



T.C.
Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

SİLİNMIŞ KAN LEKELERİNİN
GÖRÜNTÜLENMESİNDE YENİ LUMİNOL
KARIŞIMLARININ HAZIRLANMASI VE DNA
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN AZALTILMASINA
YÖNELİK ANALİTİK YAKLAŞIMLAR

Mehmet YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

**SİLİNMIŞ KAN LEKELERİNİN
GÖRÜNTÜLENMESİNDE YENİ LUMİNOL
KARIŞIMLARININ HAZIRLANMASI VE DNA
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN AZALTILMASINA
YÖNELİK ANALİTİK YAKLAŞIMLAR**

Mehmet YILMAZ



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİLİNİMİŞ KAN LEKELERİNİN GÖRÜNTÜLENMESİNDE
YENİ LUMİNOL KARIŞIMLARININ HAZIRLANMASI VE DNA
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN AZALTILMASINA YÖNELİK ANALİTİK
YAKLAŞIMLAR**

Mehmet YILMAZ

**DOÇ. DR. BELGİN İZGİ
(DANIŞMAN)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

BURSA 2013

HER HAKKI SAKLIDIR

TEZ ONAYI

Mehmet YILMAZ tarafından hazırlanan “**SİLİNMIŞ KAN LEKELERİNİN GÖRÜNTÜLENMESİNDE YENİ LUMİNOL KARIŞIMLARININ HAZIRLANMASI VE DNA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN AZALTILMASINA YÖNELİK ANALİTİK YAKLAŞIMLAR**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : (Doç. Dr, Belgin İZGİ)

Başkan: Doç. Dr, Belgin İZGİ
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat
Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. Mustafa TAVASLI
Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat
Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı

İmza

Üye: Doç. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji ABD.

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

.././.....

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.

.././....

İmza

Mehmet YILMAZ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİLİNİMİŞ KAN LEKELERİNİN GÖRÜNTÜLENMESİNDE YENİ LUMİNOL KARIŞIMLARININ HAZIRLANMASI VE DNA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN AZALTILMASINA YÖNELİK ANALİTİK YAKLAŞIMLAR

Mehmet YILMAZ

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

KİMYA Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Belgin İZGİ

Suçun aydınlatılmasında kriminal uzmanlarına yardımcı en önemli delillerin başında kan örneği gelmektedir. Ancak suç işlendikten sonra olay yerinde bulunan kanın temizlenmesi suçun tespit edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu yüzden uzmanlar olay yerinde bırakılan kan örnekleri üzerinde yapılan araştırmalara büyük önem vermişlerdir. Özellikle silinmiş kan tespitinde kullanılan çok sayıda test kitleri mevcut olmakla birlikte yaygın olarak luminol, hemasecin ve bluestar kullanılmaktadır. Belirtilen kitlerde reaksiyon hidrojen peroksit (H_2O_2) ilavesi ile gerçekleşmektedir. Reaksiyon sırasında hidrojen peroksitin DNA yapısına zarar verdiği, ortamda bulunabilecek diğer maddelerle de tepkime verebildiği bilinmektedir. Bu sebeple çalışmada DNA üzerine hasar oluşturabilecek etkilerin azaltılması ve girişim sorunlarının neler olduğunun belirlenmesine yönelik çalışmalar planlandı. Kullanılan kitler kemiluminesans prensibine göre bilgi vermektedir. Luminol çözeltisi hazırlanırken kemiluminesans süresinin istenilen sürede olması ve H_2O_2 'in DNA üzerine etkisinin azaltılması amacına yönelik optimizasyon çalışması yapılarak uygun reaktifler ve miktarları belirlendi. Hazırlanan yeni luminol çözeltisinin DNA üzerine etkisi diğer olası kan testi kitleri (Weber tarafından belirtilen luminol çözeltisi, hemasecin ve bluestar) ile karşılaştırıldı. DNA üzerindeki etkisi elektroforez ve spektrofotometrik olarak incelendi. Ayrıca süt, ayran, patates suyu, domates suyu gibi girişim sorunlarına neden olabilecek sıvılarla denenerek de girişim etkileri araştırıldı.

Anahtar Kelimeler: DNA, Kemiluminesans, Silinmiş kan, Kriminal, Luminol, Bluestar, Hidrojen peroksit

2013,ix+61 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

ANALYTICAL APPROACHES FOR PREPARING OF NEW LUMINOL MIXTURES IN THE MONITORING OF BLOODSTAINS AND DECREASE THE EFFECT ON DNA

Mehmet YILMAZ

Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Belgin İZGİ

Blood is one of the most important evidences which help the criminal specialists solve the crime. However, it is difficult to identify the blood after cleaning at the scene of the crime. For this reason, specialists have attached great importance to the blood samples investigations at crime scene. As well as there are a great number of blood test kits especially identify the cleaned blood, luminol, hemasecin and bluestar are used commonly. The reaction of mentioned kits is occur addition of hydrogen peroxide (H_2O_2). It is known that hydrogen peroxide is damaging the structure of DNA during the reaction and also react with other substances in the working medium. For this reason, the study is planned to decrease the effect of DNA damage and determine the interference problems. The kit which is used give information on the principle of chemiluminescence. While preparing of luminol solution, the appropriate reagents and its amount are identified via optimization conditions of period of chemiluminescence time and less damage effect of peroxide on DNA. The effect of this newly prepared luminol solution on DNA is compared with other blood test kits (luminol solution which is indicated by Weber, hemasecin and bluestar). Effect on DNA is examined by electrophoresis and spectrophotometric. In additionally, interference effects of milk, buttermilk, potato, tomato juice and hypochlorite are investigated on the new prepared luminol solution.

Key Words: DNA, Chemiluminescence, Cleaned blood, Criminal, Luminol, Bluestar, Hydrogen peroxide

2013,ix+61 sayfa

TEŞEKKÜR

Kriminalistik kan analizleri gibi çalışma alanının çok geniş olduğu ve çok sayıda konusunda uzman olan kişilerin yardımına ihtiyaç duyulduğu bir alanda tez çalışması yapmanın zorluklarını yaşadım. Ancak tez çalışmamda pek çok kişinin yardımlarını benden esirgememeleri bu zorlukların üstesinden gelmemi sağladı. Çalışmamın başından sonuna kadar bana desteklerini esirgemeyen pek çok kişiye minnettarım.

DNA analizleri gibi hiçbir tecrübemin olmadığı bir alanda yardımlarını benden esirgemeyen Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Gülşah CEÇENER'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans derslerine katılmamda bana karşı çok büyük sabır gösteren ve bana yardımlarını esirgemeyen Bursa Jandarma Kriminal Laboratuvar Amirliği'nden J.Albay Mesut DEMİRAĞ ve J.Albay M.Cem Er ile işyeri arkadaşlarıma şükranlarımı sunarım.

Her ne zaman biyoloji alanında bir bilgiye ihtiyacım olsa imdadıma koşan Ankara Jandarma Kriminal Daire Başkanlığı'nda görevli Biyolog Barış KAYDIRAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocam ve tez danışmanım Doç.Dr.Belgin İZGİ'ye bana ayırmış oldukları değerli zamanları ve destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca sürekli arkamda duran ve desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Mehmet YILMAZ

14/08/2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Kriminal	3
2.2. Kanın Yapısı ve Kan Analizlerinin Önemi	5
2.2.1. Kanın yapısı	5
2.3. Adli Leke İncelemesi	6
2.3.1. Delilin toplanması ve görsel incelenmesi	6
2.3.2. Olası test taraması (leke kan mıdır?)	7
2.3.2.1. Fenolftalein (Kastlemeyer reaktifi)	9
2.3.2.2. Benzidin ve tetrametilbenzidin	9
2.3.2.3. Tolidin	10
2.3.2.4. Luminol	10
2.3.2.5. Bulestar	11
2.3.2.6. Hemascein	12
2.3.3. Onay testi (lekenin kan olduğunun kesinleştirilmesi)	13
2.3.3.1. Teichman testi	14
2.3.3.2. Takayama testi	14
2.3.4. Kanın kökeninin belirlenmesi (insan kanı mıdır?)	15
2.3.4.1. Çökeltme testi	15
2.3.5. Kanın kimliklendirilmesi (Kan kime ait dir?)	15
2.4. DNA ve DNA Analizi	16
2.4.1. Nükleik asitler	16
2.4.1.1. DNA (Deoksiribonükleik asit)	16
2.4.1.1.1. Organik bazlar	17
2.4.1.1.2. 5 karbonlu pentoz şekeri	17
2.4.1.1.3. Fosfat molekülü	17
2.4.2. DNA profillemesi (DNA Testi)	17
2.4.2.1. RFLP analizi	18
2.4.2.2. PCR analizi	19
2.4.2.3. STR analizi	19
2.5. Kan Tespitinde Kullanılan Olası Kan Testi Kimyasallarının	19
DNA Üzerine Etkisi	19
2.5.1. Hidrojen peroksitin DNA üzerine etkisi	21
2.5.2. Genetik toksikoloji testleri ve luminolün toksisite etkisi	23
2.5.2.1. Genetik toksisite testleri	23
2.5.2.2. Luminolün toksisite etkisi	23
2.6. Kemilüminesans	24
2.6.1. Kemilüminesans reaksiyonları	24

2.6.2. Luminol ve kemiluminesans	25
2.6.3. Analitik problemler (Girişim Sorunları)	26
2.6.3.1. Silinmiş kan testi kitleri için girişim sorunları	26
2.6.4. Olası kan testi kitleri için yüzey girişim etkileri	28
3.MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Kullanılan cihaz ve malzemeler	29
3.1.1.1. CCD kameralı UV kabin	29
3.1.1.2. Analitik terazi	29
3.1.1.3. Etüv	29
3.1.1.4. Ultrasonik su banyosu	29
3.1.1.5. Mikropipetler.....	29
3.1.1.6. DNA Analizleri	30
3.1.2. Reaktifler, çözeltiler ve hazırlanmaları	30
3.1.2.1. Olası kan testlerinin hazırlanması	30
3.1.2.1.1. Luminolun hazırlanılmasında kullanılan çözeltiler.....	30
3.1.2.1.2. Hemaşceinin hazırlanılması	30
3.1.2.1.3. Bulestarın hazırlanılması.....	30
3.1.2.2. Stok çözeltiler	30
3.1.2.3. Günlük olarak hazırlanan çözeltiler	31
3.1.2.4. Temizleme amaçlı kullanılan çözeltiler	31
3.1.2.5. Kullanılan örnekler	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Örneklerin hazırlanması	32
3.2.2. Reaktiflerin en uygun çalışma koşulları.....	32
3.2.2.1 Süreye bağlı olarak (insan kanı kullanılarak) en uygun reaktif miktarlarının belirlenmesi	32
3.2.2.2 Süreye bağlı olarak (sentetik kan kullanılarak) en uygun reaktif miktarlarının belirlenmesi	39
3.2.2.3. H ₂ O ₂ derişimi ve kemiluminesans süresi değerlendirilerek en uygun reaktiflerin belirlenmesi	41
3.2.2.4. NaOH'in hazırlanan reaktifler üzerine etkisi	44
3.2.3. Kemiluminesans şiddetinin artırılması	46
3.2.4. Elde edilen veriler ile Weber tarafından hazırlanan Luminol reaktifinin karşılaştırılması	48
3.2.5. EDTA kullanılarak kemiluminesans şiddetinin artırılması.....	49
3.2.6. Hazırlanan yeni luminol çözeltilisinin DNA üzerine etkisinin diğer olası kan testlerinin DNA üzerine etkisi ile karşılaştırılması	51
3.2.7. Girişim sorunlarının belirlenmesi	55
4. Tartışma ve Sonuç.....	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%.....	Yüzde
°.....	Derece
°C.....	Santigrat derece
λ.....	Dalga boyu
s.....	Saniye
g.....	Gram
mg.....	Miligram
ng.....	Nanogram
L.....	Litre
mL.....	Mililitre
µL.....	Mikrolitre
nm.....	Nanometre
M.....	Molar

Kısaltmalar	Açıklama
DNA.....	Deoksiribonükleik asit
RNA.....	Ribonükleik asit
A.....	Adenin
G.....	Guanin
T.....	Timin
C.....	Sitozin
VNTR.....	Variable number tandem repeats
RFLP.....	Restriction fragment length polymorphism
RE.....	Restriksiyon enzimleri
PCR.....	Polimeraz Chain Reaction
STR.....	Short tandem repeats
ROS.....	Reaktif oksijen türevleri
HPLC.....	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
GC.....	Gaz kromatografi
NMR.....	Nükleer manyetik rezonans
OD.....	Optik Dansite

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Olay yeri incelemesi	3
Şekil 2.2. Olay yerinden bulguların toplanması	4
Şekil 2.3. Kan ve kan hücrelerinin yapısı	6
Şekil 2.4 Laboratuvar ortamında delillerin incelenmesi	7
Şekil 2.5. Olası test kitlerinin çalışma prensibi.....	8
Şekil 2.6. Hemogloblin ve peroksit tarafından indirgenmiş fenolftaleinin yükseltgenmesi.....	9
Şekil 2.7. Benzidin ve Tetrametilbenzidin molekülleri	9
Şekil 2.8. Olay yerinde silinmiş kana luminol uygulaması yapılarak görünür hale getirilmesi.....	11
Şekil 2.9. Banyo küvetindeki silinmiş kana bluestar uygulaması yapılarak görünür hale getirilmesi.....	12
Şekil 2.10. Yanmış kan lekesi üzerine uygulanan test kitlerinin zamana karşı ışık şiddetlerinin grafiği	12
Şekil 2.11. Olay yerinde silinmiş kana hemasecin uygulaması yapılarak görünür hale getirilmesi.....	13
Şekil 2.12. Silinmiş kan lekesi için kullanılan test kitlerinin avantaj ve dezavantajları .	13
Şekil 2.13. Teichman testi ve kanın mikroskopta görünümü.....	14
Şekil 2.14. Takayama testi ve kanın mikroskopta görünümü	14
Şekil 2.15. Olay yerinden elde edilen kanın insan kanı olduğunun çökeltme testi..... ile belirlenmesi	15
Şekil 2.16. DNA'nın yapısı	16
Şekil 2.17. 1:10 oranında seyreltilmiş kanda olası kan testlerinin DNA üzerine etkisi..	20
Şekil 2.18. 1:100 oranında seyreltilmiş kanda olası kan testlerinin DNA üzerine etkisi.....	20
Şekil 2.19. Hidroksil radikalinin atak yapacağı bölgeler	22
Şekil 2.20. Kemilüminesans olayı.....	25
Şekil 2.21. Luminolün kemiluminesans reaksiyonu	26
Şekil 2.22 Silinmiş kan ve Gözle görülen kan testi kitlerinde karşılaşılan analitik problemler	26
Şekil 2.23. Silinmiş kan testi kitlerinde hatalı sonuçlara neden olan materyaller.....	27
Şekil 2.24. Süt ve luminolün kemiluminesans görüntüsü	27
Şekil 2.25. Patates ve hemasecinin kemiluminesans görüntüsü	27
Şekil 3.1. CCD kameralı UV kabin Cihazı	29
Şekil 3.2. Çizelge 3.1.'deki verilerin grafiksel gösterimi	33
Şekil 3.3. Çizelge 3.2.'deki verilerin grafiksel gösterimi	34
Şekil 3.4. Çizelge 3.3.'deki verilerin grafiksel gösterimi	35
Şekil 3.5. Çizelge 3.4.'deki verilerin grafiksel gösterimi	35
Şekil 3.6. Çizelge 3.5.'deki verilerin grafiksel gösterimi	36
Şekil 3.7. Çizelge 3.6.'daki verilerin grafiksel gösterimi	37
Şekil 3.8. Çizelge 3.7.'deki verilerin grafiksel gösterimi	37
Şekil 3.9. Çizelge 3.8.'deki verilerin grafiksel gösterimi	38
Şekil 3.10. Çizelge 3.9.'daki verilerin grafiksel gösterimi	39
Şekil 3.11. Çizelge 3.10.'daki verilerin grafiksel gösterimi	40
Şekil 3.12. Çizelge 3.11.'deki verilerin grafiksel gösterimi	40

Şekil 3.13. Çizelge 3.12.'deki verilerin grafiksel gösterimi	41
Şekil 3.14. Çizelge 3.13.'deki verilerin grafiksel gösterimi	42
Şekil 3.15. Çizelge 3.14.'deki verilerin grafiksel gösterimi	43
Şekil 3.16. Çizelge 3.15.'deki verilerin grafiksel gösterimi	43
Şekil 3.17. Çizelge 3.16.'daki verilerin grafiksel gösterimi	44
Şekil 3.18. Çizelge 3.17.'deki verilerin grafiksel gösterimi	45
Şekil 3.19. Çizelge 3.18.'deki verilerin grafiksel gösterimi	46
Şekil 3.20. Reaktifler içerisinde H ₂ O ₂ olmadan HNO ₃ , HCl, KI, NaBrO ₃ ,..... Na ₂ S ₂ O ₈ ve K ₂ S ₂ O ₈ ile kemiluminesans denemeleri	47
Şekil 3.21. Weber luminolün kemiluminesans şiddeti.....	48
Şekil 3.22. HCl ile hazırlanan luminolün kemiluminesans şiddeti	48
Şekil 3.23. HNO ₃ ile hazırlanan luminolün kemiluminesans şiddeti.....	49
Şekil 3.24. NaBrO ₃ ile hazırlanan luminolün kemiluminesans şiddeti.....	49
Şekil 3.25. HCl ile hazırlanan luminole EDTA eklenmesi ile artan kemiluminesans	50
şiddeti	50
Şekil 3.26. HNO ₃ ile hazırlanan luminole EDTA eklenmesi ile artan.....	50
kemiluminesans şiddeti	50
Şekil 3.27. NaBrO ₃ ile hazırlanan luminole EDTA eklenmesi ile artan	50
kemiluminesans şiddeti	50
Şekil 3.28. Lum1, Lum2 ve Weber luminolün kemiluminesans şiddetleri.....	51
Şekil 3.29. Solüsyon eklenen DNA örneklerinin elektroforezde yürütülmesi.....	51
Şekil 3.30. Solüsyon eklendikten sonra 5 gün bekletilen DNA örneklerinin	52
elektroforezde yürütülmesi.....	52
Şekil 3.31. Omega kiti ile izole edilen DNA örneklerinin elektroforezde yürütülmesi..	54
Şekil 3.32. Weber Luminol ile çamaşır suyunun reaksiyonu sonucu elde edilen.....	55
kemiluminesans ışınma	55
Şekil 3.33. Weber Luminol ile patates suyunun reaksiyonu sonucu elde edilen	56
kemiluminesans ışınma	56
Şekil 3.34. Weber Luminolün domates ve süt ile verdiği ışınma reaksiyonları	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Gözle görülen kan lekesi için kullanılan test kitlerinin genel özellikleri.....	8
Çizelge 2.2. Silinmiş kan lekesi için kullanılan test kitlerinin genel özellikleri.....	10
Çizelge 2.3. Olası test kitlerinin değişik yüzeylere uygulanması	28
Çizelge 3.1. 12,5 µL kan 50 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	33
Çizelge 3.2. 12,5 µL kan 100 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	34
Çizelge 3.3. 12,5 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	34
Çizelge 3.4. 25 µL kan 50 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	35
Çizelge 3.5. 25 µL kan 100 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	36
Çizelge 3.6. 25 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	36
Çizelge 3.7. 50 µL kan 50 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	37
Çizelge 3.8. 50 µL kan 100 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	38
Çizelge 3.9. 50 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	38
Çizelge 3.10. 50 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	39
Çizelge 3.11. 50 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	40
Çizelge 3.12. 50 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.....	41
Çizelge 3.13. Farklı HCL derişimlerinde ölçülen kemiluminesans süreleri	42
Çizelge 3.14. Farklı HNO ₃ derişimlerinde ölçülen kemiluminesans süreleri	42
Çizelge 3.15. Farklı NaBrO ₃ derişimlerinde ölçülen kemiluminesans süreleri	43
Çizelge 3.16. 10 ⁻² mol/L HCL derişiminde NaOH derişiminin kemiluminesans	44
süresi üzerine etkisi	44
Çizelge 3.17. 10 ⁻² mol/L HNO ₃ derişiminde NaOH derişiminin kemiluminesans	45
süresi üzerine etkisi	45
Çizelge 3.18. 10 ⁻² mol/L NaBrO ₃ derişiminde NaOH derişiminin kemiluminesans	45
süresi üzerine etkisi	45
Çizelge 3.19. H ₂ O ₂ yerine farklı derişimlerde farklı reaktifler kullanılarak.....	46
yapılan denemeler	46
Çizelge 3.20. 10 ⁻² mol/L H ₂ O ₂ kullanılarak elde edilen kemiluminesans ışımaları.....	47
Çizelge 3.21. 1:100 oranında seyreltilmiş kana solüsyonlar eklendikten sonra Qiagen....	53
Mini kiti ile İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve optik dansite değerleri ..	53
Çizelge 3.22. 1:2 oranında seyreltilmiş kana solüsyonlar eklendikten sonra Qiagen.....	53
Mini kiti ile İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve optik dansite değerleri ..	53
Çizelge 3.23. Kan üzerine solüsyonlar eklendikten sonra Omega DNA	54
izolasyon kiti ile ölçülen DNA konsantrasyonları	54
Çizelge 3.24. Lum1, Lum2, Lum3 ve Weber luminolün çeşitli sıvılarla.....	55
vermiş olduğu kemiluminesans ışıma şiddetleri	55

