

DIŞ ÖRNEKLERİNDEN DNA ELDE EDİLME METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI VE ADLİ BİLİMLER AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Özlem İmamoğlu¹, Mustafa Karapirli¹, Nur Akboyun²

1 Adli Tıp Kurumu, Ankara Grup Başkanlığı, Ankara

2 Ankara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji AD, Ankara

Alındı: 15.11.2011 / Kabul: 16.12.2011

Sorumlu Yazar: Özlem İmamoğlu,
Ankara Adli Tıp Grup Başkanlığı, Ankara Grup Başkanlığı, Ankara, e-posta: ozlemimamoglu@yahoo.com

ÖZET

Dişlerden genetik materyalin ekstraksiyonu özellikle adli araştırmalarda DNA analizlerinin önemli bir parçasıdır. Dişler insan vücudunun en sert yapısı olması, nem, yüksek ısı ve mikrobiyal olaylar gibi sert çevre koşullarına karşı dayanıklı olması nedeni ile adli olaylarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Dişlerden DNA ekstraksiyonunda birçok yöntem olmasına karşın, son zamanlarda dişin tamamen öğütülerek kullanıldığı metotlar yerine dişleri koruyucu metotlar önem kazanmaya başlamıştır, bu şekilde arkeolojik ipuçları ve müze örnekleri de korunmuş olacaktır. Dişlerde koruyucu metotların kullanılmasının avantajı nispeten düşük maliyetli olması ve adli araştırmalarda dişin bütünlüğünün korunmasıdır. Bu derlemede Ters Kök Kanal Metodu, Doğru Kanal metodu, Kemik Tozu Hazırlama Metodu'nun ve bazı diğer metotların avantaj ve dezavantajları açıklanmaya çalışılmış, adli bi-

limler açısından önemi hakkında değerlendirmelere yer verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: DNA ekstraksiyonu, dişler, adli bilimler

COMPARISION OF DNA EXTRACTION METHODS FROM TEETH SAMPLES AND EVALUATION IN TERMS OF FORENSIC SCIENCES

Özlem İmamoğlu¹, Mustafa Karapirli¹, Nur Akboyun²

1 Ankara Regional Center, The Council of Forensic Medicine, The Ministry of Justice, Ankara, Türkiye

2 Department of Periodontology, The Faculty of Dentistry, Ankara University, Ankara, Türkiye

Received: 15.11.2011 / Accepted: December 16, 2011

Correspondence to: Özlem İmamoğlu,
Ankara Adli Tıp Grup Başkanlığı, Ankara Grup Başkanlığı, Ankara, e-posta: ozlemimamoglu@yahoo.com

ABSTRACT

The extraction of genetic material from teeth is an essential part of DNA analysis especially in forensic investigations. Teeth are widely used in forensic cases because they are the hardest structures of the human body that is resistant to adverse conditions such as humidity, high temperature and the microbial action. There are currently many DNA extraction methods from teeth, however, more conservative methods are gaining importance recently rather than grinding the whole tooth because the tooth samples of archaeological evidence or museum samples have to be preserved. The advantages of conservative technique are its simplicity, relatively low cost and preservation of the tooth integrity which can be considered in forensic investigations. In this report we aimed to clarify the advantages and disadvantages of Retrograde Reverse Root Canal Technique, Orthograde Entrance Technique, Bone Mill Preparation

Technique (Traditional) and some other methods. Besides assessments on their importance in terms of forensic science are given.

Key words: DNA extraction, teeth, forensic sciences

GİRİŞ

DNA analizi, kişinin kesin tanımlanmasını yaparken kişinin fiziksel karakteri, etnik kökeni ve cinsiyeti hakkında detaylı bilgiler vermektedir. Günümüzde kullanılan DNA analizleri yüksek güvenilirliğe sahip olduğu için uzun süredir mahkemeler-

(6). Adli tıp ve hukuk uygulamalarında iki tür kimlik tanımlanmaktadır. “Adli kimlik” kişinin nüfus kayıtlarında bulunan, cinsiyet, yaş, baba adı, anne adı, doğum yeri ve yılı gibi bilgilerin oluşturduğu bütün olarak kabul edilmektedir. “Tıbbi kimlik” ise vücut özelliklerinin tümünün birlikte değerlendirilmesinin

lerinde kemik örnekleri yerine diş örneklerinin tercih edilmesinin diğer bir nedeni ise dişlerin gözenekli bir yapıya sahip olması ve dişleri saran, koruyan kuvvetli mine tabakası sayesinde kontaminasyon riskinin az olmasıdır. Ölen kişilerden alınan diş örnekleri ile aile bireyleri olabilecek şahıslardan alı-

Adli kimliklendirme, ölen kişinin yakınları tarafından tanınması ile sağlanmakla beraber, cesedin tanınamayacak derecede olduğu durumlarda, DNA temelli adli genetik çalışmaları ön plana çıkmaktadır. İleri derecede çürümüş ve yanmış cesetlerde kimliklendirme iskelet dokusu veya diş örneklerinden sağlanabilmektedir

de yasal deliller olarak kullanılmaktadır [1,2,3]. Adli Bilimlerde kişilerin kimliğinin tespitinde biyolojik materyaller üzerinde DNA analizleri bugüne kadar yapılmış olan en önemli gelişmelerden birisi olarak kabul edilmektedir.

Kitlesel afetler, savaş suçları, trafik ve uçak kazaları ile terörist saldırıları gibi olaylarda kimliği tespit edilemeyen ölü bireylerin kimliklendirilmesi gerekmektedir [4,5]. Bir insanın tanınmasında, tanımlanmasında ve diğer insanlardan ayırt edilmesinde etkin olan özelliklerin tümüne “kimlik” adı verilmektedir, yaşayan ya da ölü bir kişinin bu özelliklerinin ortaya konulmasına ise “kimlik tespiti” denilmektedir. Birçok nedenden ötürü hem canlıda hem de ölüde kimlik tespiti yapmak gereklidir

sonucu ortaya çıkan kimliktir. Yaş, cinsiyet, parmak izi, kemik ve dişler bir bireyin tıbbi kimliğini oluşturan fiziksel yapıların başında gelmektedir [6].

Adli kimliklendirme, ölen kişinin yakınları tarafından tanınması ile sağlanmakla beraber, cesedin tanınamayacak derecede olduğu durumlarda, DNA temelli adli genetik çalışmaları ön plana çıkmaktadır. İleri derecede çürümüş ve yanmış cesetlerde kimliklendirme iskelet dokusu veya diş örneklerinden sağlanabilmektedir [4].

Yapılan çalışmalar, diş örneklerinde kemiğe oranla daha fazla genomik DNA bulunduğunu göstermektedir [7]. Bu nedenle, kişilere ait diş örneklerinden daha fazla bilgi edinmek mümkün olabilmektedir. DNA analiz-

nan biyolojik materyallerin, DNA analizi profillerinin karşılaştırılmasıyla kimliklendirme sağlanabilmektedir [7,8]. Adli olaylar için DNA belirleme teknikleri, temel olarak PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ürünü dizisini elde etmeye dayanmaktadır [9]. Diş örnekleri adli çalışmalarda delil niteliği taşımasının yanında tarihi öneme sahip antropolojik çalışmalar için de önemli delil kaynaklarıdır. Bu derlemede diş örneklerinden farklı DNA izolasyon metotlarının karşılaştırılması, metotların avantajları, dezavantajları ve adli bilimlere değerlendirmelere yer verilmiştir.

Dişin Yapısı

Diş, sindirim sisteminin başlangıcında; besinlerin kesilme-

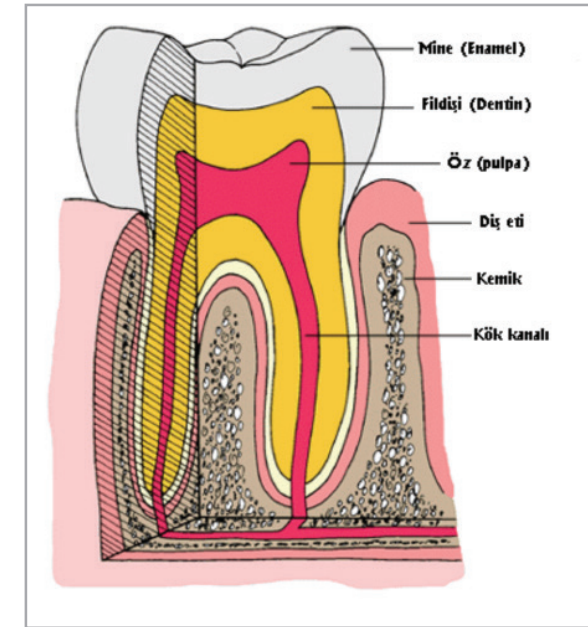
si, ufalanması, koparılması ve kendini destekleyen dokuların korunmasına ve gelişmesine yardımcı bir organdır.

Diş, klinik olarak taç, boyun (kole, collum dentes) ve kök (radix dentes) kısımlarından oluşur. Taç kısım, ağızda görünen ve mineyle kaplı bölümdür.

Mine, dentin ve sement dişin sert tabakalarını oluştururken pulpa (diş özü) dişin yumuşak olan tek tabakasıdır [10]. Kole yani diş boynu, dişetiyle sarıllı mine-sement birleşimidir.

Ektoderm kökenli sinir hücreleri içermeyen mineral bir dokudur. Dişlerdeki mine dokusu

yapısının %96-97’lik kısmının inorganik olması nedeni ile vücudun en sert ve dayanıklı dokusudur (Şekil 1). Bu da dişleri DNA’nın degrade olmasına sebep olan nem, yüksek ısı, mantar ve bakteriyel bozunma gibi koşullara karşı oldukça dayanıklı kılmaktadır [11,12].



Resim 1: Ölüm zamanı ile olgu sayıları arasındaki ilişki

Dentin, dişlerin en büyük bölümünü kaplayan, insan vücudunda kimyasal yapısı, fiziksel sertliği ve biyolojik özellikleri açısından kemik dokusuna en benzer özellikleri taşıyan mineralize bağ dokudur. Dentin içerisinde, dentin tübülleri pulpa boşluğundan dentinin dış yüzündeki semente doğru uzanır. Pulpa diş çevresi, odontoblast hücreleri ile kuşatılmış, içerisinde kan dolaşımını sağlayan

dişi besleyen yumuşak bağ dokudur [13]. Kök ise periodontal ligament tarafından kemiğe bağlandığı için çene kemiğinin içinde kalan kısımdır [10].

Dişlerden DNA İzolasyonu

DNA izolasyon çalışmalarında en doğru sonucu elde edebilmek için vücudun en doğru yapı-

sı örneklenmelidir. Günümüzde ticari olarak satılan kitler çok düşük miktarlardaki DNA varlığında dahi sonuç verebilmektedir [11].

Kimliklendirme çalışmalarında DNA molekülünün tamamı değil, ancak belirli bazı bölgeleri incelenmektedir. DNA molekülünün baz dizisinin tümü, protein üretiminden sorumlu değildir [14,15]. Protein kodlayan kısım

tüm genomun yaklaşık % 3'üdür (16). Geri kalan kısım ise prote- in kodlaması gerçekleştirmez. Bu kısmın büyük çoğunluğu son derece polimorfik ve oldukça yüksek ayırım gücüne sahip tek- rarlardan oluştuğu bilinmekte- dir. Bir tekrar dizisinin ardışık olarak tekrarlanması sonucu oluşan uzunluk polimorfizmi bu bölgelerdeki diziden değil tekrar sayısındaki farklılıktan kaynak- lanmaktadır. Ardışık tekrarlar, tekrar eden baz dizisinin bü- yükülüğüne göre çeşitli gruplara ayrılmaktadır. Minisatellitler (de- ğişken sayıda ardışık tekrarlar, Variable Number of Tandem Re- peats: VNTR'ler) 15-70 baz çifti (bç)'lik, mikrosatellitler (Kısa Ardışık Tekrarlar; Short Tan- dem Repeats: STR'ler) 2-5 bç'lik bir ünitenin tekrarlanmasından oluşmaktadır (16). Kısa zin- cir tekrar (STR) lokusları insan kalıntılarının kimliklendirilme- si ve kriminal araştırmalarda toplanan biyolojik örneklerin tanımlanmasında kullanılan en yaygın ve en güçlü metot olarak bilinmektedir (17,18). Bu başarı- lı uygulama kan, tükürük, epitel hücre ve sert kemik örneklerin- de dahi kullanılmaktadır (19). STR'ların adli bilimlerde kulla- nılmasının nedenleri, küçük par- çalar olmaları nedeniyle oldukça hasar görmüş DNA örneklerinde bile sonuç vermesi, elde edilen sonuçların tekrarlanabilir olması, yüksek polimorfizme bağlı olarak ayırım gücünün yüksek, mutasyon ora- nının düşük olması ve otomas- yona ya da çoklu analize imkan vermesi olarak sıralanabilir (20).

SNP'ler (single nucleotide poly- morphism) tek nükleotid poli- morfizmidir. SNP insan geno- munda oldukça fazla miktarda olup, 300 baz çiftinde 1 SNP olmak üzere yaklaşık 17 mil- yon SNP vardır. İnsanlarda- ki varyasyonların % 85'i SNP nedeniyle oluşmaktadır. DNA parçaları 150 bç'den az olan ör- neklerde, STR analizi yapılamadı- ğı durumlarda, özellikle yük- sek oranda bozulmuş diş gibi biyolojik örneklerde rahatlıkla SNP analizi ile kimliklendirme yapılabilir. SNP'lerin ko- lay çoğaltılabilmesi veya mikro- varyantların olmaması, verilerin yorumlanmasının STR'a göre daha kolay olması, yüksek ve- rimli teknolojiler kullanılması ve bu nedenle otomasyona uy- gun olması gibi nedenlerle adli bilimlerde kullanılmaya başlan- mıştır (14).

Kişinin ölümü ile DNA analizi arasında geçen zaman süreci uzadığında yumuşak dokular- dan DNA analizi imkansız hale gelmekte, ancak kemik ve diş örnekleri gibi sert dokulardan sağlanabilmektedir (11).

Antik iskelet kalıntılarında DNA bulunmasına rağmen, oldukça bozuk ve hasarlı olduğu görül- mektedir. Bu örneklerde bu- lunan DNA'nın, kemik yapıla- rından ziyade dişlerde daha iyi korunmuş olduğu kanıtlanmıştır (11). Dişler yanma, boğulma, travma, bozulma, çürüme gibi kötü koşullara dayanıklı, insan vücudunun en sert yapısı ola- rak adli araştırmalarda kulla- nılmaktadır. Kitleselel afetlerde

vücudun tüm yapıları bozuldu- ğunda diş örneklerinden elde edilen DNA önemli bir kaynak oluşturmaktadır (11, 21). Antik diş örneklerinden DNA analiz- leri arkeolog ve antropologla- ra geçmişe yönelik bilgi verme açısından da yepyeni bir olanak sağlamaktadır (22, 23, 24). DNA diş içerisinde çok uzun süre korunabilen, değerli bir bilgi kaynağıdır. Antik DNA analizle- ri (aDNA) yüz ile onbinlerce ya- şındaki iskelet kalıntılarında az miktardaki DNA ekstraksiyonla- rını kapsamaktadır. Dişin dentin ve pulpa yapısında oldukça yük- sek miktarda DNA bulunmakta ve kolaylıkla ekstrakte edilebil- mektedir. Yapılan çalışmalar di- şin gövde, kök ve kök ucundan yeterli miktarda DNA elde edile- bileceğini göstermiştir. Tüm diş veya diş kökleri rutin DNA ça-lışmalarında kullanılmaktadır, sert mine tabakası ve sement dişi dış etmenlerden koruyarak DNA'nın kontamine olmasına da engel olmaktadır (10, 25, 26). Fakat en yüksek miktarda DNA'nın diş köküne yakın gövde kısmından elde edildiği saptan- mıştır (10).

Ancak DNA analizleri için sade- ce elde edilen DNA'nın miktarı değil aynı zamanda DNA kalitesi ve saflığı da önemlidir (10,11). DNA miktarı ve yapısı dişin böl- gelerine göre farklılık göster- mektedir. Örneğin, dentin için- de kök bölgesinde (65x103mm² / 20x103mm²) apeks göre (15x103mm² / 20x103mm²) 3-4 kat daha fazla odontoblastik hücre bulunduğu belirtilmiştir (10).

Diş Örneklerinde Mitokondrial DNA Analizinin Önemi

Genomik DNA içermeyen ya da de- grede olmuş kemik, diş, saç kılı gibi örneklerde kimliklendir- me, mitokondrial DNA (mtDNA) analizi ile sağlanabilmektedir (1,11).

Dişler yüksek molekül ağırlığın- da mtDNA içermediği için adli çalışmalar için ideal bir kay- naktır (27). İnsan kalıntılarının kimliklendirilmesinde mtDNA analizleri çok önemlidir. DNA hücre çekirdeği dışında diğer bir organel olan mitokondriden DNA'nın elde edilerek kullanıl- masına imkan vermektedir. (28)

Akrabalık derecelerinin belir- lenmesinde de mtDNA analizi ön plana çıkmaktadır. Çünkü aynı aileye mensup her çocuğun mtDNA'sı annenin yumurta hü- crelerinden gelmekte, çekirdek DNA'sı ise baba kaynaklıdır (28). Spermin sitoplazma içermemesi ve mitokondrilerinin fer- tilizasyona katılmayan kuyruk kısmında toplanması nedeniyle zigotdaki mitokondriler sadece ovuma aittir. Anne tüm çocuk- larına mtDNA'sını aktarırken, sadece kız çocuklar bunu ikinci kuşağa aktarabilir.

Annenin mtDNA'sında var olan polimorfizm çocuklarına aynen aktarılır. mtDNA'nın bu özelliği sayesinde maternal örnek ile şüpheli örneğin karşılaştırılma- sı sonucunda kimliklendirme yapılabilir (28).

Diş Örneklerinden DNA Elde Etme Metotları

Diş örneklerinden DNA'nın elde edilerek izole edilmesinde çe- şitli metotlar kullanılmaktadır (4, 29, 30, 31). Burada temel amaç; hücrelerin parçalan- ması, ortamdaki inhibitörlerin, nükleazların ve en önemlisi kontaminantların giderilmesi, maksimum miktarda ve kalite- de DNA elde edilmesidir. DNA izolasyonunu takip eden aşama- da DNA'nın çoğaltılarak, kişinin DNA'sına karşılık gelen şifrelen- miş numara dizileri olan profilin elde edilmesi gerekmektedir. PZR (Polimeraz zincir reaksiyo- nu) reaksiyonunda ortalama 1 ng DNA yeterli olmaktadır.

Diş ve kemik örnekleri dahil olmak üzere tüm dokulardan DNA izolasyon çalışmalarında karşılaşılan en önemli problem kontaminasyondur. Antik DNA çalışmalarında ise karşılaşılan iki önemli problemden birincisi DNA'nın zamanla bozulması, di- ğeri ise modern DNA örnekleri ile kontamine olma olasılığıdır. Bu durum yanlış pozitif sonuç- lara sebebiyet verebilmektedir (22, 32). Kontaminasyonu azalt- mak veya korunmak için en iyi yol koruyucu tedbirlerin en kısa sürede alınması, örnek toplan- ması aşamasında konuyu bilen arkeologlarla birlikte çalışılma- sı gerekmektedir (22).

Laboratuar koşullarında kon- taminasyonu azaltmak için bazı dezenfektanlar kullanılmakta-

dır. SDS (sodyum dodesil sülfat), H2O2 (Hidrojen peroksit), NaOCl (Sodyum hipoklorit), C4H10O (eter) gibi dezenfektanlarla veya UV ışığı gibi fiziksel etmenlere tabi tutularak diş örneklerinin diş yüzeyi temizlendikten sonra ekstraksiyon işlemine devam edilmelidir (33).

Diş ve antik diş örneklerinden DNA elde etmek için birçok yöntem kullanılmasına rağmen standart bir metot yoktur. Gü- nümüz diş örneklerinden DNA analizinde dişin tamamen kay- bedilmesi sorun yaratmazken, antik diş örnekleri ve müze ko- leksiyonu gibi korunması gerek- li örneklerde diş kayıplarına izin verilmemektedir (13).

Diş ve kemik örneklerinin tama- men parçalanarak DNA'nın elde edildiği "Kemik Tozu Hazırlama Metodu" yaygın olarak kulla- nılan geleneksel bir metottur. "Ters Kök Kanal Metodu" Cobb (2002) tarafından isimlendiril- miştir. Bu yöntemde diş örne- klerinin tamamen kaybı söz ko- nusu olmadan sadece dişin kök kısmından bir kanal açılarak alınan materyalden DNA elde- si söz konusudur. "Doğru Giriş Kanal Metodu"(Alakoç, 2009) dişin mine kısmından kök ucuna doğru bir kanal açılması ve bu şekilde alınan materyalden DNA izolasyonu ile sağlanmaktadır. Benzer yollarla farklı isimlen- dirilmiş birçok metot bulun- maktadır. Jakubowska (2011), tarafından önerilen kristal agre- gatlardan DNA ekstraksiyonu ile toplam deminerilizasyon da ke- mik örneklerinde kullanılan bir

metottur. Bu tip çalışmalarda genetik materyal olan DNA'nın izole edilmesi en önemli aşamadır.

1-Kemik Tozu Hazırlama Metodu

Kemik tozu hazırlama metodunda dış yüzeyi kontaminantlardan temizlenen diş ve antik diş örnekleri, diş öğütme cihazında farklı devirlerde çarpma hızla-

rında öğütülmektedir. Toz haline getirilen diş örnekleri 10 mg/ml Proteinaz K, 10mM Tris ile 56 oC'de bir gece inkübasyona bırakılmakta, inkübasyon sonrası 11000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile oluşan üç farklı fazdan, orta faz alınarak eşit hacimde fenol kloroform yöntemi uygulanmaktadır (Şekil 2). Bu ekstraksiyon yönteminde; fenol proteini bağlamakta ve etkili bir şekilde denatüre etmekte, kloroform ise fenölü bağlamaktadır [34].



Resim 2: Kemik tozu hazırlama metodunda kullanılan kemik öğütme cihazı

yumuşak diş fırçası ile fırçalama, steril suda bekletme, açık havada kurutma, H3PO4 (Fosforik asit) içeren jelde bir süre bekletildikten sonra steril su ile yıkama aşamaları gibi birkaç işlemten geçirilmektedir. Kontaminantlardan uzaklaştırılan diştan DNA ekstrakte etmek için, kanal aletleri ile apekten vertikal olarak girilmektedir. Bu işlem mümkün olan en ince

kanal aleti ile başlatılıp, gittikçe artan kalınlıktaki kanal aletleri ile kanala giriş genişletilmektedir. Genişletilen kanaldan dentin doku örnekleri alınmaktadır. Açılan bölge kompozit materyallerle doldurularak, bu şekilde diş örneklerinin orjinalliği korunmuş olmaktadır. Elde edilen dentin ve doku materyali 1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, Tween 20 ve 75 µl proteinaz-K ile bir

2-Ters Kök Kanal Metodu

Cobb tarafından önerilen dişin tamamen kaybı söz konusu olmadan DNA'nın elde edildiği metottur. Antropolojik olarak değerli, korunması gerekli diş örneklerinin orjinalliği bozulmadan yeterli DNA elde etmek mümkündür (Şekil 3). Diş örneklerinden kontaminantları uzaklaştırmak amacı ile derişik NaOCl ile temizlendikten sonra



Resim 3: Ters Kök Kanal metodunda dişin kök ucundan kanal açılması

fat) ile yıkanmakta daha sonra UV ışığında bir süre bekletildikten sonra sterilizasyon maddesi ile temizlenmektedir (Şekil 4). Dezenfeksiyon işleminden sonra diş örnekleri farklı çapta elmas uçlu delici aletler aracılığı ile dişin mine tabakasından pulpa çıkarılmakta, boşaltılan bölge dolgu materyali ile doldurularak, halojen ışık ile sabitlenmektedir. Alınan pulpa örnekleri 500 ml lizis çözeltisi (%10 SDS, 1M NaCl, 10 mg/ml Proteinaz

K, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH: 8,0) ile 56oC'de bir gece inkübasyona bırakılmaktadır. Örnek üzerine eşit hacimde fenol-kloroform eklenerek santrifüj edilmekte ve üstteki berrak faz alınarak üzerine sırası ile 1ml %100'lük ve % 70'lik alkol eklenmektedir. Tüpler santrifüj edilerek alkol uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet ile DNA izolasyon aşamalarına devam edilmektedir. Antik diş pulpalarından DNA elde edilir-

ken lizis öncesi bir dekalsifikasyon aşaması uygulanmaktadır. Dekalsifikasyon aşaması EDTA içerisinde 40oC'de 10 dk'lık inkübasyon sonrası EDTA'nın uzaklaştırılması ve iki kez steril distile su ile durulandıktan sonra diş örneklerinden DNA elde edilmesinde kullanılan süreç tekrarlanmaktadır. Diş örneklerinden elde edilen, DNA ekstraksiyon aşaması sonuçlandırılan pelet miktar tayini için kullanılabilir hale gelmektedir.



Resim 4: Doğru Giriş Kanal Metodunda dişin mine tabakasından kanal açılması

TARTIŞMA ve SONUÇ

Tarihi olayların aydınlatılmasında, doğal afetler sonucu kaybolan kişilerin kimliklendirilmesinde genetik uygulamalar oldukça önem kazanmaya başlamıştır.

Adli Bilimciler, doğal afetler gibi kayıpların çok olduğu olaylarda kimliklendirme için kullanılan DNA analizlerinin tek güvenilir kaynak olduğunu düşünmektedirler [8]. Kriminal olgularda bulunan biyolojik materyallerden DNA'nın elde edilmesine yönelik çalışmalar sürekli devam etmekte ve DNA'nın korunması, incelenmesi, elde edilmesi ve miktarının belirlenmesine yönelik yeni metotlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Diş örnekleri birçok postmortem olayda varlığını korurken, diğer biyolojik yapılar ya bozulmakta ya da değişmektedir. Dişler yüksek sıcaklık, nem ve mikrobiyal aktiviteler gibi DNA degradasyonunu engelleyen kötü koşullara dayanıklı yapılardır. İstatistikler, dental kayıtların yangın, sel gibi doğal felaketlerde ve terör saldırıları gibi insanların neden olduğu olaylarda en önemli kaynak olduğunu göstermiştir [10, 11, 35, 36]. 2004 yılında, Tayland'da meydana gelen Tsunami felaketinde, kaybolan kişilerin kimliklendirilmesi, 4 ay gibi kısa bir sürede dental kayıtlara başvurularda tespit edilmiştir. Bu bölgede dental kayıtlarla kimliklendirme en önemli rolü oynamış % 46,2 oranında kimliklendirme bu yolla sağlanmış-

tır [36]. Eski olarak nitelendirilebilecek antik örneklerde DNA miktarı oldukça azdır. Cesetlerin maruz kaldığı nem, ortam ısısı, mikroorganizmalar ve çok sayıda organik bileşik DNA'nın bozulmasına neden olmaktadır. Biyolojik örnekler arasında uzun süreli korunmasından dolayı kemik örnekleri yerine diş örnekleri tercih edilmektedir [1, 10, 37]. Yapılan çalışmanın başarısı büyük ölçüde kullanılan yöntemlere bağlıdır.

mtDNA'nın genomik DNA'ya göre eldesinin yüksek olması aile ağacı çalışmaları gibi birçok araştırmada başvurulana bir yöntem olarak ön plana çıkmaktadır [38,39]. mtDNA toplam DNA'nın % 0,5'ni oluşturmaktadır ve 16569 baz çifti uzunluğundadır. mtDNA adli genetik çalışmalarında sadece anneden kalıtım sağladığı için çok önemlidir [38].

Pulpa ve dental dokular mtDNA'nın potansiyel kaynaklarıdır. Diş örnekleri sert çevresel koşullarda degradasyona dayanıklı olmasına rağmen, pulpa dokusu hemen hemen bu şartlara hiç maruz kalmamaktadır. mtDNA analizi için dişin dentin tabakası da kullanılabilir. Pulpa ve dental dokular mtDNA'nın potansiyel kaynaklarıdır. Diş örnekleri sert çevresel koşullarda degradasyona dayanıklı olmasına rağmen, pulpa dokusu hemen hemen bu şartlara hiç maruz kalmamaktadır. mtDNA analizi için dişin dentin tabakası da kullanılabilir.

Diş örneklerinde en çok karşılaşılan sorun kontaminasyondur. Kontaminasyon nedeni ile DNA'nın büyük bir kısmı kaybedilmektedir. DNA analiz çalışmalarına başlamadan önce diş ve antik diş örneklerinin çeşitli dezenfektanlarla temizlenmesi gerekmektedir [33].

Diş örneklerinden geçmişten bugüne kadar kullanılan Kemik Tozu Hazırlama Metodu bilinen en iyi DNA elde etme yöntemidir. Bu metot diş örneklerinin tamamen öğütülmesi ve toz haline getirilmesi esasına dayandığı için tarihi önemi olan örnekler için kullanılması uygun değildir. Diğer bir dezavantajı diş örnekleri tamamen parçalandığı için işleme başlanmadan önce dekontaminasyon aşaması dikkatlice uygulanmalıdır. Metodun uygulanması kolay olmasına rağmen dişin öğütülmesi aşamasında uygulanan fiziksel güç ile ısı arttığından DNA'nın denatüre olma riski de artmaktadır. Dişin öğütülmesi anında uygulanan çarpma hızının mümkün olduğunca azaltılması önerilmektedir [40]. Ayrıca bu metoden DNA'nın kalite ve miktarını nasıl etkilediği de tam olarak bilinmemektedir [29]. Bu metot, antik örneklerde DNA çalışmaları yapan uzmanlar ile antik dişlerden morfolojik analizler yapan araştırmacıların birlikte çalışma olasılığını azaltmaktadır. Ayrıca, diş örneklerinin bu metotla çalışılması sonucunda müze koleksiyonlarında yer alan ve ait olduğu döneme ait değerli bilgiler sağlayan antik diş örneklerinin geri dönüşümsüz olarak yok edilmesine sebep olacaktır [29].

DNA'nın ekstraksiyonunu takiben uygulanan fenol kloroform yöntemi çok basamaklı bir metot olması dolayısıyla DNA kayıplarının oluşmasını ve kontaminasyon riskini arttırması açısından uygulaması zor bir yöntemdir.

Diş örneklerinden DNA izolasyonuna imkan veren, Ters Kök Kanal metodunun, Kemik Tozu Hazırlama metoduna göre birçok avantajı bulunmaktadır. Bu metotta elde edilen örnek diş içerisindeki pulpadan alındığı ve diş etkenlerden korunmuş olduğu için kontaminasyon sorunu çok azdır. Elde edilen DNA'nın kalitesinin daha iyi olduğu düşünülmektedir [29]. Bu metodun kullanım avantajları tarihsel olarak önemli örneklerin birden fazla bilim adamı tarafından farklı yönlerinin değerlendirilebileceği şekilde analiz edilebilmesi disiplinlerarası çalışmalar için önemlidir. Bu şekilde moleküler çalışma yapan bilim adamları ile morfolojik çalışma yapan bilim adamları birlikte araştırma yapabilmektedir [29]. Müze örnekleri için uygun bir yöntem olmasının yanı sıra diş morfolojisi çalışmalarına da olanak sağlamaktadır. Ancak bu metot antik diş kökünün kırılma ve yapısının zayıf olması nedeni ile bazı dezavantajlara sahiptir. Uygulama sırasında antik dişin zayıf yapısı nedeni ile kökün zarar görme riski yüksektir. Ayrıca kullanılan sterilizasyon araçları pulpa kanalı, sement tabakası ve dentini tahrip edebilmektedir [13].

Doğru Giriş Kanal metodu, dişin korunması yönünde geliştirilen, Ters Kök Kanal metoduna alternatif bir diğer DNA ekstraksiyon metodudur. Ters Kök Kanal metodu ve Doğru Giriş Kanal metodu dişe zarar vermeden diş içerisindeki dentin ve pulpaya ulaşmayı sağlamaktadır. Her iki

metot da birden fazla araştırma için dental kalıntılar kullanmaya izin vermekte antik diş örnekleri antropolojik uygulamalarda kullanılabilirliği gibi müze koleksiyonlarında da kullanılabilir. Ters Kök Kanal metodunun, Doğru Giriş Kanal metoduna göre bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan birincisi Ters Kök Kanal metodunda dişe zarar verme olasılığının daha yüksek olmasıdır. İkincisi pulpa kavitesi odontoblast hücrelerini içerirken sement mineralize dokusu çekirdekli hücreleri içerir. Diş pulpasının mineralize olmuş tübüllere göre daha hızlı bozulduğu bilinmektedir. Sonuç olarak pulpasız bir dişte dentin içindeki tüm DNA odontoblastik tübüllerdedir yani ters kök kanal tekniği ile yeterli örnek sağlanamayabilir. Ancak Doğru Giriş Kanal metodu ile direk olarak mine yüzeyinden girilerek daha fazla pulpa elde edilebilir. Ayrıca kök yüzeyini kompozit materyal ile doldurmak, mine yüzeyine göre daha zor bir işlemdir. DNA ekstraksiyon metotları içerisinde Doğru Giriş Kanal metodu'nun diğer metotlara göre daha uygun olduğu görülmektedir.

Araştırmacılar diş yapısının farklı bölümlerinin pulpa odası, dentin tozu, dentin-sement tozu ve periodontal liflerin DNA analiz çalışmaları için örnek olarak kullanılabilirliğini göstermiştir. Araştırmalar dentin tozu ve pulpanın diş içerisinde korunduğu için mitokondriyal DNA veya

genomik izolasyon için en iyi örnekler olduğunu göstermiştir [38].

Antik diş örnekleri çeşitli çevre etkenlerine maruz kaldığı için zarar görmüş olabilir, bu nedenle DNA izolasyon aşamasında yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmamalı kontaminasyonu gidermek için sert deterjanlar kullanılmamalıdır. Bu aşamalar DNA izolasyonunu kolaylaştırmasına rağmen DNA molekülünü bozduğundan DNA'ya zarar vermektedir. Ayrıca antik diş örnekleri büyük miktarlarda PZR inhibitörü içermekte, DNA saflaştırılırken bu inhibitörlerin ayrılması imkansız hale gelebilmektedir. PZR inhibitörlerinin etkisini azaltmak için N-phenacylthiazolium bromide (PTB) veya ekstraksiyon solusyonuna 50 mM dithiothreitol eklenebilir [40].

Diş örneklerinden genomik DNA veya mtDNA izolasyonu için hangi yöntemin kullanılacağı, örnekler ve doğrudan DNA izolasyonundan sonra elde edilen DNA'nın hangi amaç ve/veya amaçlar için kullanılacağına bağlıdır. Uygun ekstraksiyon ve izolasyon metotlarını belirlemek için laboratuvar koşulları ve kullanılan kimyasal maddeler de dikkate alınmalıdır. Ayrıca elde edilen DNA'nın miktarı ve saflık derecesi de DNA izolasyon yöntemini belirlemede en önemli parametrelerdir.

Deprem, sel gibi doğal afetlerde, uçak kazaları gibi toplu ölümlerin yaşandığı olaylarda

birçok yasal işlemin gerçekleştirilebilmesi için kurbanların en kısa sürede kimliklerinin tespit edilmesi gerekmektedir. Olayların açığa kavuşturulması için tek bir diş örneğinin kaldığı durumlarda en doğru sonucu verebilecek metotlara ve Adli Bilimlerin

farklı dallarında çalışan ekiplere ihtiyaç bulunmaktadır.

DNA kimliklendirme sürecini en kısa sürede, en ucuza gerçekleştiren ve en doğru profili veren yeni araştırmalar oldukça hızlı devam etmektedir.

Dip not: 02-05 Haziran 2011 tarihinde Priştina’da düzenlenen “The 8th Annual Meeting of Forensic Sciences” kongresinde poster olarak sunulmuş, Abstract kitabında özet olarak basılmıştır.

KAYNAKLAR

1- Da Silva RH, Sales-Peres A, de Oliveira RN, de Oliveira FT, Sales-Peres SH. Use of DNA technology in forensic dentistry. J Appl Oral Sci 2007;15:156-61.

2- Frumkin D, Wasserstrom A, Davidson A, Grafit A. Authentication of forensic DNA samples. Forensic Sci Int Genet 2010;4:95-103.

3- Borovko SR, Korban VV, Kritskaya SV, Yeumenenka SA. Missing people: Problems of identification of unknown bodies using DNA database. Forensic Science International: Genetic Supplement Series 2009; 2:1,260-262

4- Jakubowska J, Maciejewska A and Pawowski R. Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation, International J. Legal Medicine 2011; DOI 10.1007/s00414-011-0590-5.

5- Piccinini A, Betti F, Capra M, Cattaneo C. The identification of the victims of the Linate air crash by DNA analysis. International Congress Series 1261,2004;39- 41

6- Çöloğlu AS. Adli Olaylarda Kimlik Belirlenmesi. In: Soysal Z, Çakalır C; eds. Adli Tıp Cilt 1.1. baskı, İstanbul: İ.Ü. Tıp Fak. Yayınlarından Rektörlük No:4165 Fakülte No:224; 1999; 73-92.

7- Bilge Y, Kedici PS, Doğan AY, Ulkuer U, İlkyaz Y. The identification of a dismembered human body: a multidisciplinary approach. Forensic Science International 2003;137:141-146.

8- Budowle B, Bieber FR, Eisenberg AJ. Forensic aspects of mass disasters: Strategic considerations for DNA-based human identification, Legal Medicine,2005;7, 230-243.

9- Alaeddini R, Walsh JS, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA-a review, Forensic Science International: Genetics 2010;4,148-157.

10- Adler CJ, Haak W, Donlon D, Cooper A, the G Consortium. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. Journal of Archaeological Science 2011; 38, 956-964.

11- Manjunath BC, Chandrashekar BR, Mahesh M, Vatchala, Rani RM. DNA profiling and forensic dentistry-A review of the recent concepts and trends. Journal of Forensic and Legal Medicine 2011;18(5):191-7.

12- Cerri N, Ricci U, Verzeletti A, Falconi B, De Ferrari F, Typing of teeth with two different amplification systems, International Congress Series 1261,2004; 622-624.

13- Alakoç YD, Aka PS. “Orthograde entrance technique” to recover DNA from ancient teeth preserving the physical structure. Forensic Science International 2009;188,96-98.

14- Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. Journal Forensic Science 2006;51(2):253-65.

15- Butler JM, Almirall JR. Forensic Science, Anal. Chem 2007; 79, 4365-4384

16- Dönmez, ÖU. DNA Analizinde laboratuvar kaynaklı kontaminasyonun tespiti ve adli bilimler açısından değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, 2008.

17- Wurmb-Schwark von N, Schwark T, Harbeck M, Oehmichen M, A simple Duplex-PZR to evaluate the DNA quality of anthropological and forensic samples prior short tandem repeat typing, Legal Medicine 6, 2, 2004; 80-88.

18- Hoff-Olsen P, Mevag B, Staalstroem E, Hovde B, Egeland T and Olaison B, Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat

at typing. Forensic Science International 105,1999; 171-183.

19- Schneider PM, Bender K, Mayr WR, Parson W, Hoste B, Decorte R, Cordonnier J, Vanek D, Morling N, Karjalainen M, Marie-Paule Carlotti C, Sabatier M, Hohoff C, Schmitter H, Pflug W, Wenzel R, Patzelt D, Lessig R, Dobrowolski P, O'Donnell G, Garafano L, Dobosz M, De Knijff P, Mevag B, Pawlowski R, Gusmão L, Conceicao Vide M, Alonso Alonso A, García Fernández O, Sanz Nicolás P, Kihlgreen A, Bär W, Meier V, Teyssier A, Coquoz R, Brandt C, Germann U, Gill P, Hallett J, Greenhalgh M. STR analysis of artificially degraded DNA results of a collaborative European exercise, Forensic Science International 139,2004; 123-134.

20- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. American Journal Human Genetic 1991; 49(4): 746-756.

21- Wurmb-Schwark von N, Harbeck M, Wiesbrock U, Schroeder I, Ritz-Timme S and Oehmichen M. Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones. Legal Medicine 5 2003; 169-172.

22- Yang DY, Watt K. Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis, Journal of Archaeological Science 32,3,2005; 331-336.

23- Jones M, Ancient DNA in pre-Columbian archaeology: a review. Journal of Archaeological Science 30, 2003; 629-635.

24- Richards MB, Sykes B and Hedges R, Authenticating DNA extracted

from ancient skeletal remains. Journal of Archaeological Science 22,1995; 291-299.

25- Meyer E, Wiese M, Bruchhaus, H, Claussen M, Klein A, Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. Forensic Science International 2000;113, 87-90.

26- Haak W, Brandt G, de Jong HN, Meyer C, Ganslmeier R, Heyd V, Hawkesworth C, Pike AW, Meller H, Alt KW. Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008; 105, 18226-18231.

27- Ginther C, Issel-Tarver L and King MC, Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. National Genetic 2,1992; 135-138.

28- Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carraço A and Gill P, Morling N, Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. Forensic Science International 124,2001; 83-91.

29- Cobb JC, Ancient DNA recovered by a non destructive method, Ancient Biomolecules 2002; 4 (4),169-172.

30- Smith BC, Fisher DL, Weedn VW, Warnock GR and Holland MM, A systematic approach to the sampling of dental DNA. Journal of Forensic Science 38;1993;1194-1209.

31- Trivedi R, Chattopadhyay P and Kashyap VK, A New improved method for extraction of DNA from teeth for the analysis of hypervariable loci. American J Forensic Med Pathol 23,2002;191-196.

32- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M and Pääbo S, Ancient DNA. Nature Review Genetics 2,2001; 353-359.

33- Kemp BM, Smith DG. Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. Forensic Science International 2005;10;154(1):53-61.

34- Kotan LD. Silika Metodu ile Kemikten DNA Ekstraksiyonu, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adli Tıp Anabilim Dalı, 2010; Yüksek Lisans Tezi.

35- Heras SM, Valenzuela A, Luna JD, Bravo M. The utility of dental patterns in forensic dentistry, Forensic Science International 2010; 25;195(1-3):166.e1-5

36- Petju M, Suteerayongprasert A, Thongpud R, Hassiri K. Importance of dental records for victim identification following the Indian Ocean tsunami disaster in Thailand, Public Health 2007;121,251-257.

37- Malaver PC and Yunis JJ. Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases J Croat Med, 44 ,2003; 306-309.

38- Presecki Z, Brkic H, Primorac D, Drmic I. Methods of preparing the tooth for DNA isolation, Acta Stomatol Croat 2000; 21-24.

39- Shiroma CY, Fielding CG, Lewis JA Jr, Gleisner MR, Dunn KN. A minimally destructive technique for sampling dentin powder for mitochondrial DNA testing. J Forensic Science 2004;49(4):791-5.

40- Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. Nature Protocols 2007;2:7.