

Geliş: 11.03.2025
Kabul: 24.04.2025

Adli Genetikte Tükürük Sıvılarındaki MikroRNA'ların İn Siliko Analizi

In Silico Analysis of MicroRNAs in Salivary Fluids in Forensic Genetics

 Filiz Ekim Çevik¹,  Esra Güzel Tanoğlu²

¹ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü, Tıp Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı, adli genetikte önemli biyolojik sıvılardan olan tükürükteki miRNA'ların referans/hedef belirteçler olarak kullanımında aday olarak sunulan hedef genlerin ve bu genlerin etkin yollardaki etkilerinin in siliko yöntemler ile araştırılmasıdır.

Yöntem: Çalışmamız kapsamında adli tıp alanında dereglasyonu bildirilen mikroRNA'larla ilgili araştırmalardan dahil etme kriterlerine uyan 26 tam metin makale PubMed Central'dan ve Google Scholar'dan taranarak derinlemesine incelendi. Bu araştırma makalelerinde tükürükte 36 miRNA'nın farklı ifadesinin olduğu bulundu. İn siliko analizlerde TAM 2.0 software kullanıldı.

Bulgular: Çalışmamıza dahil edilen adli tıp pratiğinde yapılan araştırma makaleleri incelendiğinde tükürükte 36 miRNA'nın farklı ifadesinin olduğu bulundu. Bunlardan; mir-205, miR-203, mir-203a-3p, mir-223-3p, mir-658 gibi belirteçlerin sadece tükürükte yüksek düzeyde bulunması, tükürüğü kan, semen, idrar ve vajinal sıvı gibi diğer vücut sıvılarından ayırt edebileceği gösterildi. İn siliko analizler neticesinde tespit edilen miRNA'ların hedefledikleri genlerin TP53, STAT3, KLF2, NKFB1, MYC, TGFB1, ZEB1 gibi hücrelerde önem arz eden genleri hedeflediği bulundu. Bu genlerin pankreas, kolorektal, prostat kanserlerde ilaveten epitelyal-mezenkiyal geçiş, tiroid hormon sinyal yolağı TGF-beta sinyal yollarında rol oynadığı tespit edildi.

Sonuç: Tükürüğe özgü miRNA profillerinin belirlenmesi, olay yerinde bulunan vücut sıvısının hangi kaynaktan geldiğini ayırt etmede önemli bir avantaj sunmaktadır. Bu çalışmamızdaki bulgularımız tükürükteki miRNA'ların ve hedef genlerinin adli genetik uygulamalarda vücut sıvılarının tanımlanması, travma tespiti, ölüm zamanı tahmini ve bireysel tanımlama gibi birçok alanda önemli bir biyobelirteç olma potansiyelini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tükürük, MikroRNA, mRNA, İn siliko, Adli genetik

Abstract

Objective: The aim of this study is to investigate the target genes presented as candidates for the use of miRNAs in saliva, which is an important biological fluid in forensic genetics, as reference/target markers, and the effects of these genes on active pathways using in silico methods.

Methods: Within the scope of our study, 26 full-text articles that met the inclusion criteria from studies on microRNAs reported to be deregulated in the field of forensic medicine were scanned from PubMed Central and Google Scholar and examined in depth. In these research articles, it was found that 36 miRNAs were differentially expressed in saliva. TAM 2.0 software was used in in silico analyses.

Results: When the research articles in forensic medicine included in our study were examined, it was found that 36 miRNAs were differentially expressed in saliva. Of these; It has been shown that the presence of markers such as mir-205, miR-203, mir-203a-3p, mir-223-3p, mir-658 only in saliva can distinguish saliva from other body fluids such as blood, semen, urine and vaginal fluid. As a result of in silico analyses, it was found that the genes targeted by the detected miRNAs target genes such as TP53, STAT3, KLF2, NKFB1, MYC, TGFB1, ZEB1, which are important in cells. It was determined that these genes play a role in epithelial-mesenchymal transition, thyroid hormone signaling pathway and TGF-beta signaling pathways in pancreatic, colorectal and prostate cancers.

Conclusion: Determination of saliva-specific miRNA profiles offers a significant advantage in distinguishing the source of body fluid found at the scene. Our findings in this study highlight the potential of miRNAs and their target genes in saliva as an important biomarker in many areas such as body fluid identification, trauma detection, time of death estimation and individual identification in forensic genetic applications.

