T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI SÜRELERDE BEKLETİLEN SEMEN ÖRNEKLERİNİN MİKROBİYOM ANALİZİ İLE TANIMLANMASI

NURSENA GÜRSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK

Eş Danışman

Doç. Dr. Şükriye KARADAYI

Ocak, 2023

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI SÜRELERDE BEKLETİLEN SEMEN ÖRNEKLERİNİN MİKROBİYOM ANALİZİ İLE TANIMLANMASI

Nursena GÜRSOY tarafından hazırlanan tez çalışması 20.01.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Şükriye KARADAYI
Altınbaş Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Tülin ÖZBEK, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Beytullah KARADAYI, Üye
İstanbul Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Tülin ÖZBEK ve eş danışmanım Doç. Dr. Şükriye KARADAYI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Farklı Sürelerde Bekletilen Semen Örneklerinin Mikrobiyom Analizi ile Tanımlanması” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Nursena GÜRSOY

İmza

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FYL – 2021- 4807 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Ailem

ve

Dostlarıma

TEŞEKKÜR

Tüm tez çalışmam boyunca beni yönlendiren, tüm bilgi ve deneyimini paylaşan danışmanım Sayın Doç. Dr. Tülin Özbek'e,

Her konuda sabır ve özveriyle yaklaşıp, tez çalışmam boyunca yardımlarını hiç esirgemeyen eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Şükriye Karadayı'ya,

Tüm deney ve tez aşamalarında her türlü sorunuma yardımcı olan Mikrobiyoloji laboratuvarındaki arkadaşlarıma,

Yeni nesil dizileme ve metagenomik çalışmalarda bana yardımcı olan ve karşılaştığım sorunların çözümü konusunda destek olan Epigenetiks firması çalışanları ve Ali Arslan'a,

Oldukça tesadüfi bir şekilde yolarımızın kesiştiği ve o günden beri bana hem hayat hem de kariyer konularında yol gösteren, tez çalışmam da yine aynı şekilde yardımcı olan, mentörüm Uzm. Emb. Ender Yalçınkaya Kalyan'a,

Hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da yanımda olup beni destekleyen, varlıklarını hediye kabul ettiğim başta Selim Süylün olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Ve en önemlisi, yüksek lisans eğitimim de dahil olmak üzere attığım her adımda arkamda olduklarını bilmenin özgüvenini bana veren ve hep yanımda olan biricik aileme,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Nursena GÜRSOY

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ xi

TABLO LİSTESİ xiii

ÖZET xiv

ABSTRACT xvi

1 GİRİŞ 18

1.1 Literatür Özeti ... 18

1.2 Tezin Amacı ... 20

1.3 Hipotez ... 21

2 GENEL BİLGİLER 22

2.1 Adli Bilimler ... 22

2.2 Olay yeri ... 22

2.3 Delil Kavramı ... 23

2.4 Cinsel Saldırı Suçları ... 24

2.5 Adli Vakalarda Semen Lekeleri ... 26

2.6 Semen Lekelerinin Belirlenmesi Yöntemleri ... 27

2.6.1. Tarama Testleri ... 27

2.6.2. Doğrulama Testleri ... 29

2.7 İnsan Mikrobiyom Çalışmaları ... 29

2.7.1 Adli Bilimlerde Mikrobiyom Çalışmalarının Uygulama Alanları ... 30

2.7.2 Adli Bilimlerde Semen Mikrobiyomunun Kullanımı ... 33

2.8 DNA Dizileme Analizleri ... 34

2.8.1 Birinci Nesil Dizileme Teknolojisi ... 34

2.8.2 İkinci Nesil Dizileme Teknolojisi ... 35

2.8.3 Üçüncü Nesil Dizileme Teknolojisi ... 36

2.9 Metagenomik Çalışmalarda Biyoinformatik Analizler ... 36

2.9.1. Alfa Çeşitlilik ... 38

2.9.2 Beta çeşitlilik ... 38

2.9.3. Temel Koordinatlar Analizi (PCoA) ... 39

3 MATERYAL METOT 40

3.1 Materyal 40
3.1.1 Deneyde Kullanılan Malzemeler 40
3.1.2 Deneyde Kullanılan Kimyasallar 40
3.2 Metot 40
3.2.1 Kurgunun Oluşturulması ve Örneklerin Toplanması 41
3.2.2. Örneklerden DNA İzolasyonu 41
3.2.3 PZR Reaksiyonunun Oluşturulması ve Agaroz Jel Elektroforezi 42
3.2.4. Yeni Nesil Dizileme 44
3.2.5. Biyoinformatik Analizler 44
4 BULGULAR **46**
4.1 Örneklerin DNA Kantifikasyonu 46
4.2 Metagenomik Analiz Bulguları 46
4.2.1. Taksonomik Sınıflandırma, Alfa ve Beta Analizleri 47
4.2.2. Semen Lekesi Yaşı Tespiti için Filum, Cins ve Tür Düzeyindeki Bakteriyel Değişimlerin Analizi 62
5 SONUÇ VE ÖNERİLER **70**
KAYNAKÇA **74**
A ETİK KURUL ONAYI **74**
B BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU **82**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **85**

SİMGE LİSTESİ

bp	Baz Çifti
dk.	Dakika
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı (Rotation Per Minute)
°	Derece
gr.	Gram
g	Gravite
ph	Hidrojen Potansiyeli (Potential Of Hydrogen)
kb	Kilobaz
μl	Mikrolitre
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
cm^2	Santimetre kare
V	Volt
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devleti
ALS	Alternatif Işık Kaynakları (Alternative Light Source)
AP	Asit Fosfataz
BGOF	Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu
ddNTP	Dideoksiribonükleosit Trifosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosit Trifosfat
dsDNA	Çift Sarmallı DNA (Double-Stranded DNA)
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EtBr	Etidyum Bromür
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
IR	Kızılötesi (Infrared)
İGP	İnsan Genom Projesi
İMP	İnsan Mikrobiyom Projesi
MALDI-MS	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu Kütle Spektrometresi (Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Massspectrometry)
miRNA	Mikro Ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
NIH	Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health)
OTU	Operasyonel Taksonomik Birim (Operational Taxonomic Unit)
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCoA	Temel Koordinatlar Analizi (Principal Coordinates Analysis)
PMI	Postmortem İnvertal
PSA	Prostat Spesifik Antijen
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TAE	Tris-Asetat-EDTA

tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik asit
UV	Ultraviyole
YND	Yeni Nesil Dizileme

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Bir pyrogram örneği.....35

Şekil 3.1 Semen ile lekelendirilmiş kumaş örnekleri.....41

Şekil 3.2 Jel elektroforez görüntüleri.....43

Şekil 4. 1 Filum düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerini gösteren grafik (%).....47

Şekil 4. 2 Filum düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerinin 0., 5., 10. ve 20. günlerdeki dağılımını gösteren grafik (%).....49

Şekil 4. 4 Filum düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin zamana bağlı olarak dağılımını gösteren Venn Şeması.....51

Şekil 4. 5 Filum düzeyinde örnekler arasındaki Unifrac uzaklıların dikkate alındığı zamana bağlı dağılımı gösteren Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği.....52

Şekil 4.6 Cins düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerini gösteren grafik (%).....53

Şekil 4.7 Cins düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerinin 0., 5., 10. ve 20. günlerdeki dağılımını gösteren grafik (%).....54

Şekil 4.8 Cins düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin Shannon ve Simpson indeksleri kullanılarak oluşturulan alfa çeşitlilik ölçüm grafiği.....55

Şekil 4. 9 Cins düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin zamana bağlı olarak dağılımını gösteren Venn Şeması.....55

Şekil 4.10 Cins düzeyinde örnekler arasındaki Unifrac uzaklıların dikkate alındığı zamana bağlı dağılımı gösteren Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği.....56

Şekil 4.11 Tür düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerini gösteren grafik (%).....57

Şekil 4.12 Tür düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerinin 0., 5., 10. ve 20. günlerdeki dağılımını gösteren grafik (%).....58

Şekil 4.13 Tür düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin Shannon ve Simpson indeksleri kullanılarak oluşturulan alfa çeşitlilik ölçüm grafiği.....59

Şekil 4.14 Tür düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin zamana bağlı olarak dağılımını gösteren Venn Şeması.....60

Şekil 4.15 Tür düzeyinde örnekler arasındaki Unifrac uzaklıların dikkate alındığı zamana bağlı dağılımı gösteren Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği.....61

Şekil 4.16 Tür düzeyinde anlamlı farklılık gözlenenTreponema medium, Corynebacterium tuberculostearicum, Faecalibacterium prausnitzii ve Anaerostipes hadrus türlerinin 0., 5., 10. ve 20. günlerdeki göreceli bolluk değerleri.....61

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Ölüm nedenlerinin sınıflandırılması.....32

Tablo 2.2 Metagenomik için uygun yeni nesil DNA dizileme teknolojileri arasındaki karşılaştırma.....37

Tablo 2.3 Metagenomik analizlerde kullanılan bazı yazılımlar.....39

Tablo 3.1 PZR bileşenlerinin reaksiyon başına kullanılacak hacimleri.....42

Tablo 4.1 İzolasyon sonrası DNA miktarları.....46

Tablo 4.2 Filum düzeyindeki bakterilerin tüm katılımcılar için ortalama göreceli bolluk (Ort.) değerleri (%). 48

Tablo 4.3 Tüm zaman dilimlerinde katılımcılara ait örneklerdeki mikroorganizma filumlarının medyan değerleri (%).....50

Tablo 4.4 Cins düzeyinde en çok görülen bakterilerin tüm katılımcılar için ortalama göreceli bolluk (Ort.) değerleri (%). 53

Tablo 4.5 Tüm zaman dilimlerinde katılımcılara ait örneklerdeki mikroorganizma cinslerinin medyan değerleri (%).....54

Tablo 4.6 Tür düzeyinde en çok görülen bakterilerin tüm katılımcılar için ortalama göreceli bolluk (Ort.) değerleri (%). 57

Tablo 4.7 Tüm zaman dilimlerinde katılımcılara ait örneklerdeki mikroorganizma türlerin medyan değerleri (%).....59

Tablo 4.8 İstatiksel analizlerde anlamlı çıkan bakterilerin örneklem günlerindeki ortalamaları.....62

Tablo 4.9 0. günde bulunan 5., 10. ve 20. günde bulunmayan bakterilerin ortalama değerleri 62

Tablo 4.10 0. ve 5. günde bulunan 10. ve 20. günde bulunmayan bakterilerin ortalama değerleri 65

Tablo 4.11 0., 5. ve 10. günde bulunmayan 20. günde bulunan bakterilerin ortalama değerleri 65

Tablo 4.12 0. ve 5. günde bulunmayan 10. ve 20. günde bulunan bakterilerin ortalama değerleri 68

ÖZET

Farklı Sürelerde Bekletilen Semen Örneklerinin Mikrobiyom Analizi ile Tanımlanması

Nursena GÜRSOY

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Tülin Özbek

Eş-Danışman: Doç. Dr. Şükriye Karadayı

Mikrobiyal parmak izi ve biyolojik örneğin ortama transfer olma zamanına yönelik tespitler cinsel saldırı şüphelisi olan kişinin, daha önce farklı bir nedenle olay mahallinde bulunduğu iddiasını destekleyen ya da desteklemeyen bulgulara ulaşmamızı sağlayabilir. Bu çalışmada olay yeri kurgusu kapsamında, semen örneklerinin iç çevre koşullarında farklı sürelerde bekletilmesiyle adli amaçlı kullanım için mikrobiyom yapısı değişkenliğinin metagenomik analiz yöntemleri ile ortaya konulması amaçlanmaktadır.

Çalışma kapsamında 5 farklı bireyden alınan semen örnekleri polyester kumaş üzerinde leke oluşturularak, 20 gün boyunca bekletilmiştir. 0., 5., 10. ve 20. günlerde kumaş üzerindeki lekelerden alınan toplam 20 örneğin 16S rRNA (V1-V9) gen bölgesi yüksek verimli dizileme ile sekanslanarak veriler üzerinde biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Taksonomik sınıflandırmalar ile alfa ve beta çeşitlilik analizler sonucunda; 5 katılımcıya ait 4 farklı zaman dilimine ait örneklerde; *Firmicutes*, *Proteobacteria, Bacteroidetes* ve *Actinobacteria*'nın sırasıyla en yüksek oranda (toplam %95'in üzerinde) tespit edilen şubeler oldukları görülmüştür. Semen örneklerindeki mikrobiyota çeşitliliği, iç ortam

koşullarına ve zamana bağlı olarak, maruziyetin 10. gününde bir miktar artış gösterse de maruziyetin 20. günündeki mikrobiyota zenginliğinin, maruziyet öncesinden daha düşük olduğu gözlenmiştir. Öte yandan, tüm zamanlardaki örneklerde, mikrobiyal kompozisyon nispeten korunmuştur. Tür düzeyindeki analizlerde ise; bazı bakterilerin zaman içerisinde artık tespit edilemediği buna karşın zamanla yeni bazı bakteri türlerinin saptandığı görülmüştür. Bu bulgular bir olay yerindeki semen lekesinin ev içi ortam koşullarına uzun süreli maruziyet sonrasında dahi tanımlanabilmesi için metagenomik analizlerin kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte tür düzeyindeki değerlendirmeler semen lekesinin yaşı hakkında bize önemli bilgiler sağlayabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adli bilimler, semen identifikasyonu, semen lekesi yaşı, metagenomik analiz, mikrobiyom

ABSTRACT

Identification of Semen Samples that Hold on Different Periods by Microbiome Analysis

Nursena GÜRSOY

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Tülin Özbek

Co-supervisor: Assoc. Prof. Şükriye Karadayı

Detections of microbial fingerprints and the time of transfer of biological samples to the environment can enable us to reach findings that support or do not support the claim that the person suspected of sexual assault has been at the crime scene for a different reason before. This study, within the scope of crime scene fiction, it is aimed to reveal the microbiome structure variability used for forensic by metagenomic analysis methods by keeping semen samples in different periods in indoor environmental conditions.

Within the scope of the study, semen samples taken from 5 different individuals were stained on the polyester fabric and kept for 20 days. On the 0th, 5th, 10th, and 20th days, the 16S rRNA (V1-V9) gene regions of a total of 20 samples taken from the stains on the fabric were sequenced by high-throughput sequencing, and bioinformatic analyzes were performed on the data. As a result of taxonomic classifications and alpha and beta diversity analyses; in the samples of 4 different time periods of 5 participants; Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, and Actinobacteria were found to with the highest rate of the phyla (over 95% in total), respectively. Although the microbiota diversity in semen samples increased

slightly on the 10th day of exposure, depending on the indoor conditions and time, it was observed that the microbiota diversity on the 20th day of exposure was lower than before the exposure. On the other hand, in all samples of the periods, the microbial composition was relatively preserved. In the analysis at the species level, while some bacteria could no longer be detected, it was observed that some new bacterial species were detected over time. These findings suggest the potential for metagenomic analyzes to be used to identify a semen stain at a crime scene, even after prolonged exposure to indoor environmental conditions. Addition, evaluations at the species level can provide us with important information about the age of the semen stain.

Keywords: Forensic sciences, semen identification, semen stain age, metagenomic analysis, microbiome

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Adli bilimler, birçok kriminal vakanın aydınlatılmasında farklı bilim alanlarıyla birlikte çalışarak, adli vakanın çözümünü amaçlayan multidisipliner bir alandır. Tıp, fizik, kimya vb. birçok disiplinden yardım alan adli bilimlerin sıklıkla başvurduğu bir alan da adli mikrobiyolojidir. Adli mikrobiyoloji; başta biyoterörizm olmak üzere biyolojik kökenli suçlarda, eldeki kanıtların mikrobiyolojik açıdan ayrıntılı yöntemlerle incelenmesi aracılığıyla insanları korumayı hedefleyen bir bilim dalıdır [1]. Bununla birlikte, son yıllarda adli mikrobiyolojinin moleküler genetik alanında yeni nesil dizileme (YND) teknikleri ile daha da geliştiği görülmektedir [2,3].

Çok farklı çeşitlilikte olay yeri ve delilin olması sebebiyle, adli bilimciler birçok farklı ortam ve materyal ile çalışmak zorunda kalabilmektedirler. Vakaların aydınlatılabilmesi için büyük önem taşıyan olay yerine bırakılan vücut sıvılarının tespiti ise vakanın çözümlenmesine oldukça katkıda bulunur. Olay yerinde canlıların vücutlarından düşen, akan, kopan ya da dökülen her türlü biyolojik madde biyolojik delil olarak sınıflandırılmaktadır. Olay yerinde sıklıkla rastlanan biyolojik delillere; kan, saç, tükürük, semen, doku parçası örnek verilebilir. Cinsel saldırı vakalarında genellikle koltuk, çarşaf ve iç çamaşırı gibi yerlerden elde edilen semen örnekleri yaygın biyolojik örneklerden bir tanesidir [4].

Elde edilen bu biyolojik delillerin analizi amaçlanan hedefe göre çok farklı şekillerde çalışılabilmektedir. Fakat hedeflenen çalışmanın yapılmasının ilk ve en önemli basamağı çok farklı olay yerlerinden elde edilebilen bu biyolojik örneklerin doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanabilmesidir [1].

Günümüzde cinsel saldırılar bu adli vakalar arasında, ülkemizde de olmak üzere, maalesef büyük bir yer kaplamaktadır. Cinsel saldırı vakalarında en önemli ve sonuca katkısı bulunan örnekler semen örnekleridir. Spektroskopi, kimyasal

analiz, enzim-katalitik analiz ve immünolojik testler gibi varsayımsal ve doğrulayıcı teknikler semen lekelerinin tanı ve tespit metodu olarak adli laboratuvarlarda kullanılmaktadır, fakat rutinde kullanılan bu testlerin özellikle beklemiş numunelerin tespitinde çoğu kez yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar vermeye yatkın olduğu bilinmektedir [5]. Yapılan yeni çalışmalar ve gelişen teknoloji ile bu biyolojik delillerin tanımlanması için farklı metotlar geliştirilmesi üzerine araştırmalar da hız kazanmıştır. Tanımlama yöntemlerine yardımcı olması için birçok çalışma yapılmış ve bazı çalışmalarda köpeklerin eğitilerek semen lekesinin yerini bulması konusu üzerinde durulmuştur fakat bu da köpeklerin eğitimi için harcanan zamanın fazlalığı nedeniyle adli bilimlerde yeterince yer edinememiştir [6].

Son zamanlarda kısıtlı miktardaki örneklerden sonuca ulaşmayı sağlayan, çeşitli vücut sıvılarına spesifik belirteçlere dayalı moleküler teknikler geliştirilmiştir [7]. Özellikle mRNA, mikroRNA ve DNA metilasyon gibi çoklu tanımlama metotları son yıllarda fazlaca üzerinde durulan yöntemlerdir [8]. Fakat bu yöntemlerinde bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Semen tanımlamasında ortamın etkisini belirlemeye yönelik bir deneyde, miRNA’nın, test edilen çevresel koşullar altında mRNA'dan daha kararlı ve kalıcı olduğu görülmüştür [9]. mikroRNA, vücut sıvısı tanımlaması için bir araç olarak kullanılmaktadır ancak kısa parçalar halinde olması tespitte teknik bir zorluk haline gelmektedir [10]. miRNA’ların normal semen örnekleri ile kıyaslandığında infertil erkeklerde önemli derecede az ifade edildiği gözlemlenmiştir [11]. Sperm DNA metilasyonu yöntemi ise; beslenme durumu, endokrin düzenleyici hormonlar ve diğer kirlilikler gibi çeşitli maruziyetlerden etkilenmektedir. Çalışılan tekniklerdeki bu eksiklikler nedeniyle adli bilimlerde semen lekelerinin tanımlanması için yeni biyolojik metotların geliştirilmesi önem kazanmıştır. Yeni bir yöntem olarak mtDNA kopya sayısı ve telomer tekrar uzunluğu semen tanımlamasında kullanılmaktadır fakat bu metotlar da olgun olmayan sperm hücrelerini ve azospermik örnekleri dışlamaktadır [12]. MALDI-MS metodu, insan vücut sıvısını hızla ayırt etmek için kullanılabilmekte olup fazla miktarda örneğe ihtiyaç duyduğundan adli bilimler tarafından tercih edilmemektedir [13].

İnsan Mikrobiyom Projesinin hayata geçirilmesi ile çoğu adli bilimci, postmortem intervalin tahmini, bireyin kimliklendirilmesi, vücut sıvılarının tanımlanması vb. konularda mikrobiyolojinin adli bilimlerde kullanımına odaklanmıştır [14,15]. Son yıllarda yüksek verimli dizileme teknikleri mikrobiyom tespitinde devrim niteliğinde bir teknolojik yenilik yapmıştır. Ancak, özellikle cinsel saldırı vakalarının aydınlatılmasında büyük öneme sahip olan seminal mikrobiyom çalışmaları, tükürük ve vajinal sıvı gibi diğer vücut sıvıları kadar fazla sayıda değildir. Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında mikrobiyom analizleri yararlı bir araç olarak adli bilimler konusunda umut vaat etmektedir.

Bilinmektedir ki bir biyobelirtecin adli identifikasyon amaçlı kullanılabilmesi için, temel şartlardan birisi zaman ve çevresel etkiler sebebiyle meydana gelebilecek değişimlerinin belirlenmesi gerekliliğidir. Bu sebeple semen mikrobiyomunun zaman içinde kararlılığını geçici veya kalıcı olarak etkileyen faktörlerin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Adli bilimlerde olay yerinden elde edilen biyolojik materyallerin tespiti ve analizi büyük önem taşımaktadır, özellikle semen örneklerinin identifikasyonunun sağlanması, cinsel saldırıların belirlenmesinde adli makamlara yardımcı olmaktadır. Bazen de olay yerinde semen örneği tespit edilmesine ve kişi/kişiler kimliklendirilmesine rağmen olayın şüphelileri, mevcut örneği hayatın olağan akışı içerisinde olay anından farklı bir zaman periyodunda olay yerine transferinin sağlanmış olabileceğini iddia etmektedirler. Böyle durumlarda örneklerin leke yaşlarının da tespit edilmesi önem taşıyabilmektedir.

Günümüzde rutinde kullanılan metotlar ile beklemiş semen örneklerinin tanımlanmasında ve leke yaşlarının tespitinde zorluklar yaşanmaktadır. Mevcut yöntemler ile yanlış pozitif veya negatif sonuçlar verilebilmektedir. Semen örneğinin tanımlanması için mikrobiyomların kullanılması ise son yıllarda yararlanılan metotlardan biridir ve halen rutin çalışmalara dahil edilememiştir. Diğer vücut sıvılarının mikrobiyom analizi ile değerlendirilmesine ilişkin çalışmalar bulunmasına karşın farklı sürelerde beklemiş semen örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır ve bazı kısıtlamalar içermektedir.

Bu çalışmada olay yeri kurgusu kapsamında, semen örneklerinin iç çevre koşullarında farklı sürelerde bekletilmesiyle adli amaçlı kullanım için mikrobiyom yapısı değişkenliğinin metagenomik analiz yöntemleri ile ortaya konulması amaçlanmaktadır. Çalışma sonrasında elde edilen bulgular eşliğinde semen mikrobiyomunun zamana bağlı olarak değişimleri, biyoinformatik analizler ile adli kullanım açısından yorumlanacaktır.

Yapılan çalışma sonuçları adli bilimlere yeni bir bakış açısıyla katkı sağlayarak kumaş üzerinde bekleyen semen örneklerinin mikrobiyom kullanılarak tayin edilmesi ve niteliğinin belirlenmesi konusunda anlamlı bir çalışma olarak literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada, kumaş üzerindeki farklı bekletme sürelerine maruz bırakılan semen lekeleri üzerinde gerçekleştirilen mikrobiyal yapının tespitine yönelik analizler ile lekenin tanımlanması ve leke yaşı arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu ilişkinin tespiti halinde, rutin çalışmalarda çözümü zor vakaların aydınlatılması için daha kesin ve az maliyetli alternatif yeni bir metot önerilebilecektir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Adli Bilimler

Adli bilimler; farklı bilim alanlarındaki bilgilerin, hukuki uyuşmazlıkların ve suçların aydınlatılmasında kullanıldığı, suçla ilgili objeler, yerler ve kişiler arasında ilişkilendirme sağlayan multidisipliner bir bilim alanıdır. Adli bilimler; Adli Fen Bilimleri, Adli Tıp ve Adli Sosyal Bilimler olarak 3 temel alanda faaliyetlerini sürdürür. Adli Fen Bilimleri; adli biyoloji, adli mikrobiyoloji, adli kimya, adli fizik vb. birçok alt başlığa ayrılmaktadır ve bu alt birimlerin her birinin birbiri ile iş birliği içinde çalışmalarıyla adli vakalardaki bilinmezlerin aydınlatılmasında görevleri bulunmaktadır [16,17].

Adaletin sağlanması, yargılamanın hatasız şekilde yapılması ile mümkündür ve adli bilimler vakaların çözümlenmesinde özellikle olay yerinden toplanan delillerin aydınlatılması ile adalete hizmet etmektedir.

2.2 Olay yeri

Olay yeri, bir olayın başlangıcından sonucuna kadar geçtiği tüm alanları kapsamaktadır. Gerçekleşen olayın işleniş şeklini ve olaya ait kanıtları barındırdığından işlenen bir suçta, suçlunun etkileşim kurduğu her alanı ve eşyayı kapsamaktadır.

Olay yeri kısıtlı bir alanla sınırlı kalmaz ve her olay yeri farklılık gösterir. Olay yerinin sınırları konu alınan olayın hikayesine ve akışına göre devamlılık gösterir. Bu nedenle bir olayda genellikle olay yeri birden fazla mekândan oluşur. Farklı olay yerlerinden toplanan deliller kimi zaman birbirleriyle ilişkili olabilir. Bazen de adli olguya ait biyolojik materyaller, farklı bir alana taşınmış ya da saklanmış olabilir. Böylelikle faile ait biyolojik materyaller birden fazla alanda bulunabileceğinden, tüm bu alanlar geniş ve dinamik bir delil alanını meydana getirir [18].

Mağdur, suçlu ve olay yeri arasındaki ilişkinin açığa çıkması amacıyla olay yerinden elde edilen her tür materyal kanıt olarak kullanılabilir. Mağdur, fail ve olay yeri arasındaki geçiş, *"Her temas, bir iz bırakır"* ilkesi olarak bilinen, adli bilimler için önemli bir görüş olan Locard Prensibi ile açıklanır. Bu prensibe göre iki nesne birbiri ile temas ettiğinde birbirleri ile materyal alışverişinde bulunurlar. Bu nedenle adli bilimlerin her zaman olay yerinde başladığı söylenmektedir [19].

Olay yeri; olayı ilk tespit eden ekip, olay yeri inceleme ekibi, Cumhuriyet Savcısı, soruşturma ekibi, adli tıp hekimi vb. ekiplerin sorumluluğundadır. Olay yerleri genellikle sonuca ulaşılması sağlanacak en önemli delilleri barındırdığından, olayın aydınlığa kavuşmasındaki en büyük başarı, olay yerine gelen ilk ekibin doğru müdahalelerine bağlıdır. Olay yeri incelemesi; olay yerinde delil niteliği taşıyabilecek her türlü bulgunun, çeşitli bilimsel ve teknik yöntemler kullanılarak araştırılması, elde edilen verilerin tespit edilmesi ve kayıt altına alınması, toplanması, korunması ve incelenmek üzere ilgili kriminal laboratuvarlara gönderilmesi işlemlerinin her aşamada özen gösterilmesi gerekliliğini sağlamalıdır. Laboratuvardaki analizlerin başarısı, olay yerinden laboratuvara ulaşana kadar tüm aşamalarda çok dikkatli olarak çalışılması ile mümkündür [19,20].

2.3 Delil Kavramı

Türk Dil Kurumuna göre delil; "insanı aradığı gerçeğe ulaştırabilecek her şey" olarak tanımlanmıştır. Nitekim, hukuki bir anlaşmazlığı çözmek veya bir suçun aydınlatılmasını sağlamak için mağdur, fail ve olay yeri arasındaki ilişkiyi açıklayan her türlü ispat vasıtası delil kapsamına girmektedir [21,22].

Mağdur, fail ve olay yeri üçlüsünün arasındaki ilişkiyi açıklamak amacıyla olay yerinden alınan tüm materyallere bulgu adı verilir. İşlenen suçun açığa çıkarılmasında ve suçlu kişinin belirlenmesinde kullanılan bulgular ise delil olarak nitelendirilmektedir [4]. Deliller; tanık, sanık ve diğer kişilerin ifadelerini içeren beyan deliller olabileceği gibi, laboratuvarda incelenerek değerlendirilecek maddi deliller de olabilir. Bununla birlikte, olay yerindeki biyolojik deliller, olayın tüm aşamalarının açığa çıkarılmasında, fail ya da faillerin belirlenmesinde çoğu zaman en önemli delil grubunu oluşturmaktadır [19,23,24].

Deliller birçok farklı şekilde sınıflandırılabilmektedir. Türlerine göre bakıldığında sınıflandırma şu şekildedir:

- Biyolojik deliller; kan, kıl, semen, tükürük, idrar ve gaita, doku ve kemik örnekleri, deri döküntüsü, burun akıntısı, ter vb. canlıya ait tüm delillerdir.
- Kimyasal deliller; atış artıkları, boya, uyuşturucu madde, yanıcı ve yakıcı maddelerdir.
- Fiziksel deliller; balistik inceleme ve alet izleri gibi maddesel ispat unsurlarıdır.
- İz deliller; parmak izi, ayak izi ve ayak giysileri izleri, diş izi gibi olağan olarak herhangi bir yüzeye bırakılan özel izlerdir [24].

Olay yerinden elde edilen tüm bu örneklerin toplanma, muhafaza ve taşınma koşulları da en az örneklerin elde edilmesi kadar önemli bir süreçtir. Bu açıdan incelendiğinde cinsel saldırı vakalarında da en çok karşılaşılan örneklerden biri olan vücut sıvı lekelerinin toplanması ve taşınması için belirli kabul kriterleri bulunmaktadır. Olay mahalinden alınan herhangi bir leke örneği (sperm, tükürük vb.) temiz ve dışarı ile teması olmayan bir ortamda kurumaya bırakıldıktan sonra tek tek paketlenir. Ardından üzerine, tarih ve olay yerinde nerede bulunduğuna dair bilgiler içerecek şekilde etiketlemeler yapılır ve bu şekilde taşınımı sağlanır. Alınan örneğin taşınması kadar toplanmasında da dikkat edilmesi gereken unsurlar vardır. Örneği toplayacak kişinin uygun ekipmanları giymesi, eldiven ve bone takması gerekir. Ayrıca bir örneğin toplandığı eldivenle kesinlikle ikinci bir örnek toplanmamalıdır [25].

2.4 Cinsel Saldırı Suçları

Cinsel saldırı kavramının tanımı, bulunulan coğrafyanın etnik kökenine, gelenek görenek ve ahlaki yapısına göre değişiklik gösterebilmektedir. Ülkemizde cinsel saldırı; rızası olmayan ve yaşının küçük olması veya zihinsel problemlere sahip olunması gibi nedenlerle rızası sayılmayan bireyin kandırma, hile, zor kullanma vb. şekillerde cinsel içerik bulunduran bir davranışa maruz kalmasıdır. Bu davranışlar cinsel amaçlı bir dokunuştan ırza geçmeye kadar her tür davranışı kapsayacak şekilde çeşitlilik göstermektedir [26].

Cinsel suçlar genellikle insanın temel hak ve özgürlüklerine, bireysel özerkliğine ve bütünlüğüne yönelmiş en ağır fiziksel saldırı türü olarak, Türk Ceza Kanunu'nda "Cinsel Dokunulmazlığa Karşı Suçlar" başlığı altında yer almaktadır [27].

Cinsel saldırıyı kanıtlamanın en etkili yolu elde edilebilecek biyolojik delillerdir. Bu yüzden cinsel saldırı mağduruna son derece titizlikle yaklaşılmalı ve delil sayılabilecek tüm biyolojik materyaller tek seferde dikkatle toplanmalıdır. Bir cinsel saldırı vakasının ardından olay yerinden ve kişilerden elde edilebilen deliller genellikle tükürük, saç, kıl, deri, kan ve semen lekeleridir. Saldırı sonrasında mağdurun vücudunda rutin incelemeler yapılmalı, ayrıca anamnezi ve uygunsa ağız içi örnekleri de alınmalıdır. Elde edilen bu biyolojik deliller şüpheliye ulaşmada en önemli delilleri oluşturmaktadır [28].

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırmada cinsel saldırı suçunun yaşam boyu görülme sıklığının %5-40 aralığında olduğu bildirilmektedir [29]. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan başka bir çalışma ise, cinsel saldırıların büyük oranda olduğu şiddetli saldırı vakalarında; çoğunlukla eylemin mağdurun daha önceden tanıdığı biri tarafından gerçekleştirildiğini, saldırı mekanının genellikle ev ortamı olduğunu ve bu şiddet içeren suçların şehirde kırsala göre daha fazla işlendiğini ortaya koymaktadır [30,31].

Cinsel saldırı suçları, mağdurda hem fiziksel hem de psikolojik travma oluşturma oranlarının yüksek olması sebebiyle cinayetten sonra kişiye karşı işlenen en ağır suçları oluşturmaktadır. Oysa diğer suçlarla karşılaştırıldığında, adli makamlara bildirilen cinsel saldırıların çok düşük bir oranda olduğu, buzdağının sadece görünen kısmını yansıttığı görülmektedir [32]. Toplum ya da aile baskısı, şüphelinin yakalanamayacağı kaygısı, delillerin saklanması sebebiyle kullanılamayacağı endişesi, maalesef adli makamlara başvurularda düşük oranlara sebep olmaktadır. ABD'de, 2006-2010 yılları kapsamındaki verilerin değerlendirildiği bir çalışmada, cinsel saldırı olgularının %65 oranında polise rapor edilmediği belirtilmiştir [32]. Ayrıca son yıllarda çocuk vakalarının cinsel saldırı mağduru olarak büyük bir orana ulaştığı ve çocukların olayın duyulmasının

oluşturacağı toplum baskısı sebebiyle daha fazla zarar görecekleri kaygısıyla delilleri sakladıkları da görülmektedir [33,34,35]

2.5 Adli Vakalarda Semen Lekeleri

Cinsel saldırı iddiasının kanıtlanması için gerekli olan kesin kanıtlar çoğu zaman biyolojik delillerdir. Olay yerinde bulunabilecek biyolojik deliller; semen, tükürük, saç, kıl, deri ve kan olabilmektedir. Olay yerindeki çeşitli objelerde ve mağdurun giysilerinde semen lekelerinin belirlenmesi, cinsel olgunun faillerinin tespitinde çok önemli kanıtlar sunmaktadır [36]. Bu biyolojik delillerden sanığa ait semen örnekleri genellikle mağdurun vücut boşluklarından, giysilerinden ve çoğunlukla da olay yerindeki iç çamaşırı, çarşaf, koltuk, çöp kutusu vb. alanlardan elde edilmektedir [31]. Bulunan semen örneği taşınabilir bir eşya üzerinde ise kuruması beklendikten sonra laboratuvara gönderilir. Eğer bulunan semen örneği hala nemli ise eküvyonlu svap ile sürüntü alınır, güneş görmeyen temiz bir odada kurumaya bırakılır ardından etiketlenip, paketlenerek laboratuvara gönderilir. Eğer semen taşınılamaz bir obje üzerinde leke şeklindeyse önce kuruması beklenir ardından bulunduğu alandan kesilerek, etiketlenir ve paketlenerek laboratuvara gönderilir [24].

Semen vücudun tek bir bölümünde üretilen saf bir vücut sıvısı değildir. Erkek üreme organlarının farklı bölümlerinde farklı sekresyonlar ile birleşerek çoğalan bir yapıya sahiptir. İçeriğinin %60'ı seminal keseden, %20'si prostat bezinden, %10-15'i bulboüretral, üretral, duktus epididimis ve duktus deferensten salgılanan sıvılardan ve %5'i de spermatozoadan oluşur [37]. Semen sıvısının biyokimyasal içeriğinde fruktoz, asit fosfataz, spermin, PSA, çinko, gibi çok sayıda bileşik bulunmaktadır. Semen kendine özgü kestane çiçeği kokusundadır. Üç günlük cinsel perhiz sonrası alınan ejakülat hacmi ortalama 2-5 ml ve taze ejakülat gri-beyaz opelesan görünümdedir. Seminal plazmanın pH'si turnusol kâğıdı ile ölçüldüğünde hafif baziktir (pH:7.5-7.8). Ejakülasyondan 5-40 dakika sonra, ilk olarak koagülasyon, ardından likefaksiyon görülür. Seminal plazmanın içeriği kişiden kişiye değişir; hatta aynı kişide saatten saate de değişiklik gösterebilir [31].

Semenin bu özelliklerinden, olay yerinde tespit edilmesi için sıklıkla faydalanılır. Olay yerindeki semenin tespiti için kimyasal ajanlar, UV, spesifik proteinlerin saptanması gibi yöntemler kullanılabildiği gibi DNA analizleri gibi moleküler teknikler de sıklıkla kullanılmaktadır [31].

2.6 Semen Lekelerinin Belirlenmesi Yöntemleri

Herhangi bir cinsel saldırıya maruz kalan mağdurun anamnezinin alınmasının ardından ilk olarak fiziki muayenesi yapılır ve bu fiziki muayenede olası semen varlığı araştırılır. Daha önce yapılan çalışmalarda cinsel saldırı vakalarında araştırma yöntemleri içerisinde en anlamlı delilin mağdurun vücudunda, elbiselerinde veya eşyalarındaki semen varlığı olarak gösterilmiştir, fakat her zaman delile ulaşmak kolay olmamaktadır [38,39,40]. Cinsel saldırı vakalarında en önemli konulardan biri de semen lekesinin bulunması ve doğrulanması aşamalarıdır. Bu açıdan ele alındığında semen lekesi de dahil olmak üzere tüm biyolojik sıvıların belirlenmesi; tarama ve doğrulama olmak üzere iki başlık altında toplanmaktadır [23].

2.6.1. Tarama Testleri

İncelenen olay yerinde birden çok biyolojik sıvı, döküntü ve leke bulunabilmektedir. Bu karışık ortam içerisinden olaya yönelik sıvıları ayrıştırmak önemli bir eylemdir. Tarama testleri bu noktada örneğin ve örnek alınacak bölgenin tespiti için kullanılmaktadır. Bu çalışmanın konusu olan semen lekeleri ise olay yerlerinde sıklıkla rastlanan örneklerdir ve günümüze kadar varlığının tespiti için farklı metotlar kullanılmıştır [23].

Alternatif Işık Kaynakları (Alternative Light Source (ALS)), UV, görünür veya infrared (IR) ışık biyolojik örneklerin tanımlanmasında kullanılan ışık kaynaklarıdır [38,39]. Semen, yapısı gereği içerisinde farklı kimyasal bileşenler içerdiğinden, özellikle kumaş üzerindeki lekelerin, 250-365 nm dalga boyunda mor ötesi (Wood Işığı) ışık altında mavi-beyaz floresan verdiği bilinmektedir. Kuru semen lekesi çok güçlü fotolüminesans etki göstermektedir. Semen belirli bir dalga boyunu absorbe etmekte ve daha uzun bir dalga boyu olarak yaymaktadır. 300-480 nm'de emilen ışık, 400-700 nm'de geri yayılıma uğramaktadır. Spesifik emilim

ışığıyla beraber gerekli gözlük veya filtre kullanıldığında semen izleri net bir şekilde fotolüminesans etkisi nedeni ile görülebilmektedir. Örneğin bozulmaması ve yöntemin kolaylığı gibi avantajları olmasına rağmen benzer sıvılarda krem vb. ilaçlarda da ışıma yapması gibi nedenlerle bu testlerde tek başına yeterli olmamaktadır [23,40].

Semen içeriğindeki asit fosfataz (AP), sodyum alfa naftil fosfattan fosfat grubunu ayırarak fenol ve naftollere hidrolize eder, böylece lekenin menekşe rengini almasına neden olur ve semen lekesinin belirteci olarak kullanılır. Asit fosfataz deneylerinin oldukça hassas olması, çok fazla sulandırılan örneklerde ve lekelerde bile sonuç vermesi, 20 yıl kadar eski örneklerde de tespit edilebilmesi ve AP'nin diğer vücut dokularına kıyasla 500-1000 kat daha fazla bulunması nedeniyle semen taramaları için önemli bir belirteçtir. Ancak AP enzim aktivitesini ısı, nem vb. faktörler ile kolaylıkla kaybedebilmektedir, yapılan çalışmalar bu sürenin yaklaşık 48 saat olduğunu göstermektedir. Bu sürenin kısa olması nedeni ile de yanlış sonuçlar vermeye yatkındır. Ayrıca diğer vücut sıvılarında da az miktar dahi olsa bulunması testin spesifikliğini azaltmaktadır [31,40].

Lösin aminopepdidaz enzimi semen içerisinde yüksek aktivitededir ve bu enzim kullanılarak yine renk değişimine dayanan bir yöntem geliştirilmiştir. Semen içerisindeki enzim L-lösin-betanaftilamidden beta naftilaminin serbestleştirilmesini sağlar. Açığa çıkan ürün diazonyum tuzu ile birleştiğinde kırmızı renk gözlemlenir, bu değişim ile lekenin tanımlaması yapılır. Bu test vazektomi uygulanan kişilerde dahi sonuç vermesiyle avantaj sağlasa da farklı lekeler üzerinde yanlış sonuç verme oranı AP testine göre daha fazladır [40,41].

Semen içerisinde yüksek oranda bulunan bileşiklerden biri kolindir. Kolin seminal veziküllerden sentezlenir. Genellikle vazektomize kişilere ait olan semen lekelerinden de tespit imkânı sağlaması, uzun süre bekletilen lekelerde de olumlu sonuç vermesi gibi etmenler nedeniyle kullanılsa da rutin analizlerde hassasiyetinin az olması ve yanlış negatif sonuçlar verme olasılığı bulunması nedeniyle kullanımı kısıtlıdır [23,40].

2.6.2. Doğrulama Testleri

Doğrulama testleri, elde edilen bir örneğin tanımlanması ve kökeninin belirlenmesinde kullanılan testlerdir. Araştırılan biyolojik delile göre tek başlarına veya birlikte kullanılabilirler. Yanlış pozitif oranı çok düşük olmasına rağmen bu testlerinde yanılma payı bulunmaktadır. Cinsel saldırı vakalarındaki en önemli delil olan semen lekelerinin doğrulanması içinde farklı yöntemler ile çalışılmaktadır [23].

Semen varlığının tespitinde spermatozoitlerin mikroskop ile görüntülenmesi tanılama yöntemleri içerisinde en kesin sonuç veren yöntem olarak belirlenmektedir, fakat semende farklı hastalıklara bağlı olarak sperm görülememesi sık karşılaşılan bir durumdur. Mikroskobik incelemelerin bu gibi istisnaları nedeni ile semen tanımlamasında kimyasal yöntemler üzerinde durulmuştur [40].

Prostat Spesifik Antijen (PSA, P30 antijeni), prostat bezi tarafından üretilen proteolitik bir glikoproteindir. Seminal sıvıdaki konsantrasyonu çok yüksektir ve bu nedenle doğrulama testleri içerisinde önemli bir konumdadır [38]. Kurumuş lekelerde uzun süre (12-16 yıl) sonra dahi pozitif sonuç vermesi, az örnek bulunmasına rağmen duyarlı olması ve en önemlisi semen varlığı tayinini spermatozoa varlığından ayırmasıyla oldukça öne çıkan bir testtir. ELISA testlerinde de kullanılabilmektedir [40,41].

2.7 İnsan Mikrobiyom Çalışmaları

Tek hücreli mikroorganizmalar yaklaşık 3 milyar yıl önce dünya üzerinde oluştuğu düşünülen ilk canlı türleridir. Mikroorganizma terimi içerisinde; bakteriler, virüsler, funguslar, tek hücreli algler, arkeler ve protozoalar yer almaktadır. Mikroskop yardımıyla görülebilen bu canlılar genellikle başka canlılarla ortak bir ilişki içerisinde yaşarlar [42]. Spesifik olarak bir organizma üzerinde yaşayan veya bir organizmanın belirli bir alanında yaşayan tüm bu mikroorganizmalara mikrobiyota, bu mikroorganizmaların çevreleri ve diğer organizma ile olan etkileşiminden doğan hücresel bileşenleri ve genomu da kapsayan ekosisteme mikrobiyom denmektedir [43].

İnsan Mikrobiyom Projesi (İMP) 2007 yılında, İnsan Genom Projesinin (İGP) devamı olarak ortaya çıkmış ve ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health (NIH)) girişimi ile başlatılmıştır. Proje, çeşitli anatomik bölgelerdeki mikrobiyotayı ve mikrobiyom çeşitliliğini anlamayı, mikroorganizmaların sağlık ve hastalıktaki rollerini belirlemeyi hedeflemiştir. İMP, sağlanılan veriler ile zaman içerisinde daha kapsamlı hale gelmiş ve günümüzde yalnızca ABD ile sınırlı kalmayıp Avrupa ve Asya'dan da fazlaca projenin katılımıyla interdisipliner bir çalışma olmuştur [44].

İMP, gelecek çalışmaların bilimsel olarak yapılabilmesi için hem bir veri tabanı hem de teknolojik gelişmeler sağlamayı amaçlayarak, insan mikrobiyom çeşitliliğinin ve bunların hastalıklara etkisini inceleyecek yeni çalışmaların ortaya çıkabilmesi için insan mikrobiyom karakterizasyonunun kullanılabilirliğini göstermektedir. İMP, çeşitli sınırlamaları bulunmasına rağmen insan mikrobiyomunun takip edilmesi ve anlaşılması ile insan sağlığı araştırmalarına katkı sağlayacak yeni olanaklar ortaya çıkarmayı hedeflemektedir [44].

2.7.1 Adli Bilimlerde Mikrobiyom Çalışmalarının Uygulama Alanları

Geçtiğimiz son 10 yıla kadar mikrobiyoloji adli bilimlerde küçük roller oynamıştır. Kayıtlanan en eski vaka bir dişçinin hastalarına HIV virüsü bulaştırması ile ilgilidir. 2000'lerin başında biyoterörizim teriminin hayatımıza girmesiyle adli mikrobiyoloji üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Öncelerde pahalı olması ve uzun sürmesi gibi zorlukları nedeniyle fazla gelişme imkânı bulamayan adli mikrobiyoloji çalışmaları, son yıllarda teknoloji ve yöntemlerin gelişmesiyle araştırmaya daha elverişli hale gelmiştir [45].

Günümüzde adli mikrobiyoloji daha çok biyolojik savaş, biyolojik suç, besin zehirlenmeleri ve post mortem incelemelerde ölüm nedeninin ve zamanının belirlenmesi alanlarında kullanılmaktadır. Herhangi bir cinayet vakasında ceset veya delil üzerindeki çürümeye bağlı olarak artan mikrobiyotanın incelenmesi, cinsel yolla bulaşan hastalıkların bulaş yolunun araştırılması, sıklıkla tüketilen besinlere göre canlıda görülmesi beklenen mikrobiyota farklılıklarının araştırılması vb. daha birçok çeşitli vakanın çözümlenmesinde adli mikrobiyolojiden yararlanılmaktadır [46].

2.7.1.1 Mikrobiyomların Kişi İdentifikasyonunda Kullanımı

Bugüne kadar yapılan çalışmalar belirli bir bölgeye ait mikrobiyal profilleri incelenerek kişilerin spesifik olarak tanımlanabileceğini göstermiştir. Buna karşın hala insanlar arasındaki mikrobiyal farklılığın geniş popülasyonlardaki kişileri eşsiz bir şekilde ayırt edebilmek için kullanılıp kullanılamayacağı kesinleşmemiştir.

Mikrobiyomu adli açıdan kullanabilmek adına yapılan çalışmaların adli bilimlerde tam olarak yer alması için örneklem sayısının arttırılması ve yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bazı çalışmalar bireysel identifikasyonun kullanılabilir olacağını belirtmelerine rağmen benzer mikrobiyom modellerindeki artış nedeniyle daha geniş kitleler için yanlış sonuç verme ihtimalinin artacağını söylemişlerdir [47,48]. Genel olarak bakıldığında, bireysel kimliği tanımlamak için adli bir araç olarak mikrobiyomların kullanılması, potansiyel ve teknolojik uygulanabilirliği göstermektedir, yeterli ve elverişli miktarda insan DNA'sına ulaşılamadığı durumlarda özellikle faydalı olabilmektedir. Ayrıca, bulguların adli bir değere sahip olması için zaman ve mekândaki mikrobiyal dinamiklerin daha iyi anlaşılması gerekmektedir.

2.7.1.2 Ölüm Şekli ve Nedeninin Belirlenmesi

Adli vakalarda göz önüne alınan 5 farklı ölüm şekli vardır: doğal, kaza, intihar, cinayet ve nedeni belli olmayan ölümler. Lutz ve arkadaşlarının 2019'da geniş bir kohort ile yaptığı çalışmada kaza, intihar, cinayet ve doğal ölümlerdeki cesetler arasındaki mikrobiyom incelenerek, ölüm türleri ve mikrobiyom arasında ilişki belirlenmiştir [49]. Ancak elde edilen bazı bakteri türlerinin çevresel kontaminasyonlarda da görüldüğü ve bu nedenle çalışılacak testin iyi valide edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Bu ve buna benzer çalışmalar, geniş veri tabanları oluşturulması ile bu çalışmaların rutin adli vakalarda kullanımlarını arttırma eğilimi göstermektedir.

Ölüm nedeninin belirlenmesi ile ilgili rutin çalışmalar daha uzun süredir adli bilimlerin alanına girmektedir. Sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri ceset üzerindeki diyatome miktarının ölçülmesi ile ölüm nedeninin boğulmaya bağlı olup olmadığının anlaşılmasıdır fakat bu yöntemin güvenilirliği sorgulanmaktadır

[50]. Çeşitli çalışmalar ise sucul ortamlarla ilişkili *Aeromonas spp.* gibi bakterilerin tanılanmasına yönelik çalışmalar yaparak boğulma tanılarına destek sağlamışlardır [51]. Ayrıca biyolüminesan bakterilerin, deniz suyunda boğularak ölüm için biyobelirteç olabileceği de öne sürülmüştür [52].

2.7.1.3 Postmortem İnterval (PMI) Tahmini

Günümüzde ölüm zamanını tam olarak belirleyecek bir yöntem henüz geliştirilmemiştir fakat ceset üzerinde bazı incelemeler yaparak ölümün hangi zaman aralıklarında gerçekleşmiş olabileceği yüksek doğrulukla belirlenebilmektedir ve bu işleme *Postmortem İnvertal Tayini (PMI)* denmektedir. Ölüm sonrası ceset üzerindeki ve çevresindeki biyolojik, kimyasal ve fiziksel bulguların incelenmesi ile çalışılmaktadır.

PMI, ölüm belirtilerini inceleyerek ilerler; bu belirtiler erken belirtiler ve geç belirtiler olarak ikiye ayrılır. (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 Ölüm nedenlerinin sınıflandırılması

ERKEN BELİRTİLER	GEÇ BELİRTİLER
Fonksiyonel Belirtiler	Ölüm lekeleri
Kasların Gevşemesi	Ölü katılığı
Su Kaybı	Çürüme
Cesedin Soğuması	
Otoliz	
Kandaki değişiklikler	

Bu belirtiler arasında adli mikrobiyolojinin alanına giren kısım cesedin çürümesidir. Bu çürüme hem ceset üzerindeki mikrobiyotadan kaynaklanır hem de ceset üzerinde yeni mikroorganizmaların üremesine izin verir [37].

Ceset üzerinden elde edilen mikroorganizma kültürleri, klinik mikrobiyoloji çalışmalarında olduğu gibi kültüre alınarak çalışılır. Aralarındaki fark genel olarak çalışmaların yorumlanması ile ilgilidir.

Kimi zamanda ceset üzerindeki örnekler, yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak genomdaki belirli bir bölgenin (örn. 16S rRNA, 18S rRNA) dizilenmesi ve bilgisayar destekli programlar kullanılarak taksonomik ve filogenetik olarak sınıflandırılması aşamaları ile analiz edilir. Bu çalışmalar sırasında yalnızca PMI için değil aynı zamanda karakterize mikrobiyal değişikliklerin incelenmesi ile ek kanıtlarda oluşturulmaktadır [14].

PMI'da belirlenmesi gereken en önemli konu, ceset üzerinden elde edilen mikroorganizmaların ölümün sebebi olarak mı yoksa ölümün sonucu olarak mı ortaya çıktığıdır. Bu tartışmaların açığa çıkmasında ise ölüm sonrasında meydana gelen agonal invazyon, postmortem invazyon ve postmortem kontaminasyon aşamalarının görülme durumlarıdır. Agonal invazyon, bir bölgede veya bir organda lokalize enfeksiyonun ölümden sonra yayılım göstermesi olarak tanımlanır. Postmortem İnvazyon/Translokasyon, ölümü takiben bakterilerin çoğalarak vücudun başka bölgelerine göç etmeleridir. Postmortem kontaminasyon, otopsi tanısında, klinik ve histopatolojik bulgular ile mikrobiyolojik bulgular arasındaki ilişkilerin saptanması sırasında karşılaşılan en önemli sorundur ve sonuca ulaşılmasını zorlaştırmaktadır [37].

2.7.2 Adli Bilimlerde Semen Mikrobiyomunun Kullanımı

Cinsel saldırı vakalarında en önemli ve sonuca katkısı bulunan örnekler semen örnekleridir. Spektroskopi, kimyasal analiz, enzim-katalitik analiz ve immünolojik testler gibi tarama ve doğrulama teknikleri semen lekelerinin tanı ve tespit metodu olarak adli laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Fakat rutinde kullanılan bu testlerin özellikle beklemiş numunelerin tespitinde çoğu kez yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar vermeye yatkın olduğu bilinmektedir. Yapılan yeni çalışmalar ve gelişen teknoloji ile bu biyolojik delillerin tanımlanması için farklı metotlar geliştirilmesi üzerine araştırmalar da hız kazanmıştır. Tanımlama yöntemlerine yardımcı olması için birçok çalışma yapılmış ve günümüzde bu araştırmalar mikrobiyomların çeşitliliğini ve miktarlarını belirlemek üzerine çalışan metagenomik analizlerin kullanımı üzerine odaklanmıştır [45].

Bugüne kadar vücut sıvılarının identifikasyonu ve bunların adli bilimlerde kullanımı açısından çalışmalar yapılmış olsa da hala rutin çalışmalarda

kullanılmamaktadır. Yine de yapılan bu çalışmalarda çeşitli vücut sıvılarından kaynağa özgü mikrobiyal belirteçler belirlenebilmiştir. Örneğin; *Proteobacteria,* deri ve semen ile, tükürük *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus salivarius* ile [53,54], vajinal sıvı *Lactobacillus crispatus* ve *Lactobacillus gasseri* ile [55,56] ilişkilendirilmiştir. Bu alandaki çalışmaların çoğalması, çalışmaların geniş kohortlara yayılması ve bu çalışmalara özgü veri tabanları oluşturulması gibi adımlar adli bilimlerde mikrobiyomun kullanılması ve özellikle en önemli delilleri vücut sıvıları olan cinsel saldırı vakalarının aydınlatılmasında önemli bir adım olacaktır.

2.8 DNA Dizileme Analizleri

Genetik bilimi üzerine üst üste yapılan keşifler ve bu keşiflerden doğan yeni sorular genetik bilimcileri adım adım ileriye taşımıştır. 1953'te Watson ve Crick'in DNA'nın çift sarmal yapısını keşfetmesi dizileme teknolojilerin doğması için en önemli adımlardan biri olmuştur. Dizileme adına ilk yapılan çalışma ise 1965 yılında Robert Holley ve arkadaşlarının 77 nükleotidlik bir tRNA'yı dizilemesidir [57]. Bu yıllardan sonra çalışmalar hızlanarak devam etmiş farklı dizileme yöntemleri ortaya çıkarılmıştır.

2.8.1 Birinci Nesil Dizileme Teknolojisi

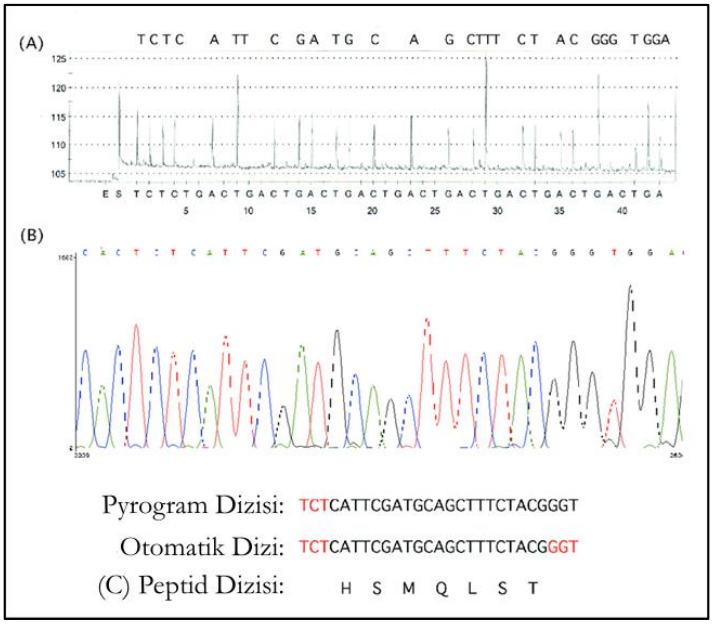
İlk oluşturulan dizileme yöntemi 1977'de Maxam ve Gilbert tarafından geliştirilen kimyasal ayrışım yöntemidir. Yöntemin temel prensibi, DNA' da bulunan bazların kimyasallar kullanılarak değiştirilmesine ve daha sonra değişikliğe uğramış nükleotidlerin (Piperidin) bulunduğu noktalardan zinciri kırması esasına dayanır [58]. Yine aynı yıl Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen zincir sonlandırma metodu ise daha uzun ipliklerin analiz edilmesine olanak sağlaması, daha kolay oluşu ve daha az toksik madde kullanımı gerekmesi gibi nedenlerle kimyasal ayrışma metodunun önüne geçmiştir. Sanger dizileme yönteminin temelinde DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozittrifosfat) yanı sıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozittrifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanmaktadır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi

durdurmakta ve daha sonra elde edilen farklı uzunluktaki DNA parçaları elektroforezle ayrıştırılarak, baz tespiti yapılabilmektedir [59].

2.8.2 İkinci Nesil Dizileme Teknolojisi

Sanger dizileme yönteminin maaliyetinin çok yüksek olması ve uzun sürelerde gerçekleşmesi ikinci nesil dizileme yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. İkinci nesil dizileme yöntemleri ile yüksek miktarda DNA molekülü dizileyerek daha yüksek verim elde edilmiştir.

İkinci nesil yöntemler bir primer yardımıyla elde edilen PZR ürünlerinin sabit bir ortamda üzerine eklenen enzim ve substratlar ile sırayla yıkanması ve taranması esasına dayanır. PZR ürünlerinin bulunduğu ortama sırası ile işaretli dNTP'ler eklenir, dNTP'lerin eklenmesi sonucu açığa çıkan floresan boyalar ışıma verir ve bu ışımalar kızıl ötesi kameralar ile tespit edilir. Ardından ortamdaki tüm dNTP ve floresan belirteçlerin yıkılması sağlanır. İşlem diğer dNTP için tekrarlanır. Elde edilen ışıma miktarı o dNTP'nin kullanım miktarı ile özdeş bir değer verir ve bu sayede Pyrogram (Şekil 2.1) adı verilen grafikler ortaya çıkar ve DNA dizilenmiş olur. Bu yöntem; dizilenecek DNA'nın uzunluğuna bağlı olarak çok kısa sürelerde sonuç verebilmektedir, doğruluk oranı oldukça yüksektir [58,60].



Şekil 2.1 Bir pyrogram örneği

2.8.3 Üçüncü Nesil Dizileme Teknolojisi

Yeni Nesil Dizileme (YND) yöntemleri olarak da adlandırılan üçüncü nesil dizileme yöntemleri ikinci nesil dizileme yöntemlerini bir adım daha ileriye taşımış ve maliyet, hız ve daha uzun dizileme açılarından fayda sağlamıştır. Üçüncü nesil DNA dizilime teknolojileri, sekansı yapılacak olan DNA parçasının ya da komple bir DNA şablonunun, katı bir yüzeye tutturularak ya da sabitlenerek veya bir gözenek hattı boyunca hareketi sağlanarak, sentez safhasında çeşitli teknolojiler sayesinde görüntülenmesi, tanınması, tekrardan okunarak uzama zincirlerine eklenmesi esasına göre çalışmaktadır. Temel olarak PZR'ye gereksinim duyan ikinci nesil dizileme yöntemlerinden en büyük farkı, direkt kalıp DNA üzerinden dizileme yapılmasıdır. Bu sayede PZR sırasında meydana gelen tüm aksaklıkların ve bundan kaynaklanan yanlış okumaların da önüne geçilmiştir [60].

2.9 Metagenomik Çalışmalarda Biyoinformatik Analizler

Metagenomik, belirli bir çevre ile ilişkili yerel mikrobiyal topluluğun farklı yönlerini hedefleyen iki ana yaklaşıma bölünmüştür. Birincisi, yapısal metagenomik yaklaşım olarak adlandırılan ana odak, topluluk üyeleri arasında kurulan karmaşık metabolik ağın yeniden yapılandırılması gibi diğer özelliklere genişletilebilen kültüre alınmamış mikrobiyal popülasyonun yapısını incelemektir. İkincisi de fonksiyonel metagenomik yaklaşımdır. Bu yaklaşım binlerce metagenomik klonlu ekspresyon kitaplıklarının oluşturulmasını ve ardından aktiviteye dayalı taramaları içeren, ilgilenilen bir fonksiyonu kodlayan genleri tanımlamayı amaçlar [61].

Tablo 2.2 Metagenomik için uygun yeni nesil DNA dizileme teknolojileri arasındaki karşılaştırma

	454/Roche	Illumina Miseq	Ion Torrent	PacBio RSII
Okuma uzunluğu (bp)	1200	300	400	50,000
Kütüphane için amplifikasyon	Evet	Evet	Evet	Hayır
Maliyet/Gb ($)	9,538	29	29	600
Hata türü	Indel	Nokta mustasyonu	Indel	Indel
Hata oranı (%)	1	0.1	1	13
Çalışma süresi	20 saat	6 gün	7 saat	2 saat

Metagenomik analizler, YND ile başlar ve elde edilen sonuçların; birleştirme, gruplama, anotasyon ve istatiksel analiz aşamaları ile devam eder.

Birleştirme, temel DNA dizisini yeniden oluşturmak için okunmuş kısa parçaların daha uzun DNA dizilerini kaynak alarak hizalanmasını ve birleştirilmesini ifade eder. Daha az karmaşık örneklerde ve araştırma konusu olan genomla yakından ilişkili türlerin genomlarının yeniden oluşturulması açısından kolay ve verimlidir. Bunun yanında okuma kapsamı düşük olduğunda ve yüksek polimorfizm ve tekrarlayan bölgeler sıklığı olduğunda dizilerin birleştirilmesinde problemler ve güçlükler yaşanabilmektedir.

Gruplama (“Binning”), elde edilen DNA dizileri içerisinden birbirleri ile yakın taksonomik sınıflandırmaya ait organizmaları temsil edebilecek gruplara ayırma aşamasını ifade eder. Gruplama algoritmaları taksonomik atamayı gerçekleştirmek için dizi kompozisyon sınıflandırması ve referanslara göre dizi hizalaması olmak üzere iki farklı strateji kullanır.

Anotasyon, tam anlamıyla, birleştirilmiş DNA molekülleri üzerindeki özelliklerin açıklamasıdır. Burada bahsedilen özellikler protein ve RNA moleküllerini kodlayan genlerdir. Anotasyon, bu genlerin fonksiyonel işlevlerinin, genetik ve metabolik yolakları üzerine açıklamalar yapılmasıdır [62].

Tüm bu biyoinformatik aşamaların ardından elde edilen çıktıların değerlendirilebilmesi, bulguların örnek meta verilerle ilişkisinin ne olduğunun anlaşılması için yapılması gereken istatiksel analizler bulunmaktadır [63]. Kullanılan çoğu istatiksel analiz metodu metagenomik için özel olmamakla birlikte çoğu biyolojik araştırmada kullanılabilecek analizlerdir [63]. Metagenomik analizlerde genellikle numune başına toplam sayının büyük değişkenlikte olması, verilerin anlamlı bir şekilde karşılaştırılmasını önler. Bu yüzden öncelikle elde edilen sayılar 'normalleştirilir'. En basit ve en sık kullanılan normalleştirme, ham bollukları numune başına toplam sayım sayısına bölerek göreceli bollukların hesaplanmasıdır. Verilerin düzenlenmesinin ardından taksonomik analizlerdeki en önemli aşamalardan biri çeşitlilik analizleridir. Mikrobiyom çeşitliliği, alfa ve beta çeşitliliği olmak üzere iki tür ölçüme ayrılabilen çoklu ekolojik endekslerle değerlendirilebilir. Alfa çeşitliliği, bir numune içindeki türlerin değişkenliğini ölçerken, beta çeşitliliği, numuneler arasında bileşimdeki farklılıkları hesaba katar [64].

2.9.1. Alfa Çeşitlilik

Bir örnek içindeki organizma çeşitliliğinin araştırılması için yararlanılır. Niceleme ölçütleri, zenginliği (örnekteki toplam organizma sayısı) ve / veya eşitliği (diğerlerinden daha bol olanın aksine, eşit olarak dağıtılmış olmaları) vurgulanır [65]. Bir OTU (Operational Taxonomic Unit) tablosu kullanarak alfa çeşitliliğini veya örnek içi çeşitliliği hesaplanabilir. Kullanılan bazı biyoinformatik programlar (örneğin QIIME paketi) ile birçok farklı çeşitlilik ölçümüne uygun hesaplamalar yapılabilmektedir.

Örnek bazında tür kompleksliğinin hesaplanması için farklı indeksler (observed species, chao1, ace, shannon ve simpson) üzerinden Alfa çeşitlilik analizi yapılabilir [66].

2.9.2 Beta çeşitlilik

Bu analizde iki ya da daha fazla topluluk arasında paylaşılan, örneğin aynı vücut bölgesinde örneklenen iki ya da daha fazla farklı kişiden paylaşılan üye çeşitliliği araştırılabilir. Taksonomik olarak (paylaşılan mikroorganizmaları sayarak) veya

filogenetik olarak (paylaşılan filogenetik dalları ölçerek) ölçülebilme seçenekleri mevcuttur [65].

2.9.3. Temel Koordinatlar Analizi (PCoA)

Temel Koordinat Analizi (PCoA) ve sıcaklık haritası (Heatmap), sekanslama verilerini analiz etmek için kullanılan iki popüler yöntemdir [67]. Temel Koordinatlar Analizi verilerin benzerliklerini veya farklılıklarını araştırmak ve görselleştirmek için bir yöntemdir. Ana koordinat analiziyle üretilen grafikler çoğunlukla çok boyutlu ölçeklemeler şeklindedir. Bir benzerlik matrisi veya benzemezlik matrisi (= mesafe matrisi) ile başlar ve her bir öğe için düşük boyutlu bir alanda genellikle 3 boyutlu bir grafik olarak gösterilebilir [68].

Tablo 2.3 Metagenomik analizlerde kullanılan bazı yazılımlar

Araç	**Özellikleri**
FastQC	Modüler seçenekleri kullanarak yüksek verimli dizi verileri için kalite kontrol aracı. Temel dizi kalitesini, GC içeriği, N sayısı ve duplikasyon sonuçlarını grafik olarak verir
Fastx-Toolkit	Kısa okuma kalite kontrolü için komut satırı araçları. Bunlar, dizi uzunluğuna ve kimliğine göre işlemeye, kesmeye, format dönüştürmeye ve daraltmaya izin verir.
MEGAHIT	Hesaplama maliyetini azaltmak için kısa ve öz de Bruijn veri yapısıyla artan k-mer stratejisini kullanır.
QIIME	Ham okumaların kalite ön işlemesi, taksonomik açıklama, çeşitlilik tahmin edicilerinin hesabı ve metaprofil oluşturma veya metagenomik verilerin karşılaştırılmasını yapar.
MEGAN	Metagenomik okumaların taksonomisi ve fonksiyonel analizi. Kısa okumaların BLAST çıktısını temel alır ve karşılaştırmalı metagenomikleri gerçekleştirir. Grafik arayüzü.
FragGeneScan	Kısa okumalardan gen kodlama dizileri tahmin eder ve kümeler.
MetaclusterTA	Referans genomlarına bağlı olarak okumaların ve kontiglerin gruplandırılmasına dayalı taksonomik anotasyon yapar.
MaxBin	Metagenomik kısa okumaların ve kontiglerin denetimsiz gruplamasını yapar.
MetaORFA	Tahmini ORF'lerden elde edilen peptitleri birleştirir.
RAMMCAM	Metagenomik fonksiyonel anotasyon ve veri kümelemesi
Phyloseq	Ön işleme, çeşitlilik analizi ve grafik üretimi için satır okumaları için araç seti. R, Bioconductor paketi
MetagenomeSeq	Metaprofil oluşturma verilerinde 16S rRNA geninin diferansiyel bolluğunun analizi. R, Bioconductor paketi
MG-RAST	Taksonomik ve fonksiyonel anotasyona, karşılaştırmalı metagenomik. Grafik arayüz.
IMG/M	Fonksiyonel açıklama, genlerin filogenetik dağılımı ve karşılaştırmalı metagenomik.

3
MATERYAL METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Deneyde Kullanılan Malzemeler

- Santrifüj (Hettich)
- +4 °C Buzdolabı (Arçelik)
- Vorteks (VELP Scientifica)
- - 20 °C Derin Dondurucu (Arçelik)
- PZR cihazı (Ependorf)
- Thermal Cycler (Biorad)

3.1.2 Deneyde Kullanılan Kimyasallar

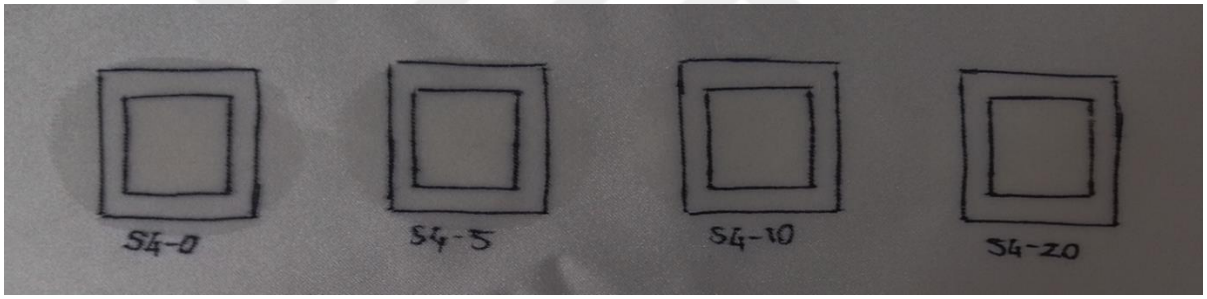
- Etil Alkol (Merck)
- Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo)
- PBS (Sigma)

3.2 Metot

Yapılan çalışmada bir adli olay senaryosu kurgulanmıştır. Çalışmada kullanılan semen örnekleri için Altınbaş Üniversitesi Etik Kurulu'ndan (Etik Kurul no. 2021/87) izin alınmıştır. Çalışmaya katılan gönüllülere çalışmanın amacı hakkında bilgi verilmiş ve her bir gönüllüden "Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu" alınmıştır. Kurguya göre amaç, olay yerinde bulunan bir kumaş parçasının üzerindeki semen lekesinin oluşturduğu alandaki mikrobiyomun incelenerek tayin edilmesi olduğundan, alınan örnekler kumaş parçalarına uygulandı ve çevresel etmenlere maruz kalmasını canlandırmak amacıyla bir dolap içerisinde açık bir şekilde bekletildi. Örnekler 0., 5., 10. ve 20. günlerde kumaş üzerinden kesilerek toplandı. Çalışma da tek bir kurgu olup, bu kurgu 5 farklı kişiyle tekrarlandı.

3.2.1 Kurgunun Oluşturulması ve Örneklerin Toplanması

- Çalışma için son 1 ay içerisinde antibiyotik kullanmamış 5 erkek gönüllü seçildi ve bu kişilerden steril bir alanda semen örnekleri ejakülasyon yoluyla steril bir idrar kabına alındı.
- Beyaz renkli polyester kumaş üzerine 4 farklı 3x3 cm^2'lik kare ve bu karelerin içerisine de 2x2 cm^2'lik kareler çizildi. Kareler etiketlendirildi (Şekil 3.1).
- 150 μl örnek karelerin merkezine denk gelmesine dikkat edilerek mikropipet yardımı ile boşaltıldı.
- Kuruyan kumaş örneklerinden sırasıyla 0., 5., 10. ve 20. günlerde 2x2 cm^2'lik küçük kareler kesilerek alındı ve izole edilecek DNA miktarını arttırmak amacıyla, kit protokolü uygulanmadan önce, PBS çözeltisi içerisine konularak 4 gün oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Sonrasında DNA izolasyon kiti protokolüne göre izolasyona devam edildi.



Şekil 3.1 Semen ile lekelendirilmiş kumaş örnekleri

3.2.2. Örneklerden DNA İzolasyonu

Tüm örneklerden DNA izolasyonu, Zymo Quick-DNA Miniprep Plus Kit ile gerçekleştirilmiştir.

- PBS içerisindeki örnekler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Tüp içerisinde 200 μl pellet kalacak şekilde süpernatant atıldı.
- Pellete 200 μl Bio-Fluid & Cell Buffer ve 20 μl DTT eklendi ardından dikkatlice vortekslendi.
- Tüpler 55 ºC' de 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası tüp içerisindeki kumaş parçası atılarak tüp içerisine 420 μl Genomic Binding Buffer eklendi.

- Karışım iyice vortekslendikten sonra kolona aktarıldı ve 12000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolon yeni toplama tüpüne alındı ve üzerine 400 μl DNA Pre-Wash Buffer eklendi ve 12000 g' de 1 dakika santrifüjlendi.
- Kolon içeriği döküldükten sonra, kolona 700 μl g-DNA Wash Buffer eklendi ve 12000 g' de 1 dakika santrifüjlendi.
- Toplama tüpü boşaltılarak kolana 200 μl g-DNA Wash Buffer eklendi ve 12000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.
- Son olarak kolonlar örneğin saklanacağı toplama tüplerine alınarak 30 μl DNA Elution Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk. inkübasyona bırakıldı. Ardından 12000 g' de 1 dk. santrifüjlendi.
- Elde edilen izolasyon ürünleri bir sonraki aşamaya kadar -20 ºC' de muhafaza edildi.

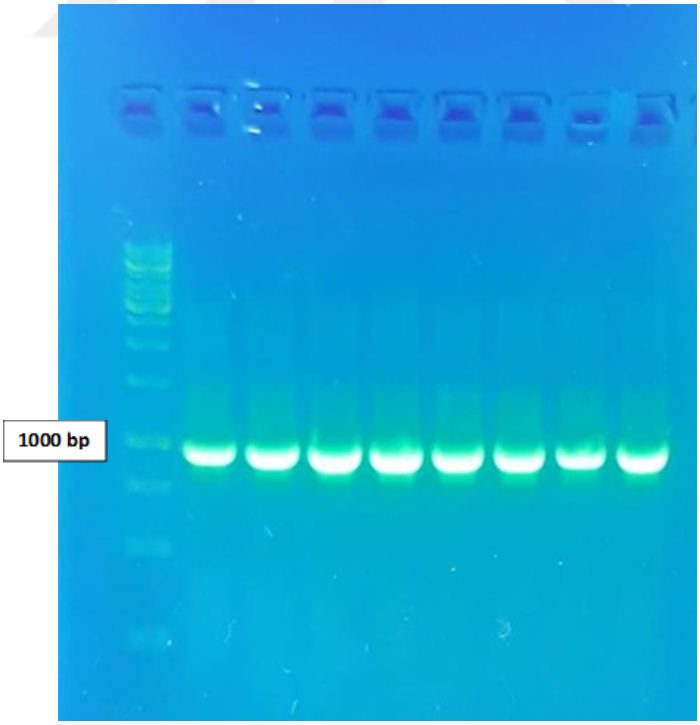
3.2.3 PZR Reaksiyonunun Oluşturulması ve Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen tüm örnekler için 16S ribozomal DNA PZR reaksiyonu oluşturulmuştur. Reaksiyon başına kullanılan PZR bileşenleri ve miktarları Tablo 3.1'de yer almaktadır.

Tablo 3.1 PZR bileşenlerinin reaksiyon başına kullanılacak hacimleri

PZR bileşenleri	Reaksiyon başına kullanılan hacim
Forward Primer (518 F)	1 μl
Reverse Primer (1492 R)	1 μl
Su (Distile)	9,5 μl
Green PCR Master Mix (Dream Tag DNA Polimeraz)	12,5 μl
Kalıp DNA	1 μl
Toplam Hacim	**25 μl**

- Tüm örnekler için PZR tüpleri hazırlandı ve etiketlendirildi.
- Tüm PZR bileşenleri sırasıyla belirtilen hacimlerde (Tablo 3.1) tüplere aktarıldı.
- Hazırlanan PZR karışımları cihaza yerleştirildi. PZR reaksiyonu Bio-Rad T100 PCR Thermal Cycler ile gerçekleştirildi.
- PZR sonrası tüm örnekler agaroz jel elektroforezi için +4 ºC'de bekletildi.
- Agaroz jel elektroforezi için 50 ml 1X TAE tamponu üzerine 0.5 gr. agaroz eklendi.
- Karışım iyice çalkalandı ve ısıtılarak çözünmesi sağlandı.
- Soğuması beklendikten sonra içerisine 3 μl EtBr eklendi ve jel tepsisine döküldü.
- Hazırlanan jel kuyularına her birinden 5 μl olacak şekilde PZR reaksiyon ürünleri eklendi. Ladder olarak Thermo Fisher GeneRuler 1 kb DNA Ladder kullanıldı.
- Örnekler 90 V' da 1 saat boyunca yürütüldü ve ardından görüntüleri alındı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Jel elektroforez görüntüleri

3.2.4. Yeni Nesil Dizileme

Elde edilen semen örneklerinden, Zymo Quick-DNA Miniprep Plus Kit çalışma talimatlarına göre gDNA'ları elde edilmiş ve konsantrasyon bilgileri Qubit 2.0 (Thermo Fisher, Cat. No. Q32866)- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. Q32854) ile alınmıştır. 16S rRNA geninin PZR amplifikasyonu QIAGEN 16S/ITS Screening Panel (QIAGEN, Cat. No. 333845) kiti ile el kitabında (QIAseq 16S/ITS Panel Handbook v. 04/2019) belirtilen koşullarda ve 16S rRNA geninin V1-V9 bölgelerini kapsayan, bu kitin içeriğinde bulunan primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplamda 3 primer havuzu kullanılmıştır ve bunlar sırasıyla aşağıdaki bölgeleri kapsamıştır:

- Primer 1: V1-V2, V4-V5
- Primer 2: V2-V3, V5-V7
- Primer 3: V3-V4, V7-V9

Elde edilen 16S amplikonları manyetik tanecik (QIAseq Beads – QIAGEN, Kat. No. 1107460) yöntemiyle saflaştırılmıştır. Daha sonra örneklerin tekrar kontrol ve esas konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler Qubit 2.0 ve QIAxcel (Qiagen, Kat. No. 9001941) kullanılarak yapılmıştır. Dizileme işleminde, hazırlanmış olan DNA kütüphanesi, Illumina V3-500 döngülük kartuş ile Illumina MiSeq (Illumina) ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. Biyoinformatik Analizler

3.2.5.1. Biyoinformatik Analiz

Dizileme sonucunda elde edilen ham verilerin temel kaliteleri fastqc (v. 0.11.9) komut satırı programı kullanılarak gösterilmiştir [69]. Dizilerin kalite kontrolü sonrasında, bbduk (v. 38.98) komut satırı programı ile adapter ve barkodlardan kurtarılmış, clumpify (v. 38.98), filterbytile (v. 38.98), bbduk (v. 38.98) ve bbmap (v. 38.98) ile de birleştirilmiş 16S dizileri oluşturulmuştur [70]. Bakteriyel 16S dizileri, 21.06.2021 tarihli NCBI 16S bakteri taksonomi referansı (NCBI 16S Ribosomal RNA Database ve NCBI Entrez Molecular Sequence Database System) veri bankasına NCBI BLASTN CLI (v. 2.0.13) ile eşleştirilip anotasyonu yapılarak,

her örnek için OTU tabloları %95 benzerlik limiti kullanılarak tür taksonomik seviyesine kadar elde edilmiştir.

3.5.2.2. İstatistiksel Analizler

Elde edilmiş olan OTU dosyaları, R (v. 4.2.1) ve Rstudio IDE (v. 2022.07.1) ile tek bir tabloda birleştirilerek tüm bakteriler için göreceli miktarlar elde edilmiş, yine R İstatistiksel Bilgisayar Dili (tidyverse, dbplyr, extrafont, caret, crayon, gplots, ggscı, ggplot2, ggrepel, ggpubr, ggthemes, ggthreed, grid, gridExtra, hrbrthemes, MASS, pheatmap, proustr, purr, RcolorBrewer, readr, readxl, rgl, RVenn, stats, taxize, taxizedb, tm, VennDiagram ve xlsx paketleri) kullanılarak verilerin istatistiksel analizleri yapılmıştır. Analizlerin güvenilirlik değeri olarak %95 (alpha=0.05) alınmıştır. Normallik testi için Shapiro-Wilk's testi, önemli farklılık gösteren özellikleri belirlemek amacıyla dağılımlara göre, ANOVA ya da Kruskal-Wallis Testi ve doğrulama yöntemi olarak da Benjamini-Hochberg yöntemi uygulanmıştır.

OTU ve organizma bolluk tabloları alfa – beta çeşitlilik analizlerinde türe kadar tüm taksonomik seviyelerde uygulanmıştır. Bu işlemde, Python programlama dili (v. 3.10.4) ve R istatistiksel bilgisayar dili (v. 4.2.1) kullanılmıştır [71,72]. Çalışmada, OTU ve bolluk tablolarındaki dağılımların farklı gruplara ayrılmasını ve bunların minimum boyuttaki ayrımını yapan değişkenler bulunmaktadır (R MASS v.7-3.58 paketi). Alfa çeşitlilik analizinde (R phyloseq v. 1.40.0 paketi [73]), örneklerin grupsal olarak farklılıkları ele alınmaktadır. Bu analizde üç farklı metrik ele alınmıştır: Gözlenen miktar (Observed), Shannon ve Inverse Simpson Metrikleri. Gözlenen miktar, sadece listelenmiş organizma çeşidi sayısına, Shannon ve Inverse Simpson ise hem gözlenen çeşitlilik sayısına hem de organizmaların bolluklarının eşitliliklerine bakmaktadır. Hesaplamalarında ise Inverse Simpson eşitliliğe daha çok ağırlık vererek metriğini hesaplamaktadır. Beta analizi (R phyloseq v. 1.40.0 paketi), OTU ve bolluk tabloları kullanılarak hesaplanmıştır [73]. Burada Bray-Curtis Benzersizlik İndisi, Unifrac Unweighted ve Unifrac Weighted İndisleri hesaplanmıştır. Beta analizi sonucunda oluşturulan uzaklık değerleri PCoA saçılım grafiğinde (R v. 1.40.0 phloseq paketi [73]) gösterilmiştir.

4
BULGULAR

4.1 Örneklerin DNA Kantifikasyonu

Çalışma kapsamında gönüllülerden toplanan semen örneklerinden Zymo Quick-DNA Miniprep Plus Kit DNA izolasyon kiti ile ekstraksiyon yapıldı. Sonrasında, Qubit™ 4 (Thermo Fisher) cihazı ile DNA izolatlarının saflık ve miktar analizleri gerçekleştirildi ve elde edilen ölçüm verileri Tablo 4.1'de belirtilmektedir.

Tablo 4.1 İzolasyon sonrası DNA miktarları

Kişi	P01			
Zaman	S00	S05	S10	S20
DNA miktarı (ng/μl)	9.47	22.3	10	10.4
Kişi	P02			
Zaman	S00	S05	S10	S20
DNA miktarı (ng/μl)	34.4	15.94	20.4	15.76
Kişi	P03			
Zaman	S00	S05	S10	S20
DNA miktarı (ng/μl)	68.8	118	44.2	66.9
Kişi	P04			
Zaman	S00	S05	S10	S20
DNA miktarı (ng/μl)	133.5	316	139.5	62.5
Kişi	P05			
Zaman	S00	S05	S10	S20
DNA miktarı (ng/μl)	150	96.2	265	64

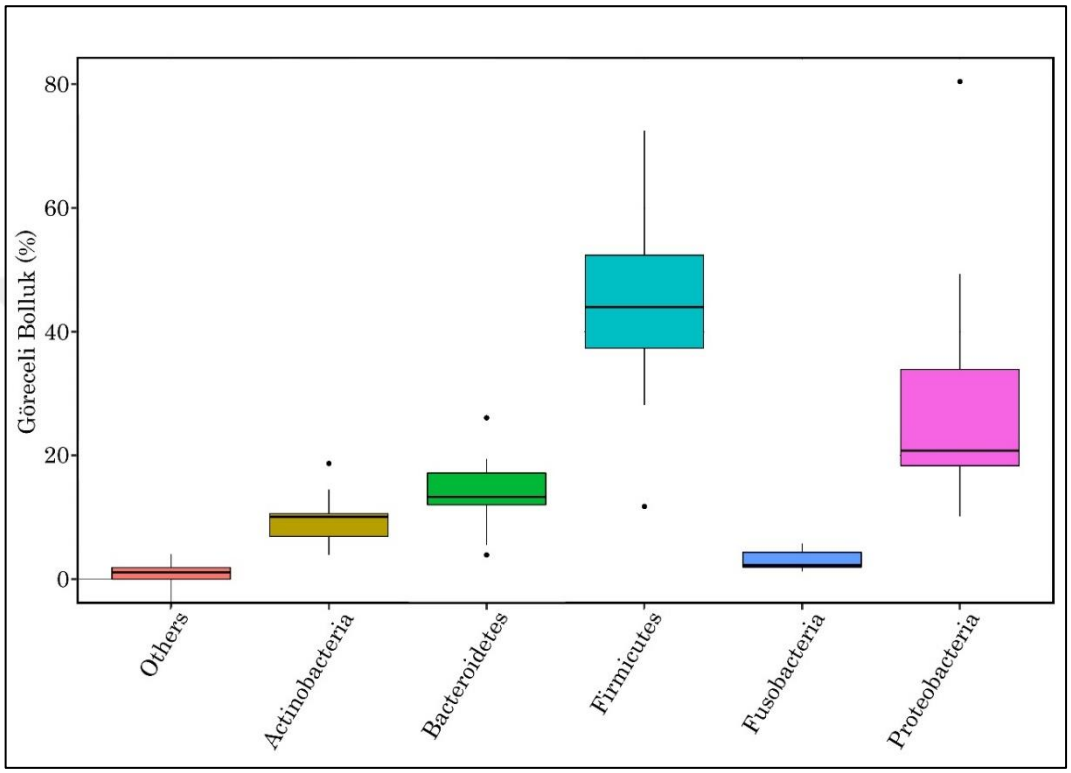
4.2 Metagenomik Analiz Bulguları

Toplamda 20 örnek için yapılan 16S rRNA sekanslaması sonucunda tüm taksonomik sınıflar için biyoinformatik ve taksonomik analizler gerçekleştirilmiştir. Toplam 13.433.596 V1 ve V9 16S rRNA gen dizisi elde edilmiş ve numune başına dizi sayısı 317.979 ila 1.685.999 arasında değişmiştir. GC içeriği % 52 mevcuttur. Filum düzeyinde 17, cins düzeyinde 323, tür düzeyinde ise 692 farklı OTU tespit edilmiştir.

4.2.1. Taksonomik Sınıflandırma, Alfa ve Beta Analizleri

Örneklerdeki taksonomik bilgi tür, cins ve filum seviyesinde taksonomik olarak sınıflandırılmıştır. Sonuçlar Python programlama dili (v. 3.10.4) ve R istatistiksel bilgisayar dili (v. 4.2.1) kullanılarak histogram düzeyinde hazırlandı.

4.2.1.1. Filum Düzeyinde Analiz



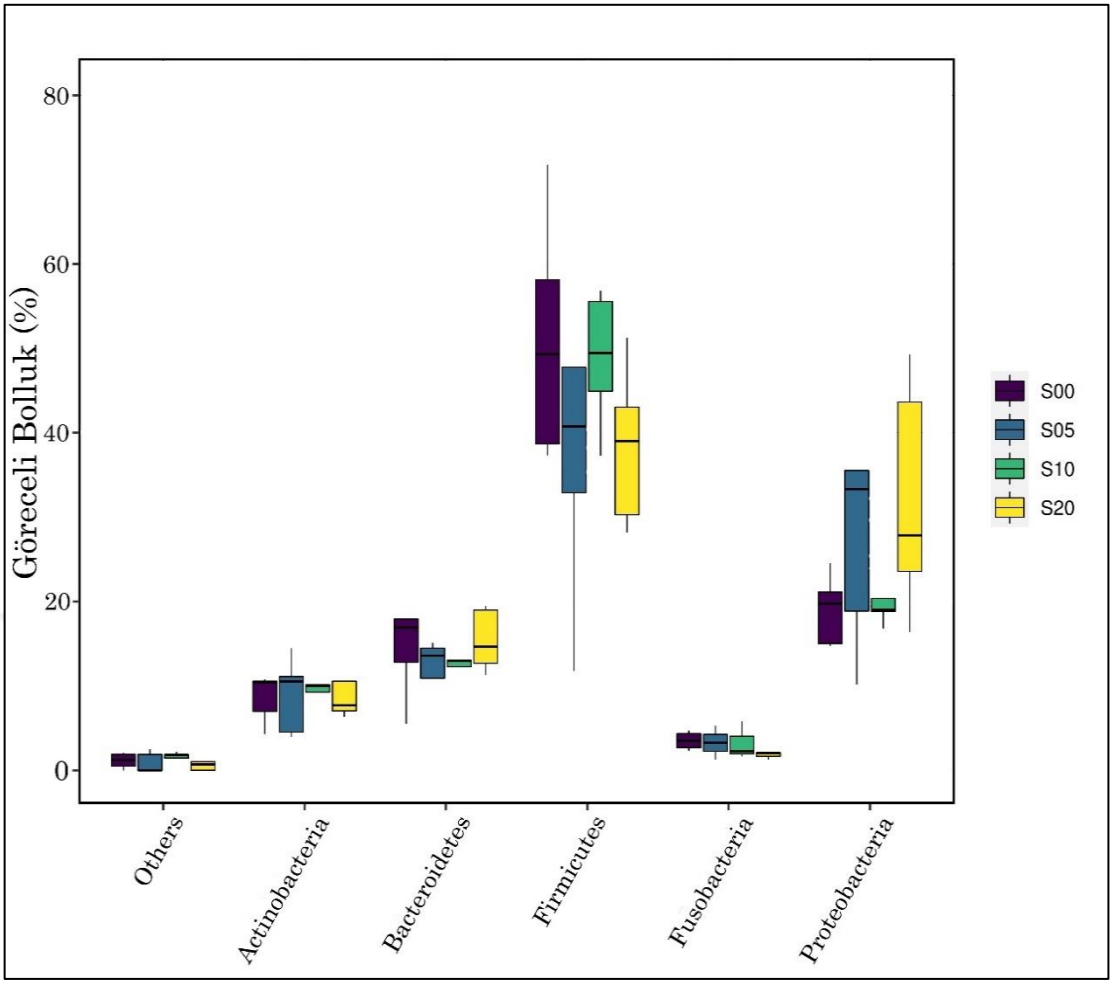
Şekil 4. 1 Filum düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerini gösteren grafik (%)

Semen örneklerinin filum seviyesindeki incelemelerinde; *Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidete*s, *Actinobacteria* ve *Fusobacteria* filumları tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Bu filumların ortalama bolluk değerleri % cinsinden Tablo 4.2'de verilmiştir.

Taksonomik sınıflandırmalar ve metagenomik analizler sonucunda; 5 katılımcının tüm örneklem günlerinde *Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria* ve *Fusobacteria* sırasıyla en yüksek oranda belirlenerek, tüm toplamın %95'ini oluşturdukları tespit edilmiştir. Özellikle *Firmicutes* ve *Proteobacteria* filumları, tüm semen örnekleri açısından araştırıldığında, toplam bakteri popülasyonu içerisinde %72'nin üzerinde bir oranda bulunmaktadır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Filum düzeyindeki bakterilerin tüm katılımcılar için ortalama göreceli bolluk (Ort.) değerleri (%).

Organizma	P01 Ort.	P02 Ort.	P03 Ort.	P04 Ort.	P05 Ort.	Genel Ort.
Acidobacteria	0.16	0.14	0.00	0.00	0.00	0.06
Actinobacteria	11.68	8.74	7.88	8.71	9.49	9.30
Bacteroidetes	12.05	15.08	13.73	11.75	17.33	13.99
Candidatus Melainabacteria	0.00	0.14	0.29	0.00	0.00	0.09
Chloroflexi	0.51	0.19	0.00	0.00	0.32	0.20
Cyanobacteria	0.46	0.76	0.18	1.10	0.18	0.54
Deinococcus-Thermus	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
Euryarchaeota	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
Firmicutes	53.54	55.65	33.52	39.65	41.85	44.84
Fusobacteria	0.36	2.16	1.27	2.43	3.25	1.89
Proteobacteria	19.38	15.15	41.91	36.18	26.14	27.75
Spirochaetes	0.16	1.12	0.29	0.18	0.97	0.54
Synergistetes	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.02
Tenericutes	0.98	0.61	0.70	0.00	0.24	0.51
Thaumarchaeota	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.02
Thermotogae	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24	0.05
Verrucomicrobia	0.20	0.26	0.00	0.00	0.00	0.09



Şekil 4. 2 Filum düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerinin 0., 5., 10. ve 20. günlerdeki dağılımını gösteren grafik (%)

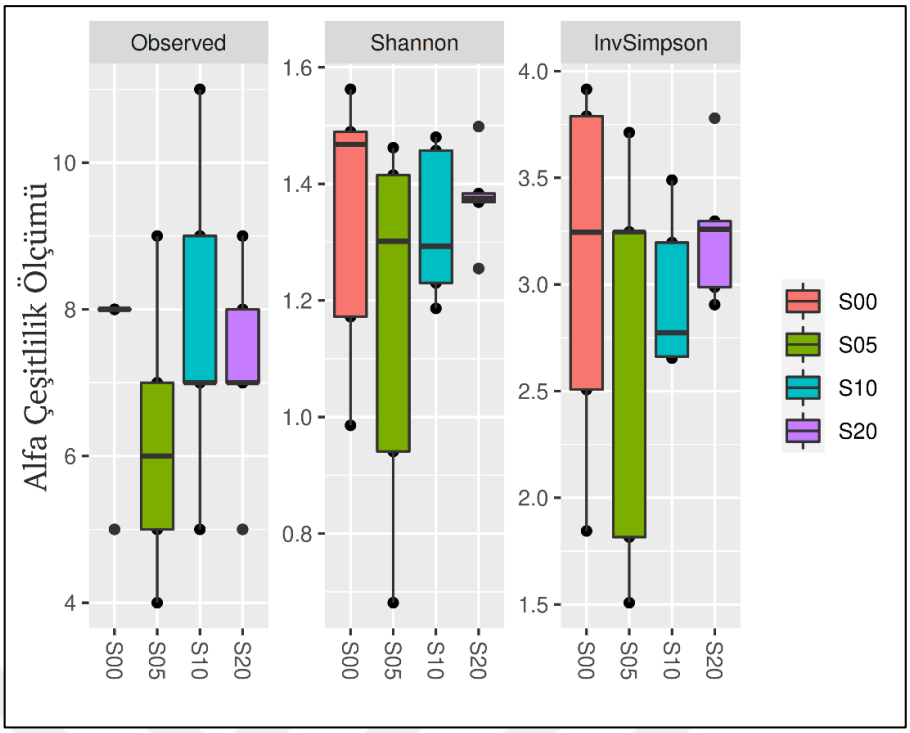
Şekil 4.2 incelendiğinde, *Proteobacteria* hariç, *Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria* ve *Fusobacteria*'nın, 20. gündeki maruziyet örneklerinde, örneklerin iç ortam koşullarına maruz kalmadığı günden (S00) daha düşük oranda mikroorganizma tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3 Tüm zaman dilimlerinde katılımcılara ait örneklerdeki mikroorganizma filumlarının medyan değerleri (%)

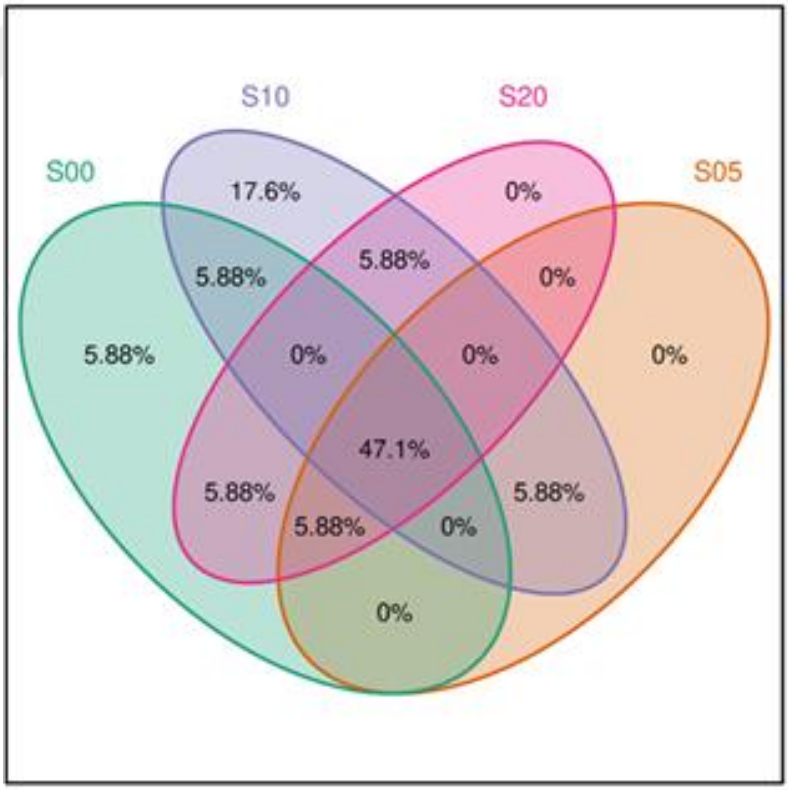
Organizma	S00 Medyan	S05 Medyan	S10 Medyan	S20 Medyan
Actinobacteria	10.38	10.53	10.00	7.69
Bacteroidetes	16.90	13.58	12.96	14.63
Cyanobacteria	0.70	0.00	0.73	0.00
Firmicutes	49.30	40.74	49.46	39.02
Fusobacteria	2.82	0.75	1.63	1.27
Proteobacteria	19.77	33.33	19.02	27.85
Spirochaetes	0.70	0.00	0.46	0.70
Tenericutes	0.47	0.00	0.00	0.51

Alfa Çeşitlilik Analizleri

Her bir örnekleme zamanı içindeki mikroorganizma çeşitliliğinin araştırılması amacıyla OTU tablosundan yararlanarak, alfa çeşitlilik analizleri gerçekleştirildi. Örneklerin alfa çeşitliliğini tahmin etmek için, Shannon çeşitlilik indeksi ile ölçülen zenginlik fonksiyonunu yansıtacak şekilde alfa çeşitlilik grafiği (Shannon indeksi) çizilmiştir (Şekil 4.3). Her numunenin bakteri topluluğu çeşitliliğini tahmin etmek ve karşılaştırmak için, Shannon indeksi her kütüphanenin OTU'larından topluluktaki bir bakteri türünün birey sayısının toplam birey sayısına oranlanması ile hesaplandı (Şekil 4.3). Shannon grafiği incelendiğinde örneklerdeki tür çeşitliliğinin oldukça yüksek olduğu ve örneklemenin ilk günündeki mikroorganizma sayısının 5. ve 10. günde bir miktar azaldığı, sonrasında tekrar artma eğilimi gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.3).



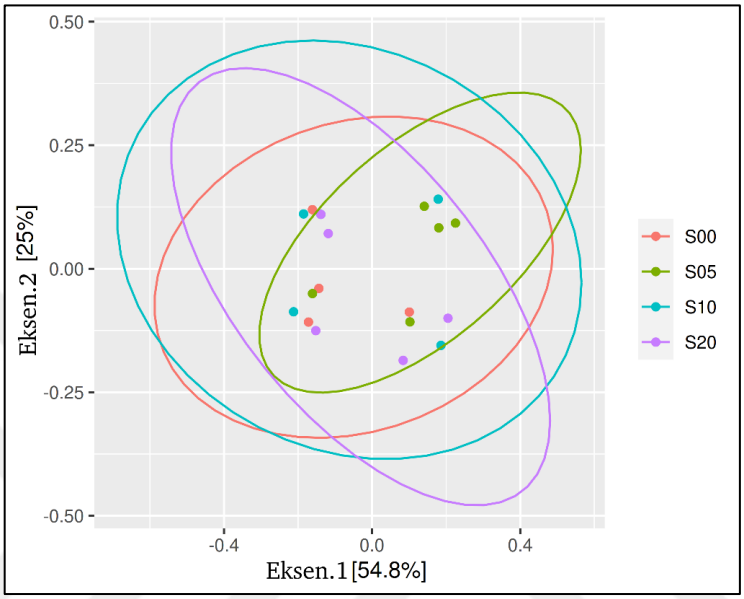
Şekil 4. 3 Filum düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin Shannon ve Simpson indeksleri kullanılarak oluşturulan alfa çeşitlilik analiz grafiği



Şekil 4. 4 Filum düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin zamana bağlı olarak dağılımını gösteren Venn Şeması

Venn şeması analizlerinde, mikrobiyal çeşitlilikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen, iç ortam koşullarına 10 gün maruz kalan semen numunelerin kontrol numunelerinden filum düzeyinde daha yüksek oranda farklılık gösterdiğini gözlemledik (Şekil 4.4).

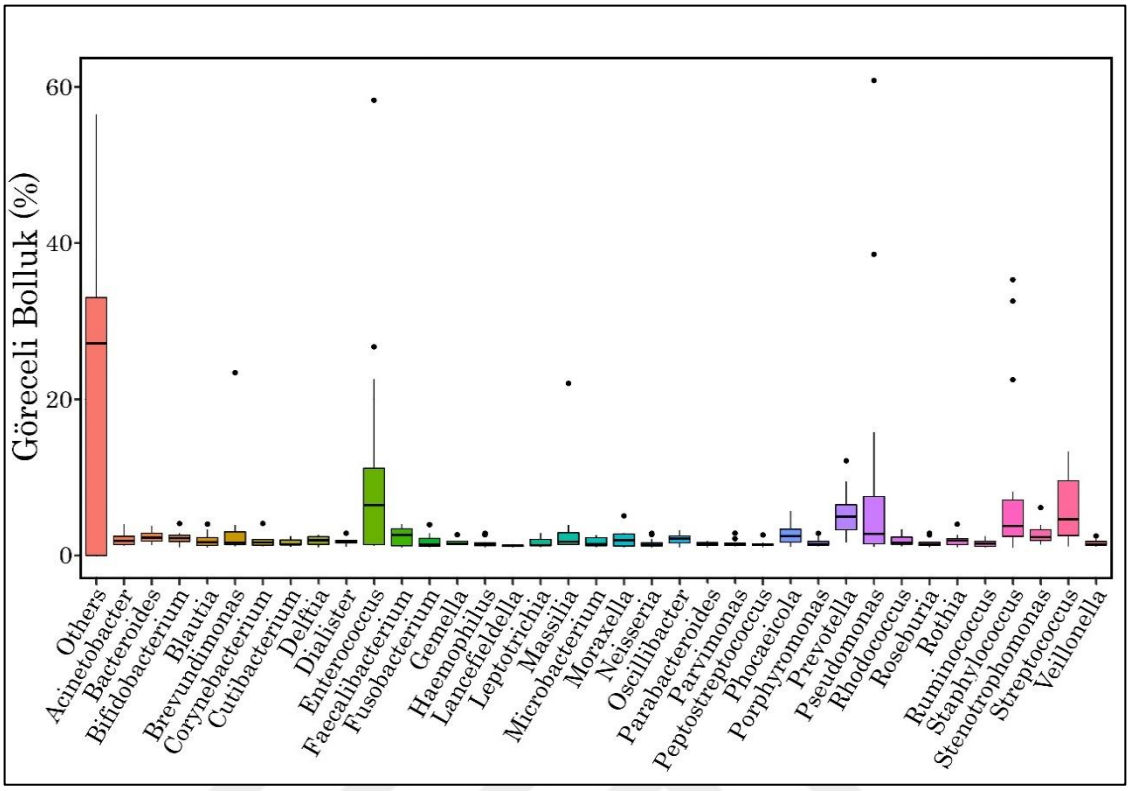
Beta Çeşitlilik Analizleri



Şekil 4. 5 Filum düzeyinde örnekler arasındaki Unifrac uzaklıların dikkate alındığı zamana bağlı dağılımı gösteren Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği.

Semen örneklerinin dış ortam maruziyeti ve zamana bağlı olarak elde edilen örneklerindeki değişimi, örneklerin dizilemesi sonucu elde edilen veriler ve tespit edilen bakteri filumlarının göreceli bolluğunu gösteren tablolar kullanılarak, beta çeşitlilik analizleri oluşturulmuştur. Beta çeşitlilik analizlerinde örnekler arasındaki mikrobiyal uzaklık, unweighted Unifrac mesafeler kullanılarak değerlendirilmiştir. Şekil de kırmızı noktalar maruziyet öncesi semen örneklerini ve diğer renkler de maruziyet sonrası örnekleri temsil etmektedir. Birbirine yakın olarak bulunan örneklerin, filum kompozisyonu bakımından benzer olduğu görülmektedir. Örnekler arasındaki Unifrac mesafesi nispeten en yüksek olan örneğin, maruziyet sonrasındaki 20. gündeki örnekler olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.5).

4.2.1.2. Cins Düzeyinde Analiz

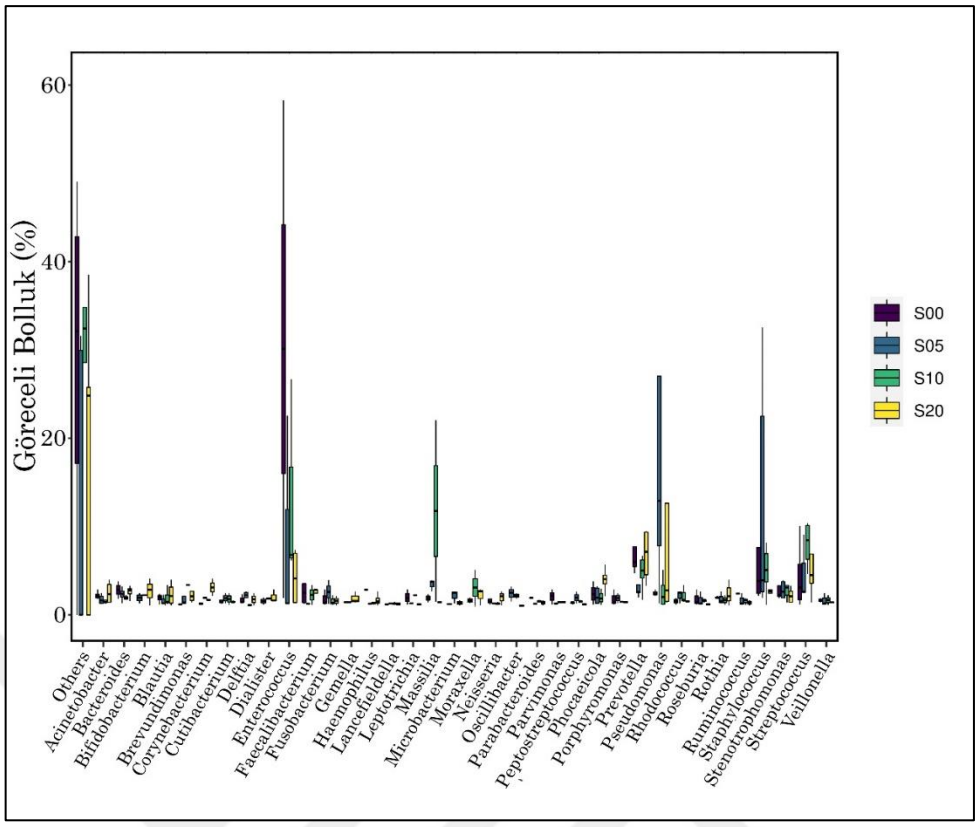


Şekil 4.6 Cins düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerini gösteren grafik (%)

Semen örneklerinin cins seviyesindeki incelemelerinde; *Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus ve Provetella* bakterileri ağırlıklı olarak tespit edilmiş ve toplam bakteri popülasyonunun %32' sini oluşturdukları gözlenmiştir (Şekil 4.5). Bu cinslerin ortalama göreceli bolluk değerleri % cinsinden oranları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4 Cins düzeyinde en çok görülen bakterilerin tüm katılımcılar için ortalama göreceli bolluk (Ort.) değerleri (%).

Organizma	P01 Ort.	P02 Ort.	P03 Ort.	P04 Ort.	P05 Ort.	Genel Ort.
Pseudomonas	0.84	1.10	26.07	6.16	4.40	7.71
Staphylococcus	2.64	9.65	3.97	11.99	10.23	7.70
Enterococcus	28.74	3.92	0.00	2.38	0.88	7.18
Prevotella	3.17	6.04	4.57	4.49	6.05	4.86
Streptococcus	1.87	8.50	3.30	1.31	7.03	4.40



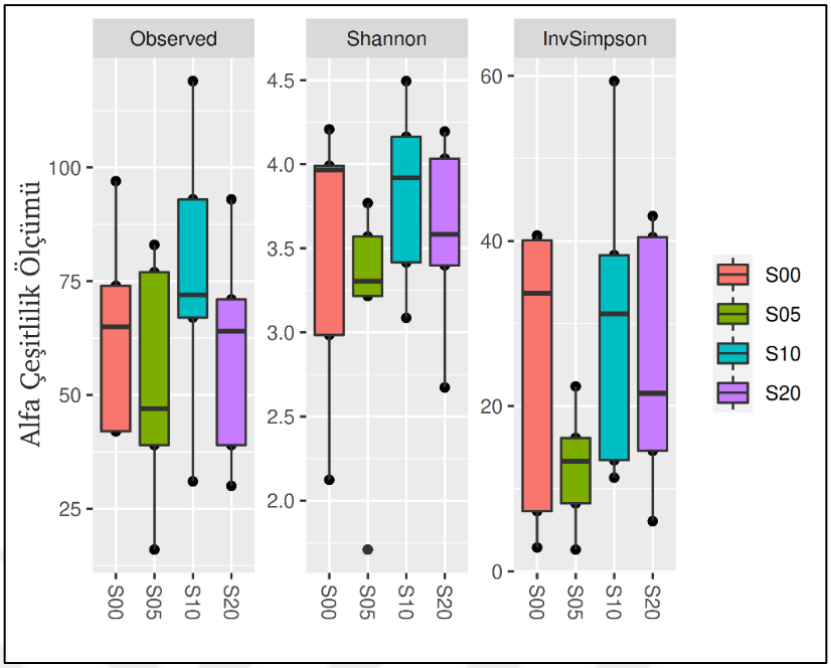
Şekil 4.7 Cins düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerinin 0., 5., 10. ve 20. günlerdeki dağılımını gösteren grafik (%)

Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus ve *Provetella* bakterileri Şekil 4.7'de incelendiğinde iç ortam koşullarına maruz bırakılan örneklerin ortalamalarının özellikle 5. günde maruz bırakılmayan örneklere kıyasla önemli şekilde değiştiği (arttığı veya azaldığı) görülmüştür. Genel olarak bakıldığında ise 5. ve 10. günde bu beş bakterinin yüzdelerinde, maruz kalmayan örneklere kıyasla artış meydana geldiği; 20. günde ise azaldığı görülmüştür (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 Tüm zaman dilimlerinde katılımcılara ait örneklerdeki mikroorganizma cinslerinin medyan değerleri (%)

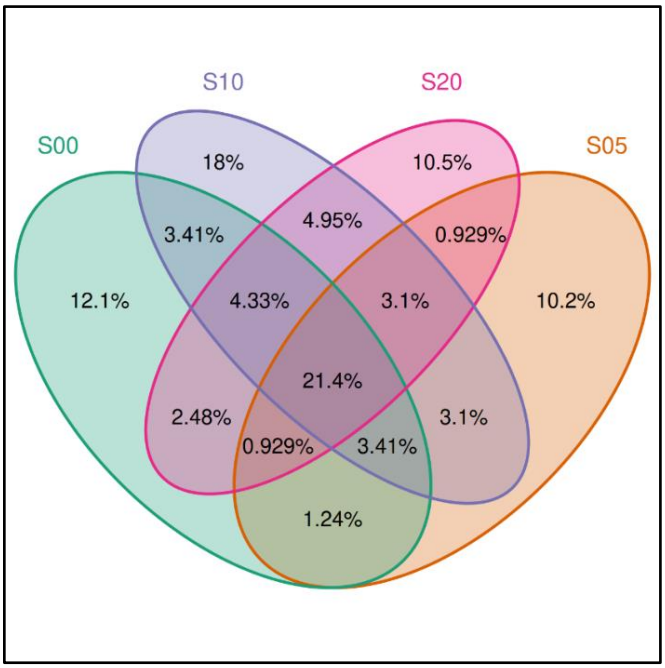
Organizma	S00 Medyan	S05 Medyan	S10 Medyan	S20 Medyan
Enterococcus	0.95	1.25	6.15	1.42
Prevotella	5.71	2.58	5.03	4.97
Staphylococcus	3.85	3.92	5.09	2.67
Streptococcus	1.91	2.50	6.83	4.29

Alfa Çeşitlilik Analizleri



Şekil 4.8 Cins düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin Shannon ve Simpson indeksleri kullanılarak oluşturulan alfa çeşitlilik ölçüm grafiği

Cins düzeyinde oluşturulan alfa çeşitlilik analizlerinde Shannon ve Simpson grafiklerine bakıldığında tür çeşitliliğinin özellikle 5. günde azaldığı daha sonraki günlerde ise tekrar artış gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.8).

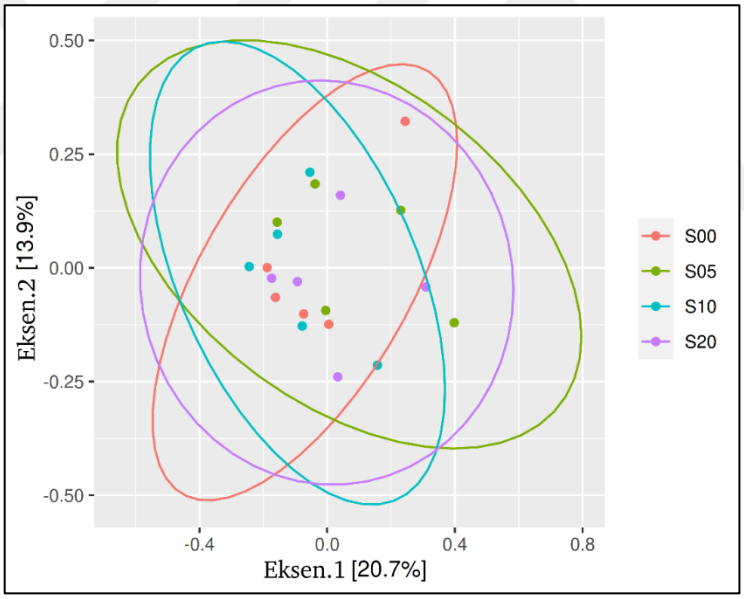


Şekil 4. 9 Cins düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin zamana bağlı olarak dağılımını gösteren Venn Şeması

Venn şeması analizlerinde, iç ortam koşullarına 10 gün maruz kalan semen numunelerinin hem kontrol numunelerinden hem de 5. ve 20. gün maruziyetlerinden daha yüksek oranda zenginliğe sahip olduğunu gözlemledik (Şekil 4.9).

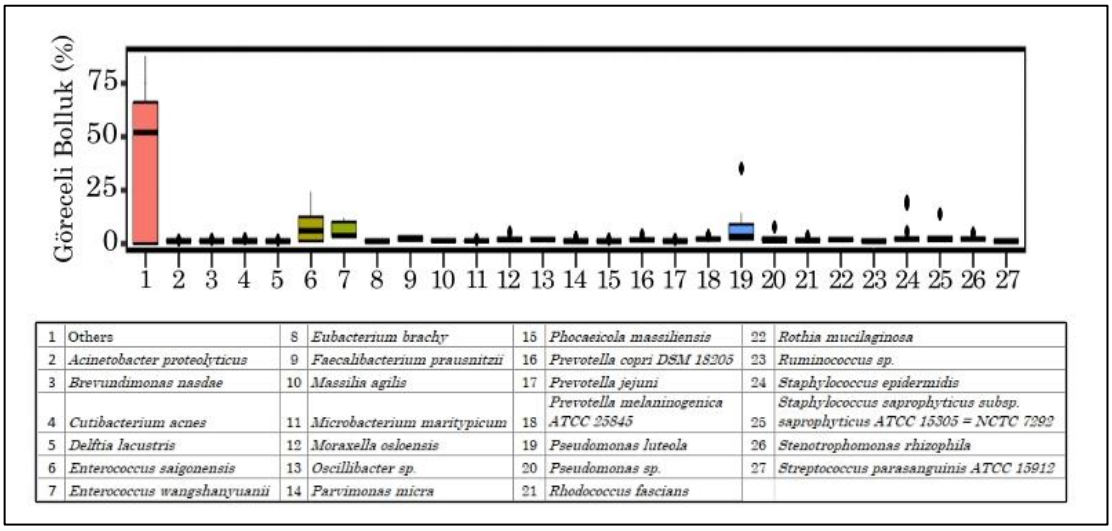
Beta Çeşitlilik Analizleri

Cins düzeyinde elde edilen bakteriler ile oluşturulan PCoA grafiği (Şekil 4.10) tüm günlerde kişilere ait bakterilerin beta çeşitliliğini göstermiştir. Unifrac mesafeleri incelendiğinde kişilerin cins çeşitliliğinin birbirlerinden dikkat çekici şekilde farklı olmadığı görülmüştür. Özellikle örneklerin iç ortam koşullarına maruz kalmadan önceki ve 20. günlerindeki cins düzeyindeki bakteri kompozisyonları arasındaki mesafenin diğer bekletilme zamanlarına kıyasla daha az olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 4.10 Cins düzeyinde örnekler arasındaki Unifrac uzaklıların dikkate alındığı zamana bağlı dağılımı gösteren Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği.

4.2.1.3. Tür Düzeyinde Analiz

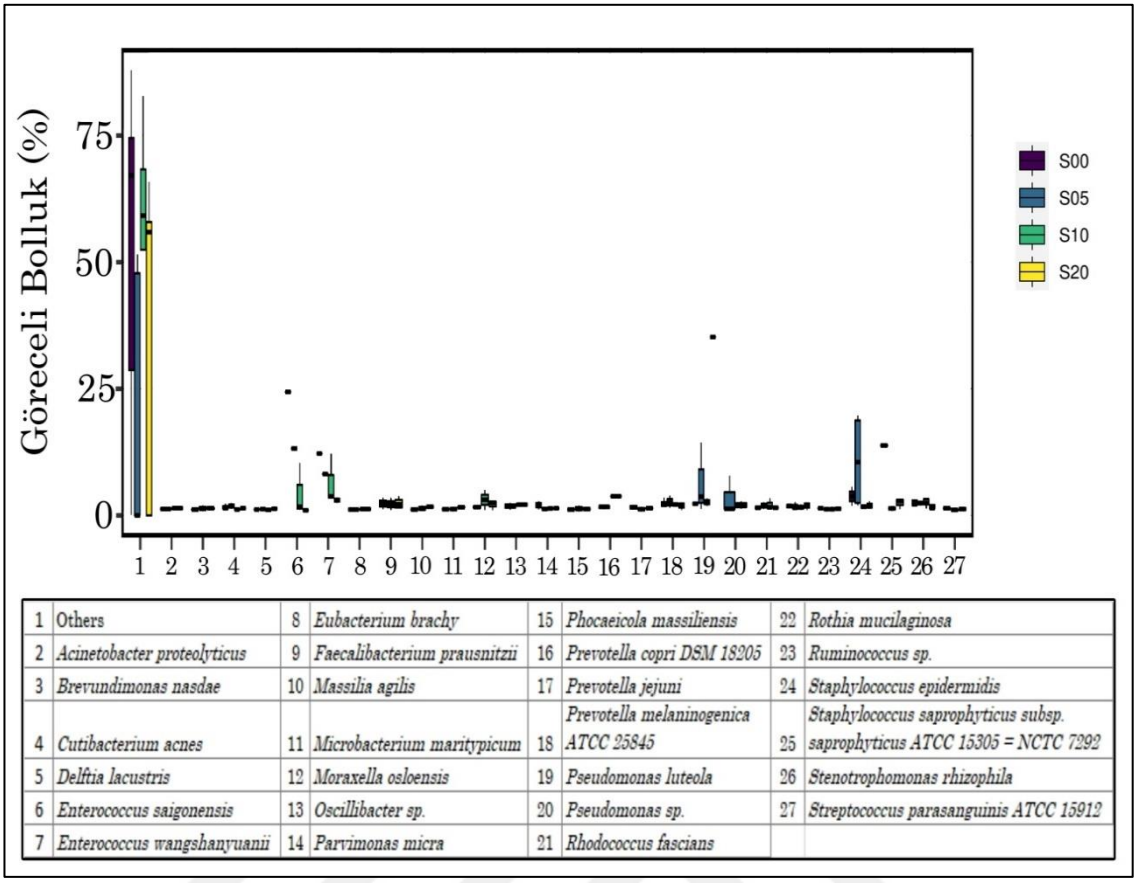


Şekil 4.11 Tür düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerini gösteren grafik (%)

Örneklerin tür seviyesindeki incelemeleri gerçekleştirildiğinde *Staphylococcus epidermidis* tüm bakteriler içerisinde en çok tespit edilen bakteri olmuştur. *Pseudomonas luteola, Enterococcus saigonensis, Pseudomonas lactis, Enterococcus wangshanyuanii* ve *Stenotrophomonas rhizophila* ise sırasıyla en çok elde edilen diğer bakteriler olmuşlardır (Şekil 4.11). Bu altı bakteri, elde edilen tüm bakterilerin %16'sını oluşturmaktadır. Bu bakterilere ait ortalama göreceli bolluk değerleri % cinsinden Tablo 4.6 da verilmiştir.

Tablo 4.6 Tür düzeyinde en çok görülen bakterilerin tüm katılımcılar için ortalama göreceli bolluk (Ort.) değerleri (%).

Organizma	P01 Ort.	P02 Ort.	P03 Ort.	P04 Ort.	P05 Ort.	Genel Ort.
Staphylococcus epidermidis	0.56	5.20	1.71	1.61	7.21	3.26
Pseudomonas luteola	0.31	0.00	9.43	5.04	1.34	3.23
Enterococcus saigonensis	12.19	0.64	0.00	0.60	0.00	2.69
Pseudomonas lactis	0.00	0.13	11.76	0.00	0.93	2.56
Enterococcus wangshanyuanii	8.75	2.04	0.00	1.02	0.00	2.36
Stenotrophomonas rhizophila	3.11	1.73	1.22	2.43	1.95	2.09



1	Others	8	*Eubacterium brachy*	15	*Phocaeicola massiliensis*	22	*Rothia mucilaginosa*
2	*Acinetobacter proteolyticus*	9	*Faecalibacterium prausnitzii*	16	*Prevotella copri DSM 18205*	23	*Ruminococcus sp.*
3	*Brevundimonas nasdae*	10	*Massilia agilis*	17	*Prevotella jejuni*	24	*Staphylococcus epidermidis*
4	*Cutibacterium acnes*	11	*Microbacterium maritypicum*	18	*Prevotella melaninogenica ATCC 25845*	25	*Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15305 = NCTC 7292*
5	*Delftia lacustris*	12	*Moraxella osloensis*	19	*Pseudomonas luteola*	26	*Stenotrophomonas rhizophila*
6	*Enterococcus saigonensis*	13	*Oscillibacter sp.*	20	*Pseudomonas sp.*	27	*Streptococcus parasanguinis ATCC 15912*
7	*Enterococcus wangshanyuanii*	14	*Parvimonas micra*	21	*Rhodococcus fascians*		

Şekil 4.12 Tür düzeyinde en çok elde edilen bakterilerin göreceli bolluk değerlerinin 0., 5., 10. ve 20. günlerdeki dağılımını gösteren grafik (%)

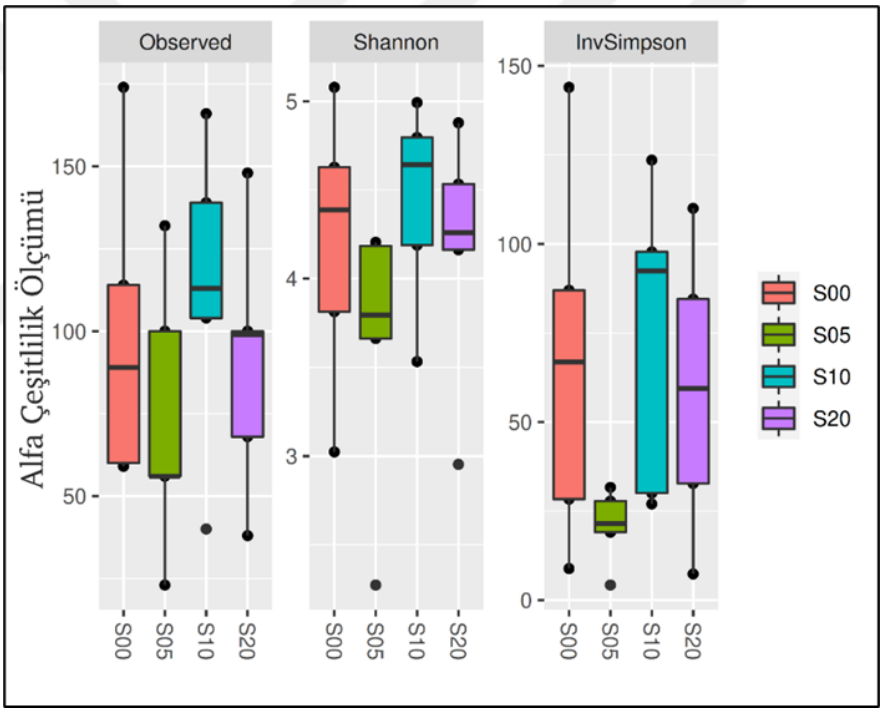
Tür düzeyinde en çok bulunan bakterin göreceli bolluklarının kumaş üzerinde bekletme sürelerine göre dağılımı Şekil 4.12' de verilmiştir. *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas luteola, Enterococcus saigonensis, Pseudomonas lactis, Enterococcus wangshanyuanii* ve *Stenotrophomonas rhizophila* türleri özelinde bekletilme sürelerine ait analizlerin değerlendirmesi yapıldığında; maruz bırakılmayan örneklere göre 5. günde bu beş bakterinin yüzdelerinde artış meydana geldiği; 10. ve 20. günlerde ise azalma olduğu gözlenmiştir. (Şekil 4.12).

Tablo 4.7 incelendiğinde en yüksek oranda çıkan tür olan *Staphylococcus epidermidis'in* iç ortam koşullarına maruz bırakılmayan örneklerde de bulunduğu fakat en yüksek oranda 5. günde elde edildiği ve gün geçtikçe azaldığı gözlemlenmiştir.

Tablo 4.7 Tüm zaman dilimlerinde katılımcılara ait örneklerdeki mikroorganizma türlerin medyan değerleri (%)

Organizma	S00 Medyan	S05 Medyan	S10 Medyan	S20 Medyan
Enterococcus saigonensis	0.00	0.00	1.08	0.70
Enterococcus wangshanyuanii	0.00	0.00	3.39	0.70
Pseudomonas luteola	0.70	1.26	0.72	0.00
Staphylococcus epidermidis	0.70	2.63	1.36	1.63
Stenotrophomonas rhizophila	2.10	1.89	2.44	1.41

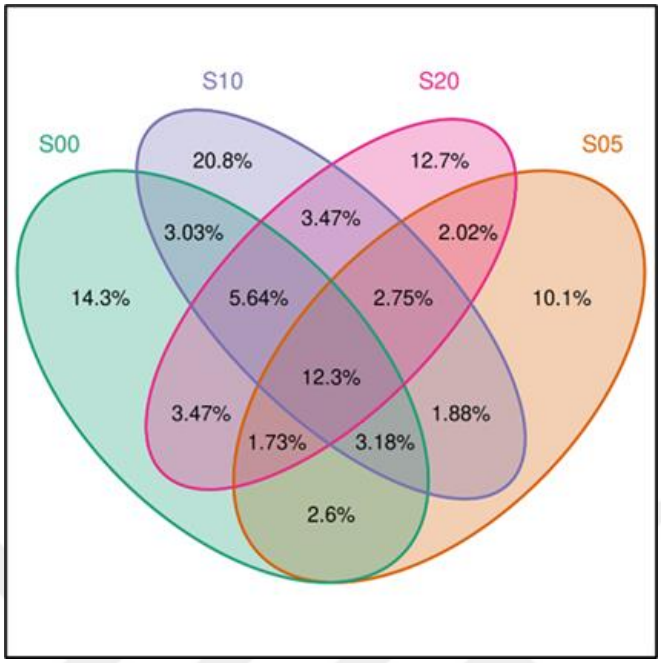
Alfa Çeşitlilik Analizleri



Şekil 4.13 Tür düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin Shannon ve Simpson indeksleri kullanılarak oluşturulan alfa çeşitlilik ölçüm grafiği

Tür düzeyinde oluşturulan alfa çeşitlilik analizlerinde Shannon ve Simpson grafiklerine bakıldığında tür çeşitliliği ve zenginliğinin 0. gün örneklerine göre 5.gün örneklerinde önce azaldığı, 10. gün örneklerinde tekrar bir artış olduğu ve

20. gün örneklerinde ise tekrar azalma eğiliminde olduğu görülmüştür (Şekil 4.13).

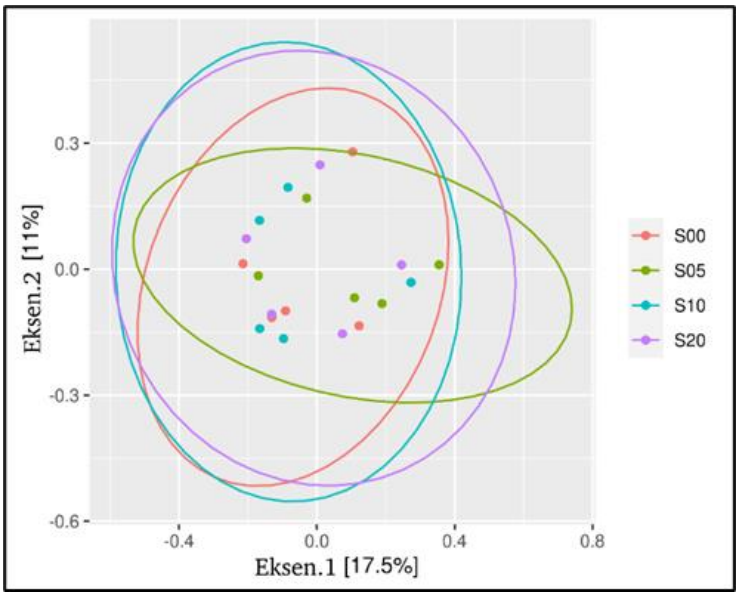


Şekil 4.14 Tür düzeyinde sınıflandırılan bakterilerin zamana bağlı olarak dağılımını gösteren Venn Şeması

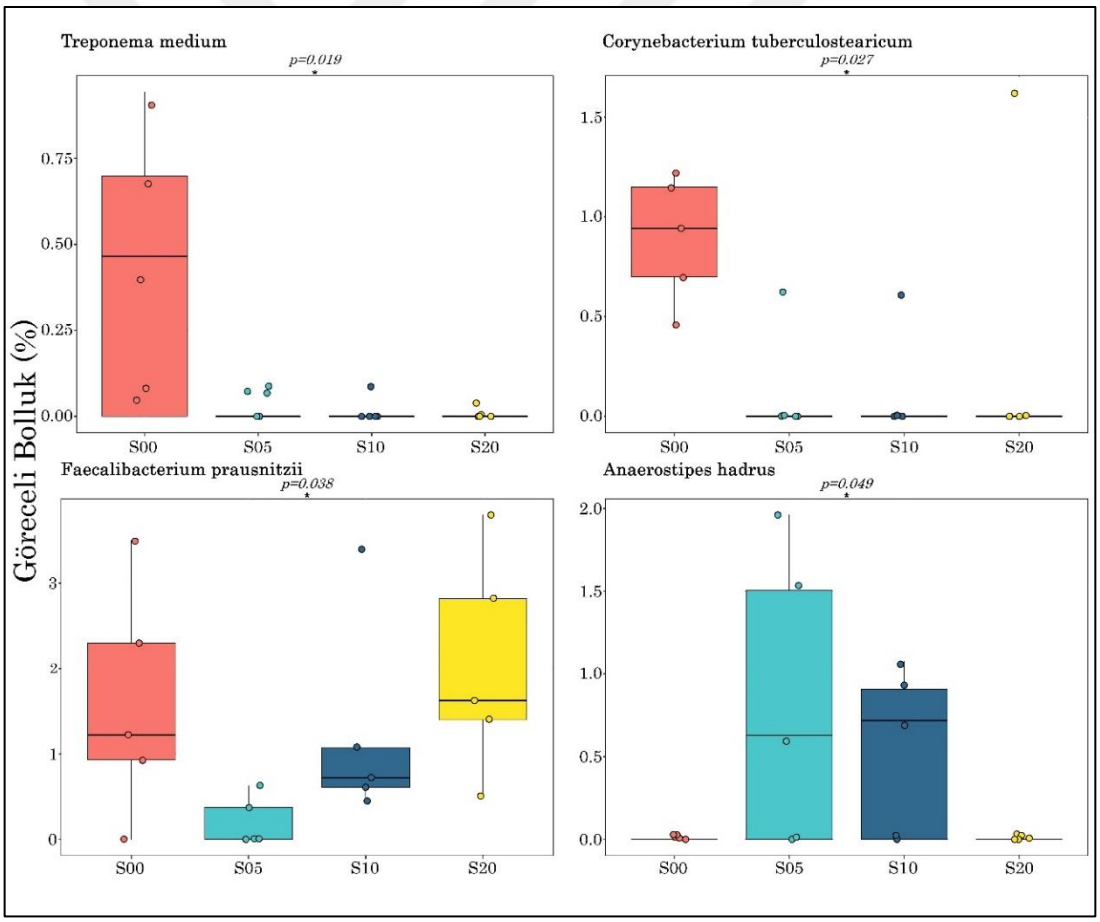
Venn şeması analizlerinde, iç ortama 10 gün maruz bırakılan kumaş üzerindeki semen numunelerinin hem kontrol numunelerinden hem de 5. ve 20. gün maruziyetlerinden daha yüksek oranda tür zenginliğine sahip olduğunu gözlemledik.

Beta Çeşitlilik Analizleri

Tür düzeyinde örnekler arasındaki Unifrac uzaklıkların dikkate alındığı PCoA grafiği (Şekil 4.15) incelendiğinde, tüm zaman dilimlerine ait örneklerin bakteriyel kompozisyon açısından nispeten stabil kaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.15 Tür düzeyinde örnekler arasındaki Unifrac uzaklıların dikkate alındığı zamana bağlı dağılımı gösteren Temel Koordinat Analizi (PCoA) grafiği



Şekil 4.16 Tür düzeyinde anlamlı farklılık gözlenenTreponema medium, Corynebacterium tuberculostearicum, Faecalibacterium prausnitzii ve Anaerostipes hadrus türlerinin 0., 5., 10. ve 20. günlerdeki göreceli bolluk değerleri

Tablo 4.8 İstatiksel analizlerde anlamlı çıkan bakterilerin örneklem günlerindeki ortalamaları

Organizma	S00 Ort.	S05 Ort.	S10 Ort.	S20 Ort.	p değeri
Anaerostipes hadrus	0.00	0.82	0.54	0.00	0.04
Corynebacterium tuberculostearicum	0.90	0.13	0.12	0.33	0.02
Faecalibacterium prausnitzii	1.59	0.20	1.25	2.03	0.03
Treponema medium	0.42	0.00	0.00	0.00	0.01

Tür düzeyindeki incelemelerde, *Treponema medium, Corynebacterium tuberculostearicum, Faecalibacterium prausnitzii* ve *Anaerostipes hadrus* türleri, maruziyet öncesi ve maruziyet sonrasındaki gruplar arasında, anlamlı olarak farklı göreceli bolluklarda temsil edilmiştir ($p<0.05$).

4.2.2. Semen Lekesi Yaşı Tespiti için Filum, Cins ve Tür Düzeyindeki Bakteriyel Değişimlerin Analizi

Tablo 4.9 0. günde bulunan 5., 10. ve 20. günde bulunmayan bakterilerin ortalama değerleri

	Organizma	S00 Ort.	S05 Ort.	S10 Ort.	S20 Ort.	p değeri
Filum						
	Thermotogae	0.19	0	0	0	0.39
Cins						
	Aequorivita	0.24	0	0	0	0.39
	Anaerotruncus	0.25	0	0	0	0.39
	Arthrobacter	0.24	0	0	0	0.39
	Cardiobacterium	0.14	0	0	0	0.39
	Dietzia	0.14	0	0	0	0.39
	Extensimonas	0.19	0	0	0	0.39
	Gardnerella	0.19	0	0	0	0.39
	Geotoga	0.19	0	0	0	0.39
	Gulosibacter	0.14	0	0	0	0.39
	Heliophilum	0.19	0	0	0	0.39
	Hungatella	0.19	0	0	0	0.39
	Lachnobacterium	0.29	0	0	0	0.10
	Lactiplantibacillus	0.14	0	0	0	0.39
	Lactococcus	0.12	0	0	0	0.39
	Loriellopsis	0.27	0	0	0	0.10
	Lutispora	0.22	0	0	0	0.10
	Mammaliicoccus	0.24	0	0	0	0.39
	Mesoplasma	0.12	0	0	0	0.39
	Mitsuaria	0.14	0	0	0	0.39

Tablo 4.9 0. günde bulunan 5., 10. ve 20. günde bulunmayan bakterilerin ortalama değerleri (devamı)

	Mycoplasma	0.19	0	0	0	0.39
	Ornithinibacillus	0.14	0	0	0	0.39
	Pantoea	0.14	0	0	0	0.39
	Pedobacter	0.38	0	0	0	0.10
	Peredibacter	0.12	0	0	0	0.39
	Petrimonas	0.12	0	0	0	0.39
	Pseudoduganella	0.12	0	0	0	0.39
	Rubellimicrobium	0.14	0	0	0	0.39
	Subdoligranulum	0.33	0	0	0	0.10
	Sulfitobacter	0.12	0	0	0	0.39
	Thermus	0.12	0	0	0	0.39
	Thiohalospira	0.19	0	0	0	0.39
Tür						
	Actinomyces graevenitzii	0.14	0	0	0	0.39
	Adlercreutzia muris	0.19	0	0	0	0.39
	Aequorivita sublithincola DSM 14238	0.23	0	0	0	0.39
	Anaerotruncus colihominis	0.12	0	0	0	0.39
	Anaerotruncus sp.	0.12	0	0	0	0.39
	Arthrobacter echini	0.23	0	0	0	0.39
	Bacillus sp.	0.12	0	0	0	0.39
	Blautia luti	0.14	0	0	0	0.39
	Capnocytophaga sp.	0.14	0	0	0	0.39
	Cardiobacterium hominis	0.14	0	0	0	0.39
	Caulobacter sp.	0.19	0	0	0	0.39
	Chryseobacterium gambrini	0.37	0	0	0	0.10
	Comamonas jiangduensis	0.12	0	0	0	0.39
	Coprococcus sp.	0.22	0	0	0	0.10
	Curtobacterium plantarum	0.14	0	0	0	0.39
	Cutibacterium sp.	0.19	0	0	0	0.39
	Dietzia papillomatosis	0.14	0	0	0	0.39
	Enterococcus olivae	0.12	0	0	0	0.39
	Enterococcus sp.	3.85	0	0	0	0.10
	Extensimonas vulgaris	0.19	0	0	0	0.39
	Fusobacterium varium	0.19	0	0	0	0.39
	Geotoga subterranea	0.19	0	0	0	0.39
	Gulosibacter bifidus	0.14	0	0	0	0.39
	Haemophilus sputorum CCUG 13788	0.14	0	0	0	0.39
	Heliophilum sp.	0.19	0	0	0	0.39
	Hungatella xylanolytica	0.19	0	0	0	0.39
	Lachnoanaerobaculum saburreum DSM 3986	0.23	0	0	0	0.10
	Lachnoanaerobaculum sp.	0.19	0	0	0	0.39
	Lachnobacterium sp.	0.28	0	0	0	0.10
	Lactiplantibacillus plantarum	0.14	0	0	0	0.39
	Lactobacillus iners	0.23	0	0	0	0.39
	Lactobacillus sp.	0.19	0	0	0	0.39
	Lactococcus sp.	0.12	0	0	0	0.39
	Leptotrichia shahii	0.38	0	0	0	0.10
	Loriellopsis sp.	0.26	0	0	0	0.10
	Lutispora sp.	0.22	0	0	0	0.10
	Mammaliicoccus sp.	0.23	0	0	0	0.39
	Mediterraneibacter sp.	0.14	0	0	0	0.39

Tablo 4.9 0. günde bulunan 5., 10. ve 20. günde bulunmayan bakterilerin ortalama değerleri (devamı)

Megasphaera micronuciformis	0.14	0	0	0	0.39
Mesoplasma sp.	0.12	0	0	0	0.39
Mitsuaria sp.	0.14	0	0	0	0.39
Mycoplasma salivarium	0.23	0	0	0	0.10
Mycoplasma sp.	0.19	0	0	0	0.39
Ornithinibacillus sp.	0.14	0	0	0	0.39
Oxobacter pfennigii	0.19	0	0	0	0.39
Paracoccus caeni	0.14	0	0	0	0.39
Paracoccus chinensis	0.19	0	0	0	0.39
Paracoccus niistensis	0.14	0	0	0	0.39
Paracoccus stylophorae	0.23	0	0	0	0.39
Pedobacter mongoliensis	0.23	0	0	0	0.39
Pedobacter quisquiliarum	0.14	0	0	0	0.39
Peredibacter sp.	0.12	0	0	0	0.39
Petrimonas mucosa	0.12	0	0	0	0.39
Phocaeicola sp.	0.19	0	0	0	0.39
Prevotella colorans	0.12	0	0	0	0.39
Pseudoduganella danionis	0.12	0	0	0	0.39
Ralstonia solanacearum	0.23	0	0	0	0.39
Rhizobium soli DS-42	0.23	0	0	0	0.39
Rhodococcus sp.	0.23	0	0	0	0.39
Rubellimicrobium aerolatum	0.14	0	0	0	0.39
Ruminococcus torques	0.23	0	0	0	0.39
Selenomonas sp.	0.28	0	0	0	0.10
Sphingomonas agri	0.14	0	0	0	0.39
Staphylococcus pragensis	0.46	0	0	0	0.39
Subdoligranulum sp.	0.14	0	0	0	0.39
Subdoligranulum variabile	0.19	0	0	0	0.39
Sulfitobacter indolifex	0.12	0	0	0	0.39
Thermus igniterrae	0.12	0	0	0	0.39
Thiohalospira halophila	0.19	0	0	0	0.39
Treponema medium	0.42	0	0	0	0.02
Tyzzerella sp.	0.23	0	0	0	0.39

Maruziyet öncesinde *Thermotagae* filumu mevcut iken, iç ortam koşullarına maruz bırakılan semen lekelerinde 5., 10. ve 20. günlerde bu filum tespit edilmemiştir. Semen lekelerinde maruziyet öncesindeki lekelerde 31 cins ve 72 tür bakteri mevcut iken, bu bakteriler 5., 10. ve 20. günlerdeki iç ortam maruziyetleri sonucundaki lekelerde bulunmamaktadır.

Tablo 4.10 0. ve 5. günde bulunan 10. ve 20. günde bulunmayan bakterilerin ortalama değerleri

	Organizma	S00 Ort.	S05 Ort.	S10 Ort.	S20 Ort.	p değeri
Cins						
	Paludibacter	0.62	0.26	0	0	0.08
	Sphingomonas	0.14	0.13	0	0	0.55
	Sphingopyxis	0.12	0.13	0	0	0.55
Tür						
	Anaerostipes sp.	0.19	0.39	0	0	0.55
	Citrobacter koseri	0.19	0.25	0	0	0.55
	Comamonas denitrificans	0.12	0.13	0	0	0.55
	Delftia acidovorans	0.23	0.39	0	0	0.55
	Listeria sp.	0.23	0.15	0	0	0.55
	Neisseria mucosa	0.19	0.20	0	0	0.28
	Paludibacter sp.	0.60	0.26	0	0	0.08
	Ruminococcus bromii	0.28	0.26	0	0	0.28
	Shigella boydii	0.12	0.33	0	0	0.25
	Sphingopyxis fribergensis	0.12	0.13	0	0	0.55
	Staphylococcus caprae	0.23	0.15	0	0	0.55
	Stenotrophomonas sp.	0.24	0.23	0	0	0.55

Cins düzeyinde 3, tür düzeyinde ise 12 bakteri, iç ortam koşullarına maruziyet öncesi (S00) ve maruziyetin 5. gününde (S05) tespit edilirken 10. (S10) ve 20. (S20) günde tespit edilmemiştir. Filum düzeyinde ise bu değişimlere karşılık gelen herhangi bir bakteri bulunmamaktadır.

Tablo 4.11 0., 5. ve 10. günde bulunmayan 20. günde bulunan bakterilerin ortalama değerleri

	Organizma	S00 Ort.	S05 Ort.	S10 Ort.	S20 Ort.	p değeri
Cins						
	Aerococcus	0	0	0	0.16	0.39
	Alloscardovia	0	0	0	0.11	0.39
	Anaerofilum	0	0	0	0.16	0.39
	Anaerorhabdus	0	0	0	0.14	0.39
	Arboricoccus	0	0	0	0.14	0.39
	Atopobium	0	0	0	0.25	0.10
	Bavariicoccus	0	0	0	0.11	0.39
	Calidithermus	0	0	0	0.16	0.39
	Dermabacter	0	0	0	0.16	0.39
	Desulfotomaculum	0	0	0	0.29	0.39
	Dubosiella	0	0	0	0.11	0.39
	Faecalicoccus	0	0	0	0.16	0.39
	Gloeobacter	0	0	0	0.14	0.39
	Hespellia	0	0	0	0.16	0.39
	Kocuria	0	0	0	0.16	0.39
	Limnobacter	0	0	0	0.27	0.39

Tablo 4.11 0., 5. ve 10. günde bulunmayan 20. günde bulunan bakterilerin ortalama değerleri (devamı)

	Luteimonas	0	0	0	0.14	0.39
	Marmoricola	0	0	0	0.28	0.39
	Monoglobus	0	0	0	0.14	0.39
	Mucilaginibacter	0	0	0	0.16	0.39
	Nitrolancea	0	0	0	0.27	0.39
	Peptoanaerobacter	0	0	0	0.11	0.39
	Pseudonocardia	0	0	0	0.16	0.39
	Pseudooceanicola	0	0	0	0.11	0.39
	Ruminiclostridium	0	0	0	0.11	0.39
	Saccharofermentans	0	0	0	0.14	0.39
	Telluria	0	0	0	0.11	0.39
	Thalassospira	0	0	0	0.45	0.10
	Thermaerobacter	0	0	0	0.11	0.39
	Tistlia	0	0	0	0.14	0.39
	Trabulsiella	0	0	0	0.14	0.39
	Varibaculum	0	0	0	0.14	0.39
	Xanthomonas	0	0	0	0.16	0.39
	Yokenella	0	0	0	0.14	0.39
Tür						
	Acinetobacter septicus	0	0	0	0.14	0.39
	Aerococcus viridans ATCC 11563 = CCUG 4311	0	0	0	0.16	0.39
	Akkermansia sp.	0	0	0	0.10	0.39
	Alloscardovia omnicolens	0	0	0	0.10	0.39
	Anaerofilum pentosovorans	0	0	0	0.16	0.39
	Anaeromassilibacillus senegalensis	0	0	0	0.16	0.39
	Anaerorhabdus sp.	0	0	0	0.14	0.39
	Arboricoccus sp.	0	0	0	0.14	0.39
	Atopobium sp.	0	0	0	0.24	0.10
	Bavariicoccus seileri	0	0	0	0.10	0.39
	Bifidobacterium faecale	0	0	0	0.10	0.39
	Bifidobacterium ruminantium	0	0	0	0.16	0.39
	Bifidobacterium stercoris JCM 15918	0	0	0	0.28	0.39
	Brevundimonas albigilva	0	0	0	0.66	0.10
	Brevundimonas aveniformis	0	0	0	0.14	0.39
	Brevundimonas humi	0	0	0	2.94	0.39
	Calidithermus timidus	0	0	0	0.16	0.39
	Caulobacter flavus	0	0	0	0.28	0.39
	Caulobacter rhizosphaerae	0	0	0	0.14	0.39
	Chryseobacterium molle	0	0	0	0.10	0.39
	Citrobacter murliniae	0	0	0	0.16	0.39
	Cloacibacterium caeni	0	0	0	0.16	0.39
	Clostridium chauvoei	0	0	0	0.14	0.39
	Clostridium perfringens ATCC 13124	0	0	0	0.10	0.39
	Dermabacter jinjuensis	0	0	0	0.16	0.39
	Desulfotomaculum sp.	0	0	0	0.28	0.39
	Desulfovibrio desulfuricans	0	0	0	0.25	0.39
	Dubosiella sp.	0	0	0	0.10	0.39
	Enterococcus columbae DSM 7374 = ATCC 51263	0	0	0	0.10	0.39

Tablo 4.11 0., 5. ve 10. günde bulunmayan 20. günde bulunan bakterilerin ortalama değerleri (devamı)

Eubacterium yurii	0	0	0	0.10	0.39
Faecalicoccus sp.	0	0	0	0.16	0.39
Faecalimonas sp.	0	0	0	0.10	0.39
Gemella morbillorum	0	0	0	0.10	0.39
Gemella sp.	0	0	0	0.39	0.10
Gloeobacter sp.	0	0	0	0.14	0.39
Gordonibacter urolithinfaciens	0	0	0	0.28	0.39
Granulicatella balaenopterae	0	0	0	0.10	0.39
Haemophilus parahaemolyticus	0	0	0	0.16	0.39
Hespellia sp.	0	0	0	0.16	0.39
Intestinimonas butyriciproducens	0	0	0	0.10	0.39
Kocuria himachalensis	0	0	0	0.16	0.39
Lachnoanaerobaculum umeaense	0	0	0	0.10	0.39
Lachnospira pectinoschiza	0	0	0	0.10	0.39
Lacrimispora amygdalina	0	0	0	0.25	0.39
Lacrimispora saccharolytica	0	0	0	0.16	0.39
Lacrimispora xylanolytica	0	0	0	0.10	0.39
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus	0	0	0	0.16	0.39
Lawsonia sp.	0	0	0	0.10	0.39
Limnobacter humi	0	0	0	0.25	0.39
Longibaculum muris	0	0	0	0.14	0.39
Luteimonas abyssi	0	0	0	0.14	0.39
Marmoricola solisilvae	0	0	0	0.14	0.39
Marmoricola terrae	0	0	0	0.14	0.39
Massilia suwonensis	0	0	0	0.16	0.39
Microbacterium hydrocarbonoxydans	0	0	0	0.10	0.39
Monoglobus sp.	0	0	0	0.14	0.39
Mucilaginibacter pineti	0	0	0	0.16	0.39
Nitrolancea sp.	0	0	0	0.25	0.39
Oribacterium parvum ACB1	0	0	0	0.24	0.09
Paracoccus hibiscisoli	0	0	0	0.14	0.39
Porphyromonas asaccharolytica DSM 20707	0	0	0	0.10	0.39
Porphyromonas sp.	0	0	0	0.25	0.39
Prevotella loescheii	0	0	0	0.10	0.39
Pseudomonas kuykendallii	0	0	0	0.25	0.39
Pseudomonas tremae	0	0	0	0.14	0.39
Pseudonocardia profundimaris	0	0	0	0.16	0.39
Pseudooceanicola sp.	0	0	0	0.10	0.39
Psychrobacter sp.	0	0	0	0.10	0.39
Rhizobium wenxiniae	0	0	0	0.14	0.39
Roseburia hominis A2-183	0	0	0	0.10	0.39
Roseburia sp.	0	0	0	0.25	0.39
Ruminiclostridium sp.	0	0	0	0.10	0.39
Ruminococcus callidus	0	0	0	0.28	0.39
Saccharofermentans sp.	0	0	0	0.14	0.39

Tablo 4.11 0., 5. ve 10. günde bulunmayan 20. günde bulunan bakterilerin ortalama değerleri (devamı)

Sphingobacterium chuzhouense	0	0	0	0.28	0.39
Stenotrophomonas maltophilia	0	0	0	0.25	0.39
Streptococcus peroris ATCC 700780	0	0	0	0.10	0.39
Telluria mixta	0	0	0	0.10	0.39
Tepidiphilus succinatimandens	0	0	0	0.16	0.39
Thalassospira sp.	0	0	0	0.44	0.09
Thermaerobacter sp.	0	0	0	0.10	0.39
Tistlia sp.	0	0	0	0.14	0.39
Trabulsiella odontotermitis	0	0	0	0.14	0.39
Treponema lecithinolyticum	0	0	0	0.10	0.39
Tyzzerella nexilis DSM 1787	0	0	0	0.10	0.39
Varibaculum cambriense	0	0	0	0.14	0.39
Xanthomonas nasturtii	0	0	0	0.16	0.39
Yokenella regensburgei	0	0	0	0.14	0.39

İç ortam koşullarına 20 gün maruziyet sonrasında semen lekelerindeki bakteri kompozisyonunda değişiklik gözlenmiş ve maruziyet öncesinde bulunmayan 34 cins ve 88 tür bakteri, sadece maruziyet sonrasında tespit edilmiştir.

Tablo 4.12 0. ve 5. günde bulunmayan 10. ve 20. günde bulunan bakterilerin ortalama değerleri

	Organizma	S00 Ort.	S05 Ort.	S10 Ort.	S20 Ort.	p değeri
Filum						
	Verrucomicrobia	0	0	0.11	0.27	0.25
Cins						
	Akkermansia	0	0	0.11	0.27	0.25
	Anabaena	0	0	0.34	0.14	0.55
	Butyrivibrio	0	0	0.19	0.21	0.55
	Epilithonimonas	0	0	0.12	0.11	0.55
	Faecalimonas	0	0	0.11	0.11	0.55
	Fenollaria	0	0	0.11	0.16	0.55
	Flavonifractor	0	0	0.19	0.16	0.55
	Raoultibacter	0	0	0.12	0.27	0.25
	Tepidiphilus	0	0	0.22	0.16	0.55
Tür						
	Agathobaculum butyriciproducens	0	0	0.43	0.10	0.25
	Akkermansia muciniphila	0	0	0.11	0.16	0.55
	Anabaena sp.	0	0	0.34	0.14	0.55
	Bacteroides faecichinchillae JCM 17102	0	0	0.11	0.25	0.55
	Bacteroides nordii WAL 11050 = JCM 12987	0	0	0.34	0.14	0.55

Tablo 4.12 0. ve 5. günde bulunmayan 10. ve 20. günde bulunan bakterilerin ortalama değerleri (devamı)

Clostridium saudiense	0	0	0.20	0.24	0.20
Collinsella sp.	0	0	0.34	0.10	0.55
Corynebacterium accolens	0	0	0.11	0.14	0.55
Fenollaria massiliensis	0	0	0.11	0.16	0.55
Fusobacterium nucleatum subsp. animalis	0	0	0.18	0.14	0.55
Massilia timonae	0	0	0.88	0.44	0.09
Mycoplasma faucium	0	0	0.25	0.10	0.22
Paracoccus marinus	0	0	0.11	0.33	0.55
Prevotella copri DSM 18205	0	0	0.95	0.90	0.08
Prevotella pleuritidis	0	0	0.25	0.25	0.28
Pseudomonas panacis	0	0	0.11	0.16	0.55
Raoultibacter sp.	0	0	0.12	0.26	0.25

20 gün boyunca iç ortam koşullarına maruz bırakılan örneklerden filum düzeyinde 1, cins düzeyinde 9 ve tür düzeyinde 17 bakteri, maruziyet öncesi (S00) ve maruziyetin 5. gününde (S05) tespit edilmezken 10. günde (S10) tespit edilmiş ve bu bakteriler 20. günün (S20) örneklerinde de saptanmıştır.

5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Adli bilimlerde elde edilen bir biyolojik lekenin olay yerindeki diğer lekelerden ayrılması ve lekenin yaşının belirlenmesi oldukça önemlidir. Parametrelerin fazla olduğu karmaşık olay yeri incelemelerinde, bulunacak muhtemel biyolojik lekeler vakanın seyrini değiştirebilecek düzeyde katkı sağlayabilmektedir. Bu nedenle de adli bilimler, biyolojik sıvı içeren lekelerin tanımlanması için spesifik yöntemlere her zaman ihtiyaç duymaktadır. Günümüzde kullanılan yöntemler her ne kadar ayırt edici özellikleri olsa da hala yeterli özgüllüğe sahip değildir ve hala daha gelişmiş destekleyici yöntemlere ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu çalışmada bir olay yeri kurgusu oluşturulmuş ve 5 gönüllüden alınan semen örnekleri polyester kumaş üzerine 4 farklı bekletilme süresi sonrasında analiz edilmek üzere lekelenmiştir. Normal oda şartlarında bekletilen kumaş lekeleri 0., 5., 10. ve 20. günde kumaş üzerinden kesilerek bakteriyel DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ardından elde edilen DNA, 16S rRNA yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak dizilenmiştir. Dizileme verileri gerekli veri tabanları ve istatistik programları ile analiz edilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde filum, cins ve tür taksonomik sınıflarına odaklanılmıştır.

Taksonomik sınıflandırmalar incelendiğinde, filum düzeyinde toplamda 17 OTU tespit edilmiş ve bunlar arasında tüm örneklem günlerinde *Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria* ve *Fusobacteria* sırasıyla en yüksek oranda belirlenerek, toplam bakteri popülasyonunun %95'ini oluşturdukları tespit edilmiştir. Cins düzeyinde 323 farklı OTU tespit edilmiştir. Filum çalışmasında olduğu gibi yüksek bir oranda olmasa dahi diğerlerine kıyasla en fazla tespit edilen bakteri cinsleri *Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus* ve *Provetella* olmuştur ve toplam bakteri popülasyonun %32 sini oluşturdukları gözlenmiştir. Aynı analizler tür düzeyi için tekrarlandığında 693 farklı OTU tespit edilmiş ve tür düzeyinde diğer bakterilere kıyasla en yüksek oranda bulunan bakteriler sırasıyla *Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas luteola, Enterococcus saigonensis, Pseudomonas lactis, Enterococcus wangshanyuanii* ve

Stenotrophomonas rhizophila olmuştur. Bu altı bakteri, elde edilen tüm bakterileri türlerinin %16'sını oluşturmaktadır.

Elde edilen bakteri tür ve cinslerinin, 4 farklı gündeki göreceli bollukları incelendiğinde 0. günden 10. güne kadar bir artış meydana geldiği ve 20. günde tekrar azaldığı görülmüştür. Filum düzeyinde elde edilen göreceli bolluk değerlerinin ise en yüksek değere 0. günde sahip olduğu ve giderek azaldığı gözlenmiştir. Bu durum genel bakteri popülasyonunda zamanla bir azalış olduğunu fakat aynı zamanda belirli günlerde spesifik bakteri türlerinde artış meydana geldiğini göstermektedir.

Bizim çalışmamız ile benzer koşullarda yapılan bir araştırmada, iç ortam koşullarına maruz kalan ve kalmayan örneklerde en yüksek oranda elde edilen bakteri filumlarının bu çalışma ile uyumlu olarak *Firmicutes, Actinobacteria* ve *Bacteriodetes* olduğu gözlenmiştir [74]. Semen mikrobiyomunu herhangi bir maruziyet olmaksızın analiz eden diğer çalışmalarda da yine bu üç bakteri filumu en yüksek oranlarda tespit edilen bakteri filumları arasında yer almaktadır [54,75].

Yao ve ark. tarafından yapılan çalışmada, en yüksek oranda elde edilen *Enterococcus, Staphlyacoccus* ve *Streptococcus* cinslerinin maruziyet öncesinde de bulunduğu fakat maruziyet sonrasında göreceli bolluklarının arttığı, en yüksek oranlardan birine sahip olan *Prevotella* cinsinin ise maruziyet sonrasında azaldığı gösterilmiştir [74]. Bizim çalışmamızda ise *Streptococcus* cinsinin maruziyet sonrası arttığı ve geriye kalan 3 bakteri cinsinin maruziyet sonrası azaldığı gözlenmiştir.

Bunların yanı sıra çalışmamızda, tür düzeyinde göreceli bollukları fazla olmamasına rağmen maruziyet öncesi ve sonrasındaki değişimleri istatistiksel düzeyde anlamlı olan ($p>0,05$) *Treponema medium, Corynebacterium Tuberculostearicum, Faecalibacterium prausnitzii* ve *Anaerostipes hadrus* bakterileri elde edilmiştir. *Corynebacterium* cinsi Yao ve ark. çalışmalarında da en fazla görülen bakteriler arasındadır [74].

Bu bilgiler göz önüne alındığında semen lekelerinin iç ortam koşullarına maruziyeti sonrasında, bakteriyel kompozisyonda hem filum hem de cins ve tür

düzeyinde bariz değişiklikler olması semen lekesinin yaşının belirlenmesinde önemli ipuçlarının bulunabileceğini göstermektedir. Semen de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik sıvı lekelerinin yaş tayinin yapılabilmesi için özellikle adli tıpta da sıklıkla kullanılan alternatif ışık kaynakları, moleküler belirteçler ve enzim aktiviteleri gibi tanımlayıcılar üzerinde durulmuş olup farklı zaman periyotları için yaş tayini açısından kullanılabilirliği değerlendirilmiştir [39,76,77]. Son zamanlarda araştırmacılar semen lekelerinin yaşını tespit edilebilmesi için farklı yöntemler üzerinde durmaktadır. Semen lekelerinin kumaş da dahil olmak üzere farklı yüzeylerde farklı zamanlardaki spektrum değerlerini 1,5 yıl boyunca inceleyen bir çalışma, yüzeye bağlı olmaksızın zamanla proteinlerde ve diğer makromoleküllerde bozulmalar meydana geldiğini göstermiştir [78]. Svap üzerindeki semen örneklerinin, zamana bağlı olarak miRNA ve mRNA ekspresyon seviyelerinin incelendiği 90 günlük bir çalışmada ise özellikle miRNA'ların uzun süre boyunca stabil olarak kaldığı gösterilmiş fakat spesifik bir zaman belirtecinden kesin olarak bahsedilememiştir [79]. Salzmann ve ark. yaptıkları çalışmada bakteriyel kompozisyonda özellikle *Firmicutes, Proteobacteria* ve *Actinobacteria* filumlarında değişiklikler meydana geldiğini fakat bu değişimlerin daha çok çevresel ortamdaki bakterilerin artışından kaynaklandığını belirtmişlerdir [80]. Özetle, iç ortam koşullarına maruz bırakılan lekelerde, DNA yıkımının arttığı ve bakteriyel kompozisyonda değişiklik olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir.

Elde edilen verilerdeki çeşitlilik göz önüne alındığında yakın zamanda semen lekesinin tanımlanması için spesifik bir seminal belirteçten bahsetmek pek olası değildir. Olay yerinden alınan kumaş üzerindeki bir semen lekesinin çok farklı mikrobiyal kaynakları taşıyabileceği açıktır. Bunun yanı sıra erkek üreme sistemi düşünüldüğünde semenin üreme sistemi içerisinde izlediği yolun üretral yollar ile aynı olması nedeniyle mikrobiyal çeşitliliği arttıran ilk etmen olarak göz önünde bulundurulabilir. Araştırmacılar ayrıca semenin deri ve vajinal mikrobiyom ile yakından ilişkili olduğuna da dikkat çekmişlerdir [54]. Bu bilgiler dikkate alındığında yapılacak olan olası bir semen mikrobiyom araştırmasında idrar, vajinal sıvı ve derinin de araştırılmasının ve bu sonuçlarla karşılaştırılarak yorumlanmasının daha sağlıklı olacağını, bu kapsamda yürütülen bir adli vaka

çalışmasına daha fazla katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Fakat bulgularımızın bu konuda sınırlı sayıda gerçekleştirilmiş daha önceki araştırmalarla benzer bulgulara sahip olması nedeniyle bir olay yerindeki semen lekesinin ev içi ortam koşullarına uzun süreli maruziyet sonrasında dahi tanımlanabilmesi için metagenomik analizlerin kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir. Bu alandaki çalışmaların artması ve veri tabanlarının genişletilmesi ile adli bilimler içerisinde semenin tanımlanmasında kullanılabilecek bakteri gruplarının oluşturulabileceği düşünülmektedir. Diğer yandan, yapılan çalışma mikrobiyal kompozisyondaki değişimler ile birlikte değerlendirildiğinde semen yaşı hakkında da ipuçları sunmaktadır.

Bazı cinsel saldırı vakalarında, olayın şüphelisi olan kişi, olay yerinde olay anında değil, daha önceki bir zaman diliminde bulunduğunu iddia edebilir. Böyle bir iddianın doğru olup olmadığını belirlemek oldukça zordur. Ancak, şüpheliye ait olay yerinde tespit edilen biyolojik örneğin mikrobiyota bilgisi, kişinin olaydan önce mi, yoksa olay anında mı orada olduğu hakkında önemli bilgiler sunabilir.

Bu çalışmanın en önemli bulguları tür düzeyindeki analizlerde elde edilmiştir. Bazı bakterilerin zaman içerisinde artık tespit edilemediği buna karşın zamanla yeni bazı bakteri türlerinin saptandığı görülmüştür. Bu bulgular bize metagenomik yöntemlerinin kullanımı ile gerçekleştirilen tür düzeyindeki değerlendirmelerin geniş kapsamlı çalışmalar ile desteklenmesi koşuluyla semen lekesinin yaşı hakkında önemli bilgiler sağlayabileceğini göstermektedir. Öte yandan, tüm zamanlardaki örnekler üzerinde gerçekleştirilen beta çeşitlilik analizlerinde, mikrobiyal kompozisyonun nispeten korunduğu gözlenmektedir. Bu bulgular bir olay yerindeki semen lekesinin ev içi ortam koşullarına uzun süreli maruziyet sonrasında dahi tanımlanabilmesi için metagenomik analizlerin kullanılabilme potansiyeli olduğunu göstermektedir.

KAYNAKÇA

[1] R. Breeze, B. Budowle ve S. Schutzer, "Microbial forensics", in *Adli Mikrobiyoloji*, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2011, pp. 1-25.

[2] C. Børsting and N. Morling, "Next generation sequencing and its applications in Forensic Genetic,s" *Forensic Science International: Genetics*, vol. 18, pp. 78–89, 2015.

[3] S. E. Schmedes, A. E. Woerner, and B. Budowle, "Forensic human identification using skin microbiomes," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 83, no. 22, 2017.

[4] "Kriminolojik Araştırmalar". Kriminoloji. https://kriminoloji.blogspot.com/2007/10/kriminoloji.html (erişim tarihi 10.10.2021).

[5] K. Virkler and I. K. Lednev, "Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene," *Forensic Science International*, vol. 188, no. 1-3, pp. 1–17, 2009.

[6] A. G. Skalleberg and M. M. Bouzga, "Detecting and collecting traces of semen and blood from outdoor crime scenes using crime scene dogs and presumptive tests", *Forensic Science International*, vol. 264, pp. 146–152, 2016.

[7] J.-H. An, K.-J. Shin, W.-I. Yang, and H.-Y. Lee, "Body fluid identification in forensics," *BMB Reports*, vol. 45, no. 10, pp. 545–553, 2012.

[8] Y. Zhang, B. Liu, C. Shao, H. Xu, A. Xue, Z. Zhao, Y. Shen, Q. Tang, and J. Xie, "Evaluation of the inclusion of circular RNAS in mrna profiling in forensic body fluid identification," *International Journal of Legal Medicine*, vol. 132, no. 1, pp. 43–52, 2017.

[9] C. Mayes, R. Houston, S. Seashols-Williams, B. LaRue, and S. Hughes-Stamm, "The stability and persistence of blood and semen mrna and MIRNA targets for body fluid identification in environmentally challenged and laundered samples," Legal Medicine, vol. 38, pp. 45–50, 2019.

[10] R. Dumache, V. Ciocan, C. Muresan, A. Rogobete, and A. Enache, "Circulating micrornas as promising biomarkers in forensic body fluids identification," *Clinical Laboratory*, vol. 61, no. 09/2015, 2015.

[11] H. Tian, M. Lv, Z. Li, D. Peng, Y. Tan, H. Wang, Q. Li, F. Li, and W. Liang, "Semen-specific mirnas: Suitable for the distinction of infertile semen in the body fluid identification?," *Forensic Science International: Genetics*, vol. 33, pp. 161–167, 2018.

[12] D. Zubakov, J. Chamier-Ciemińska, I. Kokmeijer, A. Maciejewska, P. Martínez, R. Pawłowski, C. Haas, and M. Kayser, "Introducing novel type of human DNA markers for forensic tissue identification: DNA copy number variation allows the detection of blood and semen," *Forensic Science International: Genetics*, vol. 36, pp. 112–118, 2018.

[13] Y. Jiang, J. Sun, X. Huang, H. Shi, C. Xiong, and Z. Nie, “Direct identification of forensic body fluids by MALDI-MS,” *The Analyst*, vol. 144, no. 23, pp. 7017–7023, 2019.

[14] M. Oliveira and A. Amorim, “Microbial Forensics: New breakthroughs and future prospects,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 102, no. 24, pp. 10377–10391, 2018.

[15] Ş. Karadayı and B. Karadayı, “Forensic use of the saliva microbiome: Metagenomic analysis methods: Traditional review,” *Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences*, vol. 18, no. 3, pp. 260–273, 2021.

[16] O. Karakuş, "Giriş". in *Adli Bilimler*, Ankara: Adalet Y., pp. 1-3, 2011

[17] H. Hancı and N. Açıkgöz, “Adli Biyoloji,” in *Adli tıp ve Adli Bilimler*, Ankara: Seçkin Yayıncılık, 2002, pp. 98–99.

[18] “Olay Yeri ve Delil Kavramları”. Bilir Kişi Raporları. https://bilirkisiraporlari.com/olay-yeri-delil-kavramlari (erişim tarihi 22.06.2022).

[19] H.E. Yükseloğlu, Ş. Özcan, B. Ceylan, “Olay Yeri İncelemesi ve Türkiye'deki Uygulamalar”, *Polis Bilimleri Dergisi*, vol. 10 (1), pp. 61-80, 2008.

[20] B. Orhanel, Danışman: Yard. Doç. Dr. E. Hülya Yükseloğlu, “Olay Yerinde Bulunan Bakteriyel Kontaminasyona Maruz Kalan Dışkı ve İdrar Örneklerinde DNA Tiplendirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2012.

[21] B. Karadayi, M. O. Kolusayin, A. Kaya, and S. Karadayi, “Collection and transfer of biological materials from forensic cases in emergency units,” *Marmara Medical Journal*, 2013.

[22] F. Milaj. “Delil Kavramı ve Delil Sistemleri”. Epik Partners Hukuk. https://epikpartnershukuk.com (erişim tarihi 22.06.2022).

[23] B. Karadayı, Ş. Karadayı, and N. Sezgin, “Presumptive and confirmatory tests used in identification of biological evidence and the latest developments in this topic,” *Turkiye Klinikleri Journal of Forensic Medicine and Forensic Sciences*, vol. 15, no. 2, pp. 80–92, 2018.

[24] K. Durmuş, Danışman: Prof. Dr. Salih Cengiz, “Olay Yeri İncelenmesinde ve Örnek Alımında Delilin Devamlılığının Sağlanması”, Yüksek Lisans Tezi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2003.

[25] “Delil Teslim Prosedürleri”. Adli Tıp Kurumu. https://www.atk.gov.tr/biyoloji-ihtisas-dairesi.html (erişim tarihi 23.06.2022).

[26] E. Aksoy, “Cinsel Saldırılar”. Türk Tabipleri Birliği. https://www.ttb.org.tr/eweb/adli/5.html#:~:text=Adli%20T%C4%B1p%20Ders%20Notlar%C4%B1&text=Cinsel%20sald%C4%B1r%C4%B1%2C%20r%C4%B1zas%C4%B1%20olmayan%20veya,ta%C5%9F%C4%B1yan%20bir%20davran%C4%B1%C5%9Fa%20maruz%20kalmas%C4%B1d%C4%B1r (erişim tarihi 23.6.2022).

[27] Z. Yılmaz, Anayasa TCK-CMK İnfaz Kanunu, Seçkin Yayınevi, Ankara 2005, pp. 133-136.

[28] H.İ. Seyalıoglu, Danışman: Prof. Dr. Gürsel Çetin, "Semen Tespitinde Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2007

[29] K. M. Feldhaus, D. Houry, and R. Kaminsky, "Lifetime sexual assault prevalence rates and reporting practices in an emergency department population," *Annals of Emergency Medicine*, vol. 36, no. 1, pp. 23–27, 2000.

[30] A. Nasta, B. Shah, S. Brahmanandam, K. Richman, K. Wittels, J. Allsworth, and L. Boardman, "Sexual victimization: Incidence, knowledge and resource use among a population of college women," *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, vol. 18, no. 2, pp. 91–96, 2005.

[31] M. Arıcı, Danışman: Doç. Dr. Hakan Kar, "Cinsel Saldırı Delili Olarak Giysilerde Sperm Tespitini Etkileyen Faktörler ve Postkoital İnterval", Tıpta Uzmanlık, Tıp Fakültesi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 2013.

[32] L. Langton, M. Berzofsky, CP. Krebs, H. Smiley-McDonald, "Victimizations not reported to the police, 2006- 2010", *Washington, DC: US Department of Justice, Of¬fice of Justice Programs, Bureau of Justice Statistics*, 2012.

[33] Z. Gölge, M. Yavuz, "Cinsel saldırı olgularının suç motivasyonuna göre sınıflandırılması." Adli Tıp Dergisi, 21, ss.11- 19, 2007.

[34] M. Korkmaz, "Evaluation of physical and mental health of sexual assault cases applied to Forensic Medicine Department," *Dicle Medical Journal*, vol. 41, no. 4, pp. 656–661, 2014.

[35] K. E. Edward and M. D. MacLeod, "The Reality and Myth of Rape: Implications for the Criminal Justice System," *Expert Evidence*, vol. 7, no. 1, pp. 37–58, 1999.

[36] O. Gökhan, Karadayı ve Ark., "Bir Nitelikli Cinsel İstismar Olgusunda Giysiler Üzerindeki Olası Biyolojik Delillerin Önemi", içinde Olgularla Adli Psikiyatri ve Davranış Bilimleri, Akademisyen Kitabevi, 2021.

[37] B. C. Dunphy, R. Kay, C. L. R. Barrat, and I. D. Cookie, "Quality Control during the conventional analysis of semen, an essential exercise," *Journal of Andrology*, vol. 10, no. 5, pp. 378–385, 1989.

[38] S. Karadayi, E. Moshfeghi, T. Arasoglu, and B. Karadayi, "Evaluating the persistence of laundered semen stains on fabric using a forensic light source system, prostate-specific antigen semiquant test and DNA recovery-profiling," *Medicine, Science and the Law*, vol. 60, no. 2, pp. 122–130, 2020.

[39] Ş. Karadayı, B. Karadayı, D. Öner, and G. Çetin, "Evaluation of the relationship between the detectability of seminal stains on laundered fabric and stain age," *Medicine, Science and the Law*, vol. 61, no. 3, pp. 198–207, 2021.

[40] A. Eren, Danışman: Prof. Dr. Behnan Alper, "Semen Lekelerinde Y Kromozomu Short Tandem Repeat'lerin Farklı Ortam Koşullarında Zamana

Bağlı Olarak Saptanabilirliğinin Araştırılması", Tıpta Uzmanlık, Tıp Fakültesi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2010.

[41] B. Albayrak Acar, Danışman: Doç. Dr. Hakan Kar, "Adli Tıpta Vücut Sıvılarının Tanımlanmasında Biyolojik Marker Olarak Kullanımı", Tıpta Uzmanlık, Tıp Fakültesi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 2019.

[42] E. Altuntaş, Danışman: Doç. Dr. Reşat Ünal, "Yaşlanma Mikrobiyom İlişkisinin Uzun Ömürlü Spalax Leucodon Yer Altı Köstebeği Modelinde 16s rRNA Amplikon Sekanslama Metodu ile Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 2021.

[43] G. Berg, D. Rybakova, D. Fischer, et al, "Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges," *Microbiome*, vol. 8, no. 1, 2020.

[44] F. Gürkan Aslan and M. Altındiş, "İnsan Mikrobiyom Projesi, Mikrobiyotanın Geleceği ve Kişiye Özel Tıp Uygulamaları," *J Biotechnol and Strategic Health Res*, no. 1 (Special issue). pp. 1–6, 2017.

[45] J. M. Robinson, Z. Pasternak, C. E. Mason, and E. Elhaik, "Forensic applications of Microbiomics: A Review," *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, 2021.

[46] S. Salman Yılmaz, Danışman: Prof. Dr. Gökhan Aygün, "El Mikrobiyotasının Kişilerin Tanımlanmasında Kullanılmasını Sağlayacak Yeni Bir Metodun Geliştirilmesi", Doktora Tezi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2019.

[47] H. Watanabe, I. Nakamura, S. Mizutani, Y. Kurokawa, H. Mori, K. Kurokawa, and T. Yamada, "Minor taxa in human skin microbiome contribute to the personal identification," *PLOS ONE*, vol. 13, no. 7, 2018.

[48] E. A. Franzosa, K. Huang, J. F. Meadow, D. Gevers, K. P. Lemon, B. J. Bohannan, and C. Huttenhower, "Identifying personal microbiomes using metagenomic codes," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 22, 2015.

[49] H. Lutz, A. Vangelatos, N. Gottel, E. Speed, A. Osculati, S. Visona, S. J. Finley, S. Tuomisto, P. Karhunen, J. A. Gilbert, and G. T. Javan, "Manner of death and demographic effects on microbial community composition in organs of the human cadaver," 2019.

[50] M. Cenderadewi, R. C. Franklin, A. E. Peden, and S. Devine, "Pattern of intentional drowning mortality: A total population retrospective cohort study in Australia, 2006–2014," *BMC Public Health*, vol. 19, no. 1, 2019.

[51] V. M. Voloshynovych, R. O. Kasala, U. Y. Stambulska, and M. S. Voloshynovych, "Determination the presence of amplification products of 16S rrna microcystis aeruginosa as a biomarker of drowning," *Romanian Journal of Legal Medicine*, vol. 27, no. 1, pp. 16–21, 2019.

[52] E. Kakizaki, S. Kozawa, M. Sakai, and N. Yukawa, "Bioluminescent bacteria have potential as a marker of drowning in seawater: Two immersed cadavers retrieved near estuaries," *Legal Medicine*, vol. 11, no. 2, pp. 91–96, 2009.

[53] A. P. Salzmann, G. Russo, S. Aluri, and C. Haas, “Transcription and microbial profiling of body fluids using a massively parallel sequencing approach,” *Forensic Science International: Genetics*, vol. 43, p. 102149, 2019.

[54] A. Dobay, C. Haas, G. Fucile, N. Downey, H. G. Morrison, A. Kratzer, and N. Arora, “Microbiome-based body fluid identification of samples exposed to indoor conditions,” *Forensic Science International: Genetics*, vol. 40, pp. 105–113, 2019.

[55] A. Choi, K.-J. Shin, W. I. Yang, and H. Y. Lee, “Body fluid identification by integrated analysis of DNA methylation and body fluid-specific microbial DNA,” *International Journal of Legal Medicine*, vol. 128, no. 1, pp. 33–41, 2013.

[56] S. Giampaoli, E. DeVittori, F. Valeriani, A. Berti, and V. Romano Spica, “Informativeness of NGS analysis for vaginal fluid identification,” *Journal of Forensic Sciences*, vol. 62, no. 1, pp. 192–196, 2016.

[57] R. W. Holley, G. A. Everett, J. T. Madison, and A. Zamir, “Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 240, no. 5, pp. 2122–2128, 1965.

[58] R. Durmaz, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2001

[59] İ. C. Kızmaz, İ. C. Paylan, S. Erkan, “DNA Dizilemenin Tarihsel Gelişimi”, *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, vol. 6(2), pp. 47-53, 2017.

[60] E. Bolukbasi, S. Aras, “Third Generation DNA Sequencing Technologies”, *International Journal of Scientific and Technological Research*, vol. 1, pp. 14-21, 2015.

[61] S. G. Tringe, C. von Mering, A. Kobayashi, A. A. Salamov, K. Chen, H. W. Chang, M. Podar, J. M. Short, E. J. Mathur, J. C. Detter, P. Bork, P. Hugenholtz, and E. M. Rubin, “Comparative Metagenomics of Microbial Communities,” *Science*, vol. 308, no. 5721, pp. 554–557, 2005.

[62] X. Dong and M. Strous, “An integrated pipeline for annotation and visualization of metagenomic contigs,” *Frontiers in Genetics*, vol. 10, 2019.

[63] C. Quince, A. W. Walker, J. T. Simpson, N. J. Loman, and N. Segata, “Shotgun Metagenomics, from sampling to analysis,” *Nature Biotechnology*, vol. 35, no. 9, pp. 833–844, 2017.

[64] M. L. Calle, “Statistical analysis of Metagenomics Data,” *Genomics & Informatics*, vol. 17, no. 1, 2019.

[65] X. C. Morgan, N. Segata, and C. Huttenhower, “Biodiversity and functional genomics in the human microbiome,” *Trends in Genetics*, vol. 29, no. 1, pp. 51–58, 2013.

[66] P. D. Schloss, S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn, and C. F. Weber, “Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software

for describing and comparing microbial communities," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 23, pp. 7537–7541, 2009.

[67] T. Metsalu and J. Vilo, "Clustvis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap," *Nucleic Acids Research*, vol. 43, no. W1, 2015.

[68] S. Holbert, M. Branger, A. Souriau, B. Lamoureux, C. Ganneau, G. Richard, T. Cochard, C. Tholoniat, S. Bay, N. Winter, J. L. Moyen, and F. Biet, "Interferon gamma response to mycobacterium avium subsp. paratuberculosis specific lipopentapeptide antigen L5p in cattle," *Research in Veterinary Science*, vol. 102, pp. 118–121, 2015.

[69] A. S, "Fastqc: A Quality Control Tool For High Throughput Sequence Data," Babraham Bioinformatics - FastQC a quality control tool for high throughput sequence data. [Online]. Available: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/. [Accessed: 13-Oct-2022].

[70] B. Bushnell Super Moderator Join Date: Jan 2014 Posts: 2709, "BBDuk: Adapter/Quality Trimming And Filtering," SEQanswers. [Online]. Available: https://www.seqanswers.com/forum/bioinformatics/bioinformatics-aa/37399-introducing-bbduk-adapter-quality-trimming-and-filtering. [Accessed: 13-Oct-2022].

[71] K. Katoh and D. M. Standley, "MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 30, no. 4, pp. 772–780, 2013.

[72] M. N. Price, P. S. Dehal, and A. P. Arkin, "FastTree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 26, no. 7, pp. 1641–1650, 2009.

[73] P. J. McMurdie and S. Holmes, "Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of Microbiome Census Data," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 4, 2013.

[74] T. Yao, X. Han, T. Guan, Z. Wang, S. Zhang, C. Liu, C. Liu, and L. Chen, "Effect of indoor environmental exposure on seminal microbiota and its application in body fluid identification," *Forensic Science International*, vol. 314, p. 110417, 2020.

[75] D. Baud, C. Pattaroni, N. Vulliemoz, V. Castella, B. J. Marsland, and M. Stojanov, "Sperm microbiota and its impact on semen parameters," *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, 2019.

[76] A. Jimenez-Verdejo, E. Osuna, E. Garcia-Olivares, and A. Luna, "Study of the enzymatic activity of GGT, LDH, PAP and PSA in semen stains: Application to age calculation," *Forensic Science International*, vol. 68, no. 1, pp. 7–15, 1994.

[77] F. Asaghiar and G. A. Williams, "Evaluating the use of hypoxia sensitive markers for body fluid stain age prediction," *Science & Justice*, vol. 60, no. 6, pp. 547–554, 2020.

[78] S. Zha, X. Wei, R. Fang, Q. Wang, H. Lin, K. Zhang, H. Zhang, R. Liu, Z. Li, P. Huang, and Z. Wang, “Estimation of the age of human semen stains by attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy: A preliminary study,” *Forensic Sciences Research*, vol. 5, no. 2, pp. 119–125, 2019.

[79] S. Alshehhi and P. R. Haddrill, “Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers,” *Forensic Science International*, vol. 298, pp. 58–63, 2019.

[80] A. P. Salzmann, N. Arora, G. Russo, S. Kreutzer, L. Snipen, and C. Haas, “Assessing time dependent changes in microbial composition of biological crime scene traces using microbial RNA markers,” *Forensic Science International: Genetics*, vol. 53, p. 102537, 2021.

A
ETİK KURUL ONAYI

Evrak Tarih ve Sayısı: 21.10.2021-18924

ALTINBAŞ ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: 80 **Tarih: 15.10.2021**
Konu: Dr. Öğr. Üyesi Şükriye Karadayı

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şükriye Karadayı
Altınbaş Üniversitesi SHMYO Müdürlüğü

İlgi: Altınbaş Üniversitesi SHMYO Müdürlüğünün 21.09.2021 tarihli yazısı ile Altınbaş Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 2021/87 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz **2021/87** dosya numaralı Nursena Gürsoy'a ait **"Farklı Sürelerde Bekletilen Semen Örneklerinin Mikrobiyom Analizi ile İdentifikasyonu"** başlıklı çalışma, kurulumuzun **14 Ekim 2021 tarih ve 13 sayılı toplantısında** görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.
Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mustafa Aydın BARLAS
Altınbaş Üniversitesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı
E-imzalıdır

Eki: Altınbaş Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.
Evrak sorgulaması https://www.turkiye.gov.tr/altinbas-universitesi-ebys?eD=BSF9D6A46&eS=18924 adresinden yapılabilir.

B
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu çalışma Altınbaş Üniversitesi ve Yıldız Teknik Üniversitesi bünyesinde gerçekleştirilecek bir araştırma çalışmasıdır.

Araştırmanın adı: Farklı Sürelerde Bekletilen Semen Örneklerinin Mikrobiyom Analizi ile İdentifikasyonu

Araştırmanın amacı:

Kurgulanan bir adli olgu senaryosunun yardımıyla olay yeri incelemelerinde cinsel saldırı sonrası maktulün kıyafetlerinde semen varlığının araştırılması için mikrobiyom analizi yapılması, analiz sonuçlarının örnek alınma zamanına göre ve çevresel maruziyet karşısındaki kararlılığının ve niteliğinin araştırılması ile adli amaçlı kullanım açısından önemli bulgulara ulaşılması amaçlanmıştır.

Gönüllünün sorumlulukları: Örnek alımı sırasında, araştırmacıya yardımcı olmak.

Gönüllünün araştırmaya katılımı isteğe bağlıdır ve gönüllü istediği zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın ve hiçbir hak kaybına uğramaksızın araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilir.

İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri bulunmaktadır, ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır, yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya yasal temsilcisi, söz konusu erişime izin vermiş olmaktadır.

İlgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacaktır, kamuoyuna açıklanmayacaktır; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi gönüllünün kimliği gizli kalacaktır.

Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllü veya yasal temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir.

Gönüllünün araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir tereddüttü hakkında daha fazla bilgi temin edinebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları şöyledir.

Nursena Gürsoy: 0542 509 59 17

Dr. Öğr. Üyesi Şükriye Karadayı: 0532 637 92 50

Doç. Dr. Tülin Arasoğlu: 0505 236 40 04

Gönüllü araştırmacılardan semen örneklerinin alınması sırasında refakat edecek doktor:

Dr. Ahmet Şükrü Algan: 0539 583 82 50

Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler şöyledir.

a) Gönüllü hasta olursa ya da,
b) Gönüllü şehir dışında yaşamaya başlarsa, katılımı sona erdirilebilir.

Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre: 1 gün
Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı: 5
Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyaller, farklı katılımcıların semen örneklerinin belirli zaman aralıklarından sonra kumaş üzerinden elde edilebilirliğinin adli açıdan değerlendirilmesi amacıyla kullanılacaktır. Biyolojik örnekler laboratuvarda alınacaktır. Analiz sonrasında toplanmış biyolojik örnekler imha edilecektir.

Biyolojik materyallerin analizleri yurtdışında yapılmayacaktır.

"Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen Doktor Ahmet Şükrü Algan tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum."
Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum."

Yukarıda tırnak işareti ile ayrılmış ve kalın puntolarla italik olarak yazılı olan paragrafın aşağıdaki noktalı alana gönüllü tarafından el yazısı ile yazılması rica olunur.

……
……
……
……
……
……
……

"Farklı Sürelerde Bekletilen Semen Örneklerinin Mikrobiyom Analizi ile İdentifikasyonu" araştırması kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (semen örnekleri);

Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum
İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum
Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum

Yukarıda yazılı onamlardan bir tanesinin seçilerek aşağıdaki noktalı alana gönüllü tarafından el yazısı ile yazılması rica olunur.

……
……

Gönüllü Adı Soyadı Araştırmacının Adı Soyadı

İmzası Tarih İmzası Tarih

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. N. Gürsoy, S. Karadayı, T. Özbek, “Semen Örneklerindeki Mikrobiyom Profilinin Zamana Bağlı Değişiminin Adli Açıdan Değerlendirilmesi”, 5. Uluslararası Tıp Bilimleri ve Multidisipliner Yaklaşımlar Kongresi, İstanbul, Türkiye, 09.10.2022, s. 478.