1. GİRİŞ

Kanın tespit edilmesi ve incelenmesi, çok uzun zamandan beri suç yerinin araştırılmasında önemli bir yer tutmuştur. 1220 yılında, Alman ortak kanunu olarak bilinen Sachsenspiegel’de olay yerinde bulunan kanın varlığı suç delili olarak kayıtlara geçmiştir. Sir Arthur Conan Doyle’un ünlü romanı “A Study in Scarlet”ın kahramanı Sherlock Holmes, romanda olayın çözümünü kanın tespiti üzerine kurmuştur. Bunun sonucu olarak suç araştırması ve kan delili arasında ilişki kurulması ihtiyacı doğmuş ve kan lekesi geliştirme teknikleri bulunmaya başlanmıştır. İlk olarak 1853 yılında Ludwig Teichman hemoglobinin varlığının tespiti için mikroskopik kristal tabanlı test geliştirmiştir. Bu gelişme Hollandalı ve Alman Araştırmacılara yol gösterici olmuş ve 1895 yılında Eduard Piotrowski, darbe ile oluşan kafa yaralanması sonucu çıkan kanın merkezi, şekli, yönü ve dağılımı arasında bir ilişki kurmuş ve kitabında yayınlamıştır. Bu kitap, kapsamlı deneylerle desteklenmiş, farklı etkiler sonucunda oluşan farklı tipteki kan lekelerinin yönü detaylandırılmıştır. 1901 yılında Profesör A. Florence, olay yerinde sıçrama ve damlamayla oluşan kan lekelerini sınıflandırmıştır.

Kan lekesini algılama kapsamı arttıkça, kanın hayvan kanı mı yoksa insan kanı mı olduğunun ayırt edebilecek testlere ihtiyaç duyulmuştur. Karl Landsteiner tarafından 1900’ lü yılların başında insan kan gruplarının keşfedilmesi bu sorunun çözülmesinde çok yardımcı olmuştur. Bu keşif Landsteiner’e 1930 yılında Nobel ödülü kazandırmıştır. Onun keşfi kan analizi için tamamen yeni bir yaklaşıma yol açmış ve sonunda Lewis, Kell, Duffy ve Kidd kan grubu sistemlerinin farklılıklarını ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte bu sistemin kan analizleri için bazı eksik yönleri vardı. Maurice Muller kan türleri arasındaki farklılıklar için antikor-antijen difüzyon testini kullanmıştır. 1915 yılında ise Leone LATTES kurumuş kanın, kan tipi analizleri için bir tuzlu solüsyon geliştirmiştir. İlerleyen yıllarda kan lekesinin yerinin belirlenmesi ve incelenmesi için yöntem ve sistemler artmaya devam etmiş, Culliford, “Kriminal laboratuvarında kanın cinsi ve incelenmesi” isimli kitabını yazmış ve yayınlamıştır. Bu kitap kan lekesinin incelenmesinde yeni metotların gelişimine yardımcı olmuştur. 1955 yılında kan lekesi analizleri mahkemede delil olarak kabul edilmiştir. Dr.Paul KİRK, Sam SHEPPARD’ı mahkemede savunmuştur. Savunmasında mağdurun ve saldırganın konumlarını kullanmış, dayak sonucu oluşan kan lekelerinin şekillerinden saldırının sol

elli bir kişi tarafından yapıldığını ispatlamıştır. Sam SHEPPARD ise sağ elini kullanmaktaydı. 1984 yılında Sir Alec JEFFREYS ilk DNA profilleme testini geliştirmiş ve böylece kan lekelerinin önemi daha da artmıştır. Bu DNA profilleme testi sayesinde 1986 yılında İngiltere’de bir katil tespit edilmiştir. 1987 yılında, DNA’nın davalarda kabul edilebilirliğine New York’ta ilk kez itiraz edilmiştir. Bu durum adli bilimde bir revizyon başlatmış ve akreditasyon, standartlaşma ve kalite kontrol gibi gereksinimler ortaya çıkmıştır. Bu revizyon ve onun etkileri günümüzde de devam etmektedir. Kan lekelerinin bulunması ve analiz edilmesi çalışmaları hala devam etmektedir (Lowis 2011).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kriminal

Günümüzde yaşanan bilimsel ve teknolojik gelişmeler, bireyin ve toplumun yaşamını sürekli bir biçimde etkilemekte ve değiştirmektedir. Artık, geçmişten günümüze uzanan pek çok anlayış biçiminin mevcut yapısı ve niteliğini koruyarak geleceğe taşınmayacağı düşüncesi bilimsel ortamlarda kabul edilmekte ve bu yönde çalışılmaktadır. Hızla gelişen teknoloji suç ve suçlularla daha profesyonel düzeyde mücadele etmeyi ve delilden suçluya gitmeyi zorunlu hale getirmiştir.

Yasa dışı bir fiil meydana geldiğinde, olay yerinde ceset dahil bir çok gözle görünen ve görünmeyen, fiziksel-kimyasal ve biyolojik delil bulunmaktadır. Olay yerindeki hiçbir bulgu, incelemeye gelen olay yeri inceleme ekiplerine olayın mahiyeti veya faili hakkında bilgi vermezler.



Şekil 2.1. Olay yeri İncelemesi.

Olay yerinde bulunan sessiz tanık veya delillere soru sorulduğunda cevap vermezler. Failin kim olduğunu, delillerin nerelerde bulunduğunu açıklamazlar. Hukuk sistemimiz serbest delil sistemini kabul etmiştir. Bu nedenle olay yerinde veya olayla ilgili her şey delil olabilir. Olay yeri incelemesinin olayın meydana geldiği anda başladığı gerçeği ve

en çok elde edilen iz ve delillerin olay yerlerinde çıplak gözle görünmeyen bulgulardan tespit edildiği yapılan istatistiklerden anlaşılmaktadır.



Şekil 2.2. Olay yerinden bulguların toplanması.

Olay yerinde bulunan ve olayın çözümünde en çok yararlanan iz ve bulgular olan bireysel tanımlayıcı izler (parmak izi, avuç izi, çıplak ayak izi, kulak izi, alın izi, eşkali ve diş izi), vücut sıvıları (kan, tükürük, burun akıntısı, göz yaşı, ter gibi sıvıların yanı sıra, kıl, doku parçası, kepek ve döküntüler, tırnak vb) ile olay yerinde bulunan değişik fiziksel ve kimyasal bulgular (metal parçaları, alet izleri, ayakkabı izi, oto lastik izi, lifler, cam parçaları, toprak analizi, polen ve sporlar, böcek incelemesi, çeşitli doküman ve yazılı belgeler, svaplar, balistik ve diğer sesli ve görüntülü kayıtlar) gibi bulgular olayı aydınlatmada yararlanan önemli bulgulardır.

Bulguların olay yerlerinde gelişmiş teknolojik araç ve teknikler ile tecrübeli uzman personel vasıtasıyla usulüne uygun yapılacak inceleme neticesinde, olayın çözümü kolaylaşacaktır (Kaygusuz 2002).

Jandarma genel komutanlığı kaynaklarına göre kriminal laboratuvarları, uzmanlık alanlarına giren idari soruşturma veya adli soruşturma ve kovuşturmalarda, savcılık ve mahkemeler, Jandarma genel komutanlığı ve bağlı birimleri, sahil güvenlik komutanlığı

ve bağılı birimleri, askeri birimler ile adli görevlerle ilgili olarak Emniyet genel müdürlüğü merkez ve taşra teşkilatı birimleri tarafından elde edilen ve ilgili muhakkik, savcı veya hakimin yazılı oluru alınarak gönderilen bulguları, yapılan inceleme talepleri doğrultusunda değerlendirir ve sonucu rapor halinde doğrudan talepte bulunan birime gönderir. Ayrıca, mevzuatla verilen görevler kapsamında konusuyla ilgili rapor düzenler (Anonim 2012a).

2.2. Kanın Yapısı ve Kan Analizlerinin Önemi

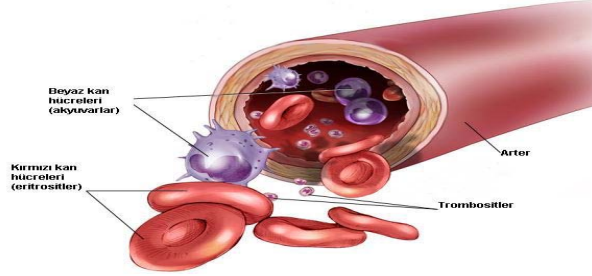
Şiddetin söz konusu olduğu her olayda kan lekelerinin varlığı kaçınılmazdır. Olayın aydınlatılmasında oldukça değerli veriler sağlayan ve soruşturmaya yön veren kan lekelerinin karşılaştırmalı analizleri sonucunda sanığın kimliklendirilmesi de mümkün olabilmektedir. Kan lekelerinin önem arz ettiği bir diğer konu kan lekeleri model analizi olup, gelişmiş ülkelerde bu yöntemden yıllardır yararlanılmasına karşın ülkemizde ancak son zamanlarda ilgi görmeye başlamıştır.

Biyolojik delil olarak olay yerinde bulunan lekelerden hangisi ya da hangilerinin kan lekesi olduğunun tespiti, olay yeri incelemesi ve biyolojik delil toplanması sürecinin önemli bir basamağını oluşturmaktadır. Kan lekesi olduğu düşünülen lekeler üzerinde yapılacak olan DNA analizi gibi ileri incelemeler oldukça pahalı incelemeler olduğundan bu lekelerin gerçekten kan lekesi olup olmadıklarının tarama testleri (olasılık reaktifleri) ile tespiti sonraki çalışmalar açısından önem kazanmaktadır. Bu nedenle, lekenin türü hakkında karar verilmesini sağlayan ve sonraki basamağa geçişi belirleyen bu tarama testlerinin güvenilirliği de önem kazanmaktadır (Büyük 2006).

2.2.1. Kanın yapısı

Türk Kızılayı Kan Hizmetleri Genel Müdürlüğü kaynaklarına göre kan; geçmişten günümüze sağlık ve yaşamın temel simgesi olarak görülmüş, modern tıpta “tek kaynağı insan olan yaşamsal bir ilaç” olarak kabul görmektedir. Kalbe gelen kan pompalanarak, damar içinde yol alır. Kan; damarlarımızda dolaşarak vücuttaki tüm hücrelere besin ve oksijen taşır. Hormonların taşınması, hastalık etkenleriyle (virüs, bakteri v.b.) savaş, pıhtılaşma gibi birçok konuda da görevlidir. Aynı zamanda hücreler tarafından

oluşturulan karbondioksit, atık ve zehirli maddeleri de hücrelerden alarak ilgili organlara taşır.



Şekil 2.3. Kan ve kan hücrelerinin yapısı.

Normal bir insanda 5000-6000 mL (5-6 litre) kadar kan bulunmaktadır. Ortalama vücut ağırlığının % 8'ini oluşturur.

Kanın;

- % 40-50'si hücrelerden,
- % 50-60'ı sıvı kısım olan plazmadan, meydana gelmektedir (Anonim 2012c).

2.3 Adli Leke İncelemesi

Adli leke incelemesi 5 aşamadan oluşmaktadır.

1. Delilin toplanması ve görsel incelenmesi
2. Olası test taraması (leke kan mıdır?)
3. Onay testi (lekenin kan olduğunun kesinleştirilmesi)
4. Kanın kökeninin belirlenmesi (insan kanı mıdır?)
5. Kanın kimliklendirilmesi (kan kime ait dir?)

(Linville 2005).

2.3.1. Delilin toplanması ve görsel incelenmesi

Olay yerinin incelenmesinden sonra elde edilen delillerin, olay yerinde yada laboratuvarında incelenmesinin ilk basamağı görsel incelemedir.



Şekil 2.4. Laboratuvar ortamında delillerin incelenmesi.

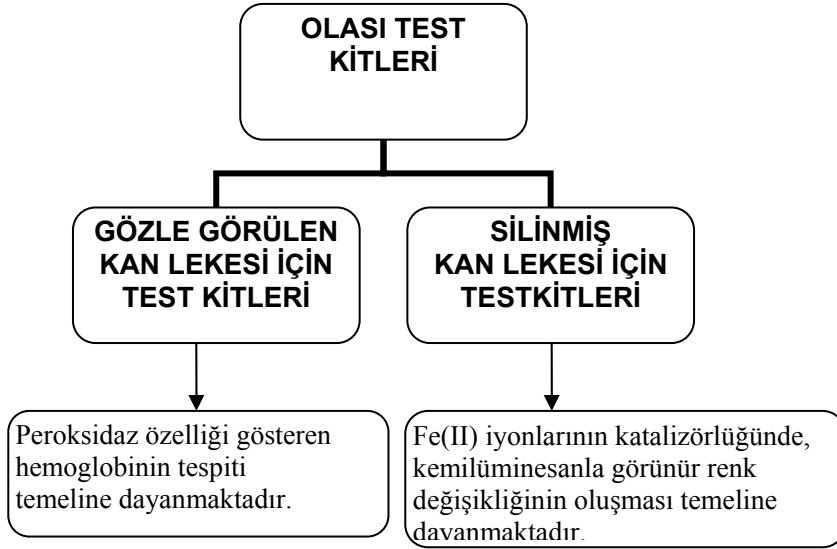
Bir olay yerinden elde edilen biyolojik deliller üzerinde başarılı DNA analizi yapma yeteneği, hangi çeşit örneklerin toplandığına ve onların nasıl korunduğuna bağlıdır. Böylece, toplama ve bu gibi delilleri belgeleme de kullanılan teknik, toplanan delilin tipi ve miktarı, delili kontrol altında tutma ve paketleme şekli ve delilin nasıl korunması gerektiği, bir adli DNA test programı için kritik noktalardan bir kaçıdır.

DNA delili uygun şekilde korunmaz ise, delil bozulabilir veya özelliğini kaybedebilir. Bu etmenlerden herhangi biri, DNA test programını önemli derecede etkileyecektir. DNA delilini toplama, paketleme ve saklama, delilin katı veya sıvı olma durumuna bağlıdır. Delilin paketlenmesi ve saklanması, delilin laboratuvara gelinceye kadar bütünlüğünü kaybetmesine engel olur (Açıkgöz ve Ark. 2002).

2.3.2. Olası test taraması (leke kan mıdır?)

Olası test taraması kitleri sıklıkla kullanıldığı yerler göz önüne alınarak iki ana başlık altında gösterilebilir.

1. Gözle görülen kan lekesi için test kitleri.
2. Silinmiş kan lekesi için test kitleri.



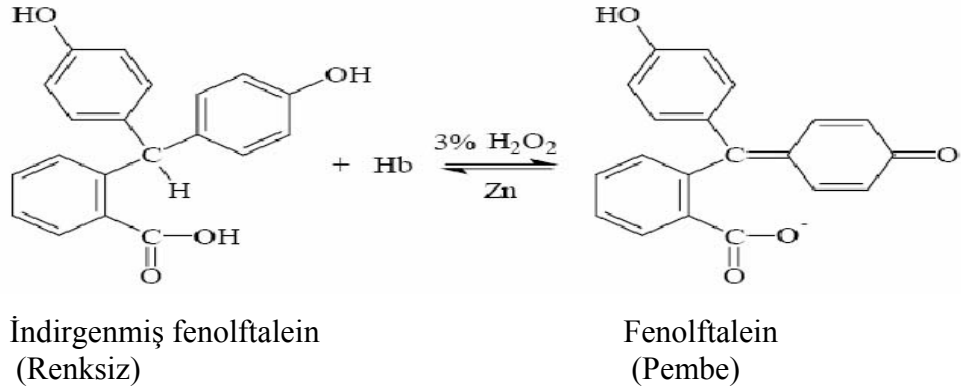
Şekil 2.5. Olası test kitlerinin çalışma prensibi.

Gözle görülen kan lekesi için test kitlerinin çalışma prensibi, peroksidaz özelliği gösteren hemoglobinin tespiti temeline dayanmaktadır. Çok sayıda test kiti bulunmakla birlikte en çok kullanılan test kitleri Fenolftalein (Kastle Meyer Reaktifi), benzidin, tolidin, tetrametilbenzidindir (Linville 2005).

Çizelge 2.1. Gözle görülen kan lekesi için kullanılan test kitlerinin genel özellikleri.

KİMYASAL İSMİ	TESTİN TEMELİ	SONUÇ RENGİ	NOT
FENOLFTALEİN (KASTLE MEYER REAKTİFİ)	PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ (KATALİTİK)	PEMBE RENK	SAĞLIĞA ZARARSIZ VE EN ÇOK KULLANILAN YÖNTEMDİR
BENZİDİN	PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ (KATALİTİK)	MAVİ RENK	KANSEROJEN
TOLİDİN	PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ (KATALİTİK)	MAVİ RENK	KANSEROJEN
TETRAMETİL BENZİDİN (TMB)	PEROKSİDAZ AKTİVİTESİ (KATALİTİK)	MAVİ RENK	AZDA OLSA KANSEROJEN ETKİSİ VARDIR

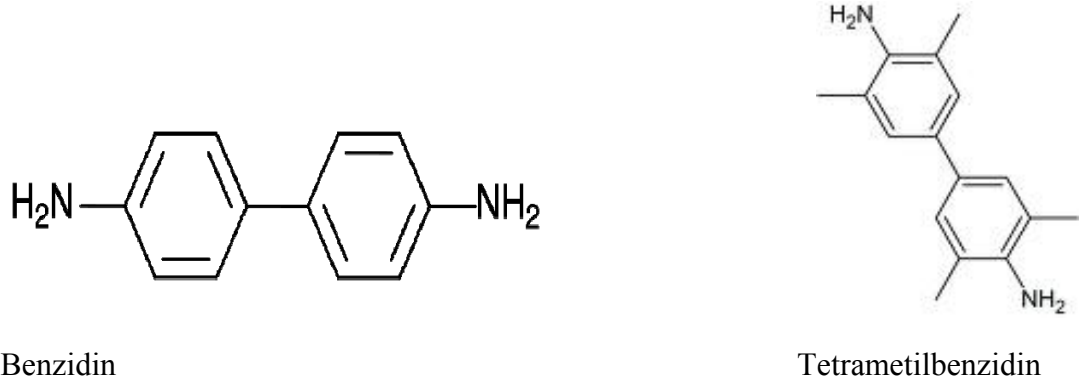
2.3.2.1. Fenolftalein (Kastlemeyer reaktifi)



Şekil 2.6. Hemoglobin ve peroksit tarafından indirgenmiş fenolftaleinin yükseltgenmesi.

Bir saat camı veya tüp içine konulmuş bir kaç damla leke solüsyonunun üzerine, önce bir iki damla reaktif, sonra da aynı miktarda hidrojen peroksit damlatıldığında, bir kaç saniye içinde açık kırmızı– pembe renk meydana gelmesi, lekenin kan lekesi olduğu ihtimalini gösterir (Anonim 2010).

2.3.2.2. Benzidin ve tetrametilbenzidin



Şekil 2.7. Benzidin ve Tetrametilbenzidin molekülleri.

Reaktif damlatıldıktan hemen sonra yeşil, 10 dakika sonra mavi bir rengin meydana gelmesi lekenin kan lekesi olduğu ihtimalini gösterir. Benzidin testi, yıllardan beri adli tıp laboratuvarlarında lekenin kan lekesi olup olmadığının araştırılmasında büyük bir güvenle kullanılmıştır. Ancak günümüzde, bu reaktifin kanserojenik özellikleri olması nedeniyle bazı ülkelerde yasaklanmıştır. Bu sebeple benzidin testinin yerine geçecek bir test araştırılmış ve tetrametilbenzidin kullanılmaya başlanmıştır (Anonim 2010).

2.3.2.3. Tolidin

Eşit miktarda çalışma solüsyonu ve hidrojen peroksit karıştırılarak ya tüpteki leke ekstratının, ya da süzgeç kağıdına emdirilen leke ekstratının üstüne damlatılır. Yeşil veya mavi rengin meydana gelmesi, pozitif sonuç olarak yorumlanır (Anonim 2010).

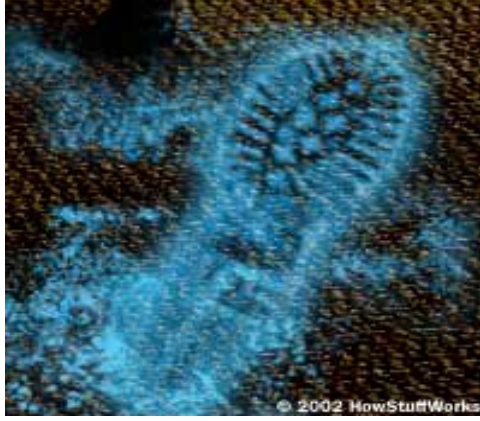
Silinmiş kan lekesi için test kitlerinin çalışma prensibi, Fe(II) iyonlarının katalizörlüğünde, kemilüminesanla görünür renk değişikliğinin oluşması temeline dayanmaktadır. Silinmiş kan lekesi test kitleri Luminol, Bluestar ve Hemasceindir.

Çizelge 2.2. Silinmiş kan lekesi için kullanılan test kitlerinin genel özellikleri.

KİMYASAL İSMİ	TESTİN TEMELİ	SONUÇ RENGİ	NOT
LUMİNOL	KEMİLUMİNESANS	MAVİ RENG	KANSEROJEN
BLUESTAR	KEMİLUMİNESANS	MAVİ RENG	DNA ANALİZLERİNİ OLUMSUZ ETKİLEMEKTEDİR
HEMASCEİN	FLORESANS	YEŞİL RENG	DNA ANALİZLERİNİ OLUMSUZ ETKİLEMEKTEDİR

2.3.2.4. Luminol

Test solüsyonu lekeli giysi veya kumaşın üzerine karanlık odada atomizer ile spreylenebilir. Parlak mavi bir görünümün ortaya çıkması, kuvvetle lekenin kan lekesi olduğunu gösterir.



Şekil 2.8. Olay yerinde silinmiş kana luminol uygulaması yapılarak görünür hale getirilmesi.

Luminolün kan üzerine sıkıldığında verdiği rengin temeli kemiluminesans denilen olaya dayanır. Burada luminol maddesi, hidrojen peroksit ile birlikte kan olduğu tahmin edilen bölgeye sıkılır ve eğer kan kalıntıları varsa, kandaki hemoglobinin Fe(II) iyonları, luminol'un hidrojen peroksit ile yükseltgenmesi tepkimesini katalizleyip, luminol'un, aminoftalat'a yükseltgenmesini sağlamaktadır. Oluşan yüksek enerjili aminoftalat enerji fazlalığından dışarıya foton yani ışık yayarak kurtulmaktadır (Anonim 2010).

2.3.2.5. Bluestar

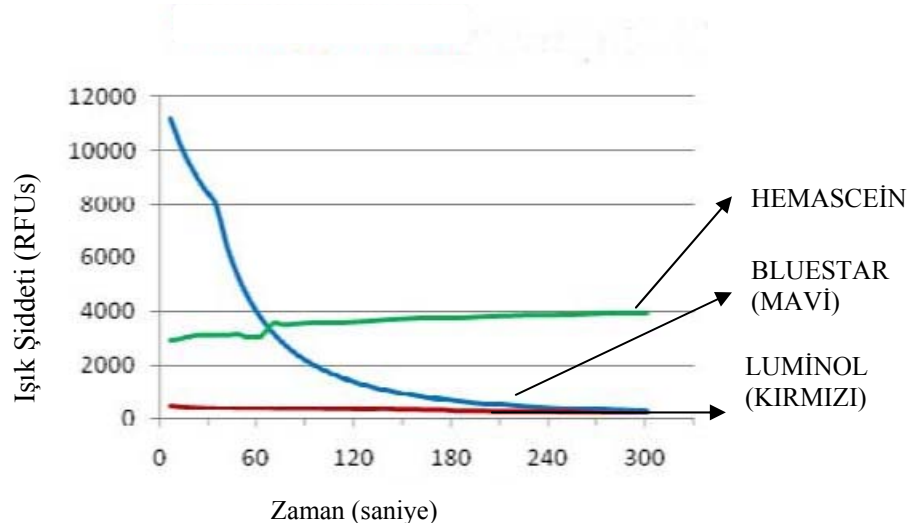
Bluestar, luminolün bir türevidir. Diğer olası kan testlerinden daha hassas ve daha şiddetli ışık yayan bir reaktiftir. 1/1000'in üzerinde seyreltilmiş kan üzerinde kullanılabilir. Hidrojen peroksitle karıştırılarak kan lekesi olduğu tahmin edilen bölgeye sıkılır. Karanlık ortamda bu karışım, hemoglobinde bulunan hem nükleosuyla etkileşime girdiğinde 420-440 nanometrede gözle görülebilen kemiluminesans tabanlı ışık yayar. Diğer olası kan testlerinden daha hassas ve daha şiddetli ışık yayan bir reaktiftir. Ayrıca arka plan renginin koyu olması durumunda bile çok iyi sonuç vermektedir. Ortamın çok karanlık olması gerekmez. Aynı yüzeye birkaç kez uygulanabilmektedir (Watkins ve Ark. A 2006).



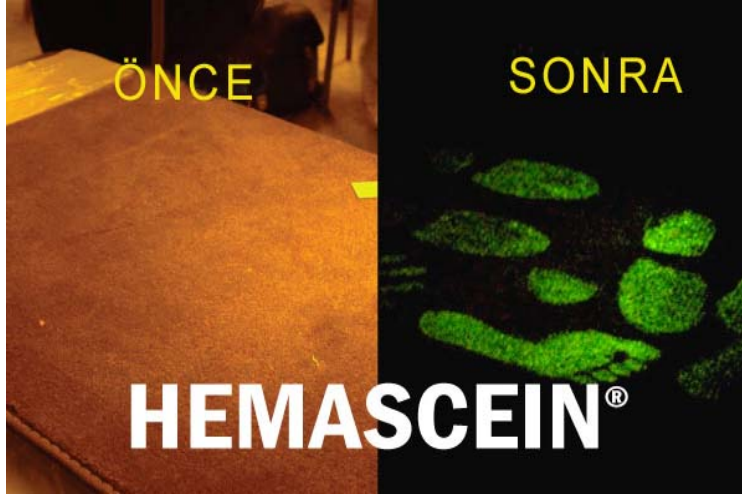
Şekil 2.9. Banyo küvetindeki silinmiş kana bluestar uygulaması yapılarak görünür hale getirilmesi.

2.3.2.6. Hemascein

Hemascein floresans tabanlı bir reaktiftir. Hemascein uygulanmış yüzey üzerine kuvvetli mavi ışık kaynağı uygulandığında, yeşil ışık yayar. Bu reaktifin en büyük avantajlarından biri uzun raf ömrüne sahip olmasıdır. Buzdolabı sıcaklığında birkaç ay muhafaza edilebilir. Diğer test kitlerinden bir farkı da yanmış kan lekeleri üzerinde daha etkin kullanılabilmesidir. Yanmış kan lekesi üzerinde de etkili olarak kullanılabilmektedir (Bilous ve Ark. 2010).



Şekil 2.10. Yanmış kan lekesi üzerine uygulanan test kitlerinin zamana karşı ışık şiddetlerinin grafiği.



Şekil 2.11. Olay yerinde silinmiş kana hemascein uygulaması yapılarak görünür hale getirilmesi.

Barksdale (2009) tarafından şekil 2.12' de verilen veriler bildirilmiştir.

<u>LUMİNOL</u>	<u>BLUESTAR</u>	<u>HEMASCEİN</u>
<ul style="list-style-type: none">➤ Hazırlanması zaman almaktadır.➤ Yüksek hassasiyete sahiptir.➤ Işık emisyon süresi kısadır.➤ Karanlık bir ortam gerekmektedir.➤ İnsan sağlığına zararlıdır.	<ul style="list-style-type: none">➤ Luminolün bir türevidir.➤ Yüksek hassasiyete sahiptir.➤ İnsan sağlığına zararı luminole göre daha azdır.➤ Karanlık bir ortam gerekmektedir.➤ Raf ömrü kısadır.	<ul style="list-style-type: none">➤ Hazırlanması kolaydır.➤ Çok az karanlık bir ortam yeterlidir.➤ Işık emisyon süresi çok uzundur.➤ Raf ömrü uzundur.➤ Düşük hassasiyete sahiptir.

Şekil 2.12. Silinmiş kan lekesi için kullanılan test kitlerinin avantaj ve dezavantajları.

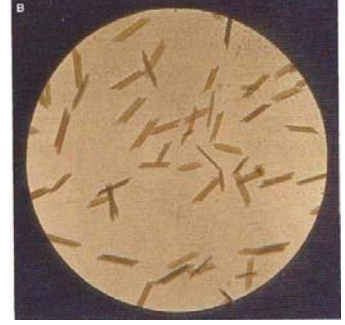
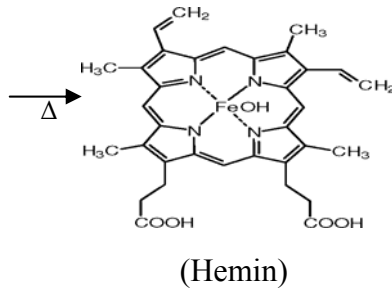
2.3.3. Onay testi (lekenin kan olduğunun kesinleştirilmesi)

Olay yerinde bulunan lekenin kan olup olmadığının kesinleştirilmesi için en çok kullanılan testler Teichman ve Takayama testleridir.

2.3.3.1. Teichman testi

- Küçük miktarda kan mikroskop lamına alınır.
- Klorid ve asetik asit eklenir.
- Kristaller mikroskopla incelenir (Stuart ve Ark. 2005).

HEMOGLOBİN
KLORİD
HOAC

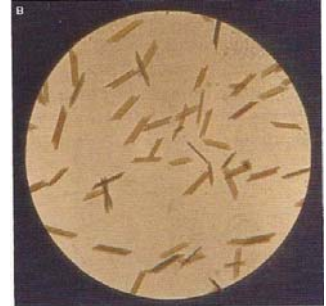
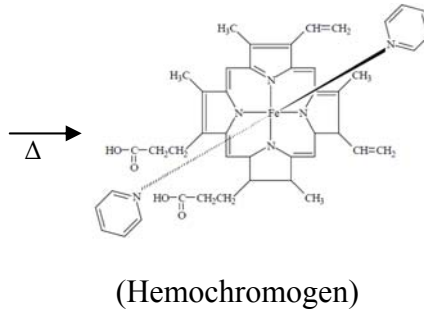


Şekil 2.13. Teichman testi ve kanın mikroskopta görünümü.

2.3.3.2. Takayama testi

- Küçük miktarda kan mikroskop lamına alınır.
- Sodyum Hidroksit ve Piridin eklenir.
- Kristaller mikroskopla incelenir (Stuart ve Ark. 2005).

HEMOGLOBİN
NaOH
GLUKOZ
PYRİDİNE

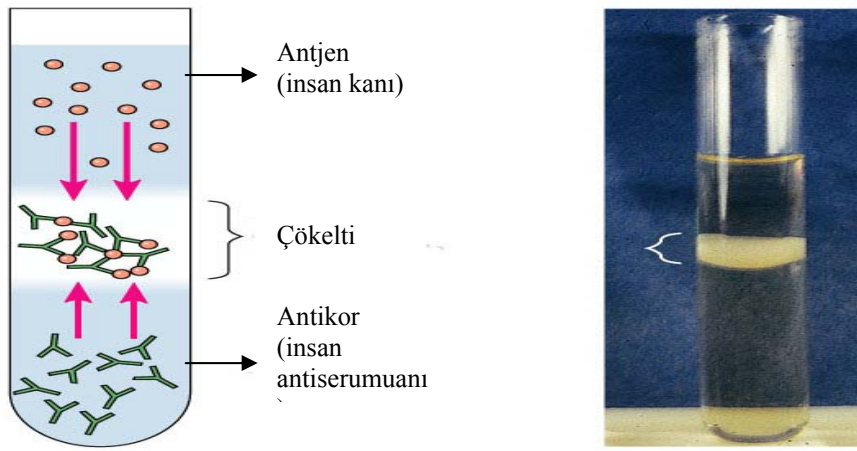


Şekil 2.14. Takayama testi ve kanın mikroskopta görünümü.

2.3.4. Kanın kökeninin belirlenmesi (insan kanı mıdır?)

2.3.4.1. Çökeltme testi

Tavşana insan kanı enjekte edildiğinde tavşan insan kanına karşı antikor üretir. Tavşandan elde edilen bu antikorlar olay yerinden elde edilen bir kanın insan kanı olup olmadığının araştırılmasında kullanılır. Bir tüpün içerisine tavşandan elde edilen insan antikoru konur. Daha sonra bunun üzerine olay yerinden elde edilmiş kan konur. Eğer kan insan kanı ise antijen ve antikor arasında bir çökelti oluşur (Yang 2011).



Şekil 2.15. Olay yerinden elde edilen kanın insan kanı olduğunun çökeltme testi ile belirlenmesi.

2.3.5. Kanın kimliklendirilmesi (Kan kime ait dir?)

Kan analizlerinde bulunan kanın insana ait olduğunu bulduktan sonra kime ait olduğunu bulmanın adli kimyada önemi büyüktür. Bunun için de DNA'nın analizi yapılmalıdır. DNA analizi yapmak için olay yerinden, mağdur ve sanıktan biyolojik örnekler alınır. Bu örneklerden DNA izole edilir (Anonim 2010).

2.4. DNA ve DNA Analizi

2.4.1 Nükleik asitler

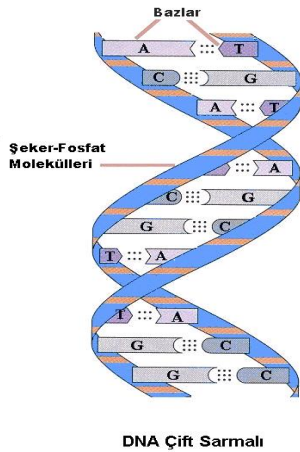
Nükleik asitler, ilk kez İsviçre’li bir bilim adamı olan Friederic Mischer tarafından 1869 yılında tanımlanmıştır. İrin içindeki akyuvarlarda proteinlerden ayrı olarak, asit karakterlerde kimi maddelerin varlığını saptayan araştırmacı, bunlara nüklein adını vermiştir. Benzer konularda incelemelerini sürdüren diğer bir bilim adamı Richard Altman (1889), asit karakterleri nedeniyle nükleinleri “nükleik asit” olarak adlandırmıştır. Daha sonra bir Alman kimyacı olan Robert Fuelgen (1920), nükleik asitleri, kendi adı ile anılan spesifik bir boyama yöntemi (Fuelgen) ile boyamayı başarmış, aynı dönemde Rockefeller Enstitüsünde Phoebus Levine, nükleik asitlerin yapısında beş karbonlu bir şeker olan pentozun bulunduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmalardan sonra 1953 yılında Watson ve Crick DNA materyalinin çift sarmallı bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymuş ve yine yapılan araştırmalar sonunda nükleik asitlerin yapısına ilişkin çok değerli bilgiler edilmiştir.

Canlılarda iki türlü nükleik asit bulunmaktadır. Bunlar;

- Deoksiribonükleik asit (DNA) ve
- Ribonükleik asit (RNA) dır (Solak 2006).

2.4.1.1. DNA (Deoksiribonükleik asit)



Şekil 2.16. DNA'nın yapısı.

Nükleik asitlerin ilk türü olan Deoksiribonükleik asit çift dallı bir yapıya sahip olan bu molekülde üç temel yapı taşı bulunmaktadır. Bunlar;

- Organik bazlar (pürin ve pirimidin bazları),
- 5 karbonlu şeker olan pentoz,
- Fosforik asit molekülüdür (Solak 2006).

2.4.1.1.1. Organik bazlar

DNA'da iki çeşit organik baz bulunmaktadır. Bunlar;

- Pürin bazları,
- Pirimidin bazlarıdır.

Pürin bazları; DNA'da iki tür pürin bazı bulunur. Bunların biri adenin, diğeri guanindir. Bu bazlar pirimidin türevi olarak kabul edilirler. Pürin bazlarında biri pirimidin, diğeri ise buna birleşmiş olarak 5 atomlu bir imidazol halkası bulunur (Solak 2006).

Pirimidin bazlar; DNA'da iki tip pirimidin bazı bulunmaktadır. Bunlar sitozin ve timin'dir. Bu bazlar, dört karbon ve iki nitrojenden oluşmuş tek halkalı temel bir yapı özelliği gösterir. Bu yapının serbest uçlarına kimi atom ve atom grupları bağlanarak pirimidinler oluşur (Solak 2006).

2.4.1.1.2. 5 karbonlu pentoz şekeri

DNA'nın yapısında bulunan önemli bir moleküldür. Bu şekerin ikinci pozisyonunda bulunan karbon atomuna bağlı oksijen olmadığından 2-deoksi-D-riboz olarak adlandırılır. Bu nedenle de, bu nükleik asit türüne deoksiribonükleik asit denmektedir.

2.4.1.1.3. Fosfat molekülü

Nükleik asitlerin yapısında bulunan üçüncü yapı taşı fosfat molekülü (H_3PO_4) olup, hem DNA ve hem de RNA'da bulunmaktadır (Solak 2006).

2.4.2 DNA profillemesi (DNA Testi)

DNA profillemesi, insanların DNA profillerine dayanarak onların kimliklerinin tespitini kolaylaştırmak için kullanılan bir tekniktir. DNA profilleri, kişinin DNA'sına karşılık gelen şifrelenmiş numara dizileridir, bunlar kişinin kimlik belirteci olarak da kullanılabilir.

Her insandaki DNA dizilerinin %99,9'u aynı ise, iki kişinin ayırt edilmesine yetecek kadar DNA farklılığı vardır. DNA profillemesi, kişiden kişiye çok değişkenlik gösteren, genomda tekrar eden dizileri kullanır. Bu diziler değişken sayılı bitişik tekrarlar (İngilizce variable number tandem repeats veya VNTR) olarak adlandırılır. VNTR lokusları, yakın akrabalık ilişkisi olan kişilerde birbirlerine çok benzemektedir.

DNA profillemesi tekniği ilk olarak 1985'te Leicester Üniversitesinden Sir Alec Jeffreys tarafından yayınlanmıştır.

İşlem, kişinin DNA'sından bir örnek almakla başlar. Biyolojik akrabalarından elde edilen örnekler kişinin profili hakkında bilgi verir.

Örnek DNA profileme yöntemlerinden biri ile analiz edilerek kişinin DNA profili elde edilir. DNA profili sonra başka bir örneğinki ile karşılaştırılarak genetik bir eşleşme olup olmadığı belirlenir.

DNA profillemesi yöntemleri

- RFLP analizi
- PCR analizi
- STR analizi
- AmpFLP
- Y kromozom analizi
- Mitokondri analizi (Anonim 2013a).

2.4.2.1 RFLP analizi

Restriksiyon enzimleri (RE), çok özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden keserek genellikle 1.000-20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. DNA'nın bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe "restriction fragment length polymorphism, RFLP" adı verilir.

Yöntem dört temel adımda gerçekleştirilmektedir. Bunlar; DNA'nın izolasyonu, DNA'nın RE ile kesimi, kesilen DNA'nın elektroforezi ve en son aşamada ise jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesidir (Yağcı 2009).

2.4.2.2 PCR analizi

Laboratuvar ortamında spesifik DNA dizilerinin; primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla çoğaltılması işlemidir. Standart bir PCR protokolü yoktur. Bileşenler çoğaltılacak DNA bölgesinin özelliklerine göre değişir.

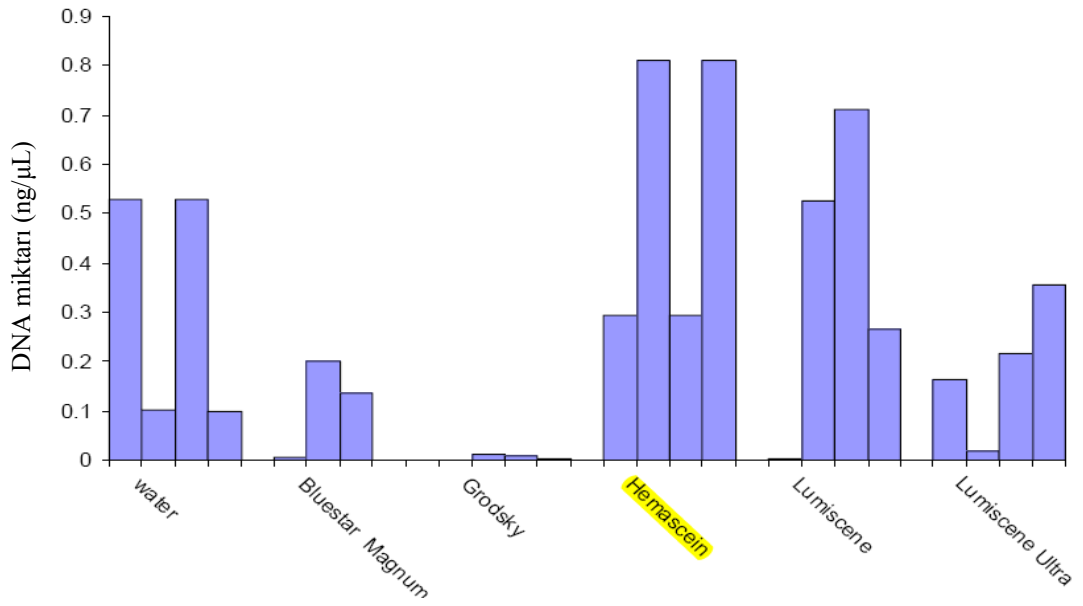
Klasik PCR analizinde hedef DNA dizisinin her iki ucuna özgü spesifik primerler kullanılarak termostabil DNA polimeraz yardımıyla uygulanan PCR çeşididir. Daha sonraki analizler için döngü sayısına göre üstel oranda artan düzeyde ürün elde edilir (Çaphan 2007).

2.4.2.3 STR analizi

Günümüzde kullanılan DNA profillemesi PCR ve kısa bitişik tekrarlarla (İng. short tandem repeats veya STR) dayalıdır. Bu yöntemde kısa tekrar eden DNA dizilerine sahip, son derece polimorfik bölgelere bakılır (en yaygın olarak tekrar eden 4 bazlı bölgelere bakılır ama 3, 5 ve başka sayıda baz tekrarları da kullanılır). Akraba olmayan kişilerde bu tekrar eden birimlerden farklı sayılarda olduğu için, bu DNA bölgeleri birbirlerine akraba olmayan kişilerin ayırt edilmesinde kullanılabilir. Bu STR lokusları (konumları) dizi-spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Elde edilen DNA parçaları sonra elektroforez ile ayrıştırılır ve tespit edilir (Anonim 2013a).

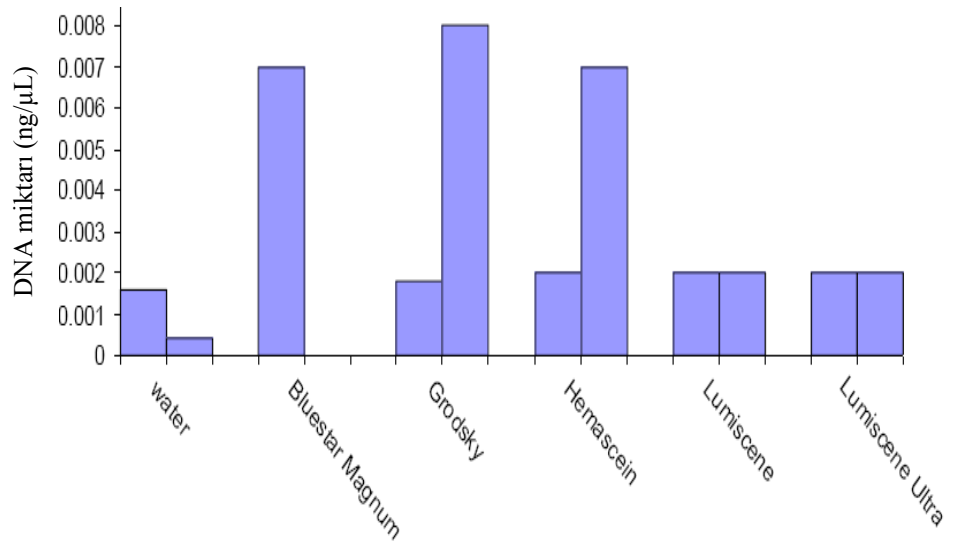
2.5. Kan Tespitinde Kullanılan Olası Kan Testi Kimyasallarının DNA Üzerine Etkisi

Cheyne (2011) 1:10 ve 1:100 oranında seyreltilmiş insan kanı üzerine olası kan testi kitlerini uyguladıktan sonra PCR ile DNA miktarını ölçtüğünü ve şekil 2.17 ve şekil 2.18' de gösterilen sonuçları elde ettiğini bildirmiştir.



Şekil 2.17: 1:10 oranında seyreltilmiş kanda olası kan testlerinin DNA üzerine etkisi.

1:10 oranında seyreltilmiş kanda yapılan araştırmada; tüm su, Hemoscein, Lumiscene ve Lumiscene ultra sonrası DNA ölçülebilmüş, Bulestar'ın bir örneğinde ve Grodsky örneklerinde DNA tespit edilememiştir.



Şekil 2.18. 1:100 oranında seyreltilmiş kanda olası kan testlerinin DNA üzerine etkisi.

1:100 oranında seyreltilmiş kanda yapılan araştırmada; tüm örneklerde çok düşük miktarda DNA tespit edilmiş, Hemoscein, Bulestar ve Grodsky' nin bir örneğinde diğerlerine göre daha yüksek DNA tespit edilememiştir.

2.5.1. Hidrojen peroksitin (H_2O_2) DNA üzerine etkisi

Moleküler oksijenin indirgenmesi sırasında oluşan ürünlere “reaktif oksijen türevleri” (ROS) denir. DNA ile hidroksil radikallerinin etkileşimi durumunda radikallerin % 80’i bazlara eklenir ve %20’den daha az bir kısmı da şeker grubundan bir hidrojen atomu alır. DNA’da tüm pürin ve pirimidin bazları arasında guanin oksidasyona daha çok yatkındır.

ROS’un DNA’da oluşturduğu ürünlerin kimyasal karakterini ve miktarını belirlemek için, immünokimyasal teknikler, ^{32}P postbeling ölçüm teknikleri, NMR spektroskopisi, gaz kromatografi (GC), yüksek basınçlı likit kromatografi (HPLC) ile radyoaktivite, absorbans ve elektrokimyasal belirleme yöntemleri gibi değişik analitik yöntemler geniş biçimde kullanılmaktadır.

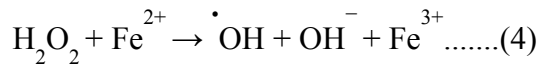
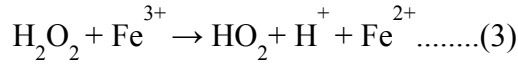
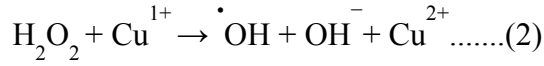
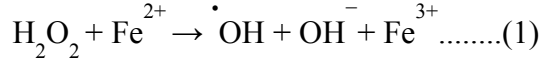
Oksijen dört elektron alarak tümüyle indirgendiğinde su oluşur. Eğer ardı ardına bir elektron indirgenmesine uğrarsa biyolojik sistemlere zarar veren reaktif türevler oluşur. Hidrojen peroksit kuvvetli bir oksitleyici ajandır. Yavaş olarak reaksiyon verme eğilimindedir. Hidrojen peroksit, süperoksit dismutasyonu sırasında ya da oksijenin doğrudan indirgenmesiyle oluşur. H_2O_2 güçlü hidroksil radikallerini oluşturan Haber-Weiss reaksiyonunda substrat olarak yer alır. Hidrojen peroksit bir radikal değildir ancak aktivitesi ve etkisi bakımından radikallere benzer.

Hidroksil radikalleri en reaktif serbest radikallerdir ve vücuttaki serbest radikal hasarının en önemli sorumlularıdır. Hidroksil radikalleri, demir gibi metal iyonlar varlığında süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin reaksiyona girmesiyle oluşturulur. DNA’nın pürin ve pirimidin bazlarıyla etkileşime girer. DNA ile hidroksil radikallerinin etkileşimi durumunda radikallerin %80’i bazlara eklenir ve %20’den az kısmı da şeker grubundan bir hidrojen atomu alır.

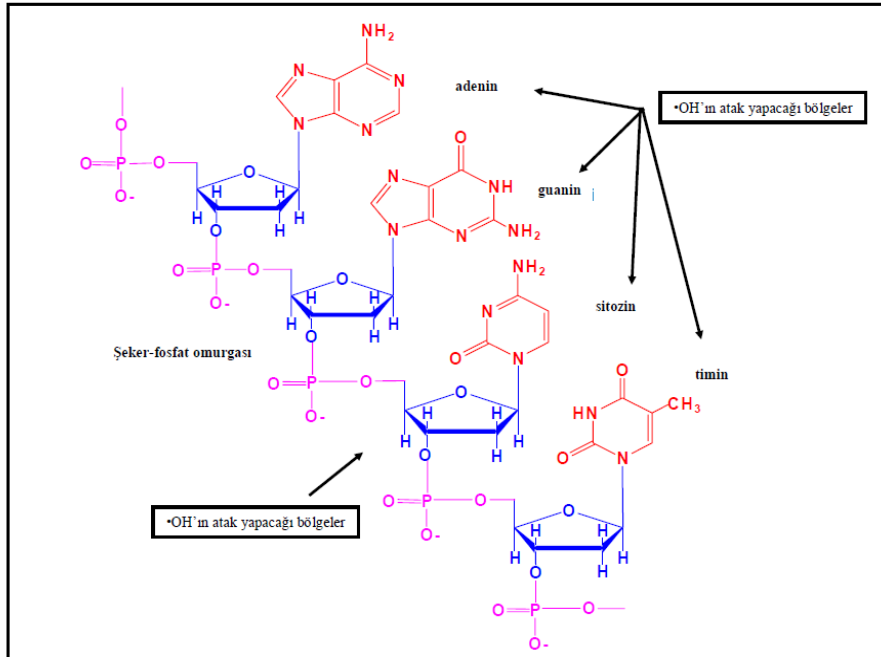
Hidroksil radikalleri hasar yapar. Süperoksit ve hidrojen peroksit ise doğrudan DNA’ da hasar yapmaz. Süperoksit radikali, hücreiçi demir depolarından demiri serbest hale getirir. Ferritin +3 değerlikli demir içerir ve süperoksit bunu +2 değerlikli demire dönüştürerek serbest hale gelmesini sağlar. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss reaksiyonu gibi demir bağımlı olan radikal üreten reaksiyonlarda kullanılabilir.

O_2^{*-} ve H_2O_2 , Fe ve Cu gibi geçiş metallere varlığında, güçlü bir reaktif olan $\cdot OH$ üretimine katkıda bulunur.

1 ve 2 numaralı reaksiyonlar demir/bakır katalizli Haber-Weiss reaksiyonları, 3 ve 4 numaralı reaksiyonlar ise Fenton reaksiyonları olarak adlandırılmaktadır.



H_2O_2 nükleusta Fe iyonları ile reaksiyona girerek hidroksil radikallerini oluştururlar. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyon durumundadır. $Fe^{+2/+3}$ iyonları negatif yüklü DNA ya sürekli bağlı bulunurlar Bu bağlanma ile DNA'yı H_2O_2 in hedefi haline getirirler (Altuntaş 2007).



Şekil 2.19. Hidroksil radikalinin atak yapacağı bölgeler.

2.5.2. Genetik toksikoloji testleri ve luminolün toksisite etkisi

Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir ve çeşitli ajanların ortaya çıkardığı genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Genetik toksisite ya da genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploidi gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır.

Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğunun gösterilmesi, genotoksisite testlerinin endüstri kuruluşları tarafından kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur (Atlı ve Ark. 2011).

2.5.2.1. Genetik toksisite testleri

Genetik sistemler ile genotoksisitesi test edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve mutajenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart in vitro ve in vivo mutajenite testleri; Ames testi, Comet testi, Kromozom anormallikleri (KA) testi, Kardeş kromatit değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testidir (Şekeroğlu ve Ark. 2011).

2.5.2.2 Luminolün toksisite etkisi

Luminol dünya çapında yaygın olarak kullanılmasına rağmen sağlık kaygıları nedeniyle bazı Avrupa ülkelerinde kısıtlı olarak kullanılmaktadır. Fareler üzerinde yapılan bir araştırmada, farelere 1,5-5 mg luminol enjekte edilmiş ve her hangi bir yan etkisine rastlanılmamıştır. Köpekler üzerinde yapılan araştırmada ise köpeklere 2,5 mg luminol enjekte edilmiş ve idrar ve sodyum atılımının arttığı, kan basıncının düştüğü gözlemlenmiştir. (Irie ve ark. 1960-1970)

Luminolün insanlar üzerindeki toksikolojik etkileri üzerine literatürde çok fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Entegre labortuvar sistemlerinin 1997 yaptığı bir çalışmada

luminolün insanlar üzerinde yapılan klinik denemelerde her hangi bir yan etkisinin bulunmadığı belirtilmiş (Tice 1997) ancak laboratuvar ortamında yapılan çalışmalar luminolün insan serum albumine bağlandığı tespit edilmiştir (Buturlakin ve ark. 1975).

Laboratuvar ortamında Hamster hücreleri ile yapılan çalışmalar, luminolün DNA üzerine etkisinin laboratuvarlarda ve evde rutin olarak kullanılan (klorofom, asetik asit ve sakarin gibi) diğer kimyasallardan farklı olmadığını göstermiştir. (Lee-Chen ve Ark. 1994) Kan araştırmalarında kullanılan luminolün DNA'ya zarar vermesinin nedeni Luminolün etkisinden çok, luminol çözeltisi içinde bulunan alkali ve yükseltgen kimyasallardan kaynaklanmaktadır (Larkin ve Ark. 2007).

2.6. Kemilüminesans

Floresans ve fosforesans, uyarılmanın fotonların absorpsiyonu ile olması bakımından benzerdirler. Bunun bir sonucu olarak, bu iki olay, sıklıkla daha genel bir terim olan fotolüminesans ile ifade edilir. Floresans, floresanstan sorumlu elektronik enerji aktarımının elektronun spininde bir değişiklik oluşturmaması ile fosforesanstan ayrılır.

Lüminesansın üçüncü tipi olan kemilüminesans, bir kimyasal reaksiyon sonucu oluşan uyarılmış bir türün emisyon spektrumuna dayanır. Bazı durumlarda, uyarılmış tür, analit ve uygun bir reaktif (ozon veya hidrojen peroksit gibi kuvvetli bir yükseltgen) arasındaki bir reaksiyonun ürünüdür. Bu durumda sonuç, analitin kendisinden çok, analitin veya reaktifin yükseltgenme ürününün karakteristik bir spektrumudur. Diğer durumlarda, analit kemilüminesans reaksiyonunda doğrudan yer almaz; bunun yerine, analitin bir kemilüminesans reaksiyonuna olan yavaşlatıcı veya katalitik etkisi analitik parametre olarak iş görür. Kemilüminesansın analitik kimyaya uygulanması bağlı olarak son yıllarda gelişmiştir (Anonim 2012b).

2.6.1. Kemilüminesans reaksiyonları

Bir kimyasal reaksiyon, temel haline dönerken, ışık yayan veya enerjisini daha sonra emisyon yapacak başka bir türe aktaran, elektronik olarak uyarılmış bir tür verdiği zaman kemilüminesans meydana gelir.

- $A + B \rightarrow C^* + D$
- $C^* \rightarrow C + h\lambda$

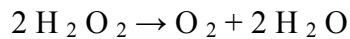
Kemilüminesans ölçmeleri için cihaz, oldukça basittir ve sadece uygun bir reaksiyon kabı ve bir fotoçoğaltıcı tüpten ibaret olabilir; Genel olarak, tek ışın kaynağı, analit ile reaktif arasındaki kimyasal reaksiyon olduğundan, dalga boyu seçici cihazına gerek yoktur (Anonim 2012b).



Şekil 2.20. Kemilüminesans olayı.

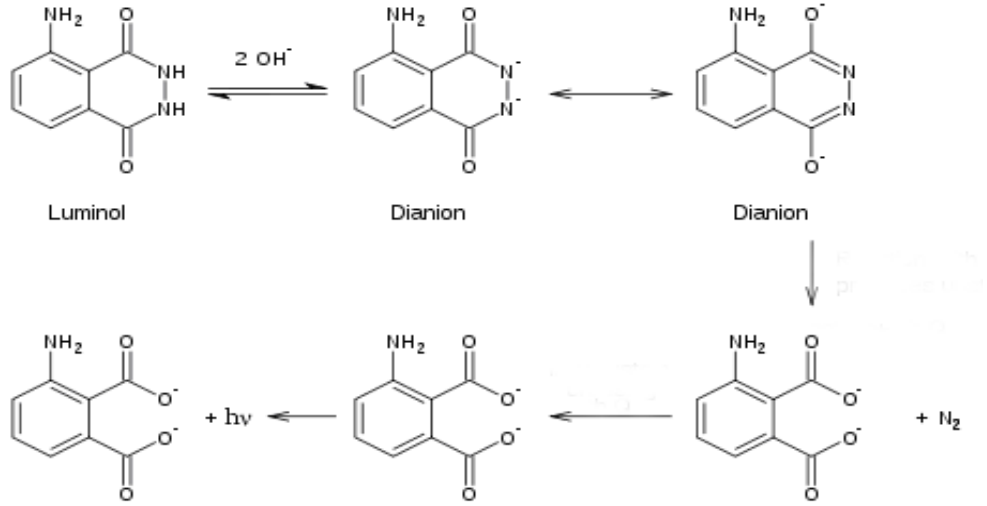
2.6.2. Luminol ve kemilüminesans

Luminolün, lüminesans sergilemesi için, ilk önce luminolün bir oksitleyici ile aktive edilmesi gerekmektedir. Genellikle hidrojen peroksit çözeltisi (H_2O_2) aktivatör olarak kullanılır. Demir bileşiğinin katalizörlüğünde hidrojen peroksit, oksijen ve su oluşturacak şekilde ayrıştırılır:



Laboratuvar ortamında, katalizör olarak genellikle potasyum ferrisiyanür kullanılmaktadır. Kanın adli tespitinde ise, katalizör olarak hemoglobinde bulunan demir kullanılmaktadır.

Luminol, hidroksit tuzu ile reaksiyona girerek bir dianyon oluşturur. Hidrojen peroksitten elde edilen oksijen daha sonra luminol dianyon ile reaksiyona girer. Bu tepkime ürünü bir organik peroksittir. Son derece kararsızdır ve azot kaybı olur. Elektronlar uyarılmış halden temel hale geçerek enerji yayarlar. Bu enerji yayımı mavi ışık şeklindedir (Anonim 2013b).



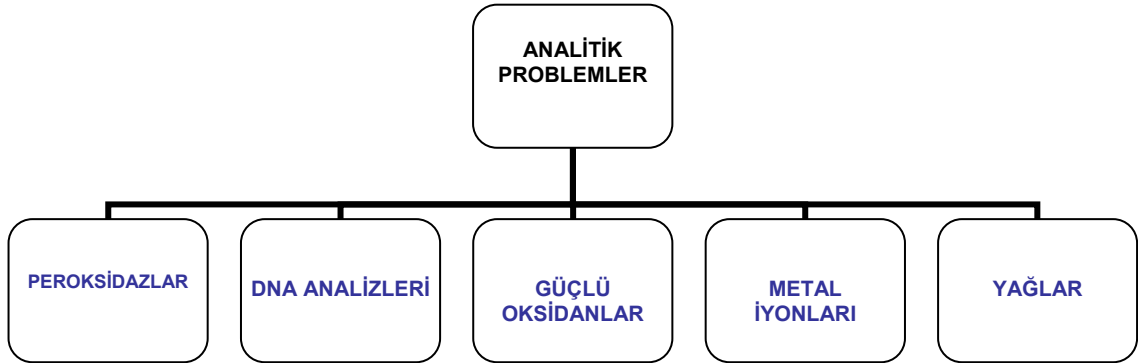
Şekil 2.21. Luminolün kemiluminesans reaksiyonu.

2.6.3. Analitik problemler (Girişim Sorunları)

Kan araştırmalarındaki en büyük sorunlar;

- Ortamda kan olmadığı halde, kan testi kitlerinin ortamda bulunabilen bazı maddelerle reaksiyona girerek kan olduğu izlenimi vermesi

DNA'nın bozulmasıdır (Barksdale 2009).



Şekil 2.22. Silinmiş kan ve Gözle görülen kan testi kitlerinde karşılaşılan analitik problemler.

2.6.3.1. Silinmiş kan testi kitleri için girişim sorunları

Kan araştırmalarında hatalı sonuçlar elde edilmesine neden olan en önemli etkenler peroksidazlardır. Peroksidazlar, birçok biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir. Peroksidaz enzimi, hidrojen peroksitten oksijeni ayırır ve kan testi

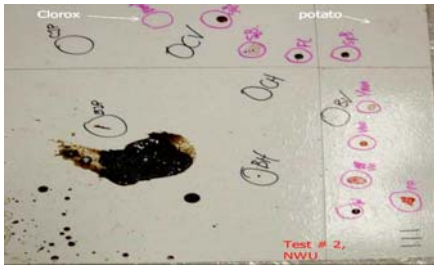
kitlerinin oksitlenerek renk değiştirmesine sebep olurlar. Peroksidaz, sütte doğal olarak bulunan enzimlerden bir tanesidir (Barksdale 2009).

<u>LUMİNOL</u>	<u>BLUESTAR</u>	<u>HEMASCEİN</u>
<ul style="list-style-type: none">➤ Güçlü oksidanlar (bakır sülfat, demir sülfat, nikel klorür)➤ Bazı metal iyonları➤ Peroksidazlar	<ul style="list-style-type: none">➤ Patates, domates, kırmızı soğan, börölce, yabanturpu➤ Askorbik asit, bakır sülfat, demir sülfat, nikel klorür	<ul style="list-style-type: none">➤ Patates➤ Yağlar

şekil 2.23. Silinmiş kan testi kitlerinde hatalı sonuçlara neden olan materyaller.



şekil 2.24. Süt ve luminolun kemiluminesans görüntüsü.



şekil 2.25. Patates ve hemasceinin kemiluminesans görüntüsü.

2.6.4. Olası kan testi kitleri için yüzey girişim etkisi

Gross ve ark. (1999) olası test kitlerini (fenolftalein, tetrametilbenzidin ve luminol) değişik yüzeyler kullandıklarını ve çizelge 2.3' de gösterilen sonuçları elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çizelge 2.3. Olası test kitlerinin değişik yüzeylere uygulanması.

YÜZEY	UYGULAMA	FENOLFTALEİN			TETRAMETİLBENZİDİN		
		Ö	E	S	Ö	E	S
HALI	YIKAMADAN	+	+	+	+	+	+
	SU İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
	SU VE SABUN İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
	%10'LUK ÇAMAŞIR SUYU İLE YIKAMA	+	+	ZAYIF	-	-	-
KARO	YIKAMADAN	+	+	+	+	+	+
	SU İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
	SU VE SABUN İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
	%10'LUK ÇAMAŞIR SUYU İLE YIKAMA	+	-	-	ZAYIF	-	-
İŞLENMEMİŞ AHŞAP	YIKAMADAN	+	+	+	+	+	+
	SU İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
	SU VE SABUN İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
	%10'LUK ÇAMAŞIR SUYU İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
VERNİKLİ AHŞAP	YIKAMADAN	+	+	+	+	+	+
	SU İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
	SU VE SABUN İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
	%10'LUK ÇAMAŞIR SUYU İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
BETON	YIKAMADAN	+	+	+	+	+	+
	SU İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
	SU VE SABUN İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+
	%10'LUK ÇAMAŞIR SUYU İLE YIKAMA	+	+	+	+	+	+

*Luminol uygulamasından önce

*Luminol uygulamasından sonra

*Luminol kurduktan sonra

* (+) Işıma gözlenmekte

* (-) ışımaya gözlenmemekte

Bu çalışma olası test kitleri ile yapılan uygulamalara yüzeyin etkili olduğunu göstermektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihaz ve malzemeler

3.1.1.1. CCD kameralı UV kabin

Bu çalışmada, CCD kameralı UV kabin kullanıldı. Çalışmada kullanılan CCD kameralı UV kabin cihazı Şekil 3.1.'de görülmektedir.



Şekil 3.1. CCD kameralı UV kabin Cihazı.

3.1.1.2. Analitik terazi

Radwag AS 220 C/2 model, kalibrasyonu yapılmış, elektronik, $\pm 0,0001$ g hassasiyet ile tartım yapabilen terazi kullanıldı.

3.1.1.3. Etüv

Numunelerin kurutulması için Müve Sterilizer FN 055 marka etüv kullanıldı.

3.1.1.4. Ultrasonik su banyosu

Çözeltilerin hazırlanmasında ve numune hazırlama işlemlerinde Cleanex marka Ultrasonik Yıkama cihazı kullanıldı.

3.1.1.5. Mikropipetler

Çalışmada Volac marka 50 ve 100 μ L aralığındaki pipetler kullanıldı.

3.1.1.6. DNA Analizleri

DNA'ya verilen zararın ölçülmesinde BIO RAD elektroforez cihazı kullanıldı.

3.1.2. Reaktifler, çözeltiler ve hazırlanmaları

3.1.2.1. Olası kan testlerinin hazırlanması

3.1.2.1.1. Luminolun hazırlanılmasında kullanılan çözeltiler

a) Farklı konsantrasyonlarda luminol çözeltisi hazırlamak için; 100 mL 10^{-3} mol/L luminol (Sigma Aldrich) çözeltisi, 100 mL 0,02 mol/L NaOH (Merck) çözeltisi, 100 mL 0,1 mol/L H_2O_2 (Merck) çözeltisi hazırlandı. Çözeltiler her analiz için taze olarak hazırlandı.

b) Weber'e göre hazırlanan luminol çözeltisi;

Çözelti A: 8 g NaOH (Merck) 500 ml saf su içerisinde çözüldü.

Çözelti B: 10 ml %30' luk H_2O_2 (Merck) alındı ve üzerine 490 ml saf su eklendi.

Çözelti C: 0,354 g luminol (Sigma Aldrich) üzerine 62,5 ml çözelti A eklendi. Bu çözelti saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

10ml çözelti A+10 ml çözelti B ve 10 ml çözelti C ve 70 ml saf su ile Weber luminol hazırlandı.

3.1.2.1.2. Hemasceinin hazırlanılması

Hemascein kiti iki farklı çözelti halinde hazırlandı. 1. çözelti hemascein ve saf su kullanılarak hazırlandı. 2. çözelti ise % 30'luk H_2O_2 çözeltisinden % 3' lük H_2O_2 çözeltisi hazırlandı.

3.1.2.1.3. Bulestarın hazırlanılması

1 tablet bulestar 500 ml saf su içerisinde 1-2 dakika çok yavaş çalkalanarak hazırlandı.

3.1.2.2. Stok çözeltiler

a) HNO_3 (Merck) stok çözeltisi; % 65' lik HNO_3 çözeltisinden 100 mL 0.1 mol/L 'lik HNO_3 stok çözeltisi hazırlandı. Daha düşük derişimdeki standart çözeltiler bu ara stok çözelti kullanılarak günlük olarak hazırlandı.

b) HCl (Merck) stok çözeltisi; % 37' lik HCl çözeltisinden 100 mL 0.1 mol/L 'lik HCl stok çözeltisi hazırlandı. Daha düşük derişimdeki standart çözeltiler bu ara stok çözelti kullanılarak günlük olarak hazırlandı.

c) NaBrO₃ (Merck) stok çözeltisi; 100 mL 0.1 mol/L 'lik NaBrO₃ stok çözeltisi hazırlandı. Daha düşük derişimdeki standart çözeltiler bu ara stok çözelti kullanılarak günlük olarak hazırlandı.

ç) KI (Merck) stok çözeltisi; 100 mL 0.1 mol/L 'lik KI stok çözeltisi hazırlandı. Daha düşük derişimdeki standart çözeltiler bu ara stok çözelti kullanılarak günlük olarak hazırlandı.

d) CuSO₄ (Merck) stok çözeltisi; 100 mL 0.1 mol/L 'lik CuSO₄ stok çözeltisi hazırlandı. Daha düşük derişimdeki standart çözeltiler bu ara stok çözelti kullanılarak günlük olarak hazırlandı.

e) Na₂S₂O₈ (Merck) stok çözeltisi; 100 mL 0.1 mol/L 'lik Na₂S₂O₈ stok çözeltisi hazırlandı. Daha düşük derişimdeki standart çözeltiler bu ara stok çözelti kullanılarak günlük olarak hazırlandı.

f) K₂S₂O₈ (Merck) stok çözeltisi; 100 mL 0.1 mol/L 'lik Na₂S₂O₈ stok çözeltisi hazırlandı. Daha düşük derişimdeki standart çözeltiler bu ara stok çözelti kullanılarak günlük olarak hazırlandı.

3.1.2.3. Günlük olarak hazırlanan çözeltiler

a) H₂O₂ (Merck) çözeltisi; 100 mL 0,1 mol/L H₂O₂ çözeltisi günlük hazırlandı. Daha düşük derişimdeki standart çözeltiler bu çözelti kullanılarak günlük olarak hazırlandı.

b) NaOH (Merck) çözeltisi; 100 mL 0,02 mol/L NaOH (Merck) günlük hazırlandı.

3.1.2.4. Temizleme amaçlı kullanılan çözeltiler

Kirli cam ve plastik malzemelerin temizlenmesi amacıyla %0,1 HNO₃ çözeltisi hazırlandı. Kirli malzemeler önce su ile bolca çalkalanıp, asit banyosunda bekletildi. Asit banyosundan çıkarılan malzemeler saf su ile en az beş kez çalkalanarak kurumaya bırakıldı.

3.1.2.5. Kullanılan örnekler

Kan numuneleri pıhtılaşmaması için saf su ile (1/100) seyreltme yapılarak kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin hazırlanması

1/100 oranında seyreltilmiş kan model mikropate üzerine 12,5 µL, 25 µL ve 50 µL damlatılarak örnekler hazırlandı.

3.2.2. Reaktiflerin en uygun çalışma koşulları

3.2.2.1. Süreye bağlı olarak (insan kanı kullanılarak) en uygun reaktif miktarlarının belirlenmesi

Kan 1/100 oranında seyreltilerek kullanıldı. Solüsyonların Hazırlanması: NaOH 0,02 mol/L hazırlandı ve solüsyonların hepsinde derişimi sabit tutuldu. 5 adet 10^{-3} mol/L luminol çözeltisi, 5 adet 10^{-4} mol/L luminol çözeltisi ve 5 adet 10^{-5} mol/L luminol çözeltisi hazırlandı. 10^{-2} - 10^{-6} mol/L H_2O_2 hazırlandı. Luminol ve H_2O_2 1:1 oranında sırası ile eklenerek 15 adet solüsyon hazırlandı.

Solüsyon1: 10^{-2} mol/L H_2O_2 ve 10^{-3} mol/L luminol

Solüsyon2: 10^{-3} mol/L H_2O_2 ve 10^{-3} mol/L luminol

Solüsyon3: 10^{-4} mol/L H_2O_2 ve 10^{-3} mol/L luminol

Solüsyon4: 10^{-5} mol/L H_2O_2 ve 10^{-3} mol/L luminol

Solüsyon5: 10^{-6} mol/L H_2O_2 ve 10^{-3} mol/L luminol

Solüsyon6: 10^{-2} mol/L H_2O_2 ve 10^{-4} mol/L luminol

Solüsyon7: 10^{-3} mol/L H_2O_2 ve 10^{-4} mol/L luminol

Solüsyon8: 10^{-4} mol/L H_2O_2 ve 10^{-4} mol/L luminol

Solüsyon9: 10^{-5} mol/L H_2O_2 ve 10^{-4} mol/L luminol

Solüsyon10: 10^{-6} mol/L H_2O_2 ve 10^{-4} mol/L luminol

Solüsyon11: 10^{-2} mol/L H_2O_2 ve 10^{-5} mol/L luminol

Solüsyon12: 10^{-3} mol/L H_2O_2 ve 10^{-5} mol/L luminol

Solüsyon13: 10^{-4} mol/L H_2O_2 ve 10^{-5} mol/L luminol

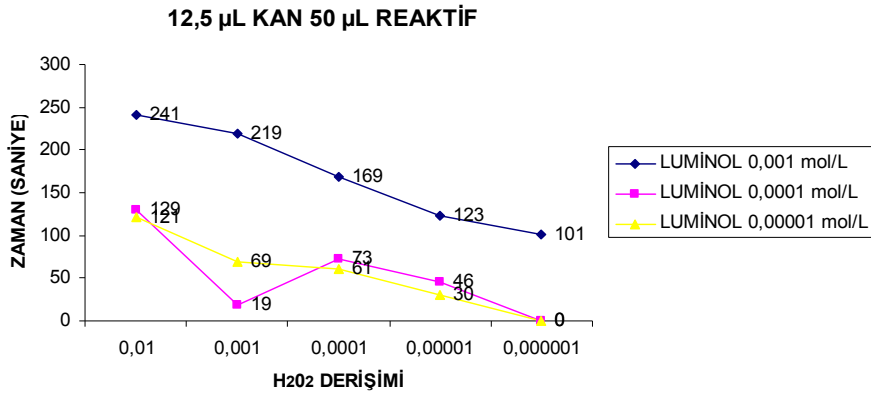
Solüsyon14: 10^{-5} mol/L H_2O_2 ve 10^{-5} mol/L luminol

Solüsyon15: 10^{-6} mol/L H_2O_2 ve 10^{-5} mol/L luminol

Hazırlanan bu solüsyonlar 12,5, 25 ve 50 µL kan (1/100 oranında seyreltilmiş) numunesi üzerine sırası ile 50, 100 ve 150 µL solüsyonlardan eklenerek süreleri ölçüldü.

Çizelge 3.1. 12,5 µL kan 50 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

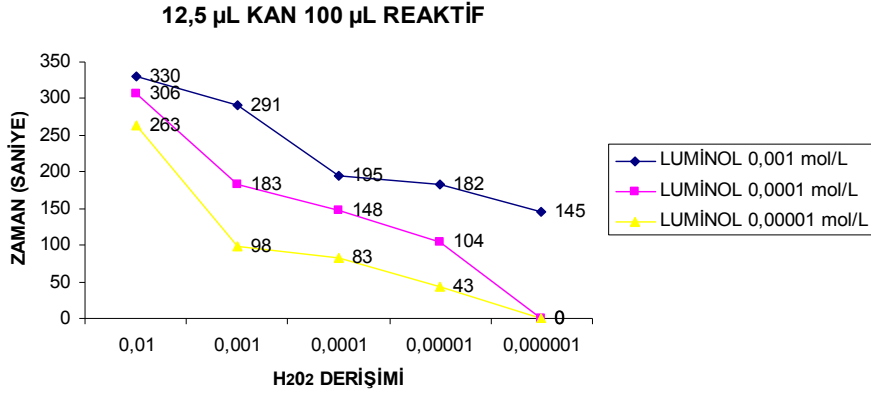
H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	10 ⁻³ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁴ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁵ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)
10 ⁻²	241	129	121
10 ⁻³	219	19	69
10 ⁻⁴	169	73	61
10 ⁻⁵	123	46	30
10 ⁻⁶	101	0	0



Şekil 3.2. Çizelge 3.1.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.2. 12,5 µL kan 100 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

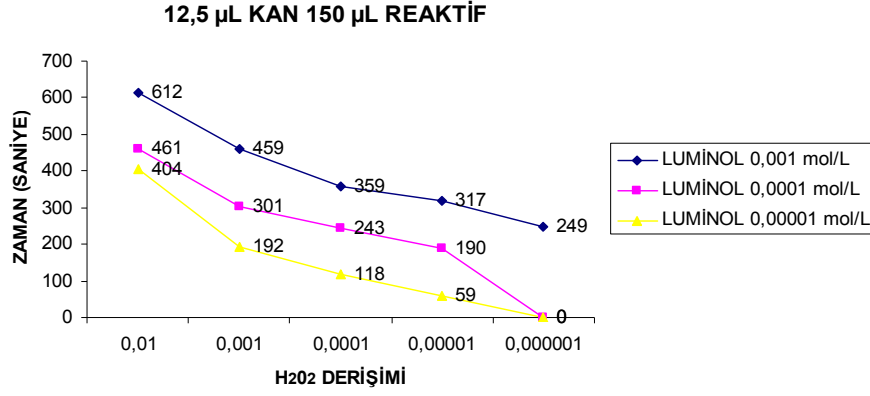
H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	10 ⁻³ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁴ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁵ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)
10 ⁻²	330	306	263
10 ⁻³	291	183	98
10 ⁻⁴	195	148	83
10 ⁻⁵	182	104	43
10 ⁻⁶	145	0	0



Şekil 3.3. Çizelge 3.2.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.3. 12,5 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

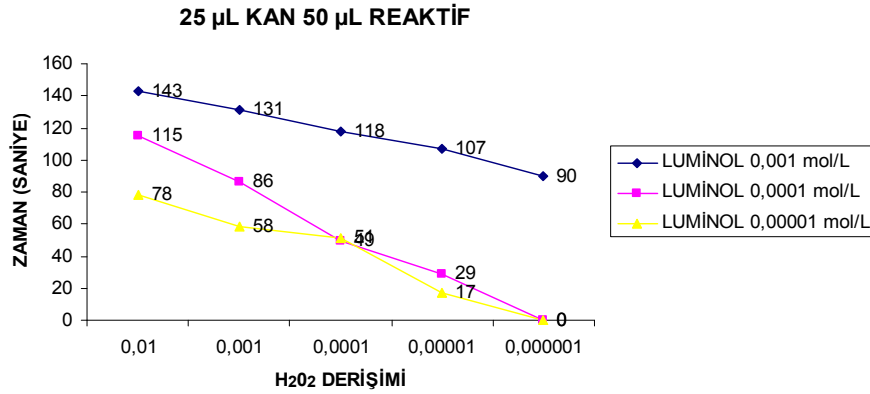
H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	10 ⁻³ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁴ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁵ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)
10 ⁻²	612	461	404
10 ⁻³	459	301	192
10 ⁻⁴	359	243	118
10 ⁻⁵	317	190	59
10 ⁻⁶	249	0	0



Şekil 3.4. Çizelge 3.3.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.4. 25 µL kan 50 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

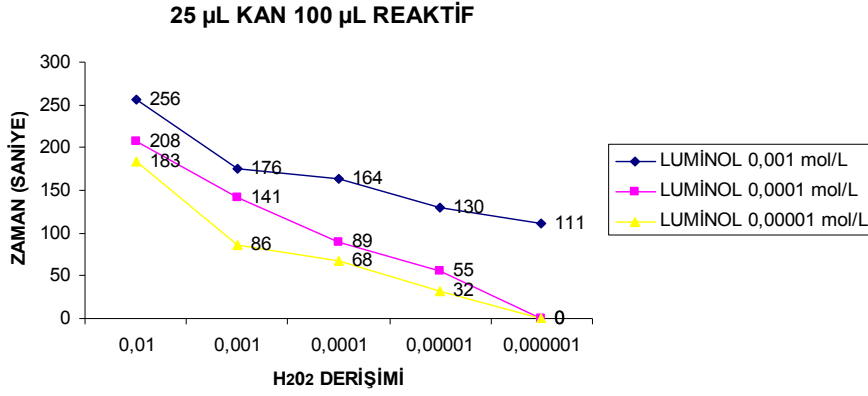
H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	10 ⁻³ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁴ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁵ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)
10 ⁻²	143	115	78
10 ⁻³	131	86	58
10 ⁻⁴	118	49	51
10 ⁻⁵	107	29	17
10 ⁻⁶	90	0	0



Şekil 3.5. Çizelge 3.4.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.5. 25 µL kan 100 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

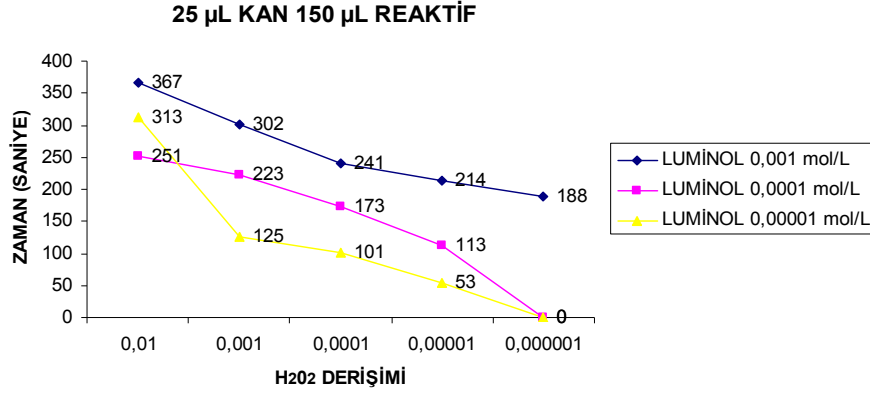
H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	10 ⁻³ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁴ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁵ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)
10 ⁻²	256	208	183
10 ⁻³	176	141	86
10 ⁻⁴	164	89	68
10 ⁻⁵	130	55	32
10 ⁻⁶	111	0	0



Şekil 3.6. Çizelge 3.5.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.6. 25 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

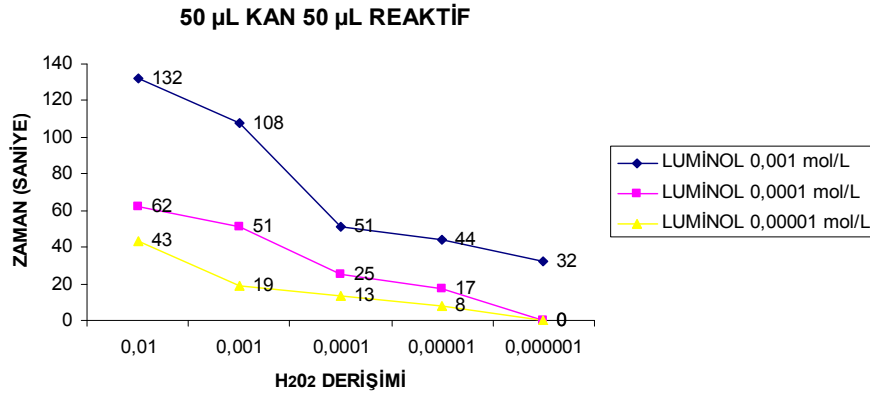
H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	10 ⁻³ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁴ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁵ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)
10 ⁻²	367	251	313
10 ⁻³	302	223	125
10 ⁻⁴	241	173	101
10 ⁻⁵	214	113	53
10 ⁻⁶	188	0	0



Şekil 3.7. Çizelge 3.6.'daki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.7. 50 µL kan 50 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

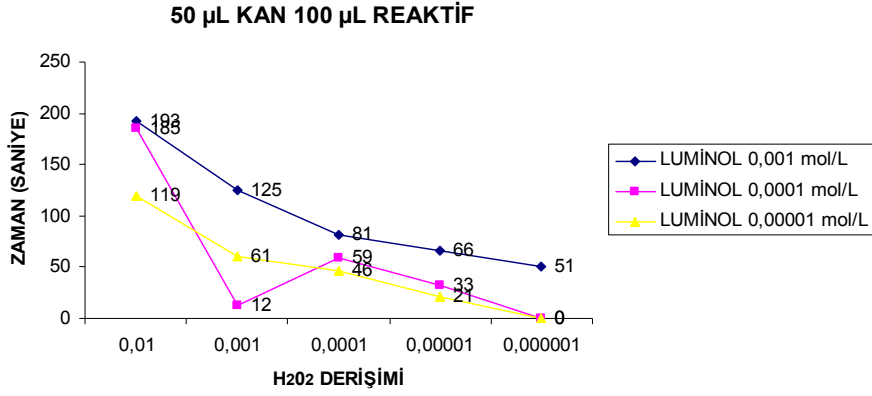
H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	10 ⁻³ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁴ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁵ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)
10 ⁻²	132	62	43
10 ⁻³	108	51	19
10 ⁻⁴	51	25	13
10 ⁻⁵	44	17	8
10 ⁻⁶	32	0	0



Şekil 3.8. Çizelge 3.7.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.8. 50 µL kan 100 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

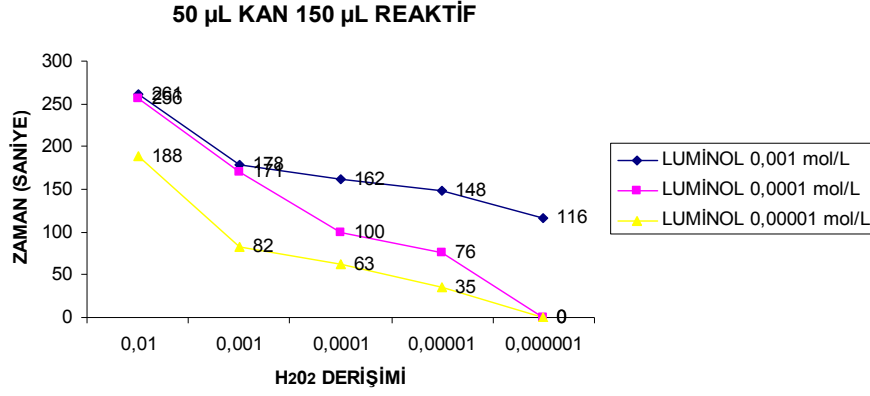
H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	10 ⁻³ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁴ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁵ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)
10 ⁻²	193	185	119
10 ⁻³	125	12	61
10 ⁻⁴	81	59	46
10 ⁻⁵	66	33	21
10 ⁻⁶	51	0	0



Şekil 3.9. Çizelge 3.8.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.9. 50 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	10 ⁻³ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁴ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)	10 ⁻⁵ mol/L luminol çözeltisi (Süre,s)
10 ⁻²	261	256	188
10 ⁻³	178	171	82
10 ⁻⁴	162	100	63
10 ⁻⁵	148	76	35
10 ⁻⁶	116	0	0



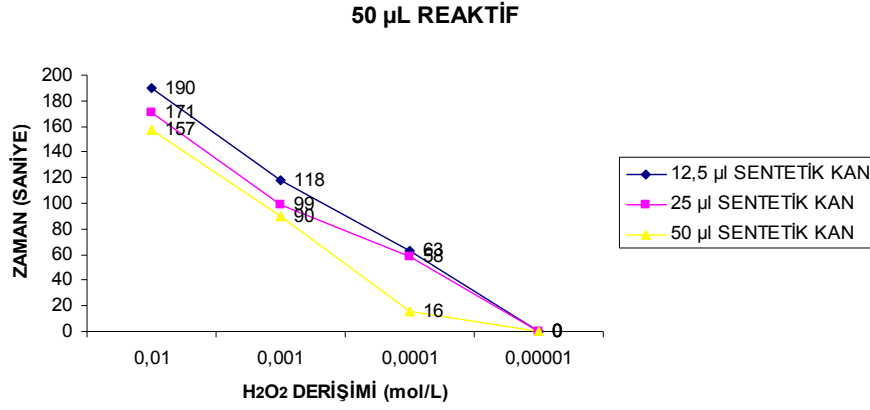
Şekil 3.10. Çizelge 3.9.'daki verilerin grafiksel gösterimi.

3.2.2.2. Süreye bağlı olarak (sentetik kan kullanılarak) en uygun reaktif miktarlarının belirlenmesi

Solüsyonların Hazırlanması: NaOH 0,02 mol/L hazırlandı ve solüsyonların hepsinde derişimi sabit tutuldu. 4 adet 10^{-3} mol/L luminol çözeltisi hazırlandı. 10^{-2} - 10^{-5} mol/L H₂O₂ hazırlandı. Luminol ve H₂O₂ 1:1 oranında sırası ile eklenerek 4 adet solüsyon hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyonlar 12,5, 25 ve 50 µL kan (sentetik kan) numunesi üzerine sırası ile 50, 100 ve 150 µL solüsyonlardan eklenerek süreleri ölçüldü.

Çizelge 3.10. 50 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

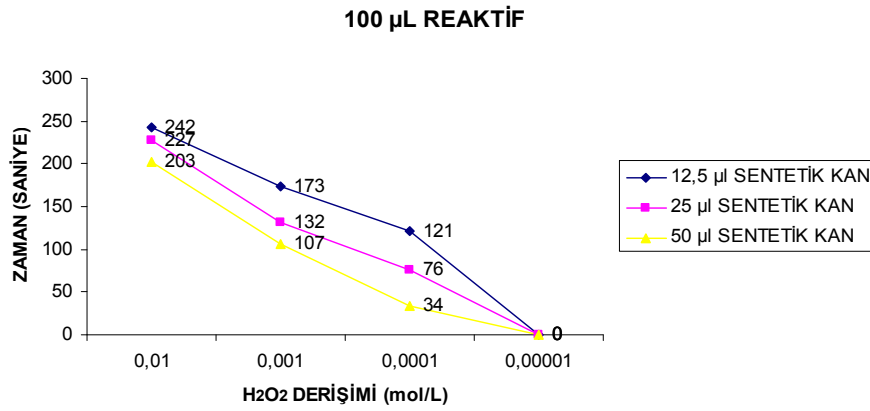
H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	12,5 µL Sentetik kan (Süre,s)	25 µL Sentetik kan (Süre,s)	50 µL Sentetik kan (Süre,s)
10^{-2}	190	171	157
10^{-3}	118	99	90
10^{-4}	63	58	16
10^{-5}	0	0	0



Şekil 3.11. Çizelge 3.10.'daki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.11. 50 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

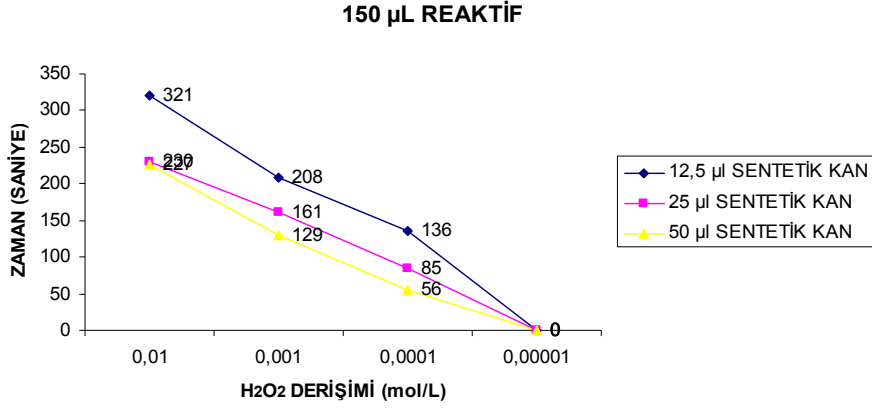
H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	12,5 µL Sentetik kan (Süre,s)	25 µL Sentetik kan (Süre,s)	50 µL Sentetik kan (Süre,s)
10 ⁻²	242	227	203
10 ⁻³	173	132	107
10 ⁻⁴	121	76	34
10 ⁻⁵	0	0	0



Şekil 3.12. Çizelge 3.11.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.12. 50 µL kan 150 µL solüsyon eklenerek ölçülen süreler.

H ₂ O ₂ Derişimi (mol/L)	12,5 µL Sentetik kan (Süre,s)	25 µL Sentetik kan (Süre,s)	50 µL Sentetik kan (Süre,s)
10 ⁻²	321	230	227
10 ⁻³	208	161	129
10 ⁻⁴	136	85	56
10 ⁻⁵	0	0	0



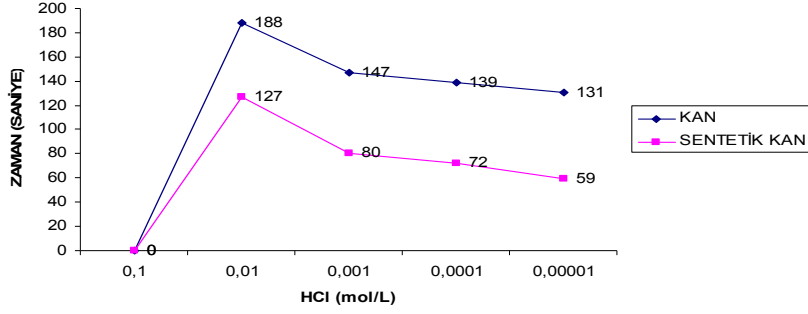
Şekil 3.13. Çizelge 3.12.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

3.2.2.3. H₂O₂ derişimi ve kemiluminesans süresi değerlendirilerek en uygun reaktiflerin belirlenmesi

İnsan kanı ve sentetik kan ile yapılan kemiluminesans süresi ölçme çalışmaları değerlendirilerek en uygun reaktifin; 10⁻³ mol/L luminol ve 10⁻² mol/L H₂O₂ ile hazırlanacağına karar verildi. Daha sonra bu reaktiflerle birlikte değişik konsantrasyonlarda HCl, HNO₃ ve NaBrO₃ çözeltileri hazırlanarak en uygun çözelti miktarları tespit edildi.

Çizelge 3.13. Farklı HCl derişimlerinde ölçülen kemiluminesans süreleri.

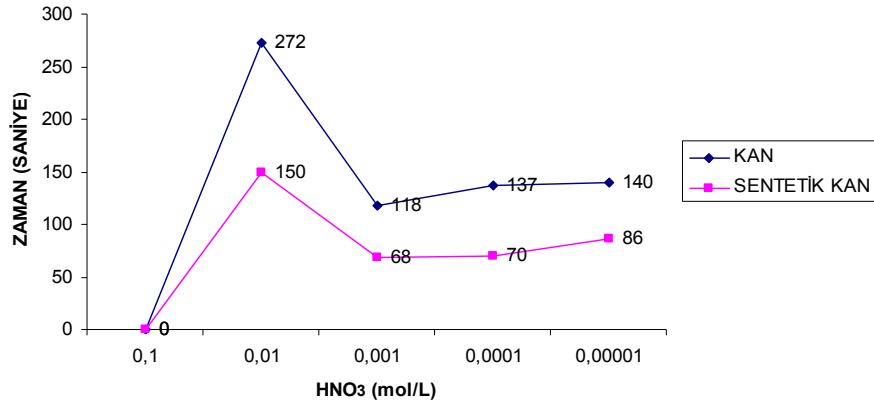
HCl Derişimi (mol/L)	Kan (Süre,s)	Sentetik Kan (Süre,s)
10^{-1}	0	0
10^{-2}	188	127
10^{-3}	147	80
10^{-4}	139	72
10^{-5}	131	59



Şekil 3.14. Çizelge 3.13.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.14. Farklı HNO₃ derişimlerinde ölçülen kemiluminesans süreleri.

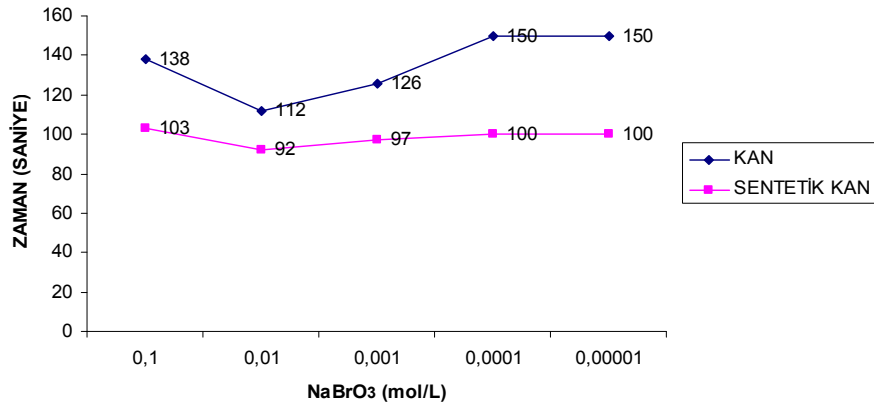
HNO ₃ Derişimi (mol/L)	Kan (Süre,s)	Sentetik Kan (Süre,s)
10^{-1}	0	0
10^{-2}	272	150
10^{-3}	118	68
10^{-4}	137	70
10^{-5}	140	86



Şekil 3.15. Çizelge 3.14.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.15. Farklı NaBrO₃ derişimlerinde ölçülen kemiluminesans süreleri.

NaBrO ₃ Derişimi (mol/L)	Kan (Süre,s)	Sentetik Kan (Süre,s)
10 ⁻¹	138	103
10 ⁻²	112	92
10 ⁻³	126	97
10 ⁻⁴	150	100
10 ⁻⁵	150	100



Şekil 3.16. Çizelge 3.15.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Yapılan bu çalışmalar değerlendirilerek, en uygun reaktiflerin;

* 10^{-2} mol/L HCl, 10^{-3} mol/L luminol ve 10^{-2} mol/L H_2O_2

* 10^{-2} mol/L HNO_3 , 10^{-3} mol/L luminol ve 10^{-2} mol/L H_2O_2

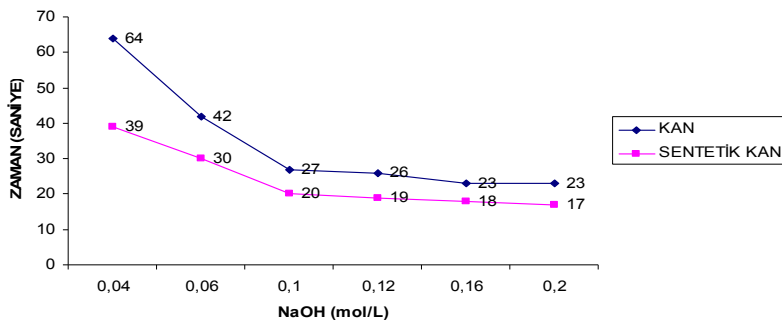
* 10^{-1} mol/L $NaBrO_3$, 10^{-3} mol/L luminol ve 10^{-2} mol/L H_2O_2

ile hazırlanacağına karar verildi.

3.2.2.4. NaOH'in hazırlanan reaktifler üzerine etkisi

Çizelge 3.16. 10^{-2} mol/L HCL derişiminde NaOH derişiminin kemiluminesans süresi üzerine etkisi.

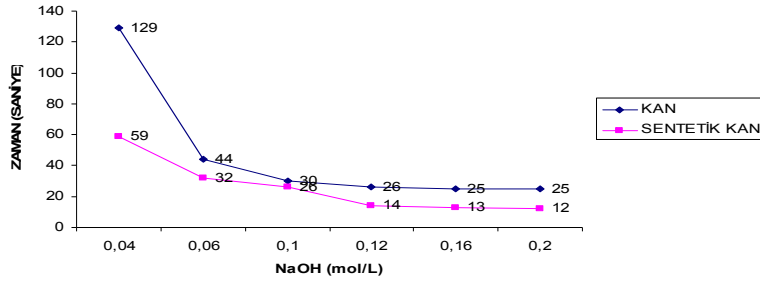
NaOH (mol/L)	Kan (Süre,s)	Sentetik Kan (Süre,s)
0,04	64	39
0,06	42	30
0,1	27	20
0,12	26	19
0,16	23	18
0,2	23	17



Şekil 3.17. Çizelge 3.16.'daki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.17. 10^{-2} mol/L HNO₃ derişiminde NaOH derişiminin kemiluminesans süresi üzerine etkisi.

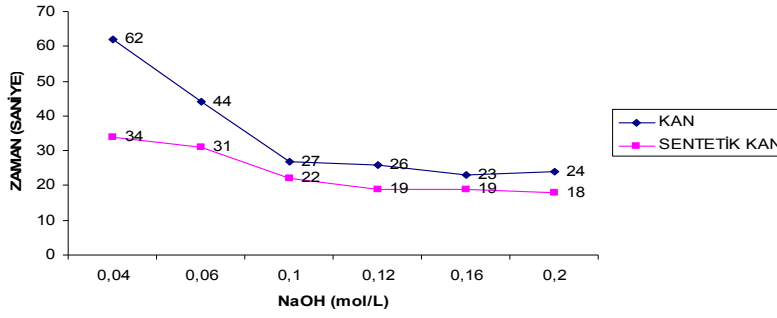
NaOH (mol/L)	Kan (Süre,s)	Sentetik Kan (Süre,s)
0,04	129	59
0,06	44	32
0,1	30	26
0,12	26	14
0,16	25	13
0,2	25	12



Şekil 3.18. Çizelge 3.17.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Çizelge 3.18. 10^{-2} mol/L NaBrO₃ derişiminde NaOH derişiminin kemiluminesans süresi üzerine etkisi.

NaOH (mol/L)	Kan (Süre,s)	Sentetik Kan (Süre,s)
0,04	62	34
0,06	44	31
0,1	27	22
0,12	26	19
0,16	23	19
0,2	24	18



Şekil 3.19. Çizelge 3.18.'deki verilerin grafiksel gösterimi.

Yapılan bu çalışma sonucunda;

NaOH derişiminin artırılması kemiluminesans süresini düşürdüğü,

NaOH derişiminin artırılması kemiluminesans şiddetini arttırdığı,

tespit edilmiştir.

Bu iki veri değerlendirilerek en uygun NaOH derişiminin 0,06 mol/L olduğuna karar verilmiştir.

3.2.3. Kemiluminesans şiddetinin artırılması

Kemiluminesans şiddetinin artırılmasının araştırılmasında karşılaştırma numunesi olarak optimize edilen luminol çözeltisi kullanılmıştır. İlk önce optimize edilen luminol çözeltisinden H₂O₂ çıkartılıp yerine başka reaktifler denenerek kemiluminesans oluşup oluşmadığına bakıldı. Mikroplate üzerine konulan 50 µL kan örnekleri üzerinde denemeler yapıldı ve çizelge 3.19'da gösterildiği gibi herhangi bir ışımaya elde edilemedi.

Çizelge 3.19. H₂O₂ yerine farklı derişimlerde farklı reaktifler kullanılarak yapılan denemeler.

	10 ⁻¹ mol/L	10 ⁻² mol/L	10 ⁻³ mol/L
HNO₃	--	--	--
HCl	--	--	--
KI	--	--	--
NaBrO₃	--	--	--
Na₂S₂O₈	--	--	--
K₂S₂O₈	--	--	--

-- kemiluminesans ışımaya elde edilemedi.



Şekil 3.20. Reaktifler içerisinde H_2O_2 olmadan HNO_3 , HCl , KI , $NaBrO_3$, $Na_2S_2O_8$ ve $K_2S_2O_8$ ile kemiluminesans denemeleri.

H_2O_2 yerine kullanılan reaktiflerin kemiluminesans ışına vermediği görülünce, reaktiflerin farklı derişimleri H_2O_2 ile birlikte kullanılarak kemiluminesans oluşup oluşmadığına bakıldı. Mikroplate üzerine konulan $50 \mu L$ kan örnekleri üzerinde denemeler yapıldı ve çizelge 3.20' de gösterilen sonuçlar elde edildi.

Çizelge 3.20. 10^{-2} mol/L H_2O_2 kullanılarak elde edilen kemiluminesans ışınmaları.

	10^{-1} mol/L	10^{-2} mol/L	10^{-3} mol/L
HNO_3	--	++	++
HCl	--	++	++
KI	--	--	--
$NaBrO_3$	++	++	++
$Na_2S_2O_8$	--	--	--
$K_2S_2O_8$	--	--	--

-- kemiluminesans ışına elde edilemedi.

++kemiluminesans ışına elde edildi.

3.2.4. Elde edilen veriler ile Weber tarafından hazırlanan Luminol reaktifinin karşılaştırılması

Yapılan tüm çalışmalar sonucunda elde edilen veriler birleştirildiğinde en uygun reaktiflerin;

* 10^{-2} mol/L HCl, 10^{-3} mol/L luminol, 10^{-2} mol/L H_2O_2 ve 0,06 mol/L NaOH

* 10^{-2} mol/L HNO_3 , 10^{-3} mol/L luminol, 10^{-2} mol/L H_2O_2 ve 0,06 mol/L NaOH

* 10^{-1} mol/L $NaBrO_3$, 10^{-3} mol/L luminol, 10^{-2} mol/L H_2O_2 ve 0,06 mol/L NaOH

ile hazırlanacağına karar verildi. Hazırlanan bu reaktifler ile Weber luminolü karşılaştırıldı.



Şekil 3.21. Weber luminolün kemiluminesans şiddeti.



Şekil 3.22. HCl ile hazırlanan luminolün kemiluminesans şiddeti.



Şekil 3.23. HNO₃ ile hazırlanan luminolün kemiluminesans şiddeti.



Şekil 3.24. NaBrO₃ ile hazırlanan luminolün kemiluminesans şiddeti.

HCl, HNO₃ ve NaBrO₃ ile hazırlanan luminol reaktifleri Weber luminol reaktifine göre daha uzun süre (HCL: 42 saniye, HNO₃: 44 saniye, NaBrO₃: 44 saniye Weber luminol: 9 saniye) kemiluminesans ışımaya vermesine rağmen, ışımaya şiddetlerinin Weber luminole göre çok zayıf olduğu görüldü ve ışımaya şiddetini artırmak için luminol ve H₂O₂ derişimleri artırıldı. Yeni derişimler;

* 10⁻² mol/L HCl, 1.34.10⁻³ mol/L luminol, 5.10⁻² mol/L H₂O₂ ve 0,06 mol/L NaOH

* 10⁻² mol/L HNO₃, 1.34.10⁻³ mol/L luminol, 5.10⁻² mol/L H₂O₂ ve 0,06 mol/L NaOH

* 10⁻¹ mol/L NaBrO₃, 1.34.10⁻³ mol/L luminol, 5.10⁻² mol/L H₂O₂ ve 0,06 mol/L NaOH ile hazırlanacağına karar verildi.

3.2.5. EDTA kullanılarak kemiluminesans şiddetinin arttırılması

EDTA metal iyonlarıyla kompleksleşme reaksiyonu vermektedir. Bu yüzden homoglobinin yapısında bulunan Fe⁺² ve ortamda bulunan Fe⁺³ ile kompleksleşme reaksiyonu vermesi için EDTA kullanıldı. EDTA eklenmesiyle Fe⁺² ve Fe⁺³ iyonları ile

kompleksleşme reaksiyonu verip, Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının reaksiyona daha yavaş katılması sağlanarak kemiluminesans süresinin ve şiddetinin artırılması sağlandı.



Şekil 3.25. HCl ile hazırlanan luminole EDTA eklenmesi ile artan kemiluminesans şiddeti.

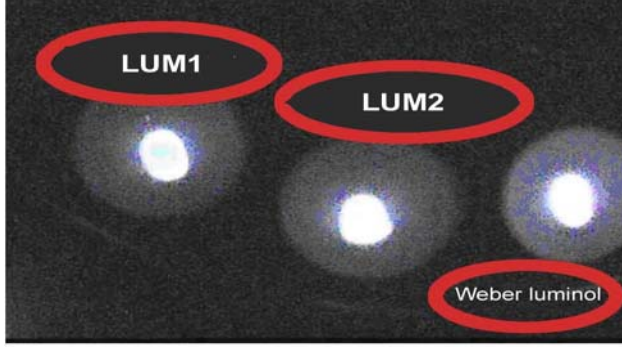


Şekil 3.26. HNO_3 ile hazırlanan luminole EDTA eklenmesi ile artan kemiluminesans şiddeti.



Şekil 3.27. $NaBrO_3$ ile hazırlanan luminole EDTA eklenmesi ile artan kemiluminesans şiddeti.

Yeni hazırlanan HCl, HNO_3 ve $NaBrO_3$ reaktiflerinin Weber luminole eşdeğer kemiluminesans şiddeti ve süresi verdiği gözlemlendi ve optimize edilen yeni luminol çözeltilerine Lum1, Lum2 ve Lum3 isimleri verildi.



Şekil 3.28. Lum1, Lum2 ve Weber luminolün kemiluminesans şiddetleri

Optimize edilen luminol çözeltileri,

- **LUM1:** Luminol+H₂O₂+HCl+NaOH+EDTA
- **LUM2:** Luminol+H₂O₂+HNO₃+NaOH+EDTA
- **LUM3:** Luminol+H₂O₂+NaBrO₃+NaOH+EDTA

olarak belirlendi ve Lum1, Lum2 ve Lum3'ün DNA üzerine etkisinin araştırılmasına geçildi.

3.2.6. Hazırlanan yeni luminol çözeltilisinin DNA üzerine etkisinin diğer olası kan testlerinin DNA üzerine etkisi ile karşılaştırılması

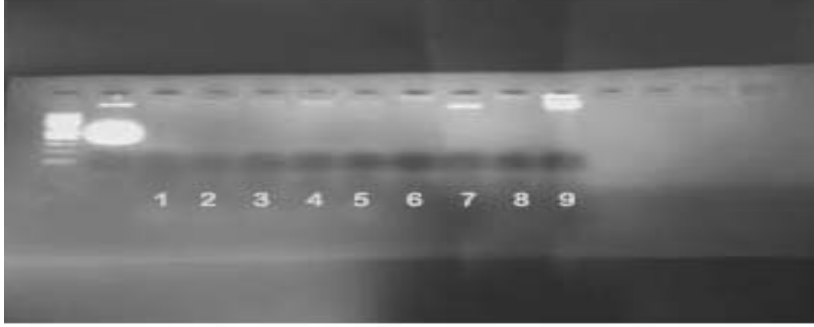
Optimize edilen luminol çözeltilerinin DNA'ya etkisini belirlemek için öncelikle elektroforez kullanıldı. İlk elektroforez deneyinde 1 µL DNA çözeltisi üzerine 5 µL solüsyon (Bluestar, Weber luminol, Lum1, lum2, lum3, HCl, HNO₃, NaBrO₃) eklendi. Üzerine solüsyonlar eklenen DNA çözeltileri 25 dakika 100 V'da jel üzerinde yürütüldü.



1. Bluestar 2. Weber 3. Lum1
4. Lum2 5. Lum3 6. HCl
7. HNO₃ 8. NaBrO₃ 9. Kontrol DNA

Şekil 3.29. Solüsyon eklenen DNA örneklerinin elektroforezde yürütülmesi.

Jel incelendiğinde, üzerine HNO₃ uygulanan DNA'nın zarar görmediği, yine HNO₃ ile hazırlanan Lum2'nin DNA'ya diğer solüsyonlara göre daha az zarar verdiği gözlemlendi. Aynı uygulama solüsyonlar eklendikten sonra 5 gün beklenerek yapıldı.



- 1. Bluestar 2. Weber 3. Lum1**
4. Lum2 5. Lum3 6. HCl
7. HNO₃ 8. NaBrO₃ 9. Kontrol DNA

Şekil 3.30. Solüsyon eklendikten sonra 5 gün bekletilen DNA örneklerinin elektroforezde yürütülmesi.

Solüsyon eklenip jel üzerinde yürütülmesi ile elde edilen veriler ile solüsyon eklenip 5 gün beklendikten sonra jel üzerinde yürütülmesi ile elde edilen verilerin aynı olduğu görüldü. 5 gün beklendikten sonrada HNO₃ uygulanan DNA'nın zarar görmediği, yine aynı şekilde HNO₃ ile hazırlanan Lum2'nin DNA'ya diğer solüsyonlara göre daha az zarar verdiği gözlemlendi.

Bundan sonraki çalışmalarda DNA'ya en az zarar veren solüsyon Lum2 olduğu belirlendiğinden Lum2 ve Weber luminolü karşılaştırılarak çalışmalar yapıldı. Yapılan ilk çalışmada 1:100 oranında seyreltilmiş kan üzerine Lum2 ve Weber luminolü eklenip Qiagen mini DNA izolasyon kiti ile DNA izole edildi ve daha sonra spektrofotometrede DNA konsantrasyonu ve kalitesini belirlemek amacıyla 260 ve 280 nm'de ölçümler yapıldı. 260/280 nm'deki absorbans değerlerinin oranı alınarak optik dansite hesaplandı.

Çizelge 3.21. 1:100 oranında seyreltilmiş kana solüsyonlar eklendikten sonra Qiagen Mini DNA İzolasyon kiti ile izole edilen DNA örneklerinin konsantrasyon ve optik dansite değerleri.

1:100 ORANINDA SEYRELTİLMİŞ KAN	OD	C (ng/ml)
WEBER	2,038	0,035
LUM2	1,841	0,108
KONTROL	0,879	0,734

Saf bir DNA 260/280=1.8 olmalıdır.

260/280>1.8 ise RNA kontaminasyonu

260/280< 1.8 ise protein kontaminasyonu

Lum2 ile muamele edilmiş optik dansitesi 1,841 olduğundan elde edilen DNA'nın kaliteli olduğu belirlendi. Weber luminolü ile muamele edilen DNA'da ölçülen 2,038 OD değeri (260/280 absorbands oranı) 1,8 OD değerinden 0,238 fazla olması DNA içerisinde RNA kirliliğinin olduğunu göstermektedir. Ölçülen bu değerler sonucunda Weber luminolün Lum2'ye göre DNA kalitesine zarar verdiği tespit edildi.

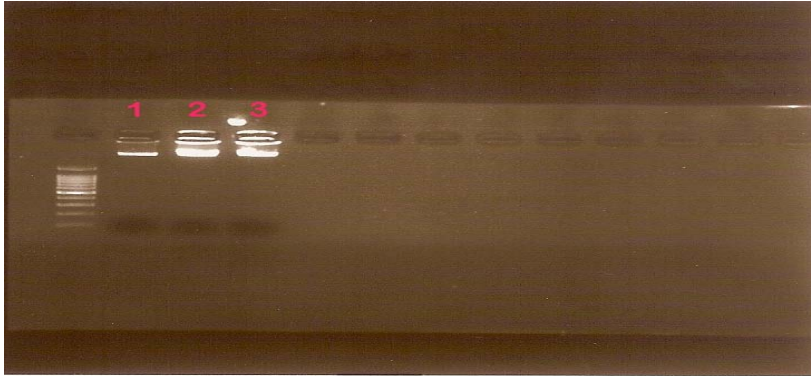
Çizelge 3.22. 1:2 oranında seyreltilmiş kana solüsyonlar eklendikten sonra Qiagen Mini DNA İzolasyon kiti ile izole edilen örneklerinin konsantrasyon ve optik dansite değerleri.

1:2 ORANINDA SEYRELTİLMİŞ KAN	OD	C (ng/ml)
WEBER	0,795	7,886
LUM2	0,757	11,448
KAN	0,828	15,655

Aynı çalışma 1:2 oranında seyreltilmiş kan ile yapıldı ve benzer sonuçlar elde edildi. Daha sonra Qiagen mini DNA izolasyon kiti ile yapılan çalışmaların aynısı Omega izolasyon kiti ile de yapıldı. Benzer sonuçlar elde edilmesi üzerine izole edilmiş DNA örnekleri elektroforezde jel üzerinde yürütülerek DNA'ya verilen zarar karşılaştırıldı.

Çizelge 3.23. Kan üzerine solüsyonlar eklendikten sonra Omega DNA İzolasyon kiti ile ölçülen DNA konsantrasyonları.

NUMUNELER	OD	C (ng/ml)
KONTROL	2,67	12,00
LUM2	1,37	2,33
WEBER	1,64	1,33



1. Weber 2. Kontrol (Kan örneğinden elde edilen DNA) 3. Lum2

Şekil 3.31. Omega kiti ile izole edilen DNA örneklerinin elektroforezde yürütülmesi.

Jel incelendiğinde üzerine herhangi bir solüsyon eklenmeyen kandan izole edilen DNA ile kan üzerine Lum2'nin eklenmesinden sonra izole edilerek elde edilen DNA'nın jel üzerinde benzer şekilde hareket ettiği görüldü. Weber luminol eklendikten sonra izole edilen DNA'nın ise konsantrasyon ve kalitesinin azaldığı gözlemlendi. Bu araştırmalar sonucunda elde edilen verilerin Lum2'nin DNA'ya verilen zararın diğer kan araştırmalarında kullanılan solüsyonlara göre çok daha az olduğunu göstermesi nedeniyle DNA çalışmalarına son verilerek girişim sorunlarının araştırılması çalışmasına geçildi.

3.2.7. Girişim sorunlarının belirlenmesi

Girişim sorunları araştırılırken literatür araştırmalarında kriminalistik kan analizlerinde sorunlara neden olduğu belirtilen patates suyu, domates suyu, ayran, süt, çamaşır suyu ve sıvı sabun gibi güçlü yükseltgeyici veya peroksidaz içeren sıvılarla çalışmalar yapıldı. Lum1, Lum2, Lum3 ve Weber Luminol çalışmalarda kullanıldı. Weber luminol ile yapılan çalışmalarda çamaşır suyu ile çok şiddetli ışık verirken patates suyu ile çok zayıf ışık verdiği gözlemlendi. Domates suyu, ayran, süt ve sıvı sabun ile yapılan çalışmalarda ise herhangi bir ışığa gözlemlenmedi.

Çizelge 3.24. Lum1, Lum2, Lum3 ve Weber luminolün çeşitli sıvılarla vermiş olduğu kemiluminesans ışığa şiddetleri.

	PATATES	ÇAMAŞIR SUYU	DOMATES	SÜT	AYRAN	SIVI SABUN
WEBER	ZAYIF	ŞİDETLİ	YOK	YOK	YOK	YOK
LUM1	ZAYIF	ŞİDETLİ	YOK	YOK	YOK	YOK
LUM2	ZAYIF	ŞİDETLİ	YOK	YOK	YOK	YOK
LUM3	ZAYIF	ŞİDETLİ	YOK	YOK	YOK	YOK



Şekil 3.32. Weber Luminol ile çamaşır suyunun reaksiyonu sonucu elde edilen kemiluminesans ışığı.



Şekil 3.33. Weber Luminol ile patates suyunun reaksiyonu sonucu elde edilen kemiluminesans ışıma.



Şekil 3.34. Weber Luminolün domates ve süt ile verdiği ışıma reaksiyonları.

Lum1, Lum2 ve Lum3 ile yapılan çalışmalar sonucunda Weber Luminol ile yapılan çalışmalara benzer sonuçlar elde edildi. Yapılan çalışmalarda çamaşır suyu ile çok şiddetli ışık verirken patates suyu ile çok zayıf ışık verdiği gözlemlendi. Domates suyu, ayran, süt ve sıvı sabun ile yapılan çalışmalarda ise Weber luminolde olduğu gibi herhangi bir ışıma gözlemlenmedi.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Literatür araştırmalarında elde edilen verilere göre silinmiş kan araştırmalarında en çok kullanılan olası kan kitleri luminol, hemasein ve bluestardır. Auckland üniversitesinden Morgan Cheyne (2011) 1:10 ve 1:100 oranında seyreltilmiş kan ile yaptığı çalışmada bu kitlerin DNA'ya zarar verdiğini bildirmiştir. Quinones ve arkadaşları (2007) luminol türevleri olan Weber, Grodsky ve bluestarla 1:10, 1:1000 ve 1:10000 oranında seyreltilmiş kan ile yaptıkları çalışmada luminol türevlerinin DNA'ya zarar verdiğini bildirmiştir. Yapılan diğer literatür araştırmalarında da yine olası kan kitlerinin DNA'ya zarar verdiği bildirilmektedir. Bir çok araştırmacı (Weber ve Grodsky gibi) luminol üzerinde optimizasyon çalışması yapmışlardır. Bu optimize edilen luminol çözeltilerinin içerisinde en çok tercih edilen Weber tarafından hazırlanan luminol çözeltisi olması nedeniyle karşılaştırma amaçlı olarak çalışmalarda kullanıldı. Optimizasyon alışmaları ile en uygun H₂O₂ derişimi, Luminol derişimi ve ortam pH belirlendi.

H₂O₂ ile birlikte kemiluminesans şiddetini ve süresini arttıracak bir oksidan (yükseltgen) araştırıldı. Bu alışma sonucunda, mevcut luminol kullanım şartları ile yapılan literatür araştırmalarından da yararlanılarak olay yeri kan araştırmalarında en çok tercih edilen Weber luminol kullanımından daha etkili olacak şekilde iyileştirilme gerçekleştirildi. Optimize edilen yeni luminol kullanım şartları Lum1, Lum2 ve Lum3 olarak isimlendirildi ve bu üç iyileştirilme yapılan kullanım şeklinin DNA üzerine verdiği zarar ile Weber luminolünün DNA üzerindeki zarar etkileri karşılaştırıldı.

DNA üzerindeki zararı değerlendirmek için hem spektrofotometrik hemde elektroforetik analizler gerçekleştirildi. ile ölçümler yapıldı ve Lum2'nin diğer luminol kullanım şartlarına göre DNA üzerine daha az zarar verdiği belirlendi. Lum2'nin DNA üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, DNA izolasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan Qiagen Mini kit ve Omega kitleri ile DNA'lar izole edildi. Bozulmadan ortamda kalan DNA'ların kalite ve miktar tayinleri gerçekleştirildi. Bunun için kan örneği üzerine optimize edilen luminol kullanım şartlarında kimyasal karışımı eklendi. DNA konsantrasyonları ölçülerek gerçekleştirilen bu çalışma ile Lum2'nin DNA üzerine daha az zarar verdiği belirlendi.

DNA'ya verilen zararların yanı sıra girişim etkileri de araştırılmış ve hazırlanan luminol kullanım şartlarında pH'nin yüksek olmasının girişim sorunlarını büyük ölçüde çözdüğü tespit edildi.

Lum2'nin DNA'ya standart olarak kabul ettiğimiz Weber luminol kullanım şartlarına göre en az zarar veren çözelti olmasının nedenini, Lum2 içerisine ilave ettiğimiz nitrik asidin metotta kullanılan hidrojen peroksidin etkinliğini azaltması ile açıklanabilir. Kullanılan nitrik asit, hidrojen peroksit de bulunan oksijeni açığa çıkararak ortamın oksijence bolluğunu arttırarak kemiluminesans şiddetinin fazlaşması yanında hidrojen peroksit derişiminin azalmasına katkı sağlayarak DNA üzerine verilen kimyasal zararın en aza inmesine neden olmaktadır. Elde edilen deneysel sonuçların olay yerinde kan ve kan lekelerinin araştırmasında önemli katkılar sağlayacağı açıktır. Özellikler yapılan deneysel çalışmalarda kan üzerine Lum2 olarak eklendikten hemen sonra ve 5 gün bekletilerek gerçekleştirilen DNA analizlerinde de daha sonraki tespitler için yeterli düzeyde DNA'nın bulunabildiği gözlemlendi (Şekil 3.30). Bu bilgi olay olduktan sonra da kan delilinin laboratuvara gönderilmesi için yeterli zaman kazandıracağını ayrıca DNA ile suçlu tespitinin yapılabilirliğini göstermektedir.

Bu bilgiler ışığında, çalışmada kullanılan ve inovasyon ile iyileştirilen Lum2 kullanım şartlarının farklı yüzeylerde (karo, duvar, tahta ve cam gibi) silinmiş kan lekeleri üzerine de çalışmalarının gelecekte yapılmasının gerektiği düşüncesindeyiz. Konu ile ilgili çalışmaların daha ileri düzeyde gerçekleştirilmesinde disiplinler arası çalışmanın çok önemli olduğu ve yeni metotların geliştirilmesi açısından da önem arz ettiği açıktır.

KAYNAKLAR

- Açıköz, N., Hancı, İ.H., Çakır, A.H. 2002.** Olay yerinden dna analizi için biyolojik örnek toplama ve örneklerin laboratuara gönderilme usulleri. S 201.
- Altuntaş, İ. 2007.** Otoimmün Tiroid hastalığının tanı ve takibinde oksidatif DNA hasar belirleyicisi 8-OHdG'nin önemi. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilimdalı. S 10-22
- Anonim, 2010.** Ders Anlatım Notları. Adli Kan analizleri. web.itu.edu.tr/~ozcanm/kim/kan%20analizleri.ppt 13.06.2012 (erişim tarihi)
- Anonim, 2012a.** Jandarma Genel Komutanlığı Türkiye, 2012. Kriminal laboratuvarlar yönergesi, jgy202-23 (A), s 2-1.
- Anonim, 2012b.** Moleküler luminesans spektroskopisi. <http://www.belgeler.com/blg/2q81/floresans-ve-fosforesans-spektroskopisi> 15.05.2012 (erişim tarihi)
- Anonim, 2012c.** Türk Kızılayı Kan Hizmetleri Genel Müdürlüğü, <http://www.kanver.net>. 11.01.2013 (erişim tarihi)
- Anonim, 2013a.** DNA profillemesi. http://tr.wikipedia.org/wiki/DNA_profillemesi. 21.02.2013 (erişim tarihi)
- Anonim, 2013b.** Luminol. <http://en.wikipedia.org/wiki/Luminol> 22.02.2013(erişim tarihi)
- Bilous, P., Mccombs, M., Sparkmon, M., Sasaki, J. 2010.** Detecting Burnt Bloodstain Samples with Light-Emitting Blood Enhancement Reagents. American Academy of Forensic Sciences. s 1-3.
- Buturlakin, M.S., Ksilera V.G., Shemelev V.P. 1975.** Interaction of human serum albumin and luminol. Biofizika 20 (6) s 975-977
- Büyük, Y. 2006.** Kan lekesi analizinde ihtimali reaktifler, özgüllük, özgünlük ve kontaminasyonun etkisi, Adli Bilimler Dergisi / Turkish Journal of Forensic Sciences, 5 (2): 13-2.
- Cheyne, M. 2011.** Illüminating latent blood. MSc Thesis, Auckland Üniversitesi. s 126-128
- Çaphan, A.İ. 2007.** PCR Nedir? (Polimeraze Chain Reaction). <http://biyoinformatik.wordpress.com/2007/02/21/pcr-polimeraze-chain-reaction-nedir> 21.02.2013 (erişim tarihi)

- Gross, A.M., Haris, K.A., Kaldun, G.L. 1999.** The Effect Of Luminol On Presumptive Tests and DNA Analysis Using The Polymerase Chain Reaction. Journal Of Forensic Sciences. s 839
- Irie, S. Mendlowitz, M., 1960-1970.** The effect of 3-aminophthalhydrazide on diuresis and blood pressure in dogs. Proceedings of the society for experimental biology and medicine. s 919-921
- James, S.H., Kish, E.K., Sutton, T.P. 2005.** Principles of bloodstain pattern analysis. Taylor&Francis group, Newyork , s 362-363
- Kaygusuz, Z. 2002.** Olay Yerindeki Sessiz Tanıkların Bilimsel Olarak Konuşturulması. S 1-2.
- Larkin, T., Gannicliffe, C. 2007.** Illuminating the health and safety of luminol. Science and Justice. s 71-75
- 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 alkalation induced DNA breaks. s 116-120
- Linville, J. 2005.** Identification of blood and bloodstains. Forensic science handbook. University of Alabama at Birmingham. Cilt1, Bölüm 7.
- Lowis, T. 2011.** Determining the sensitivity and reliability of hemaScein™. University of Nebraska. Nebraska. s 5-6.
- Quinones, I., Sheppard, D., Harbison, S., Elliot, D.,2007.** Comparative Analysis Of Luminol Formulations, Can. Soc. Forensic Sci. J. Vol. 40. No 2 pp. 53–63
- Solak, M. 2006.** Tıbbi biyoloji ve genetik, Editör: Güler, D.A., s 66-68
- Şekeroğlu, Z.A., ŞEKEROĞLU, V. 2011.** Genetik toksisite testleri. *Tıbbi bilim dergisi*, cilt 4 (sayı13): 223-224
- Tice, R. 1997.** Review of toxicological literature. National institute of environmental.
- Watkins, M.D., Brown, K.C. 2006.** A Comparison of Visual Enhancement Chemicals For the Recovery of Possible Blood Stains at the Crime Scene Luminol vs. BlueStar. the Evidence Technology Magazine, Cilt 4, Bölüm 2.
- Yağcı, A. 2009.** RFLP analizi: Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji kurs kitabçığı, s 149-150
- Yang, A., 2011.** Forensic serology. <http://www.slideshare.net/ProfdrElghamry/forensic-serology-blood-11179461>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Yılmaz

Doğum Yeri ve Tarihi : Yerköy/Yozgat – 11/11/1972

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Mamak Lisesi

Lisans : Çukurova Üniversitesi-Kimya

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi-Analitik Kimya

Meslek ve Başlama Tarihi: Parmak izi ve Avuç İzi Uzmanı-06.02.2001

İletişim (e-posta) :mehmetyilmaz_72@hotmail.com