Keywords: Saliva, MicroRNA, mRNA, In silico, Forensic genetic

Nasıl Atf Yapmalı: Çevik FE, Güzel Tanoğlu E. Adli Genetikte Tükürük Sıvılarındaki MikroRNA'ların İn Siliko Analizi. Adli Tıp Dergisi 2025;39(1):86-93. <https://doi.org/10.61970/adlitip.1655120>

Sorumlu Yazar: Doç. Dr. Esra GÜZEL TANOĞLU, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

E-mail: esra.guzel@sbu.edu.tr

GİRİŞ

Vücut sıvısı tanımlaması, suç faaliyetinin yeniden yapılandırılması açısından adli vaka çalışmalarında çok önemlidir. Suç mahallerinde bırakılan biyolojik örneklerin bileşiminin belirlenmesi, ceza davalarının soruşturulması ve kovuşturulması için önemli bilgiler sağlayabilmektedir (1). Kan, tükürük, meni, vajinal salgılar ve idrar gibi adli açıdan önemli vücut sıvısı suç mahallinde bulunabilir. Belirli bir vücut sıvısının mevcut olup olmadığını belirlemek ve ardından bunu tanımlamak adli soruşturmaların ilk adımıdır. Biyolojik delillerden DNA profilinin günümüzde geleneksel yöntemlerle analizi kimyasal, enzimatik veya immünolojik metotlara dayalı testleri içerir. Ancak bu yöntemler, karışık vücut sıvılarının varlığında, az miktarda kanıt materyalinin olması durumunda ve bozulmuş numunelerin olması durumlarında yeterli olmamakta ilaveten değişken duyarlılık ve özgüllük dereceleri gösterebilmektedir (2, 3). MikroRNA'lar, adli bilimlerde vücut sıvılarının tanımlanmasında yeni bir biyobelirteç olarak dünya çapında ilgi görmektedir. Vücut sıvılarındaki mikroRNA'lar ekzosomlarda depolanan çevresel faktörlere dirençli, yaklaşık 18-22 nükleotit uzunluğunda küçük RNA molekülleridir (4). MikroRNA'lar hücreye özgü bir şekilde ifade edilirler. Çoğu miRNA hücre içinde bulunur. Son çalışmalar; venöz kan, plazma, tükürük, burun salgısı, meni, vajinal salgı, gözyaşı, beyin omurilik sıvısı ve cilt dahil olmak üzere çeşitli vücut sıvılarında miRNA'ların yer aldığı bilinmektedir (5-7). Dolaşıma katılan miRNA'ların, yüksek sıcaklık, değişen pH gibi koşullara oldukça dayanıklı olmaları onlara umut vadeden biyobelirteç özelliği kazandırmaktadır. Bir vücut sıvısında daha yüksek miktarda bulunan ancak diğer vücut sıvılarında daha düşük oranda bulunan miRNA'ların varlığı bilinmektedir. Bu durum son

yıllarda, miRNA profillemesi kullanılarak vücut sıvısı kökenini belirlemek için çok sayıda araştırma yapılmasına neden olmuştur (7, 8). Vücut sıvısında tanımlanan miRNA'lar adli tıpta karşılaşılan boğulma, cinsel saldırı, leke yaşı tayini, ölüm sonrası geçen sürenin tayini (9), ölüme neden olabilecek patolojik durumların tespiti (10) gibi durumlarda kullanılmıştır. Adli tıp vakalarında tükürüğün varlığı vücudun belli bölgelerinde olabileceği gibi kağıt, zarf, sigara izmariti, plastik ve cam şişe, metal kutularda yer alabilir ve önemli biyolojik kanıt olarak kullanılabilir. Öte yandan; bir bireyin cinsiyeti, ABO kan grupları, mikrobiyal imza, biyobelirteçler veya sigara içme gibi alışkanlıkları gibi çeşitli yönlerini belirlemede çok yardımcı olur. Günlük pratikte Statherin ve histatin 3, tükürük tespiti için kullanılan göstergelerdir (11). Tükürükte RNA tespiti, adli moleküler tanılamada ortaya çıkan bir alandır. Tükürükteki RNA'lar, tükürük mukusları, adenin ve üridin açısından zengin element bağlayıcı protein, tükürük şaperonu Hsp70 ve apoptotik cisimler gibi spesifik mekanizmalar tarafından korunur (12). Tükürüğün miRNA analizleri için invazif olmadan kolayca elde edilebilir olması, proteaz ve RNaz aktivitesine karşı daha stabil olduğundan miRNA'ların uzun süre korunabilmesi, kan, semen veya vajinal sıvı gibi diğer biyolojik örneklerden ayırım yapılmasına yardımcı olabilmesi ölüm zamanı tahmini ve travmaya bağlı biyobelirteç tespiti açısından adli tıp incelemelerinde avantajlı bir biyolojik sıvı haline gelmesini sağlamaktadır. Bu çalışmada, biyolojik sistemleri bilgisayar tabanlı hesaplamalar ve veri analizleriyle inceleyen bir yöntem olan in siliko analizler ile tükürük sıvısındaki mikroRNA'ların mevcudiyetinin ve onların birbirleriyle ve çeşitli klinik durumlarla bağlantılarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada PubMed Central (PMC, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ve Google Scholar (<https://scholar.google.com>) kullanılarak literatürde tükürükteki miRNA'larla ilgili yayınlanmış araştırma makaleleri kullanıldı. "Saliva", "noncoding RNA" "mixed", "body fluids", "microRNA", "forensic", "forensic science", "qPCR" "microarray" "next generation sequences" ve "crime scene", "insan mikroRNA'sı" veya "insan miRNA'sı" anahtar kelimeleri ile veri tabanlarında taramalar yapıldı. Tükürük sıvısında istatistiksel olarak anlamlı ($\leq \%0,05$) ifade seviyelerine sahip taranan miRNA'lar çeşitli araştırmaların sonuçlarından elde edildi. Sadece özgün araştırma makaleler çalışmaya dahil edildi ve insan tükürüğünde anlamlı değişime uğrayan miRNA ifadeleri incelendi. İn siliko analizlerde TAM 2.0 software kullanıldı. Bu programda altı miRNA seti içerisinden, hücre ve doku özgüllüğü, transkripsiyon faktörleri, işlevsellik düzeyi ile güncellenerek hazırlandı. miRNA isimleri güncellenmiş miRBase açıklamalarından (<http://www.mirbase.org/>) elde edildi (19). Anlamlı değişime uğrayan miRNA'ların ortak yollardaki etkileri DIANA mirpath ile tespit edildi. MiRNA'ların hedeflediği gen dizilerini de STRING (<https://string-db.org/>) protein protein etkileşimi çalışmalarından tarandı ve birbirleriyle ilgili olası etkileşimleri bulundu. MikroRNA'ların deneysel olarak doğrulanmış hedef genleri (miRNA-mRNA etkileşimi) miRTarBase, TargetScan, miRDB veri tabanları kullanıldı. Uzun kodlamayan RNA'ların miRNA'lar üzerindeki etkisi starBase v2.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) software ile tespit edildi.

BULGULAR

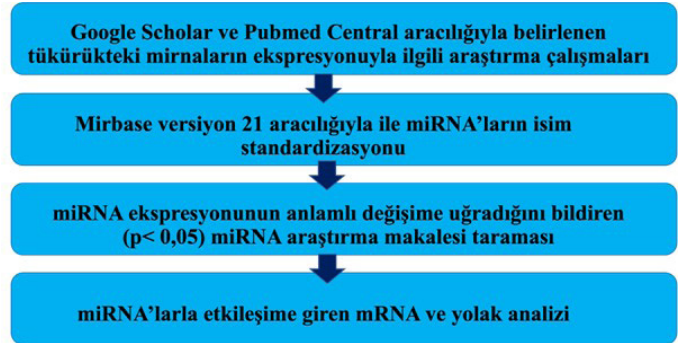
Çalışmamız kapsamında adli tıp alanında deregölasyonu bildirilen mikroRNA'lardan; dahil

etme kriterlerine göre 26 tam metin araştırma makalesi PubMed Central'dan Google Scholar'dan tarandı. Bu araştırma makalelerinde tükürükte 36 miRNA'nın farklı ifadesinin olduğu bulundu. miRNA ifade seviyeleri RT-PCR veya mikrodizi gibi çeşitli moleküler yöntemler kullanılarak çalışıldı. Adli tıp alanında çalışılan tükürük ile ilişkili tüm dahil edilen çalışmalar Tablo 1'de, çalışmanın akış şeması Şekil 1'de verilmiştir. Analizler sonucunda, ölüm sonrası biyolojik değişiklikler, stres yanıtı ve toksik maruziyet gibi adli durumlarla ilişkili olarak tükürükte ekspresyon değişikliği gösteren belirli miRNA'lar tespit edilmiştir. Özellikle miR-141, miR-451, miR-200c, miR-223 ve miR-155 gibi miRNA'ların, stres ve inflamatuvar yanıt mekanizmalarıyla ilişkili olduğu görülmüştür. Bu miRNA'ların mRNA etkileşiminde miRTarBase, TargetScan, miRDB veri tabanları kullanılarak hedef genleri incelendiğinde, BCL2, PTEN, TP53, CASP3, IL6 ve TNF gibi hücre ölümü, inflamasyon ve stres yanıtı ile ilişkili genler ön plana çıkmıştır. İlave ten mir-208'in akut miyokard enfarktüsünde, mir-23-3p, mir-124a-3p'in servikal dokularındaki ekspresyonları gösterilmiştir. Mir-34'ün apoptotik yollardaki etkisi tespit edilmiştir. Sinir sistemi, kalp hastalıkları ve çeşitli kanserlerde mir-124'ün etkisinin olduğu bulunmuştur. Seçilen mikroRNA'ların hücrelere göre spesifik ekspresyonları Şekil 2'deki gibidir. Bu miRNA'ların akciğer, böbrek, beyin, testis, ince barsak prostat gibi organlarda daha çok ifade edildikleri in siliko çalışmalar neticesinde gösterilmiştir (Şekil 3). Fonksiyonel analizler, ölüm sonrası değişikliklerin belirlenmesi, stres veya travmatik olaylara maruziyetin tespiti açısından tükürük miRNA'larındaki miRNA-gen etkileşimlerinin önemli olduğunu göstermektedir. Gene Ontology (GO) ve KEGG yollak analizleri, bu miRNA'ların özellikle apoptoz, inflamasyon, hipoksi yanıtı ve DNA hasar onarım mekanizmaları gibi biyolojik süreçlerde rol aldığını ortaya koymuştur.

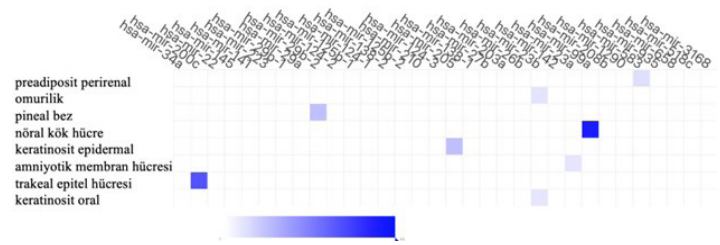
Seçilen miRNA’ların hedefledikleri mRNA’ların belirlendiği analizler neticesinde seçilen miRNA’ların en çok TP53 genini hedeflediği bunun yanısıra STAT3, KLF2, CEBPA, NKFB1, MYC, TGFB1, ZEB1 gibi hücrelerde önem arz eden genleri hedeflediği bulundu. Bu genler arasındaki etkileşimin belirlenmesi in siliko analizlerden STRING yardımıyla protein-protein etkileşimleri gösterildi. KEGG yolak analizleri neticesinde bu genlerin pankreas, kolorektal, prostat kanserlerde ilaveten epitelyal-mezenkimal geçiş, tiroid hormon sinyal yolağı TGF-beta sinyal yolaklarında rol oynadığı tespit edildi (Şekil 4a, 4b).

Tablo 1. Tükürükte farklı ekspresyon seviyesine sahip olduğu bildirilen miRNA'lar

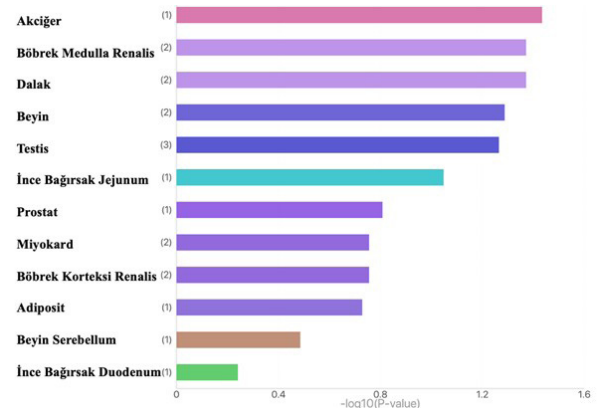
#	miRNAs	Kaynaklar
1	mir-200c	(13, 36)
2	mir-200c-3p	(6, 37)
3	mir-203	(1, 6, 13, 36, 38, 39)
4	mir-203a-3p	(37, 39-43)
5	mir-205-5p	(1, 5, 6, 13, 36-41, 43-50)
6	mir-658	(5, 36, 39, 40, 49)
7	mir-142-3p	(36, 44, 47)
8	mir-26	(36, 51)
9	mir-26b	(1, 36, 51, 53)
10	mir-223	(36)
11	mir-223-3p	(37, 41, 52)
12	mir-124	(1, 38)
13	mir-124a	(46)
14	miR-124a-3p, mir-138-2, mir-1290	(40)
15	mir-138	(54)
16	mir-208b, mir-518c, mir-583	(1, 25)
17	miR-23a-3p, miR-34a-5p	(37, 40)
18	miR-145-5p	(55)
19	miR-935, miR-3168	(25)
20	miR-23b-3p, mir-141-3p, miR-375, miR-27b-3p, miR-125b-5p, miR-99a-5p, miR-29a-3p, miR-29b-3p, miR-210-3p, miR-22-3p	(37)
21	mir-451	(48)



