

Vücut sıvılarının kimliklendirilmesinde miRNA çalışmalarının potansiyel önemi: Güncel bir bakış

Potential importance of miRNA studies in identification of body fluids:
A current perspective

 Özlem Arat¹,
0000-0002-4685-5990

 Dilek Kaya Akyüzlü^{2*}
0000-0002-3305-0587

ÖZET

Olay yerlerinde, delil niteliği kazanabilecek olan birçok bulgu bulunsa da mağdur, şüpheli ve olay yeri ilişkisini ortaya çıkaran en önemli bulgu türlerinden olan biyolojik örnekler; kan, menstrual kan, meni, vajinal salgılar ve tükürüktür. Kimliklendirmede kullanılan biyolojik sıvıların tanımlanmasında enzimatik, serolojik ve mikroskopik yöntemler yıllardır kullanılmaktadır. Biyolojik örnekler olay yerlerinde çok küçük miktarlarda bulduklarından ve çoğunlukla bozunmuş halde olduklarından dolayı örneklerin tespiti zorlaşmaktadır. Ancak son zamanlarda, yüksek stabiliteyi nedeniyle "bozunmadan kalabilecek delil" niteliğinde kabul gören miRNA'lar ile vücut sıvılarının tanımlanmasına yönelik yapılan adli çalışmalar bu durumu tersine çevirmektedir. Yapılan çalışmaların çoğunluğundaki genel görüş, miRNA'ların vücut sıvılarının tespitinde kullanılabilir olduğu yönündedir. Özellikle yüksek hassasiyetleri nedeniyle karışım halinde bulunan ve riskli örneklerin doğru bir şekilde analiz edilip sınıflandırılmasında, analiz yapılırken kullanılan modeller büyük önem taşımaktadır. Sonuç olarak yapılan literatür taramalarına göre, miRNA çalışmalarında kesin ve ortak sonuçlara tam anlamıyla ulaşamamış olmanın nedeni olarak, çalışmalarda kullanılan analiz ve modelleme yöntemlerinin çeşitliliği veya farklılığı öne sürülmüştür. İleride yapılacak olan çalışmalar için genel ve kabul görmüş ortak bir yöntemle daha fazla araştırma yapılması önerilmektedir. Bu derlemede, son zamanlarda miRNA'lar ile yapılan çeşitli çalışmaların farklı yönleriyle ele alınarak özetlenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Vücut sıvıları tanımlanması, mikro RNA, adli bilimler, olay yeri, qPCR*

ABSTRACT

Although there are many findings at crime scenes that can be considered as evidence, biological samples are among the most important types of findings that reveal the relationship between the victim, the suspect and the crime scene; blood, menstrual blood, semen, vaginal secretions and saliva. Enzymatic, serological and microscopic methods have been used for years in the identification of biological fluids used in identification. Since biological samples are found at crime scenes in very small quantities and are often in a degraded state, identification of the samples becomes difficult. However, recently, forensic studies on the identification of body fluids with miRNAs, which are accepted as "non degraded evidence" due to their high stability, have reversed this situation. The general opinion in the majority of studies is that miRNAs can be used in the detection of body fluids. The modeling used during analysis is of great importance, especially in the correct analysis and classification of mixtures and risky samples due to their high sensitivity. As a result, according to the literature review, it has been suggested that the reason for not reaching definitive and common results in miRNA studies is the diversity or difference of analysis and modeling methods used in the studies. For future studies, it is recommended to conduct further research with a general and accepted common method. In this review, it is aimed to summarize various studies conducted recently on miRNAs from different aspects.

Keywords: *Body fluid identification, micro RNA, forensic sciences, crime scene, qPCR*

Cite as: Arat Ö, Kaya Akyüzlü D. Vücut sıvılarının kimliklendirilmesinde miRNA çalışmalarının potansiyel önemi: Güncel bir bakış. J For Med 2024;38(1):80-92

Received: 27.02.2024 • **Accepted:** 15.04.2024

Corresponding Author: Dilek Kaya Akyüzlü, Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Ankara, Türkiye
E-mail: kayadilek79@gmail.com

¹Bilim Uzm., Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye

²Doç. Dr., Ankara Üniversitesi, Adli Bilimler Enstitüsü, Ankara, Türkiye



Turkish Journal of Forensic Medicine is licensed
under a Creative Commons Attribution 4.0
International License.

GİRİŞ

Olay yerlerinde delil niteliği taşıyabilecek birçok bulguyla karşılaşmakta olup bunlardan en kıymetlilerinden birisi biyolojik bulgulardır. Olay yerinden elde edilen biyolojik bulgularla suçluların tespiti yapılmaya ve bu kişilerin işlenen suç ile bağlantıları kurulmaya çalışılır (1). Kan, semen, tükürük, diş, kemik dokusu ve kıl gibi biyolojik materyaller tanımlanarak kişilerin adli kimliklendirme işlemleri gerçekleştirilmektedir (2,3).

Olay yerinde sıklıkla karşılaşılan kan, menstrual kan, semen, vajinal salgılar, tükürük gibi biyolojik örnekler DNA içerdikleri için vakalarda suçlayıcı veya kurtarıcı delil niteliği taşıyabilirler (2). Karışım halinde de bulunabilen bu beş vücut sıvısının (kan, menstrual kan, semen, tükürük ve vajinal sıvı) birbirlerinden ayrı olarak tanımlanabiliyor olması bir suç mahallinin yeniden yapılandırılması ve vakanın çözümü için çok büyük önem taşımaktadır (4). Bu vücut sıvılarının, çok küçük miktarlarda bulunabilmeleri veya çoğunlukla bozulmuş numunelerin gözle görülerek ayırt edilememeleri nedeniyle tespitleri zordur (5). Rutin ve klasik yöntemlerden biri olan serolojik yöntemlerle DNA analizinden önce vücut sıvıları için bir ön tarama yapılabilir fakat bu ön tarama, kimliklendirmede kullanılacak olan DNA'nın tahrip olmasına neden olabilir (6). Ayrıca bu yöntemler diğer vücut sıvıları ile çapraz reaksiyon veya yalancı pozitiflik de gösterebilmektedir (7,8). DNA içeren örneklerin uzun süreden beri olay yerinde bulunuyor olması veya örneklerin bozunmasına sebep olan sıcaklık, nem gibi etmenler veya kötü hava şartlarına maruziyet gibi durumlar da söz konusudur. Bu durumlarda DNA materyali kısmen veya tamamen yok olabilir, delil niteliği taşıyacak numuneler işe yaramayabilir. Bu gibi nedenlerden dolayı vücut sıvılarının tanımlanması için serolojik yöntemler gibi geleneksel yöntemlerin yerine öncelikle messenger RNA (mRNA) kullanılarak moleküler genetik tabanlı yaklaşımlar önerilmiştir. Fakat mRNA testlerinde kullanılan amplifikasyon ürünlerinin boyutunun (yaklaşık 200–300nt) adli olaylarda karşılaşılan bozulmuş numunelerin kullanımında ideal olmadıkları belirtildikten (9) sonra mRNA yerine; boyutlarının daha küçük olması (18–25 nükleotid), bozunmalarının mRNA'lara göre nispeten daha az olması gibi özelliklere sahip olan mikroRNA'lar (miRNA) ile

çalışılması önerilmiştir (6). miRNA'ların çoğu durumda "bozunmadan kalabilecek delil" niteliğinde kabul edilebileceği kanıtlanmıştır (10,11). DNA ve miRNA'ların paralel olarak aynı anda (ortak DNA ekstrasyon yöntemleriyle) analiz edilebiliyor olmaları da bu biyomoleküllerin adli uygulamalar için ideal birer biyobelirteç olarak görülmesini sağlamıştır (8,12–15). Ayrıca vücut sıvılarının tanımlanması için mRNA ve mikroRNA dışında circRNA ve piwi-RNA dâhil olmak üzere diğer RNA belirteçleri de kullanılabilir (16,17).

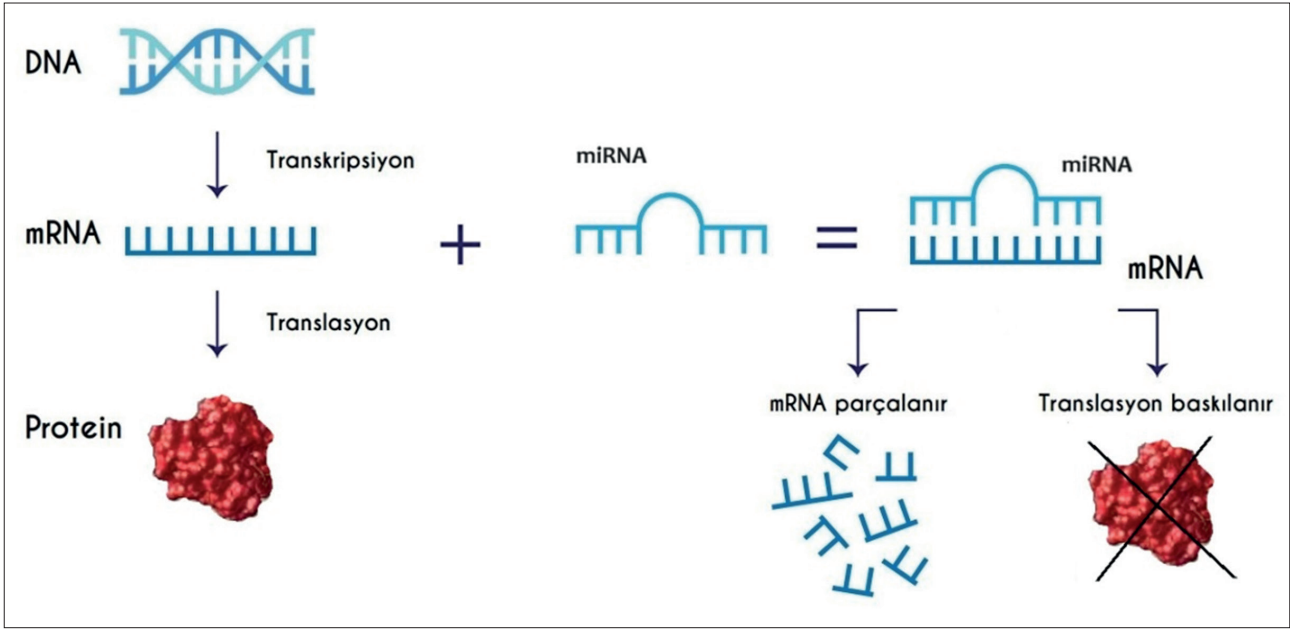
Bu derlemede vücut sıvılarının kimliklendirilmesinde potansiyel öneme sahip olan miRNA'ların keşfi, biyogenezi, adlandırılmaları, adli vücut sıvılarında miRNA'ların yeri ve vücut sıvılarının tespitleri literatür bilgileri eşliğinde detaylandırılarak sunulmuştur.

MİKRO RNA'LAR VE KEŞFİ

İnsan genomunda yaklaşık olarak %98 oranında protein kodlamayan RNA (non-coding RNA) bulunur. Bu RNA grubuna dâhil olan ve yaklaşık 18–24 nükleotid içeren miRNA'lar; insan vücudundaki birçok biyokimyasal mekanizmanın düzenlenmesinde yer alırlar ve "protein sentezinin post-transkripsiyonel düzenleyicileri" olarak tanımlanmışlardır (13,18).

miRNA çalışmaları 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan lin-4'ün keşfi ile başlamıştır (19). Pasquinelli ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yine *C. elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda olan let-7 keşfedilmiştir (20). Daha sonra çok sayıda miRNA, birçok canlıda keşfedilmiştir. miRNA'lar ile ilgili adli bilimlerde çalışmalar ise 2009 yılında Hanson ve arkadaşları tarafından vücut sıvılarının tespiti ile başlamıştır (9) ve o zamandan beri birçok araştırmacı bu alanda miRNA çalışmalarını sürdürmektedir. Son zamanlarda vücut sıvıları çalışmalarının yanı sıra olay yerinde bulunan lekelerin yaşı, biyolojik saat ritimleri ile kişilerin ölüm zamanı tespiti gibi çalışmalardan da bahsedilmektedir (21–23).

miRNA'lar, DNA'dan transkripsiyonları yapılan fakat translasyona çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanırlar. miRNA'lar hedef genlerin mRNA'larına bağlanarak ilgili mRNA'nın yıkımına ve



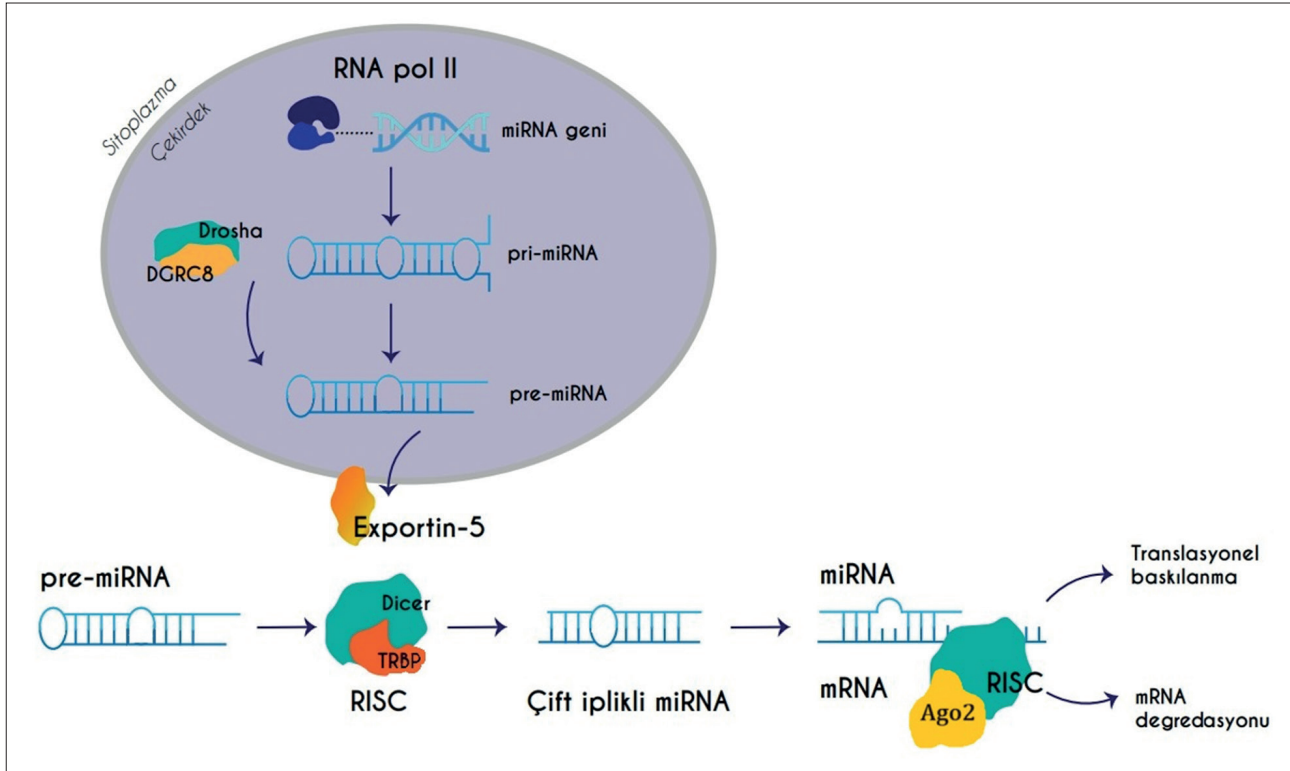
Şekil 1. Hedef mRNA'ya bağlanan miRNA ve protein inhibisyonu/mRNA yıkımı [(25)den esinlenerek yeniden çizilmiştir.]

translasyonda inhibisyona neden olurlar. Bir genin ekspresyonu miRNA'lar tarafından bu şekilde kontrol edilebilmektedir. Hedef genlerin mRNA'larına bağlanan miRNA tam komplementer yapıda ise mRNA parçalanır, komplementer yapı tam değil ise translasyon baskılanarak gen ekspresyonu kontrol altına alınmış olur (24) (Şekil 1). miRNA'lar genellikle protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde yerleşmişlerdir. Az miktarlarda genler arası bölgede veya ekzonlarda da bulunmaktadır. Kodlamayan bölgeler arasında bulunan (intergenik) miRNA genlerinin ekspresyonları, kümeler olarak bilinen çoklu miRNA'lar ile kontrol edilmektedir (26). İtronik bölgelerdeki protein kodlayan miRNA genleri ise hedef genlerindeki gibi aynı atasal zincirden ve o genin ekspresyonuna bağlı düzeylerde eksprese olmaktadır. miRNA genlerinin genellikle mutasyona kolay uğrayan kırılgen gen bölgelerinde buldukları bildirilmiştir (27). Genellikle hedef gen ürünlerinin negatif düzenleyicileri olarak işlev gören miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin, vücuttaki bir yolağın değişme durumuna göre artabildiği ya da azalabildiği de gösterilmiştir (28). miRNA'lar ile ilgili yapılan birçok çalışmada miRNA'ların çeşitli sebeplerle artan ya da azalan ekspresyon düzeyleri gözlenerek hastalıkların tanısının ve tedavisinin sağlandığı, adli boyutta da iyi birer biyobelirteç olabilme yolunda ilerlendiği bildirilmiştir (16).

miRNA'ların çoğu, DNA dizilerinden primer miRNA'lara kopyalanır ve sonrasında öncü olan pre-miRNA'lara ve daha sonra olgun miRNA'lara işlenir. miRNA'ların hedef mRNA'lar ile olan etkileşimleri dinamiktir. Bu etkileşim, miRNA'ların hücre içindeki yerleşimleri, miRNA ve mRNA'ların bolluğu ve miRNA-mRNA etkileşimlerinin afinitesi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (29).

miRNA BİYOGENEZİ

RNA polimeraz II tarafından bir primer mRNA sentezlenir ve intron bölgelerinde saç tokası (hairpin) şeklinde kıvrılıp eşleşerek ilk miRNA molekülü olan pri-miRNA oluşur. Bu saç tokası yapısı, bir RNAaz III enzimi olan Drosha ve kofaktöründen (DGCR8) oluşan mikroprosesor tarafından kesilir ve böylece prekürsör miRNA (pre-miRNA) oluşur. Exportin-5 aracılığıyla çekirdekte sitoplazmaya taşınan pre-miRNA, diğer bir RNAaz III ailesinden bir endonükleaz enzimi olan Dicer ve çift zincirli RNA bağlanma proteini (*transactivating response RNA binding protein*) TRBP aracılığıyla çift iplikli olgun miRNA oluşturulacak şekilde kesilir ve daha sonra çift iplikli RNA molekülleri Dicer'in helikaz aktivitesi ile açılır ve tekrar kısa çift iplikli parçalar olarak kesilirler (30,31). Bu ipliklerden biri miRNA olarak görev yapar, diğeri nükleaz tarafından parçalanır. miRNA



Şekil 2. miRNA biyogenezini [(34)'ten esinlenerek yeniden çizilmiştir.]

olarak görev yapacak olan iplik "argonaute" (AGO) proteini içeren (30) RISC adlı susturum kompleksine (RNA induced silencing complex) aktarılır (32). RISC kompleksi, miRNA komplementer dizi ile tam olmayan bir şekilde eşleşerek hedef mRNA'nın bulunmasını sağlar (33). Eksik baz eşleşmesi gerçekleştiğinde miRNA, RISC kompleksini indükleyerek RISC kompleksinin mRNA'ya bağlanmasını sağlar ve böylelikle hedef mRNA'nın degradasyonu ya da translasyonel susturma ile protein sentezi baskılanmış olur (31) (Şekil 2). Eğer RISC kompleksindeki miRNA, mRNA'nın 3' translasyon olmayan bölgesindeki (3'-UTR) kısmen eşlenik dizileri ile etkileşime girse başlangıç faktörleri mRNA'ya bağlanamaz ve translasyon baskılanır. RISC kompleksinin, translasyon başladıktan sonra mRNA'ya bağlanabildiği ve bu bağlanma gerçekleştiğinde ribozomların ayrıldığı ve translasyonun erken sonlandığı durumlar da söz konusudur (35). Bazen, RISC kompleksi'nin; RNA, RNA enzimleri ve proteinlerce zengin bir organel olan P-cisimciğinin (P-body, processing body) içinde daha sonra işleme sokulmak üzere saklanabildiği gözlenmiştir. miRNA bağlı mRNA'nın bu cisimciğin içinde parçalanabileceği veya bir süre sonra sitop-

lazmaya bırakılarak tekrar translasyona girebilmesinin de mümkün olduğu bildirilmiştir (36). Her bir miRNA benzer eşlenik dizilere sahip olan farklı mRNA'lara bağlanabilmektedir (37). Bu durum da, bir miRNA'nın birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiğini; bir mRNA ekspresyonunun da birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir olduğunu gösterir (38).

miRNA'ların Adlandırılması

- Pre miRNA'lar ve olgun miRNA'lar %100 aynı olsalar da genomdaki yerleşimleri farklı bölgelerdedir. Pre-miRNA küçük harflerle "mir-" yazılırken olgun miRNA'lar "miR-" şeklinde yazılmaktadır.
- Benzer dizilere sahip miRNA'lar için ise miR adından sonra bir son ek kullanılmaktadır.
- Türlerin kökenlerine göre de ön eklerle isimlendirilmişlerdir.
- Aynı olgun miRNA'ya dönüşecek olsalar da genomun farklı yerinde olan miRNA'lar farklı adlandırılır.

Tablo 1. miRNA'ların adlandırılması

Özelliklerine göre adlandırma sebebi	Örnek
pre-miRNA'lar.	mir-9
Olgun miRNA'lar.	miR-196
Benzer dizilere sahip miRNA'lar.	miR-125a miR-125b
Tür kökenine göre örn: <i>Homo sapiens</i> : <i>Solanum lycopersicum</i>	hsa-miR-123 slmiR-482-b
Genomun farklı bölgelerinde oldukları için, aynı olgun miRNA'ya dönüşecek olsalar da farklı adlandırılan miRNA'lar.	hsa-mir-194-1 hsa-mir-194-2
Aynı pre-miRNA'nın karşılıklı kollarından köken alan olgun miRNA'lar.	miR-150-3p miR-150-5p
pre-miRNA saç tokasını paylaşırsalar da ekspresyon farklılığı olan miRNA'larda az eksprese olan * işareti.	miR-123 miR-123*

- Aynı pre-miRNA'nın farklı kollarından köken alan iki miRNA da dizinin uçlarına göre -3p veya -5p olarak son ek halinde yazılırlar.
- Bağlı ekspresyon düzeyleri bilinen zincirler varsa, örneğin hairpin'in karşı kolunda bulunan ve miRNA'ya göre daha düşük düzeyde eksprese edilen bir miRNA'nın arkasına * işareti konulmaktadır (39).

miRNA'ların adlandırılmaları ve örnekleri Tablo 1'de verilmiştir.

ADLİ ÇALIŞMALARDA miRNA'LARIN YERİ

Son yıllarda yapılan çalışmalarla miRNA'ların hücre ve doku tiplerinin büyük çoğunluğunda, hücreye veya dokuya spesifik olarak eksprese edildiği bilinmektedir (40). Vücut sıvılarının tayini için, ilgili vücut sıvısına spesifik olan bazı miRNA'ların belirteç olarak kullanılmasının önerildiği adli çalışmalarda; ilgili miRNA'ların birbirlerine kıyasla ekspresyon seviyelerindeki farklılıklarına göre vücut sıvıları tanımlanmıştır. (16,40).

Vücut sıvısı tanımlamasının yanı sıra boğulma, doping mücadelesi (13), leke yaşı tayini, ölüm sonrası geçen sürenin tayini (21), ölüme neden olabilecek patolojik durumların tespiti (41) çalışmaları ile çeşitli spesifik miRNA'lar incelenmiştir. Adli miRNA araştırmalarında özellikle vücut sıvısı tanımlaması sürekli gelişme halindedir. Yapılan çalışmaların çoğunluğunda miRNA'ların vücut sıvılarının tanımlanmasında kullanılabilirliği kanıtlanmıştır fakat mahkemelerce onaylanmış biyobelirteçler olarak kabul edilebilecek ortak miRNA biyomoleküllerini

bulmak için daha fazla araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır (13).

Yapılan miRNA çalışmalarında kesin ve ortak sonuçlara tam anlamıyla varılamamıştır. Bunun nedeni olarak, çalışmalarda kullanılan analiz yöntemlerinin çeşitliliği düşünülmektedir. Farklı araştırmalarda elde edilen sonuçların güvenilir sayılabilmesi için ortak bir anlaşmaya varılabilmiş evrensel bir yöntem kullanılmalıdır (7). Bir miRNA analizinin rutin prosedüründe, miRNA'nın ekstraksiyonu, qRT-PCR normalizasyonu için referans RNA'ların doğrulanması, miRNA ekspresyonunun belirlenmesi aşamaları ve sonuçların analizi için standartlaştırılmış protokoller olmalıdır (15). miRNA çalışmaları için kullanılan moleküler tekniklerden bazıları gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR), Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Nöthern Blot, Mikrodizin ve Yeni Nesil Dizilemedir. Bu yöntemler ile bilinen miRNA'ların ekspresyonları ölçülmektedir (42). Günümüzde genel olarak miRNA ekspresyon profilinin çıkarılması için yüksek duyarlılığı, özgüllüğü ve tekrar edilebilen sonuçların elde edilebilmesi nedeniyle RT-qPCR tekniği tercih edilmektedir (11,15,43).

ADLİ VÜCUT SIVILARININ GELENEKSEL TESPİTİNDEN miRNA'LARA

Vücut sıvısı analizinde geleneksel olarak kimyasal, immünolojik ve spektroskopik yöntemlerin yanı sıra enzim aktivite tayini ve mikroskopi kullanılmaktadır. Her vücut sıvısı belirli bileşenlerden oluşur ve bir sıvıda diğerine kıyasla spesifik bir bileşenin bulunması, o sıvının tanımlanmasını sağlar. Bazı sıvılarda ortak bileşenler bulunsa da bunların düzeylerindeki göreceli farklılıklar, birbirlerinden ayrı

Tablo 2. Vücut sıvıları ve tespitinde kullanılan geleneksel yöntemlere örnekler (44, 50)

Vücut sıvısı	Protein	Geleneksel Tespit
Kan	Hem grubu	Kemilüminesans: Luminol, Fluorescein, Bluestar Kimyasal: Benzidine, Kastle-Meyer, O-toluidine, Tetramethyl-benzidine/Hemastix, Leucomalachite green
	Hemoglobin	İmmünojenik: HemeSelect, ABACard, HemaTrace, Hexagon OBTI, RSID-blood
Semen	Asit fosfataz	Kimyasal: Alpha-naphthyl phosphate/Brentamine Fast Blue, beta-naphthol/Fast Garnet B, alpha-naphthol/Fast Red AL
	Prostat Spesifik Antijen (PSA)	İmmünojenik: Biosign, ABACard, Chembio, Medpro, Onco-screen, PSA-check-1, Seratec PSA Semiquant
	-	Mikroskopik: Christmas tree, Haematoxylin/Eosin, Baecchi's, Papanicolaou's staining
Vajinal sıvı	-	Kimyasal: PAS reagent (Periodic acid-Schiff) İmmünojenik: Östrojen Reseptörleri -17 beta-estradiol (E2-17b)
Menstrual kan	D-Dimer	İmmünojenik: D-Dimer assays
Tükürük	a-Amylase	Kimyasal: Starch-iodine, Phadebas, Amylose azure, Rapignost-Amylase, SAlIgAE İmmünojenik: RSID-saliva

labilmelerini sağlayabilir. Örneğin semen ve vajinal sıvılarda da bulunan amilaz, miktar olarak tükürükte çok daha fazla bulunduğu için tükürük tayininde kullanılmaktadır (44). İlgili vücut sıvılarının tespitlerinde kullanılan geleneksel bazı yöntemlere örnekler Tablo 2'de verilmiştir.

Karışım halinde bulunan vücut sıvısı örneklerinde, miRNA'ların göreceli ekspresyon farklılıklarına göre ayırt edilebilmeleri için yapılan çalışmalar halen gelişme aşamasındadır (Tablo 3) ve çalışmalarda miRNA ekspresyon seviyelerinin göreceli ölçümü için kullanılan endojen referans genlerin, normalizasyon için önemli olduğu belirtilmektedir (45). Bu genlerin doğru seçimi ile hatalar önenebilir ve vücut sıvılarındaki miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin farkı gözlenebilir hale gelir (46). Yapılan bir çalışmada miR26b, miR92, miR144 ve miR484 olmak üzere dört aday genin stabilitesinin çalışılan miRNA'lar içinde en yüksek olduğu ve bu yüzden bu genlerin endojen referans grubu olarak seçildiği belirtilmiştir (47). Yapılan bir diğer çalışmada, 28 endojen referans aday genin ekspresyon seviyeleri 238 örnekte (periferik kan, adet kanı, tükürük, meni ve vajinal salgı) ölçülmüştür. Çalışma sonuçlarına göre miR-320a-3p'nin ilgili beş vücut sıvısı için uygun bir referans gen olabileceği bildirilmiştir. Aynı zamanda, referans gen olarak çalışılabilecek bu miRNA'nın bozulmuş örneklerin tanımlaması için de uygun olduğu ve RNU6b ile kombine kullanımının normalizasyon etkisini artırdığı gösterilmiştir (46).

Vücut sıvılarında bulunan, ilgili miRNA'ların ekspresyonlarının çevresel koşullardaki değişimlerini inceleyen araştırmalar da mevcuttur (23,48,49). Yapılan bir çalışmada gönüllü bireylerden alınan kan, tükürük ve semen örnekleri; zamanın lekeler üzerindeki etkilerini görmek için karanlık ve kuru bir yerde, oda sıcaklığında 10, 30 ve 60 gün olmak üzere bekletilmiştir. İkinci grup örneklerde ise kan lekesi, tükürük ve semen lekesi ile ayrı ayrı karıştırılmıştır. Karışım halindeki örnekler, yine aynı ortamda ve aynı sürelerde bekletilmiştir. Çalışma sonuçlarında miR16'nun kısa süre önce bırakılmış kan lekesindeki ekspresyon seviyesinin, tükürük ve semendekine göre çok daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bekletilen semen ve tükürük örneklerinde ise miR16 ekspresyonunun, kısa süre önce bırakılmış örneklere göre çok daha düşük seviyede olduğu veya ekspresyonun hiç gözlenmediği bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre kana özgü bir miRNA belirteci olarak bilinen miR16 ekspresyonunun; hem karışım halindeki hem de karışım olmayan lekelerde, çalışılan bekleme süreleri boyunca sabit kaldığı bulunmuştur (23). Semen, kan ve vajinal sıvı örnekleri kullanılarak olay yerinin simüle edildiği bir çalışmada ise miRNA-126 ve miRNA-16'nun karışım halindeki sıvılarda iki haftaya kadar olan süre içinde, kan lekesi belirteci olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir (49). Çevresel koşullara göre miRNA ekspresyon değişimini araştıran diğer bir çalışmada; kan, tükürük ve semenden oluşan 60 örnek dört gruba ayrılmış, 37 gün boyunca dış (bahçe/ haziran-temmuz ayı) ve iç mekanda (oda

Tablo 3. Karışım halinde bulunan sıvılarda ayırt edilen miRNA'lar

Kaynak	Örnek sayısı	Sıvı Örneği	Ayırt edilen sıvı Örneği	miRNA	Yöntem
Chen ve ark., 2023 (45)	169	Tükürük	Diğer sıvılar	miR-223-3p	RT-qPCR
Chen ve ark., 2023 (74)	75	Periferik kan	-Diğer sıvılar	-miR-451a miR-144-3p miR-16-5p	SYBR Green RT-qPCR
		Menstrual kan	-Diğer sıvılar	-miR-141-3p miR-412-3p miR185-5p	
		Semen	-Diğer sıvılar	-miR-10b-5p miR-135b-5p miR-891a-5p	
		Tükürük	-Diğer sıvılar	-miR-205-5p miR-658 miR-203a-3p	
		Vajinal sıvı	-Diğer sıvılar	-miR-124-3p miR-372-3p	
Rhodes ve ark., 2022 (6)	25	Vajinal sıvı	-Diğer sıvılar	miR-1208 ve miR-30 c	SYBER GREEN RT-PCR
Lewis ve Williams, 2024 (76)	180	Semen	-Kan	miR-891a	RT-qPCR
Al-Mawlah ve ark., 2023 (49)	30	Kan	Semen ve vajinal sıvı	miRNA-126 ve miRNA-16	RT-qPCR
Iroanya ve ark., 2022 (48)	60	Kan	-Tükürük/ Semen	miR-451a	qPCR
		Semen	-Tükürük/ Kan	miR-10b	
Valentine, 2021 (64)	100	Menstrual kan	Periferik kan	miR141 ve miR-412	RT-qPCR
Al-Mawlah ve ark., 2021 (2)	10	Vajinal sıvı	-Semen	-miR-124-3p, miR-372	RT-qPCR
		Semen	-Vajinal sıvı	-miR-10b, miR-135b	
Liu ve ark., 2021 (70)	605	Kan	-Diğer sıvılar	-miR-451a	SYBR Green PCR
		Periferik kan	-Menstrual kan	-miR-144-5p veya miR-144-3p	
		Semen	-Diğer sıvılar	-miR-888-5p veya miR891a-5p	
		Vajinal sıvı	-Diğer sıvılar	-miR-203a3p, miR-205-5p ve miR-124-3p	
He ve ark., 2020 (4)	350	Vajinal sıvı	Diğer sıvılar	miR-888-5p	SYBR Green RT-qPCR
Alshehhi ve Hadrill, 2020 (23)	144	Kan	Semen ve tükürük	miR16	TaqMAN RT-qPCR
He ve ark., 2020 (59)	200	Kan	-Diğer sıvılar	-miR-451	SYBR Green RT-qPCR
		Menstrual kan	-Periferik kan	-miR-203, miR-205, miR-214	

sıcaklığı), dondurucu (-80) ve buzdolabı (+4) koşullarında bekletilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre miR-451a'nın tüm kan örneklerinde ve miR-10b'nin tüm semen örneklerinde tespit edildiği fakat tükürük örneklerinde tespit edilemediği bildirilmiştir. miR-451a'nın seçilen çevresel koşullar altında kanda stabil olduğu gösterilmiştir. has-miR-451a, has-miR-10b ve has-miR-205'in olay yerlerinde vücut sıvılarının tanımlanması için umut verici birer biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri ifade edilmiştir (48).

SEMEN LEKESİNİN TESPİTİ VE AYRIMI

Olay yerindeki semen varlığı cinsel saldırı vakaları açısından büyük öneme sahiptir. Semen lekelerinde bulunan DNA ve RNA'lar, şüpheliyi hedef alan kişiselleştirilmiş bir kanıt olarak hizmet etmektedir. Semen; sperm hücrelerine ek olarak fruktoz, karnitin, gliserilfosforilkolin, asit fosfataz (50), sitrik asit, proteolitik enzim gibi bileşenleri içeren bir sıvıdır (51).

Alkali fosfataz ve PSA (Prostat Spesifik Antijen) gibi geleneksel sperm tanımlama yöntemlerinin özgüllüğü nispeten yüksektir. Ancak bu yöntemlerin, zayıf stabilite ve hedef proteine olan düşük duyarlılıkları gibi çeşitli nedenler yüzünden başarı oranları düşüktür (52).

Sperm analizi sırasında meninin sperm içerip içermediği büyük önem taşımaktadır (50). Çünkü bir lekede sadece semen analizi yapılması, sperm anormalliklerinin sebep olduğu infertilite vakaları için ayrı bir problem yaratmaktadır (53). Çalışmaların çoğunluğunda normal sperm üzerinde yoğunlaşıldığı fakat anormal sperm üzerinde durulmadığı görülmektedir (54).

Sperme özgü miRNA araştırmaları; miRNA'ların spermatogenezde (55) ve spermin sayısı, hareketliliği ve şekli gibi sperm özelliklerini tanımlamada rol oynamaları gibi nedenlerle son zamanların odak noktası haline gelmiştir. miR-135b ve miR-135a'nın

çeşitli çalışmalarda spermatogenezdeki rolleri gösterilmiştir. miR-135b, miR-205 ve miR-146a'nın sperm olgunlaşması, sperm gelişimi, hareketliliği ve çoğalmasının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (56,57). Yapılan bir diğer çalışmada ise hsa-miR-9-3p, hsa-miR-30b-5p ve hsa-miR-122-5p'nin infertilite ile güçlü bağlantıya sahip olduğu gösterilmiştir (58). İnfertilite gibi bozuklukların, miRNA ekspresyon seviyelerini değiştirdiğini bildirilen çalışmalar da mevcuttur (54).

Semen ve vajinal sıvı karışımı ile yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre, MiR-10b ve miR-135b'nin semen lekelerinde vajinal sıvılara göre daha yüksek seviyelerde eksprese edildiği, miR-124-3p ve miR-372'nin ise vajinal sıvılarda semen lekelerine kıyasla daha yüksek seviyelerde eksprese edildiği belirtilmiştir. Aynı zamanda bu dört miRNA'nın, semen ve vajinal sıvı içeren karışım sıvısında da ekspresyon seviyelerine bakılmış ve karışım sıvısı ekspresyonunun, semen lekeli veya vajinal sıvı örneklerinin ekspresyonlarına kıyasla daha düşük seviyede oldukları bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada iki hafta boyunca semen ve vajinal sıvı karışımının miRNA ekspresyon seviyelerinde değişiklik gözlenmediği ve ilgili miRNA'ların iyi bir stabilite gösterdikleri belirtilmiştir (2).

PERİFERİK VE MENTSTRUAL KAN LEKELERİNİN TESPİTİ VE AYRIMLARI

Periferik kanda plazma; kan hücreleri olan eritrosit, lökosit ve trombositlerden oluşmaktadır. Eritrositler yapılarında çekirdek bulundurmazlar. Dolayısıyla DNA içermezler, ancak "hem" grubu içerirler. Lökositlerde "hem" grubu yoktur ancak çekirdekleri olduğundan DNA içerirler. Olay yerinde bulunan periferik kan şiddet veya yaralanma vakalarını işaret eder. Bu nedenle, adli olaylar açısından büyük önem taşır. Olay yerinde çıplak gözle bile görülen kan çok kolay fark edilebilir. Ancak, suçlular durumu gizlemek için genelde lekeleri temizlemeye çalışırlar. Genel olarak "luminol" testi kan lekeli tespitinde kullanılmaktadır (50).

Her ay kanama sırasında dökülen menstrual kan ise, servikal mukus ve endometriyal doku parçalarından oluşur. Menstual kan, vajinal yoldan çıkarken vaji-

nal sekresyonla birlikte çıkacağı için karmaşık ve çok bileşenli bir sıvı haline gelmektedir. Menstrual kan, periferik kan içermesine rağmen rahim ağzı ve rahimden kaynaklı menstrual kanamaya özgü bileşenleri de içermektedir. Bu yüzden cinsel saldırı vakalarında menstrual kanama ile periferik kan ayrımı yapılabiliyor olmalıdır. Ancak günümüzde menstrual kan tespitinde kullanılan testlerin sayısı azdır ve bu testlerdeki menstrual kanamadan kaynaklanan pozitif sonuç ile yaralamadan kaynaklı periferik kan karışımı ayırt edilemez. Dolayısıyla menstrual kan ile periferik kanın ayırımında tam anlamıyla bir sonuç varılamaz (50).

Menstrual kanı periferik kandan ayırt etmek için miRNA'ların kullanıldığı bir çalışmada miR-451, miR-203, miR-205 ve miR-214 üzerine yoğunlaşmıştır (59). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda miR-203 ve miR-205'in epitel hücrelerinde (60,61) ve miR-214'in servikal dokularda (62) yüksek ekspresyon seviyeleri gösterdikleri bildirilmiş ve miR-203, miR-205, miR-214'ün menstrual kanı periferik kandan ayırt etmek için kullanılabileceği gösterilmiştir (59). miR-412'nin menstrual kanın tespiti için oldukça spesifik olduğundan bahsedilmiştir (63). Aynı zamanda, başka bir çalışmada ise miR-412 ve miR141'i analizlerde birlikte kullanmanın menstrual kanın ve periferik kanın ayırımının yapılabilmesi için daha büyük bir avantaja sahip olduğu bildirilmiştir (64).

Bir diğer çalışmada, 56 menstrual kan ve 47 periferik kan örneğinin yanı sıra 10'ar adet tükürük, semen ve vajinal sıvı olmak üzere toplam 133 örnek ile çalışılmıştır. Çalışmada miR-451a/miR-21-5p oranı ROC (*Receiver Operating Characteristic*) analizi ile yapılmış olup, miR-451a/miR-21-5p oranı 0,929'un altında olduğunda örneğin kan olmadığı, 0,929-10,201 aralığında ise menstrual kan olduğu, 10,201'in üzerinde ise periferik kan olduğu belirlenmiştir. Seksen altı örnek ile (62 menstrual kan ve 24 periferik kan örneği) yapılan harici doğrulamada sonucun %100 duyarlılık ve %100 özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir (65).

VAJİNAL SIVININ TESPİTİ VE AYRIMI

Vajinal mukoza, serviks hücreleri ve Bartholin bezleri tarafından üretilen vajinal sekresyon, diğer vücut sıvılarından farklı olarak kendine özgü bir

protein içermediği için tespiti zor olmaktadır (50). İnsan vajinal sıvısının ana bileşenleri epitel hücreleri, beyaz kan hücreleri ve asit fosfataz, laktik asit, sitrik asit, üre, vajinal peptidaz, asetik asit, piridin, skualen ve immünoglobulinler dâhil olmak üzere çeşitli biyomoleküllerdir (66). Vajinal sıvı tespitlerinde bazen Papanicolaou ve Lugol boyası kullanılabilir (67).

Literatürde miR-451a ve miR-144-3p periferel kana, miR-205-5p ve miR-203-3p tükürüğe; miR-214-3p ve miR-144-5p menstrual kana; miR-888-5p ve miR-891a-5p semene; miR-124a-3p ve miR-654-5p vajinal sekresyona özgü belirteçler olarak bildirilse de, bu miRNA'ların yalnızca belirli vücut sıvılarını tanımlamada değil diğer vücut sıvılarını tanımlamada da bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, miR-888-5p'nin ekspresyon seviyelerinde vajinal sıvıya kıyasla menstrual kan, periferel kan, tükürük ve semen örnekleri arasında önemli farklılıklar bulunduğu bildirilmiş olup miR-888-5p'nin vajinal sıvıyı diğer dört vücut sıvısından ayırt etme yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir (4).

Farklı cinsiyet, yaş grubu ve etnik kökenleri bilinen 334 kişiden alınan vücut sıvılarının tahmini için istatistiksel bir model geliştirmek amacıyla yapılan bir çalışmada QDA (*quadratic discriminant analysis*) yönteminin, karışım sıvılardaki performansı değerlendirilmiştir. Menstrual kan içeren karışımlarda menstrual kanlar doğru şekilde sınıflandırılrsa da meni, tükürük ve/veya vajinal sıvıları içeren karışımların yanlış sınıflandırıldıkları belirtilmiş ve ek çalışma veya farklı bir yöntem ile çalışılması gerektiği vurgulanmıştır. Aynı çalışmada az sayıda bir örneklem grubu kullanılarak miR-1208 ve miR-30 c'nin birlikte kullanımı ile yapılan analizde vajinal sıvıların diğer sıvılardan ayırt edilebildiği gözlenmiştir. Ancak bu miRNA'lar ile daha büyük bir örneklem grubunda çalışıldığında ise aynı sonucuna ulaşamadığı belirtilmiştir (68).

TÜKÜRÜĞÜN TESPİTİ VE AYRIMI

Ağız boşluğunda bulunan üç çift büyük bez ve birçok küçük tükürük bezinden üretilen tükürük; azotlu ürünler, müninler, immünoglobulinler, a-amilaz gibi enzimler ve ağız mikrobiyotasından oluşur.

Olay yerlerinde tükürüğe; kişilerdeki yaygın tükürme alışkanlıklarına bağlı olarak veya şiddet ve cinsel saldırı vakalarında sıklıkla rastlanmaktadır. Tükürüğü tespit etmek amacıyla kullanılan klasik testlerin temeli genellikle a-amilaz varlığının araştırılmasına dayanır (49,50,67).

Bazı hücrel bileşenlerin benzerliği nedeniyle tükürük ve vajinal sıvıların ayırımındaki çalışmalar tatmin edici kabul edilmemektedir (45). Her iki vücut sıvısının da özellikle epitel hücre içeriyor olması, tükürük ve vajinal sıvının tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. Yapılan bir çalışmada miR203a-3p ekspresyonunun vajinal sıvıda tükürüğe göre daha yüksek olduğunu gösterilmiş olup bu miRNA'nın tükürüğe özgü bir miRNA olabileceği ileri sürülmüştür (69). Yeni bir analizi yöntemi olan KDE (Kernel Density Estimation) kullanılarak tükürük ve vajinal sıvılardaki miRNA belirteçlerinin tarandığı bir çalışmada, bu yöntemin olay yerlerinde yaygın bulunan beş vücut sıvısını doğru bir şekilde ayırt edebilecek etkili bir analitik yöntem olabileceği ifade edilmiştir. Yapılan çalışmada, miR-223-3p tükürüğe özgü bir belirteç olarak tanımlanmıştır ve kullanılan yöntemin %100 doğru sonuç verdiğiinden bahsedilmiştir (45).

Bireylerin biyolojik ritimlerine veya zamana bağlı olarak vücut sıvılarından ilgili miRNA'larda herhangi bir değişiklik olup olmadığının gözlemlendiği çalışmada, bireylerden alınan tükürük örneklerinde miR-412 ve miR-205 ekspresyonuna bakılmıştır. Çalışmaya katılan bireylerden; ilk gün yemek yemeden önce ve yemek yedikten sonra ikinci gün sabah uyanmadan hemen sonrasında alınan tükürük örneklerindeki miR-412 ve miR-205 ekspresyonlarının önemli ölçüde farklı olduğu bildirilmiştir. Bu durumun, farklı koşullarda farklı tükürük bezlerinin uyarılıyor olmasından ve kişilerin metabolizmasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır (68).

SONUÇ

Bu derlemede taranan literatürler 2020–2024 arasında yapılan çalışmaları içermektedir. "BFID", "mixed", "body fluids", "miRNA", "forensic", "qPCR" ve "crime scene" anahtar kelimeleri Google Akademik ve Pubmed veri tabanlarında taranmıştır.

Son 15 yıldır vücut sıvılarının tanımlanmasında potansiyel birer biyobelirteç olan miRNA'larla, adli alanda birçok çalışma yapılmıştır. Kan, semen, vajinal sıvı ve tükürüğe özgü birçok potansiyel miRNA belirlenmiştir. Vücut sıvılarındaki miRNA belirteçlerinin tanınması, değerlendirilmesi ve diğer vücut sıvılarından ayırt edilebilmeleri için çeşitli model analizleri geliştirilmiştir ve genel olarak önceki çalışmalarda kullanılan miRNA'lar kullanılmıştır. Çalışmalardaki değerlendirmelerin sonuçlarına bakıldığında; miRNA'ların tek başlarına çalışıldıklarına kıyasla çoklu ve kombine miRNA'lar şeklinde çalışılmasının daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Özellikle karışım halindeki örneklerin doğru bir şekilde sınıflandırılması için analiz yapılırken kullanılan modellemeler büyük önem taşımaktadır. Olay yerlerinde bulunan az miktardaki örnek açısından riskli ve karışım halinde bulunan sıvılarla yapılan miRNA analiz yöntemleri güvenilir olmalıdır. Yapılan çalışmaların çoğu miRNA'ların genel olarak vücut sıvısı tespitinde kullanılabilir olduğu konusunda hemfikirdir. Aynı zamanda çalışılan miRNA'ların tek başlarına değil, ilgili vücut sıvısına spesifik birkaç miRNA ile kombine şekilde daha doğru sonuç vereceği ortak görüşler arasındadır. Ayrıca çalışılan örneklerde DNA analizi ile birlikte miRNA analizinin de eş zamanlı olarak yürütülmesi adli bir vakanın doğru bir şekilde tespit edilerek aydınlatılmasını sağlar.

Yapılan bu araştırma sonucunda miRNA'larla kombine olarak vücut sıvısı tespitinde RNA, DNA metilasyon seviyeleri ve/veya mikrobiyomlarla (71,72) yapılan çeşitli çalışmalara da rastlanılmıştır (73–76).

Çalışılan vücut sıvılarının örneklem miktarları veya sıvıların analizinde kullanılan modelleme yöntemleri ile ilgili henüz ortak bir karara varılamadığından, çeşitli ve değişken çevre koşullarına bağlı durumların simüle edildiği, belirli bir popülasyonun yaş ve cinsiyet özelliklerinin göz önünde tutulduğu özelliklerle potansiyel miRNA'ların dâhil edildiği daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Finans: Bu çalışma için hiç bir kurum veya kuruluştan finansal destek alınmamıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Çetli E, Tatar D, Özkoçak V. Adli bilimlerde DNA parmak izine adli genetik ve adli antropolojik bakış. Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Derg. 2019;8(4):1545–56. <https://doi.org/10.17798/bitlisfen.537780>
2. Al-Mawlah YH, Jebor MA, Abdulla AA. The effect of mixing seminal fluid and vaginal secretion on the expression of miRNA markers in a simulated forensic scientific detection. Ann Rom Soc Cell Biol. 2021;25(4):11477–82.
3. Alakoç YD. Adli bilimlerde DNA analizleri. Ankara Sağlık Hizmetleri Derg. 2019;9(2):1–8.
4. He H, Han N, Ji C, Zhao Y, Hu S, Kong Q, Ye J, Ji A, Sun Q. Identification of five types of forensic body fluids based on stepwise discriminant analysis. Forensic Sci Int Genet. 2020;48:102337. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102337>
5. Rao A, Rana M, Pradhan A, Sinha M. RNA- and DNA-based identification of body fluids. Forensic DNA Typing: Principles, Applications and Advancements. 2020;87–104. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6655-4_5
6. Rhodes C, Lewis C, Szekely J, Campbell A, Creighton MRA, Boone E, Seashols-Williams S. Developmental validation of a microRNA panel using quadratic discriminant analysis for the classification of seven forensically relevant body fluids. Forensic Sci Int Genet. 2022;102692. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102692>
7. Glynn CL. Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. RNA. 2020;26(1):1–9. <https://doi.org/10.1261/rna.072173.119>
8. Li Z, Lv M, Peng D, Xiao X, Fang Z, Wang Q, Zhang L. Feasibility of using probabilistic methods to analyse microRNA quantitative data in forensically relevant body fluids: a proof-of-principle study. Int J Legal Med. 2021;135:2247–61. <https://doi.org/10.1007/s00414-021-02678-w>
9. Hanson EK, Lubenow H, Ballantyne J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. Anal Biochem. 2009;387:303–14. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.037>
10. Han J, Han N, Xu Z, Zhang C, Liu J, Ruan M. Expression profile of circular RNA and construction of circular RNA-Micro RNA network in salivary adenoid cystic carcinoma. Cancer Cell Int. 2021;21(1):1–11. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01681-2>
11. Menini M, De Giovanni E, Bagnasco F, Delucchi F, Pera F, Baldi D, Pesce P. Salivary micro-RNA and oral squamous cell carcinoma: a systematic review. J Pers Med. 2021;11(2):101. <https://doi.org/10.3390/jpm11020101>
12. Fox AJ. Effects of microwave radiation on the digestion of proteins involved in body fluid identification. NY: The City University of New York; 2020.
13. Rocchi A, Chiti E, Maiese A, Turillazzi E, Spinetti I. MicroRNAs: an update of applications in forensic science. Diagnostics. 2020;11(1):32. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010032>
14. 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. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14070>
15. Praihirunkit P. miRNAs: perspective towards the use for body fluid identification. Siriraj Med J. 2020;72(6):512–26. <https://doi.org/10.33192/Smj.2020.70>

16. Xiao Y, Chen D, Peng D, Li Z, Qu S, Zhang R, Liu G, Zheng Y, Mengyu T, Xue J, Zhang Y, Zhu J, Liang W. Establishment of a co-analysis system for personal identification and body fluid identification: a preliminary report. *Int J Legal Med.* 2022;136(6):1565–75. <https://doi.org/10.1007/s00414-022-02886-y>
17. Turiello R, Nouwairi RL, Landers JP. Taking the microfluidic approach to nucleic acid analysis in forensics: review and perspectives. *Forensic Sci Int Genet.* 2023;63:102824. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102824>
18. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med.* 2016;14(1):143. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0893-x>
19. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843–54. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
20. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degen B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000;408:86–9. <https://doi.org/10.1038/35040556>
21. Maiese A, Scatena A, Costantino A, Di Paolo M, La Russa R, Turillazzi E, Frati P, Fineschi V. MicroRNAs as useful tools to estimate time since death: a systematic review of current literature. *Diagnostics.* 2021;11(1):64. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010064>
22. Janjic K, Reisinger C, Kanz F. Common ground between biological rhythms and forensics. *Biology.* 2022;11(7):1071. <https://doi.org/10.3390/biology11071071>
23. Alshehhi S, Haddrill PR. Evaluating the effect of body fluid mixture on the relative expression ratio of blood-specific RNA markers. *Forensic Sci Int.* 2020;307:110116. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.110116>
24. Paranjape T, Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut.* 2009;58(11):1546–54. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.179531>
25. Santonocito S, Polizzi A, Palazzo G, Isola G. The emerging role of microRNA in periodontitis: pathophysiology, clinical potential and future molecular perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5456. <https://doi.org/10.3390/ijms22115456>
26. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002;21:4663–70. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>
27. Shomron N, Levy C. MicroRNA-biogenesis and pre-mRNA splicing crosstalk. *Biomed Res Int.* 2009;2009:1–6. <https://doi.org/10.1155/2009/594678>
28. Toyama K, Kiyosawa N, Watanabe K, Ishizuka H. Identification of circulating miRNAs differentially regulated by opioid treatment. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):1991. <https://doi.org/10.3390/ijms18091991>
29. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
30. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 2005;123:631–40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.022>
31. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009;11:228–34. <https://doi.org/10.1038/ncb0309-228>
32. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:5779–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1630797100>
33. Vaziri PA, Rezaeieh KAP. Ökaryot Hücrelerde Korunmuş Mikro RNA'lar ve Hedef Transkripsiyonların Faliyetleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Derg.* 2012;2:96–8.
34. Cerqueira DM, Tayeb M, Ho J. MicroRNAs in kidney development and disease. *JCI Insight.* 2022;7(9):158277. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.158277>
35. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:219–30. <https://doi.org/10.1038/nrm2347>
36. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biol.* 2005;7:719–23. <https://doi.org/10.1038/ncb1274>
37. Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 2008;455:58–63. <https://doi.org/10.1038/nature07228>
38. Güzelgöl F, Aksoy K. A gene expression regulator: miRNA. *Arşiv Kaynak Tarama Derg.* 2015;24(4):472–93. <https://doi.org/10.17827/aktd.95263>
39. Erdal ME, Yılmaz ŞG. mikroRNA çalışmaları ve psikiyatriye yansması. *Türkiye Klinikleri Journal of Psychiatry Special Topics.* 2016;9(1):16–24.
40. Sidekli Ö, Korkmaz Ağaoğlu Ö. Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) ile mikroRNA (miRNA) ekspresyon profillemesi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2020;18(1):48–56. <https://doi.org/10.32707/ercivet.878031>
41. Madea B, Saukko P, Oliva A, Musshoff F. Molecular pathology in forensic medicine-Introduction. *Forensic Sci Int.* 2010;203(1-3):3–14. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.017>
42. Çubuk C. Biyoinformatik teknikleri kullanarak yeni mikro RNAların bulunması ve varyant analizlerinin yapılması: Citrus modeli. Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, 2019.
43. Dash HR. NGS-based detection and differentiation of forensically relevant body fluids using conventional, molecular, and microbial techniques. In: Al-Snan NR, Elkins KM, editors. *Next Generation Sequencing (NGS) Technology in DNA Analysis.* India: Academic Press; 2024. p. 425-50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99144-5.00003-2>
44. 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. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.02.013>
45. Chen H, Hu S, Yang R, Hu S, Yao Q, Zhao Y, Lian J, Ji A, Cao Y, Sun, Q. The screening and validation process of miR-223-3p for saliva identification. *Legal Medicine.* 2023;65:102312. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2023.102312>
46. Wei S, Hu S, Han N, Wang G, Chen H, Yao Q, Zhao Y, Ye J, Ji A, Sun, Q. Screening and evaluation of endogenous reference genes for miRNA expression analysis in forensic body fluid samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2023;63:102827. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2023.102827>

47. 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. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.11.012>
48. 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. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111338>
49. Al-Mawlah YH, Asma'a HM, Abd-Alameer AM, Hadi AM, Abdulabbas HS, Shaheed SH, Jebor MA, Alsaadi AH. Assessment of the specificity and stability of microRNAs as a forensic gene marker. *Biomed Biotechnol Res J.* 2023;7(4):569–76. https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_174_23
50. Primorac D, Schanfield M. Forensic body fluid and tissue identification. In: Primorac D, Schanfield M, editors. *Forensic DNA applications: An interdisciplinary perspective.* Florida: CRC Press, 2023. p. 319–42. <https://doi.org/10.4324/9780429019944-18>
51. Ünal MS, Özer MC, Sönmez FH, Bayrak G, Demirbağ HO. Seminal sıvının fertilizasyondaki rolü. *Androl Bul.* 2017;19(4):138–43. <https://doi.org/10.24898/tandro.2017.35403>
52. Wen YG, Yu H, Lin JS. Advanced technologies in semen stain identification. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2016;22(6):553–58.
53. Kiani M, Salehi M, Mogheiseh A. MicroRNA expression in infertile men: its alterations and effects. *Zygote.* 2019;27(5):263–71. <https://doi.org/10.1017/S0967199419000340>
54. Al-Mawlah YH, Al-Darraj MN, Al-Imari MJ. Study of small non-coding RNA (miRNA) expression pattern of fertile/infertile male semen. *Acta Inform Med.* 2022;30(3):205. <https://doi.org/10.5455/aim.2022.30.205-212>
55. Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, Li X, Sun, F. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7(1):1–10. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-13>
56. Mokanszki A, Molnar Z, Varga Tothne E, Bodnar B, Jakab A, Balint BL, Balogh I. Altered microRNAs expression levels of sperm and seminal plasma in patients with infertile ejaculates compared with normozoospermic males. *Hum Fertil.* 2020;23(4):246–55. <https://doi.org/10.1080/14647273.2018.1562241>
57. Keles E, Malama E, Bozukova S, Siuda M, Wyck S, Witschi U, Bauersachs S, Bollwein H. The micro-RNA content of unsorted cryopreserved bovine sperm and its relation to the fertility of sperm after sex-sorting. *BMC Genomics.* 2021;22:1–19. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07280-9>
58. Joshi M, Andrabi SW, Yadav RK, Sankhwar SN, Gupta G, Rajender S. Qualitative and quantitative assessment of sperm miRNAs identifies hsa-miR-9-3p, hsa-miR-30b-5p and hsa-miR-122-5p as potential biomarkers of male infertility and sperm quality. *Reprod Biol Endocrinol.* 2022;20(1):122. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00990-7>
59. He H, Ji A, Zhao Y, Han N, Hu S, Kong Q, Jiang L, Ye J, Liu Y, Sun Q. A stepwise strategy to distinguish menstrual blood from peripheral blood by Fisher's discriminant function. *Int J Legal Med.* 2020;134:845–51. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02196-w>
60. Wang Z, Luo H, Pan X, Liao M, Hou Y. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;3:419–23. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.08.008>
61. Qin AY, Zhang XW, Liu L, Yu JP, Li H, Wang SZ, Ren XB, Cao S. MiR-205 in cancer: an angel or a devil. *Eur J Cell Biol.* 2013;92:54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.11.002>
62. Qiang R, Wang F, Shi LY, Liu M, Chen S, Wan HY, Li YX, Li X, Gao SY, Sun BC, Tang H. Plexin-B1 is a target of miR-214 in cervical cancer and promotes the growth and invasion of HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(4):632–41. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.01.002>
63. Bexon K, Williams G. Characterising the Fluctuation of MicroRNA Expression throughout a Full Menstrual Cycle. *Forensic Sci Int Genet Supplement Series.* 2015;5:e264–266. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2015.09.105>
64. Valentine A. (2021). Differentiation between peripheral blood and menstrual blood using miRNA markers (Unpublished Thesis). Virginia: Virginia Commonwealth University; 2021.
65. Wang G, Wang Z, Wei S, Wang D, Ji A, Zhang W, Sun Q. A new strategy for distinguishing menstrual blood from peripheral blood by the miR-451a/miR-21-5p ratio. *Forensic Sci Int Genet.* 2022;57:102654. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102654>
66. Ali EM, Edwards HG, Scowen IJ. In-situ detection of single particles of explosive on clothing with confocal Raman microscopy. *Talanta.* 2009;78(3):1201–03. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.12.038>
67. Sakurada K, Watanabe K, Akutsu T. Current methods for body fluid identification related to sexual crime: focusing on saliva, semen, and vaginal fluid. *Diagnostics.* 2020;10(9):693. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10090693>
68. Rhodes C, Lewis C, Price K, Valentine A, Creighton MRA, Boone E, Seashols-Williams, S. Evaluation and verification of a microRNA panel using quadratic discriminant analysis for the classification of human body fluids in dna extracts. *Genes.* 2023;14(5):968. <https://doi.org/10.3390/genes14050968>
69. Li Z, Chen D, Wang Q, Tian H, Tan M, Peng D, Tan Y, Zhu J, Liang W, Zhang L. mRNA and microRNA stability validation of blood samples under different environmental conditions. *Forensic Sci Int Genet.* 2021;55:102567. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102567>
70. Liu Y, He H, Xiao ZX, Ji A, Ye J, Sun Q, Cao Y. A systematic analysis of miRNA markers and classification algorithms for forensic body fluid identification. *Brief Bioinform.* 2021;22(4):bbaa324. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa324>
71. Huang H, Liu X, Cheng J, Xu L, He X, Xiao C, Huang D, Yi S. A novel multiplex assay system based on 10 methylation markers for forensic identification of body fluids. *J Forensic Sci.* 2022;67(1):136–48. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14872>
72. Dobay A, Haas C, Fucile G, Downey N, Morrison HG, Kratzer A, Arora N. Microbiome-based body fluid identification of samples exposed to indoor conditions, *Forensic Sci Int Genet.* 2019;40:105–13. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.02.010>
73. Bamberg M, Bruder M, Dierig L, Kunz SN, Schwender M, Wiegand P. Best of both: A simultaneous analysis of mRNA and miRNA markers for body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2022;59:102707. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102707>
74. 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. <https://doi.org/10.1002/elps.202300059>

75. Liang X, Han X, Liu C, Du W, Zhong P, