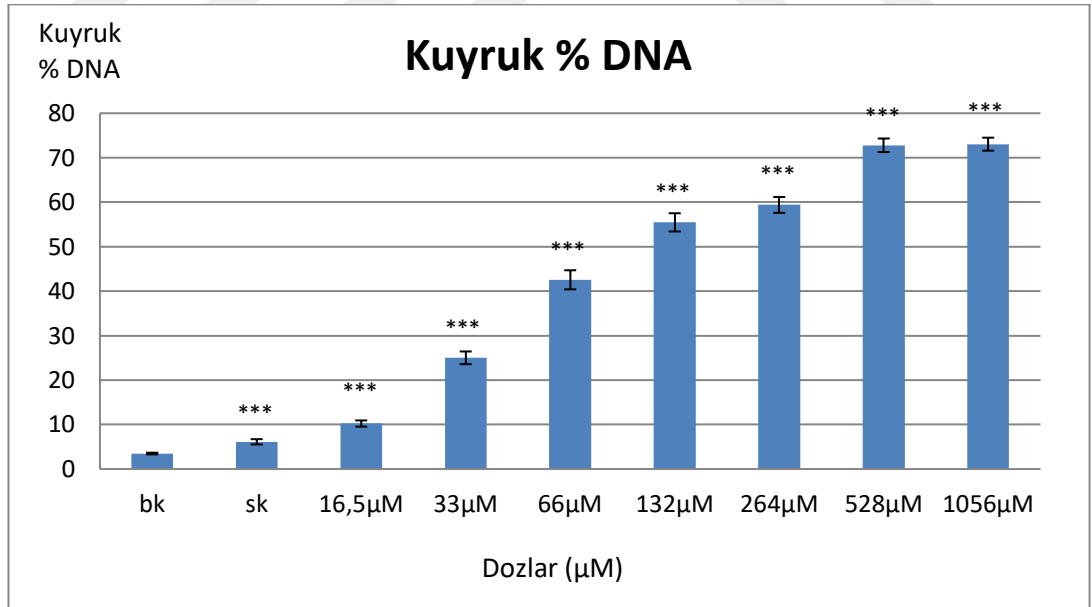
Şekil 4.5. BEAS-2B hücre hattına belirtilen dozlarda 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama Kuyruk uzunluğu değerleri, büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır. *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$

4.2.2. Kuyruk %DNA Bulguları

Luminol ile BEAS-2B hücre hatlarına 0 μM , 16,5 μM , 33 μM , 66 μM , 132 μM , 264 μM , 528 μM ve 1056 μM konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen kuyruk %DNA değerleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Kuyruk %DNA değerlerinin istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kuyruk %DNA bakımından tüm doz grupları kendi aralarında karşılaştırılmış ve doz artışının kuyruk %DNA değerini, genel olarak ele alındığında istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). Büyüme kontrol ve solvent kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,001$). 132 μM ve 264 μM dozlarının kendi aralarında test edilmesi sonucu kuyruk %DNA daki artışın anlamsız olduğu görülmüştür ($p=0.153$). En yüksek iki doz olan 528 μM ve 1056 μM da kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde 1056 μM dozunun neden olduğu artışın istatistiki olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. ($p > 0.05$).

Büyüme Kontrol grubunda %DNA değeri $3,48 \pm 1,91$ olarak belirlenmiştir. Solvent kontrol grubunda $6,13 \pm 5,93$, Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise $53,71 \pm 22,11$ olarak belirlenmiştir. 16,5 μM ; 33 μM ; 66 μM ; 132 μM ; 264 μM ; 528 μM ve 1056 μM dozlarında ise sırasıyla $10,23 \pm 6,98$; $25,01 \pm 14,28$; $42,55 \pm 21,44$; $55,47 \pm 20,47$; $59,39 \pm 17,83$; $72,81 \pm 15,22$ ve $73,05 \pm 14,59$ olarak belirlenmiştir.



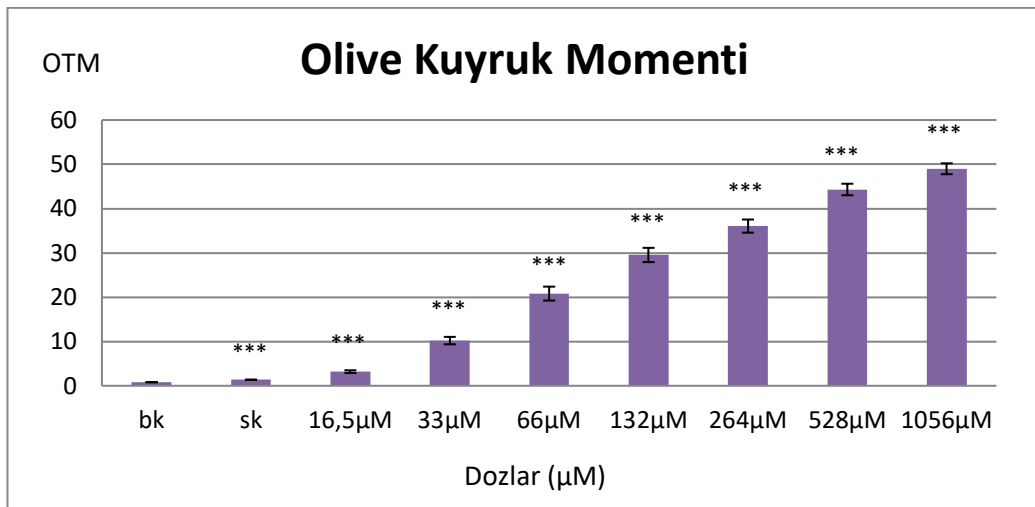
Şekil 4.6. BEAS-2B hücre hattına belirtilen dozlarda 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama Kuyruk %DNA değerleri, büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır. *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$

4.2.3. OTM (Olive Kuyruk Momenti) Bulguları

Luminol ile BEAS-2B hücre hatlarına 0 μM , 16,5 μM , 33 μM , 66 μM , 132 μM , 264 μM , 528 μM ve 1056 μM konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen OTM değerleri Şekil 4.7’de verilmiştir. OTM değerlerinin istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Olive kuyruk momenti bakımından tüm doz grupları kendi aralarında karşılaştırılmış ve doz artışının OTM değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). Büyüme kontrol ve solvent kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,001$). 528 μM ve 1056 μM da kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde 1056 μM dozunun neden olduğu OTM artışının istatistiki olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. ($p > 0,05$).

Büyüme Kontrol grubunda OTM değeri $0,81 \pm 0,41$ olarak belirlenmiştir. Solvent kontrol grubunda $1,36 \pm 0,55$, Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise $27,19 \pm 15,11$ olarak belirlenmiştir. 16,5 μM ; 33 μM ; 66 μM ; 132 μM ; 264 μM ; 528 μM ve 1056 μM dozlarında ise sırasıyla $3,19 \pm 3,09$; $10,21 \pm 8,39$; $20,81 \pm 15,76$; $29,53 \pm 16,09$; $36,06 \pm 14,82$; $44,31 \pm 13,08$ ve $48,99 \pm 12,28$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. BEAS-2B hücre hattına belirtilen dozlarda 24 saat muamele edilmesi sonucu elde edilen ortalama OTM değerleri, büyüme kontrol ile karşılaştırılmıştır. *; $p \leq 0,05$, **; $p \leq 0,01$, ***; $p \leq 0,001$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle genomda meydana gelen tüm değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılır. Genom, DNA hasarına neden olan oldukça fazla farklı etkene maruz kalmaktadır. Hücreler bütün bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap vermektedir. Küçük hasarlar çoğunlukla DNA tamir mekanizmaları ile onarılabılırken, orta derecedeki hasarların birikimi ise mutasyon ve kanser ile sonuçlanabilir. Yüksek düzeydeki hasarlar ise apoptozisi uyararak "hücre ölümüne" yol açabilir ve böylelikle organizma kendini korumuş olur.

DNA çeşitli farklı mutagenler tarafından hasara uğrayabilir. Bunun sonucunda DNA dizisi değişebilir. Mutagenler arasında, yükseltgen (oksitleyici) etmenler, alkilleyici etmenler ve morötesi ışık ve X ışınları gibi elektromanyetik ışınlar sayılabilir. DNA'da meydana gelen hasarın tipi mutagenin tipine bağlıdır. Örneğin, mor ötesi ışık timin ikilileri (timin dimerleri) oluşturarak DNA'ya hasar verir (Douki ve ark. 2003). Buna karşın, serbest radikaller veya hidrojen peroksit gibi yükseltgen etmenler baz değişimi (özellikle guanozin) ve iki iplikçikli kırılmalar gibi farklı türden hasar oluşturabilirler (Cadet ve ark. 1999). Her bir insan hücresinde günde 500 baz yükseltgeyici zarar görür (Shigenaga ve ark. 1989, Cathcart ve ark. 1984). Bu yükseltgeyici hasarlardan en zararlısı çift zincirli kırılmalardır. Onarımları çok zor olan bu hasarlar DNA dizilerinde noktasal mutasyonlara, insersiyonlara ve delesyonlara ayrıca kromozomal translokasyonlara yol açabilir (Valerie ve Povirk 2003).

Bu çalışmada olay yeri ekibinin silinmiş kanları tespit etmek için spreyleme şeklinde olay yerine uyguladıkları madde olan Luminol'un BEAS-2B insan akciğer hücreleri kullanılarak DNA'ya ne boyutta zararlar verdiği araştırılmıştır.

Luminol olarak bilinen 5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinedion, olay yeri ekibinin tek başına kullandığı bir madde değildir. Tepkimenin gerçekleşmesinde önemli role sahip başka kimyasallar da çözeltiye karıştırılmaktadır. Bu kimyasallardan ilki güçlü bir oksitleyici olan hidrojen peroksittir ve kendisi luminol ile gerçekleşen tepkimeye

doğrudan dahildir. Diğer bir ihtiyaç duyulan şart ise bazik bir çözeltilidir, ki bu sodyum hidroksit gibi bir alkali bazın eklenmesiyle sağlanabilir. Bu gereklidir çünkü nötr bir çözeltide luminol hem eksi hem artı yükün taşındığı zwitteriyon denilen bir formu benimser. Bazik bir çözeltinin içindeyse luminol, oksitleyiciler tarafından yükseltgenebilecek eksi yüklü bir moleküldür yani anyondur. Luminol çözeltisi hazırlandıktan sonra tek başına herhangi bir tepkime vermez. Tepkime gerçekleşmek için bir katalizöre ihtiyaç duyar ki kanın devreye girdiği nokta burasıdır. Kan hemoglobin denilen ve demir atomları taşıyan bir moleküle sahiptir. Bu demir atomları luminol ile hidrojen peroksit arasındaki tepkimenin katalizörlüğünü yaparlar ve tepkimenin ilerlemesine olanak sağlarlar. Tepkimenin sonucunda bir peroksit üretilir ki bu da hızlıca 3-aminoftalata yıkılır. Tepkimenin saldırdığı enerji 3-aminoftalatın elektronlarına aktarılır ve onların yüksek enerji seviyesine çıkmasını sağlar. Elektronlar daha kararlı olan düşük enerji seviyesine geçerken aradaki enerji farkını foton olarak salarlar ki bu gördüğümüz mavi kimyasal parıldamadır. Luminol kanın milyonda bir seyreltik halini dahi tespit edebilir. Kan kalıntılarındaki gözle görülmeyen demir iyonları bile bu tepkime için yeterli olmakta ve bize mavi-yeşil ışık saçarak kanın varlığını ispat etmektedir.

Luminolun kan izlerini bulmadaki hassaslığına ve serolojik analizler üzerinde herhangi bir etkisi olmamasına rağmen İngiltere ve diğer avrupa ülkelerinde luminol kullanımı yaygın olarak kabul edilmemiştir bunun sebebi de uygulamadan sonra eşya ve mekanlarda luminol kalıntılarının kalmasının sağlık açısından güvenilir olmadığı konusunda endişelerin olmasıdır (Grispino 1990; Dell Manna ve Die Meo 2000).

Luminolun üretici firmasının yayınladığı güvenlik bilgi formunda luminolun gözler, solunum sistemi ve deri için tahriş edici olabileceği belirtilmiştir, aynı zamanda solunum sistemi, sindirim sistemi ve deri emilimi yollarıyla alındığında da zararlı etkilerinin olabileceği kabul edilmektedir (Sigma 2016). Luminol için hazırlanan güvenlik bilgi formunda luminolun toksik etkileri için tam olarak araştırılmış bir veri yoktur yazmasına rağmen luminolun bir mutajen olduğu konusunda genel bir düşünce bulunmaktadır(Sigma 2016).

Literatürdeki bu eksikten dolayı planladığımız çalışmamızda olay yeri ekibinin suç mahalinde silinmiş kan izlerini tespit etmek amacıyla kullandığı Luminol'un BEAS-2B insan bronş epitel hücre hattındaki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etkilerin analizi için Klonojenik test, tek ve çift iplik DNA kırıklarının belirlenmesi için alkali Komet testi uygulanmıştır ve BEAS-2B sağlıklı insan akciğer epitel hücrelerine uygulanan 0 µM ile 1056 µM arası dozlarda doz artışına bağlı olarak hem sitotoksik hem de genotoksik hasarların arttığı gösterilmiştir.

Luminol sadece Adli bilimlere özgü bir kimyasal değildir. 1960'lı yıllarda her yaşta görülebilen kıl kaybına sebep olan *Alopecia areata* (Irie 1960) hastalığının tedavisinde kullanılmaktaydı ve kan pıhtılaşması (Irie 1960) ile yara iyileşmesini (Irie 1961) arttırıcı özellik göstermekteydi. Fakat günümüzde luminol bu hastalığın tedavisi için tıpta kullanılmamaktadır (Tice 1997).

Günümüzde luminol Biyokimya alanında, oksidasyondaki kemiluminesans özelliğinden dolayı araştırma projelerinin deneylerinde kullanılmaktadır (Bowie ve ark. 1996, Kahl ve ark. 1987).

Luminolün adli bilimlerde ilk kullanımı 1930'larda (Sprecht 1937; Proescher ve ark. 1939) çoğunlukla ABD'de olmak üzere diğer ülkelerde de başlamış ve gözle görülmeyen kanların tespit edilmesi sağlanmıştır. Avrupada alternatifleri olduğu için kullanımına çok sonraları başlanan luminol hakkında 1990'lı yılların başlarında sağlık ve güvenlik açısından kaygılar oluşmaya başlamıştır.

1990 yılında yayınlanan bir makaleye göre (Ikushima 1990) luminolun Kardeş kromatid değişimi (SCE) sıklığını arttırdığı belirtilmiş ve bunun üzerine luminolun sağlık üzerindeki etkileri hakkında endişeler başlamıştır. Hücre DNA'sı genetik toksik bir ajan tarafından zarar gördüğünde hücre bu hasarı onarmaya çalışırken SCE oranında artmaya sebep olabilir. Bu sebeple Kimyasal veya benzer maddelerin potensiyel genetik toksisitesini belirlemek için SCE oranına bakılmaktadır (Wolff 1983).

Ikushima çalışmalarında Çin hamsterının V79 hücrelerine in vitro şartlarda 0.25 mM, 0.5 mM ve 1 mM dozlarında 12 ve 24 saat luminol ile muamele etmiş ve SCE oranında artış olduğunu bildirmiştir (Ikushima 1990). Fakat bu çalışma sadece luminolun potensiyel mutajenik bir kimyasal olduğunu belirlemiştir. Rutinde sürekli luminole maruz kalan insanların lenfosit hücreleri ile ilgili bir SCE test çalışması yapılmadığı için luminolun tehlike derecesi bilinmemektedir. Sonuç olarak luminolun in-vivo şartlarda hangi dozlarında insan hücrelerine zarar verdiği tespit edilmemiştir. Ayrıca Ikushima'ya göre luminolun ortamdan uzaklaştırılmasıyla anormal durumdaki hücrelerin hızlıca normal duruma dönebildiğini düşünmektedir.

1990'ların başlarında Çin hamster hücreleri ile in-vitro şartlarda yapılan başka bir çalışmada luminolun DNA onarımını (Lee-Chen ve ark. 1994) ve rekombinasyonunu (Abramian ve ark. 1994) olumsuz yönde etkilediği konusunda bulgular elde edilmiştir. Luminol; DNA onarımı, replikasyonu ve rekombinasyonu sırasında meydana gelen kırıkların oluşmasını engelleyen polimeraz (Ikushima 1990) enziminin aktivitesini azaltmaktadır (Durkacz ve ark. 1980; Natarajan ve ark. 1981). Buna rağmen şu da görünüyor ki luminolun etkileri in-vitro şartlarda Çin hamster hücre hattında araştırılmış fakat insan lenfosit hücrelerinde bir in-vitro çalışma yapılmamıştır ve in-vivo şartlarda hangi dozun ne tür etkilere sebep olabileceğini bilinmemektedir.

Luminol dışında evlerde ve laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan kloroform (Sigma 2016), asetik asit (Sigma 2016) ve sakkarin (Wolff 1983; Wolff ve Rodin 1978) gibi kimyasalların da in-vitro deneylerde SCE oranını arttırdığı görülmüştür. Aynı zamanda bu kimyasallar DNA onarımı ve rekombinasyonunda zararlı etkilere sebep olmaktadır.

Luminol hakkında yapılmış az sayıda makale bulunmaktadır ve bunlarda luminolun sıçanlarla olan çalışmalarında LD50 (test grubunun %50'sini öldüren kimyasal doz) dozu >500 mg/kg olarak belirlenmiştir (Tice 1997). Bu çalışmada aynı zamanda dişi köpeklere uygulanan 2.5mg'lık damardan enjekte edilen tek luminol dozunun urin ve sodyum atılımını yükseltmiş ve atar damar kan basıncını düşürmüş olduğu gözlenmiştir (Irie ve Mendlowitz 1970). Fakat farelere karından enjeksiyon ile uygulanan 1.5-5 mg arasındaki dozlarda herhangi bir etki görülmemiştir (Irie 1960).

Luminolun insanlar üzerindeki toksisitesi ile açıkça bir bilgi bulunmamaktadır. 1997 yılında Integrated Laboratory Systems'in raporuna göre 1960'larda luminol için yapılan klinik incelemeler sonucunda toksik bir etkinin olmadığı raporlanmıştır. Fakat yapılan in-vitro çalışmalarda luminolun insan serum albuminlerine bağlandığı tespit edilmiştir (Buturlakin ve ark. 1975).

Çalışmalara göre in-vitro deneylerde luminolun oksidasyonu sonucu ortaya çıkan üç metabolitten biri olan 3-aminofthalik asit (Jansen ve Van den Berg 1991), in-vivo deneylerde oluşmamaktadır (Sanders ve ark. 2000). In-vivo olarak vücuda alınan luminol mide-bağırsak sisteminde hızlıca emilip metabolize olduktan sonra idrarla atılmaktadır. Sanders ve arkadaşlarına göre çok küçük bir luminol molekülü bile hemen atılır, doku ve hücrelerde luminol veya metaboliti birikme yapmamaktadır. Ayrıca deri yoluyla emilimi de oldukça azdır (Sanders ve ark. 2000). Yayınlanan çalışmalar arasında solunum yolu ile vücuda alınan luminolun toksik etkileri üzerine yapılmış bir çalışma olmadığı için Sanders ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan yola çıkarak solunum ile alınan luminolun aynı sindirim sistemindeki gibi vücut tarafından metabolize edilip idrarla atıldığı düşünülmektedir.

Uludağ Üniversitesi Genetik Toksikoloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda Beas 2B insan bronşiyal epitel hücreleri ile in-vitro yapılan çalışmamızda ise luminolun akciğer hücrelerine karşı oldukça toksik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Toksikite değerleri klonojenik test ve komet testi yöntemleri ile belirlenmiştir.

Klonojenik test için hücreler 0 μM , 16,5 μM , 33 μM , 66 μM , 132 μM , 264 μM , 528 μM ve 1056 μM konsantrasyonlarında luminol çözeltisi ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. Pozitif kontrol olarak H₂O₂ kullanılmıştır. Solvent kontrol ise kullanılan hazır luminol kitindeki çözücü maddedir.

Klonojenik test sonucu sayılan kolonilerden elde edilen veriler kontrol grubu ile karşılaştırılarak test gruplarından elde edilen canlılık yüzdeleri belirlenmiştir. BEAS-

2B sağlıklı akciğer hücrelerinde luminol için IC50 değeri 153,38 μM , $R^2 = 0,972$ olarak bulunmuştur.

Solvent kontrolün büyüme kontrol ile kıyaslanması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Ancak 16,5 μM , 33 μM , 66 μM , 132 μM , 264 μM , 528 μM ve 1056 μM dozlarının büyüme kontrol ile kıyaslanması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Bu sonuçlardan yola çıkarak olay yeri ekibinin kullandığı hazır kit ile yapılan hücre dozlamalarımıza göre kitin hazırlanmasında kullanılan çözücü maddenin hücreye herhangi bir şekilde sitotoksik etki yapmadığı gözlenmiştir. Artan katlar şeklinde yapılan dozlama sonuçlarına göre ise doz miktarının artması ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sitotoksik etkinin de arttığı belirlenmiştir.

Uygulanan tüm dozlara kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile ikili kıyaslama yapıldığında en yüksek 2 doz olan 528 μM ve 1056 μM arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). 1056 μM 'lık doz yapılan ön denemeler sonucu hücrelerin koloni oluşturabildikleri en yüksek doz olarak tespit edilmiş ve onun üzerindeki dozlarda herhangi bir koloni gözlenmemiştir.

Komet testi bulguları içerisinde Kuyruk uzunluğu (K.U.) (μm), Kuyruk %DNA (K.%DNA) ve Olive Kuyruk Momenti (OTM; Olive Tail Moment) parametreleri değerlendirilmiştir. Komet testi için Luminol ile BEAS-2B hücre hatlarına 0 μM , 16,5 μM , 33 μM , 66 μM , 132 μM , 264 μM , 528 μM ve 1056 μM konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilmiştir.

K.U., Kuyruk %DNA ve OTM değerlerinin istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kuyruk uzunluğu bakımından tüm doz grupları kendi aralarında karşılaştırılmış ve doz artışının kuyruk uzunluğu değerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). Büyüme kontrol ve solvent kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,001$). Büyüme

kontrol ve solvent kontrolün arasında Klonojenik test sonuçlarına göre herhangi bir sitotoksik etki farkı gözlenmezken, genotoksik olarak solvent kontrolün de istatistiksel açıdan anlamlı bir zarar verdiği tespit edilmiştir.

En yüksek iki doz olan 528 μM ve 1056 μM kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde 1056 μM dozunun neden olduğu artış istatistiki olarak anlamlı değildir ($p=0.014$). Klonojenik test ön denemelerinde bulunan en yüksek doz olan 1056 μM dozu Komet testi için de en yüksek doz kabul edilmiş ve daha yüksek konsantrasyondaki dozlar için bir Komet denemesi yapılmamıştır.

Büyüme Kontrol grubunda kuyruk uzunluğu değeri 6,04 $\mu\text{m} \pm 2,25$ olarak belirlenmiştir. Solvent kontrol grubunda 7,71 $\pm 2,07$, Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise 66,99 $\pm 26,18$ olarak belirlenmiştir. 16,5 μM ; 33 μM ; 66 μM ; 132 μM ; 264 μM ; 528 μM ve 1056 μM uygulamalarında ise sırasıyla 17,32 $\pm 10,65$; 35,87 $\pm 22,89$; 53,21 $\pm 30,56$; 70,52 $\pm 28,21$; 86,49 $\pm 25,47$; 94,76 $\pm 21,59$ ve 102,61 $\pm 15,99$ olarak belirlenmiştir.

Kuyruk %DNA bakımından tüm doz grupları kendi aralarında karşılaştırılmış ve doz artışının kuyruk %DNA değerini, genel olarak ele alındığında istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). Büyüme kontrol ve solvent kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,001$).

132 μM ve 264 μM dozlarının kendi aralarında test edilmesi sonucu kuyruk %DNA daki artışın anlamsız olduğu görülmüştür ($p=0.153$). En yüksek iki doz olan 528 μM ve 1056 μM da kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde 1056 μM dozunun neden olduğu artışın istatistiki olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. ($p > 0.05$).

Büyüme Kontrol grubunda %DNA değeri 3,48 $\pm 1,91$ olarak belirlenmiştir. Solvent kontrol grubunda 6,13 $\pm 5,93$, Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise 53,71 $\pm 22,11$ olarak belirlenmiştir. 16,5 μM ; 33 μM ; 66 μM ; 132 μM ; 264 μM ; 528 μM ve 1056 μM

dozlarında ise sırasıyla $10,23 \pm 6,98$; $25,01 \pm 14,28$; $42,55 \pm 21,44$; $55,47 \pm 20,47$; $59,39 \pm 17,83$; $72,81 \pm 15,22$ ve $73,05 \pm 14,59$ olarak belirlenmiştir.

Olive kuyruk momenti bakımından tüm doz grupları kendi aralarında karşılaştırılmış ve doz artışının OTM değerini istatistiki olarak anlamlı düzeyde yükselttiği belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). Büyüme kontrol ve solvent kontrol da kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p \leq 0,001$). 528 μM ve 1056 μM da kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile analiz edildiğinde 1056 μM dozunun neden olduğu OTM artışının istatistiki olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. ($p > 0,05$).

Büyüme Kontrol grubunda OTM değeri $0,81 \pm 0,41$ olarak belirlenmiştir. Solvent kontrol grubunda $1,36 \pm 0,55$, Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise $27,19 \pm 15,11$ olarak belirlenmiştir. 16,5 μM ; 33 μM ; 66 μM ; 132 μM ; 264 μM ; 528 μM ve 1056 μM dozlarında ise sırasıyla $3,19 \pm 3,09$; $10,21 \pm 8,39$; $20,81 \pm 15,76$; $29,53 \pm 16,09$; $36,06 \pm 14,82$; $44,31 \pm 13,08$ ve $48,99 \pm 12,28$ olarak belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular ışığında olay yeri ekiplerinin hazır kit halinde kullandığı Luminol'un BEAS-2B sağlıklı akciğer epitel hücreleri üzerinde doz artışına bağlı olarak sitotoksik ve genotoksik etkilerinin de arttığı gözlenmiştir. Luminole alternatif olarak kan ile tepkimeye girip aynı kemilüminesant özellikleri gösterebilen fakat insanlara sitotoksik ve genotoksik açıdan zarar vermeyen başka kimyasalların kullanılmasının daha sağlıklı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abramian, D.S., Romanov, S.R., Smagina, L.V., Glebov, O.K., 1994.** Agents that act on chromatin structure affect the rate of intrachromosomal homologous DNA recombination in cultured cells, *Tsitologiya* 36 (9-10) 1012–1021.
- Açıkgöz, N., Hancı, İ.H., Çakır H., 2002.** DNA laboratuvarının işleyişi, *Sted Dergisi*, Cilt 11(4): 126.
- Anonim, 1983.** Polisin Adli Görevlerinin Yerine Getirilmesinde Delillerin Toplanması, Muhafazası ve İlgili Yerlere Gönderilmesi Hakkında Yönetmelik. Resmi Gazete Numarası: 17962 : s.n., Resmi Gazetede Yayımlanma Tarihi: 17/02/1983.
- Anonim-1, 2015.** <http://docplayer.biz.tr/8079019-Kan-kan-kanin-yapisi-kanin-gorevleri-19-11-2015-kanin-yapisi-muge-bulakbasi-yukse-hemsire.html>. Erişim tarihi: 19.11.2015.
- Anonim-2, 2014.** <http://biyolojin.com/?p=662>. Erişim tarihi: 26.10.2014.
- Anonim-3, 2015.** <http://www.hakindakisabilgi.net/akyuvarlar-lokositler-hakkinda-kisa-bilgi/>. Erişim tarihi: 05.01.2015.
- Anonim-4, 2008.** <http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CF>
- Aşıcıoğlu, F., 2004.** *Adli Tıp Dergisi* 2004; 18(2): 12-22.
- Atasoy, S., 2000.** Suçla mücadelede DNA profilleri ve DNA bankalarının önemi, (<http://abone.turk.net/atasoy/ottenderdna.htm>). Erişim tarihi: 18.07.2000.
- Bevel, T., Gardner, R.M., 2002.** *Bloodstain Pattern Analysis*, p: 130, CRC Press, Washington DC.
- Bowie, A.R., Sanders, M.G., Worsfold, P.J., 1996.** Analytical applications of liquid phase chemiluminescence reactions — a review, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 11, 61–90.
- Budowle, B., Bechtel, F.S., 1990.** “Modifications to Improve effectiveness of restriction fragment length polymorphism typing, *appl. Theor. Electrophor*, 1: 181-187.
- Buttler, J.M., 2012.** “Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology” Elsevier Inc. ISBN 978-0-12-374513-2.
- Buturlakin, M.S., Kisileva, V.G., Schmelev, V.P., 1975.** Interaction of human serum albumin and luminol, *Biofizika* 20 (6) 975–977.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J., Ravanat, J., Sauvaigo, S., 1999.** "Hydroxyl radicals and DNA base damage". *Mutat Res* 424 (1–2): 9–21.
- Carrier, B., 2005.** *File System Forensic Analysis*, Addison Wesley Press.

Catelinois, O., Rogel, A., Laurier, D., Billon, S., Hemon, D., Verger, P., Tirmarche, M., 2006. Lung cancer attributable to indoor radon exposure in France: impact of the risk models and uncertainty analysis. *Environ Health Perspect.* 114(9):1361-6.

Cathcart, R., Schwiers, E., Saul, R., Ames, B., 1984. "Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage". *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (18): 5633-7.

Colin, P., 2006. First murder conviction on DNA evidence also clears the prime suspect Forensic Science Service Accessed.

Collins, A., Morton, N., 1994. "Likelihood ratios for DNA identification". *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (13): 6007-11. DOI:10.1073/pnas.91.13.6007. PMID 8016106.

Collins, AR., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* ;26(3):249-61.

Çakır, AH., 2001. Zabıta DNA delili hakkında ne bilmelidir? *Jandarma Dergisi, Haziran*; 46-49

Çavaş, T., Könen, S., 2008. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology*, 90:154-159.

Dell Manna, A., Di Meo, L.A., 2000. A novel approach to obtaining reliable PCR results from luminol treated bloodstains, *Journal of Forensic Sciences* 45 (4) 886-890.

Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J., Sage, E., 2003. "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation". *Biochemistry* 42 (30): 9221-6.

Durkacz, B.W., Omidiji, O., Gray, D.A., Shall, S., 1980. (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair, *Nature* 283 593-596.

Evet, IW., Weir, BS., 1998. Interpreting DNA Evidence, *Statistical Genetics for Forensic Scientists*, 98:21, Sinauer Associates, USA. F679A66406202CCB039FD8E811AF88F01 Erişim tarihi: 15.07.2016

Fabre, K., M., Saito, K., Degraff, W., Sowers, A.L., Thetford, A., Cook, J.A., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., 2011. The effects of resveratrol and selected metabolites on the radiation and antioxidant response. *Cancer Biol Ther*, 12(10):915-23.

Fisher, B., 2004. *Techniques of Crime Scene Investigation*, CRC Press Florida. p: 208

Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Van Bree, C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1(5): 2315-9.

Gill, P., Jeffreys, A., Werrett, D.J., 1985. Forensic Application of DNA Fingerprints, *Nature*, 318: 577-579.

Giusti, A.M., Budowle, B., 1995. Chemiluminescence-based detection system for human DNA quantitation and restriction fragment polymorphism (RFLP) analysis, *Appl. Theor. Electrophor*, 5: 89-98.

Gorlova, OY., Weng, SF., Zhang, Y., Amos, CI., Spitz, MR., 2007. Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. *Int J Cancer*. 1;121(1):111-8.

Göksel, T., 2004. Akciğer kanseri. Türk Toraks Derneği yayınları. http://www.toraks.org.tr/kisokulu4-ppt-pdf/Tuncay_Goksel.pdf-(Erişim tarihi:10.11.2015)

Green, MH., Lowe, JE., Delaney, CA., Green, IC., 1996. Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods Enzymol*;269:243-66.

Grispino, R.R.J., 1990. The effect of luminol on the serological analysis of dried human bloodstains, *Crime Laboratory Digest* 17 (1) 13–23.

Gunn, A., 2006. *Essential Forensic Biology*, p: 7, Wiley and Sons Press, England.

Hildebrand, D., 2011. DNA for First Responders: Recognizing, Collecting and analysing Biological Evidence Related to Dentistry. *Forensic Dental Evidence*. Chapter 8 p 159-182.

Ikushima, T., 1990. Bimodal induction of sister chromatid exchanges by luminol, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, during the S-phase of the cell cycle, *Chromosoma* 99 (5) 360–364.

Irie, S., 1960. Influence of 3-aminophthalhydrazide on the prothombin time, *Current Therapeutic Research* 2 (5) 153–157.

Irie, S., 1960. The treatment of alopecia areata with 3-aminophthalhydrazide, *Current Therapeutic Research* 2 (3) 107–110.

Irie, S., 1961. The treatment of wounds with 3-aminophthalhydrazide, *The American Surgeon* 27, 642–645.

Irie, S., Mendlowitz, M., 1970. The effect of 3-aminophthalhydrazide on diuresis and blood pressure in dogs, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 134 (4) 919–921.

Jackson, D., Abbey, C.S., Nugent D., 2006. DNA Profiling of the D1S80 lokus A Forensic Analysis fort he Undergraduate Biochemistry Laboratories, *Journal of Chemical Education* 83(5): 774.

James, SH., 2005. *Principles of Bloodstain Pattern Analysis*, CRC Press, p: 1, 295

James, SH., Nordby, JJ., 2003. *Forensic Science an İntroduction to Scientific and Investigate Techniques*, CRC Press, p:1-15.

Jansen, E., Van den Berg, R.H., 1991. High-performance liquid chromatographic investigation of product formation in the horseradish peroxidase-enhanced chemiluminescence of luminol with different enhancers, *Journal of Chromatography* 566 461–469.

Jeffreys, A., Wilson, V., Thein, S., 1985. "Individual-specific 'fingerprints' of human DNA". *Nature* 316 (6023): 76–9. DOI:10.1038/316076a0. PMID 2989708.

Jeffreys, A.J., 1987. "Highly Variable Minisatellites and DNA Fingerprints". *Biochemical Society Transactions*, 15: 309-317.

Jin, L., 1994. The exact numbers of possible microsatellite motifs [letter]. *American Journal of Human Genetics*, 55, 582–583.

Kabir, Z., Bennett, K., Clancy, L., 2007. Lung cancer and urban air-pollution in Dublin: a temporal association? *Ir Med J.* 100(2):367-9.

Kahl, R., Weimann, A., Weinke, S., Hildebrandt, A.G., 1987. Detection of oxygen activation and determination of the activity of antioxidants towards reactive oxygen species by use of the chemiluminogenic probes luminol and lucigenin, *Archives of Toxicology* 60, 158–162.

Kalfoğlu, E., Yükseloğlu, E.H., 2002. İnsan Genomu, Suç ve Suçun Önlenmesi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, s.71-81.

Karakuş, O., 2009. *Kriminalistik*, s: 8 Adalet Yayıncılık, Ankara.

Karakuş, O., Ünal, B., 2013. *Kriminalistik: Olay Yeri İnceleme*, Editör: Karakuş, O., s. 3-4,218.

Kaygısız M., 2003. *Adli Bilimler*, Ankara, Seçkin Yayınevi.

Kiely, T.F., 2001. *Forensic Evidence: Science and The Criminal Law*, p: 274, CRC Press, Washington DC.

Kobilinsky, L., Jay, J., Liotti, T.F., 2005. *DNA: Forensic and Legal Applications*, Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Lee-Chen, S.F., Yu, C.T., Wu, D.R., Jan, K.Y., 1994. Differential effects of luminol, nickel and arsenite on the rejoining of ultraviolet light and alkylation-induced DNA breaks, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 23 (2) 116–120.

Li, W., Graur, D., 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers Chapter 2 and 8.

Ludes, B., Keyser, T.C., 2005. *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine*, vol 2, p: 175, Elsevier Ltd. Press, France.

Max, M.H., 2007. *Forensic Science, Modern Methods of Solving Crime*, p: 33.

Munshi, A., Hobbs, M., Meyn, R.E., 2005. *Clonogenic Cell Survival Assay. Methods in Molecular Medicine*, vol. 110: Chemosensitivity: Vol. 1: In Vitro Assays Edited by: R.D. Blumenthal © Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Natarajan, A.T., Csukas, I., Van Zeeland, A.A., 1981. Contribution of incorporated 5-bromodeoxyuridine in DNA to the frequencies of sister chromatid exchanges induced by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase, *Mutation Research* 84 (1) 125–132.

O'Reilly, KM., Mclaughlin, AM., Beckett, WS., Sime, PJ., 2007. Asbestos-related lung disease. *Am Fam Physician.* 1;75(5):683-8.

Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Hirvonen, A., Norppa, H., Creus, A., Marcos, R., 1999. Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res.*, 441(1):115-27.

Proescher, F., Moody, A.M., 1939. Detection of blood by means of chemiluminescence, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 24, 1183–1189.

Rydberg, B., Johanson, KJ., 1978. Estimation of single strand breaks in mammalian cells. DNA Repair Mechanism. In: Hanawalt, PC, Friedberg, EC, eds. New York: Academic Press; p.465-8.

Saferstain, R., 2004. *Criminalistics: An Introduction to Forensic Science*, Pearson Prentice Hall, New Jersey.

Sanders, J.M., Chen, L.-J., Burka, L.T., Matthews, H.M., 2000. Metabolism and disposition of luminol in the rat, *Xenobiotica* 30 (3) 263–272.

Shigenaga, M., Gimeno, C., Ames, B., 1989. "Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage". *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (24): 9697–701.

Sigma Material Safety Data Sheets, 2016. www.sigma-aldrich.com (Erişim tarihi: Temmuz 2016)

Singh, NP., McCoy, MT., Tice, RR., Schneider, EL., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*;175(1):184-91.

Sparkes, R., Kimpton, C., Watson, S., Oldroyd, N., Clayton, T., Barnet, L., Arnold, J., Thompson, C., Hale, R., Champman, J., Urguard, A., Gill, P., 1996. The Validation of a 7- lokus Multiplex STR Test for Use in Forensic Casework: Mixtures, Ageing, Degradation and Species Studies, *International Journal of Legal Medicine* 109: 186-194.

Sprecht, W., 1937. Die Chemilumiscenz des Hamins, ein Hilfsmittel zur Auffindung und Erkennung forensisch wichtiger Blutspuren, *Angewandte Chemistry* 50, 155–157.

Tice, R., 1997. Review of Toxicological Literature, Report prepared by 'Integrated Laboratory Systems' for National Institute of Environmental Health Sciences.

Venter, J., 2001. "The sequence of the human genome". *Science* 291 (5507): 1304–51. DOI:10.1126/science.1058040. PMID 11181995.

Watson JD., Crick, FHC., 1953. Nature, A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid (<http://www.nature.com/physics/looking-back/crick/index.html>) Erişim tarihi: 05.12.2013

Weedn, VW., Hicks, JW., 1998. The Unrealized Potential of DNA Testing, National Institute of Justice, p: 18.

Weir, B., Triggs, C., Starling, L., Stowell, L., Walsh, K., Buckleton, J., 1997. "Interpreting DNA mixtures". J Forensic Sci 42 (2): 213–22. PMID 9068179.

Wolff, S., 1983. Sister chromatid exchange as a test for mutagenic carcinogens, Annals of the New York Academy of Sciences 407 142–153.

Wolff, S., Rodin, B., 1978. Saccharin-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster and human cells, Science 200 (4341) 543–545.

World Health Organization, 2004. The World Health Report. http://www.who.int/whr/2004/annex/topic/en/annex_2_en.pdf-(Erişim tarihi:02.07.2016).

World Health Organization, 2008. Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>--(Erişim tarihi:02.07.2016).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Melika BEKTAŞ HORTOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi : Bulgaristan / 1986
Yabancı Dili : İngilizce, Almanca
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Ulubatlı Hasan Anadolu Lisesi/2001-2005
Lisans :Viyana Üniversitesi - Moleküler Biyoloji /2006-2010 –
Viyana Üniversitesi - Mikrobiyoloji ve Genetik / 2010-2013
Yüksek Lisans : U.Ü. F.B.E. Kriminalistik A.B.D./ 2013-2016.
Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl : Araştırma Görevlisi U.Ü. F.E.F. Kriminalistik A.B.D. / 2014- Halen.
İletişim : melikabektas@uludag.edu.tr.
Yayınları :