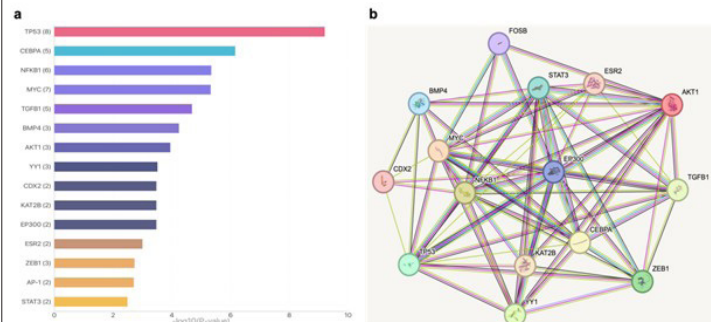
Şekil 1. Çalışmanın akış şeması.



Şekil 2. MikroRNA'ların hücrelere özgü ekspresyon düzeyleri



Şekil 3. MikroRNA'ların dokulara özgü ekspresyon düzeyleri



Şekil 4. MikroRNA hedef genlerinin protein-protein etkileşimleri

Pembe: deneysel olarak belirlenmiş (bilinen etkileşimler), Mavi: veri tabanlarından düzenlenmiş (bilinen etkileşimler). Sarı: metin madenciliği, Yeşil: gen komşuluğu (öngörülen etkileşimler), Siyah: ortak ifade.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda, tükürüğün tanısal ve adli bir araç olarak rolü giderek daha fazla araştırılmakta ve değerlendirilmektedir (13). Adli biyolojide tükürüğün suç mahallerinde bulunan en yaygın biyolojik sıvılardan biri olması önemli bir ayırt edici unsurdur. Son yıllarda, miRNA'lar adli genetikte vücut sıvılarının kaynağını belirleme, travma belirteçleri ve ölüm zamanı tahmininde kullanılabilirliği konusunda artan araştırma konularındandır (14, 15). Genler kullanılarak tükürük tanımlaması üzerine araştırmalar da 2000'li yılların başından beri artarak süregelmektedir. Özellikle, tükürüğe spesifik proteinlerden STATH ve HTN3 genlerinin varlığını doğrulayan çalışmalar mevcuttur (16). Ek olarak, mikroRNA (5, 8, 13) ve DNA metilasyonuna (17, 18) yönelik tükürük tanımlaması için yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda tükürük miRNA'larının bazı yolak ve kanserlerde biyomarker özelliği taşıdığı bildirilmiştir. miR-27b, miR-125b ve miR-223 gibi çeşitli miRNA'ların, kanserlerde tedavi etkinliği için öngörücü biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır (19). miR-200c, miR-145 ve miR-223 gibi miRNA'ların oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve apoptozisdeki rolleri gösterilmiştir (20). Mir-27b, mir-125b-5p, mir-22-5p ve mir-145-5p'nin erken dönem meme kanserindeki biyobelirteç olarak kullanımları bildirilmiştir (21). Mir-1290'un onkogenik özellikte olduğu ve mir-375, mir-26 ve mir-138'in prostat kanserlerindeki etkileri bildirilmiştir (22, 23). Geleneksel DNA analizleri, biyolojik sıvının belli bir bireye ait olup olmadığını belirlemede oldukça güvenilir olsa da hangi vücut sıvısına ait olduğunu doğrudan ayırt etmede yetersiz kalmaktadır (24). Bu noktada, tükürüğe özgü miRNA profillerinin belirlenmesi, olay yerinde bulunan vücut sıvısının hangi kaynaktan geldiğini ayırt etmede önemli bir avantaj sunmaktadır. Tükürükte spesifik

olarak eksprese edilen miR-200c ve miR-203 gibi belirteçlerin, diğer biyolojik sıvılardan ayırt edici olduğu gösterilmiştir (25). Bu miRNA'ların sadece tükürükte yüksek düzeyde bulunması, kan, semen, idrar ve vajinal sıvı gibi diğer vücut sıvılarından ayırma yapılmasını mümkün kılmaktadır (26). Bunun yanı sıra travma, darp, boğma gibi travmatik vakalarda, özellikle ağız içi yaralanmaları tespit etmek ve travmanın biyokimyasal kanıtlarını ortaya koymak için tükürüğe özgü miRNA'lar, önemli biyobelirteçlerdir (27). Özellikle inflamasyon ve doku hasarı ile ilişkili miRNA'lar (miR-21, miR-146a ve miR-155), tükürük örneklerinde travmanın varlığını doğrulamak için kullanılabilir (28). Yapılan çalışmalarda, fiziksel travmaya maruz kalan bireylerin tükürüğünde belirli miRNA'ların ekspresyonunun değiştiği ve bu değişimlerin olay anından sonraki ilk birkaç saat içinde tespit edilebildiği gösterilmiştir. Bu durum, olay zamanının belirlenmesi açısından da miRNA'ların önemli bir araç olabileceğini göstermektedir (29). Adli tıpta ölüm zamanının tahmin edilmesi açısından post-mortem görülen biyolojik değişikliklerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Tükürüğe özgü miRNA'ların ölüm sonrası belirli bir degradasyon paterni gösterdiği ve bu sürecin belirlenmesiyle ölüm zamanının daha doğru tahmin edilebileceği gösterilmiştir (14). Son yıllarda yapılan araştırmalar, miRNA profillerinin bireysel varyasyon gösterebileceğini ve belirli genetik özelliğe sahip bireylere özgü ekspresyon profilleri sergileyebildikleri gösterilmiştir (30). Bu bağlamda, tükürükteki miRNA profillerinin yaş, cinsiyet ve etnik köken gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği ve bireysel kimliklendirme sürecine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (31). Zehirlenme ve madde kullanımı tespitinde geleneksel toksikolojik analizlere ek olarak, tükürükte belirli miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde değişiklikler gözlemlenmiştir (32, 33). Bir çalışma, tükürükten alkol bağımlılığını tahmin etmek için

miRNA'larının kullanılabileceğini göstermiştir (34). Özellikle miRNA araştırmalarında, in siliko yaklaşımlar biyolojik deneylere rehberlik ederek zaman ve maliyet açısından önemli avantajlar sunar. İn siliko mikroRNA analizler, hedef genler veya biyobelirteçler için en uygun adayların belirlenmesinde RNA-seq, proteomik, epigenetik gibi biyoinformatik algoritmalar ile büyük veri setlerinin analizinde, miRNA-mRNA arasındaki etkileşimlerinin belirlenmesinde, deneysel hataların azaltılmasında, ilaç geliştirme süreçlerinde deneysel hataları minimize ederek kritik bir rol oynar (35). Adli tıpta da tükürük miRNA'larının biyobelirteç olarak kullanımına yönelik hedef belirleme süreçlerinde önemli bir destek sağlar (30). Sonuç olarak bu çalışmamızdaki bulgularımız tükürükteki miRNA'ların ve hedef genlerinin adli genetik uygulamalarda vücut sıvılarının tanımlanması, travma tespiti, ölüm zamanı tahmini ve bireysel tanımlama gibi birçok alanda önemli bir biyobelirteç olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Ancak, biyoinformatik tahminlerin daha kapsamlı in vivo ve in vitro çalışmalara desteklenmesi, klinik ve adli uygulamalarda güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi için kritik öneme sahiptir. Gelecekte yapılacak deneysel çalışmalar, bu miRNA'ların adli olaylarda kullanım potansiyelini doğrulamak ve standardizasyon süreçlerini geliştirmek için önemli bir adım olacaktır.

Bildirimler

Çıkar Çatışması

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir malî destek kullanımı bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

- Glynn CL. Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA*. 2020;26(1):1-9.
- Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int*. 2009;188(1-3):1-17.
- An JH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. Body fluid identification in forensics. *BMB Rep*. 2012;45(10):545-53.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-9.
- Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem*. 2009;387(2):303-14.
- Wang Z, Zhang J, Wei W, Zhou D, Luo H, Chen X, et al. Identification of Saliva Using MicroRNA Biomarkers for Forensic Purpose. *J Forensic Sci*. 2015;60(3):702-6.
- Guzel E, Karatas OF, Semercioz A, Ekici S, Aykan S, Yentur S, et al. Identification of microRNAs differentially expressed in prostatic secretions of patients with prostate cancer. *Int J Cancer*. 2015;136(4):875-9.
- Duz MB, Karatas OF, Guzel E, Turgut NF, Yilmaz M, Creighton CJ, et al. Identification of miR-139-5p as a saliva biomarker for tongue squamous cell carcinoma: a pilot study. *Cell Oncol (Dordr)*. 2016;39(2):187-93.
- Maiese A, Scatena A, Costantino A, Di Paolo M, La Russa R, Turillazzi E, et al. MicroRNAs as Useful Tools to Estimate Time Since Death. A Systematic Review of Current Literature. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(1).
- Madea B, Saukko P, Oliva A, Musshoff F. Molecular pathology in forensic medicine--Introduction. *Forensic Sci Int*. 2010;203(1-3):3-14.
- Juusola J, Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci Int*. 2005;152(1):1-12.
- Fábán TK, Fejérdy P, Nguyen MT, Soti C, Csermely P. Potential immunological functions of salivary Hsp70 in mucosal and periodontal defense mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007;55(2):91-8.
- Courts C, Madea B. Specific micro-RNA signatures for the detection of saliva and blood in forensic body-fluid identification. *J Forensic Sci*. 2011;56(6):1464-70.
- Singh P, Ali W, Sandhu S, Mishra S, Singh US, Verma AK, et al. Post-mortem interval estimation using miRNAs of road traffic accident cases: A forensic molecular approach. *Sci Justice*. 2023;63(4):485-92.
- Na JY. Estimation of the post-mortem interval using microRNA in the bones. *J Forensic Leg Med*. 2020;75:102049.

16. Sakurada K, Akutsu T, Watanabe K, Fujinami Y, Yoshino M. Expression of statherin mRNA and protein in nasal and vaginal secretions. *Leg Med (Tokyo)*. 2011;13(6):309-13.
17. Kim BM, Park SU, Schmelzer L, Yang SB, Lee SD, Kim MY, et al. DNA methylation-based organ tissue identification: Marker identification, SNaPshot multiplex assay development, and interlaboratory comparison. *Forensic Sci Int Genet*. 2024;71:103052.
18. Lee HY, Park MJ, Choi A, An JH, Yang WI, Shin KJ. Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. *Int J Legal Med*. 2012;126(1):55-62.
19. Hess AK, Mürer A, Mairinger FD, Weichert W, Stenzinger A, Hummel M, et al. MiR-200b and miR-155 as predictive biomarkers for the efficacy of chemoradiation in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2017;77:3-12.
20. Tanoglu EG. Differential expressions of miR-223, miR-424, miR-145, miR-200c, miR-139 in experimental rat chronic pancreatitis model and their relationship between oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis. *Iran J Basic Med Sci*. 2021;24(9):1301-6.
21. Jusoh AR, Mohan SV, Lu Ping T, Tengku Din TADA, Haron J, Romli RC, et al. Plasma Circulating Mirnas Profiling for Identification of Potential Breast Cancer Early Detection Biomarkers. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021;22(5):1375-81.
22. Huang X, Yuan T, Liang M, Du M, Xia S, Dittmar R, et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*. 2015;67(1):33-41.
23. Erdmann K, Kaulke K, Rieger C, Salomo K, Wirth MP, Fuessel S. MiR-26a and miR-138 block the G1/S transition by targeting the cell cycle regulating network in prostate cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(11):2249-61.
24. Siuta J, Dobosz A, Kawecki J, Dobosz T. DNA Content of Various Fluids and Tissues of the Human Body. *Genes (Basel)*. 2023;15(1).
25. Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med*. 2010;124(3):217-26.
26. Watanabe K, Taniguchi K, Toyomane K, Akutsu T. A new approach for forensic analysis of saliva-containing body fluid mixtures based on SNPs and methylation patterns of nearby CpGs. *Forensic Sci Int Genet*. 2022;56:102624.
27. Robles TF, Rüniger D, Sumner JA, Elashoff D, Shetty V. Salivary inflammatory biomarkers as a predictor of post-traumatic stress disorder and depressive symptom severity in trauma patients: A prospective study. *Brain Behav Immun*. 2024;119:792-800.
28. Gaytán-Pacheco N, Ibáñez-Salazar A, Herrera-Van Oostdam AS, Oropeza-Valdez JJ, Magaña-Aquino M, Adrián López J, et al. miR-146a, miR-221, and miR-155 are Involved in Inflammatory Immune Response in Severe COVID-19 Patients. *Diagnostics (Basel)*. 2022;13(1).
29. Johnson JJ, Loeffert AC, Stokes J, Olympia RP, Bramley H, Hicks SD. Association of Salivary MicroRNA Changes With Prolonged Concussion Symptoms. *JAMA Pediatr*. 2018;172(1):65-73.
30. Rocchi A, Chiti E, Maiese A, Turillazzi E, Spinetti I. MicroRNAs: An Update of Applications in Forensic Science. *Diagnostics (Basel)*. 2020;11(1).
31. Sullivan R, Montgomery A, Scipioni A, Jhaveri P, Schmidt AT, Hicks SD. Confounding Factors Impacting microRNA Expression in Human Saliva: Methodological and Biological Considerations. *Genes (Basel)*. 2022;13(10).
32. Kopcho S, McDew-White M, Naushad W, Mohan M, Okeoma CM. Alterations in Abundance and Compartmentalization of miRNAs in Blood Plasma Extracellular Vesicles and Extracellular Condensates during HIV/SIV Infection and Its Modulation by Antiretroviral Therapy (ART) and Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ . *Viruses*. 2023;15(3).
33. Ahmad MA, Ghaleb SS, Zaki AR, Kamel AO, Eid A. The role of miRNA-21 and hypoxia inducible factor-1 in predicting post mortem interval in cardiac muscles of aluminum phosphide deaths. *J Forensic Leg Med*. 2024;106:102726.
34. Rosato AJ, Chen X, Tanaka Y, Farrer LA, Kranzler HR, Nunez YZ, et al. Salivary microRNAs identified by small RNA sequencing and machine learning as potential biomarkers of alcohol dependence. *Epigenomics*. 2019;11(7):739-49.
35. Murray BS, Choe SE, Woods M, Ryan TE, Liu W. An in silico analysis of microRNAs: mining the miRNAome. *Mol Biosyst*. 2010;6(10):1853-62.
36. Atalay R EB, Holumen N, et al. Determination of blood and saliva in mixture samples with miRNA. *Med Science*. 2024;2024;13(2):455-60.
37. Wang Z, Zhou D, Cao Y, Hu Z, Zhang S, Bian Y, et al. Characterization of microRNA expression profiles in blood and saliva using the Ion Personal Genome Machine(®) System (Ion PGM™ System). *Forensic Sci Int Genet*. 2016;20:140-6.
38. Sirker M, Fimmers R, Schneider PM, Gomes I. Evaluating the forensic application of 19 target microRNAs as biomarkers in body fluid and tissue identification. *Forensic Sci Int Genet*. 2017;27:41-9.
39. Chen X, Xu H, Zhu B. Forensic validation of a combined analysis of mRNA and miRNA markers for precise tissue origin inferences of five kinds of body fluids by RT-qPCR. *Electrophoresis*. 2023;44(21-22):1714-24.
40. Sauer E, Reinke AK, Courts C. Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. *Forensic Sci Int Genet*. 2016;22:89-99.
41. Fujimoto S, Manabe S, Morimoto C, Ozeki M, Hamano Y, Hirai E, et al. Distinct spectrum of microRNA expression in forensically relevant body fluids and probabilistic discriminant approach. *Sci Rep*. 2019;9(1):14332.

42. He H, Han N, Ji C, Zhao Y, Hu S, Kong Q, et al. Identification of five types of forensic body fluids based on stepwise discriminant analysis. *Forensic Sci Int Genet.* 2020;48:102337.
43. Altmeyer L, Baumer K, Hall D. Differentiation of five forensically relevant body fluids using a small set of microRNA markers. *Electrophoresis.* 2024;45(19-20):1785-95.
44. Iroanya OO, Olutunde OT, Egwuatu TF, Igbokwe C. Stability of selected microRNAs in human blood, semen and saliva samples exposed to different environmental conditions. *Forensic Sci Int.* 2022;336:111338.
45. Omelia EJ, Uchimoto ML, Williams G. Quantitative PCR analysis of blood- and saliva-specific microRNA markers following solid-phase DNA extraction. *Anal Biochem.* 2013;435(2):120-2.
46. O Leary KR, Glynn CL. Investigating the Isolation and Amplification of microRNAs for Forensic Body Fluid Identification. *Microna.* 2018;7(3):187-94.
47. Mayes C, Seashols-Williams S, Hughes-Stamm S. A capillary electrophoresis method for identifying forensically relevant body fluids using miRNAs. *Leg Med (Tokyo).* 2018;30:1-4.
48. Graham Williams MLU, Natalie Coult, Damian World, Emma Beasley. Body fluid mixtures: Resolution using forensic microRNA analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series;* 2013.
49. Peng Bai WD, Li Wang , Bing Long , Kuanlin Liu , Weibo Liang , Lin Zhang. Micro RNA profiling for the detection and differentiation of body fluids in forensic stain analysis. 2023.
50. Li S, Liu J, Xu W, Zhang S, Zhao M, Miao L, et al. A multi-class support vector machine classification model based on 14 microRNAs for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2025;75:103180.
51. Seashols-Williams S, Lewis C, Calloway C, Peace N, Harrison A, Hayes-Nash C, et al. High-throughput miRNA sequencing and identification of biomarkers for forensically relevant biological fluids. *Electrophoresis.* 2016;37(21):2780-8.
52. Chen H, Hu S, Yang R, Yao Q, Zhao Y, Lian J, et al. The screening and validation process of miR-223-3p for saliva identification. *Leg Med (Tokyo).* 2023;65:102312.
53. Lewis CA, Layne TR, Seashols-Williams SJ. Detection of microRNAs in DNA Extractions for Forensic Biological Source Identification. *J Forensic Sci.* 2019;64(6):1823-30.
54. Wang Z, Zhang J, Luo H, Ye Y, Yan J, Hou Y. Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7(1):116-23.
55. Park JL, Park SM, Kwon OH, Lee HC, Kim JY, Seok HH, et al. Microarray screening and qRT-PCR evaluation of microRNA markers for forensic body fluid identification. *Electrophoresis.* 2014;35(21-22):3062-8.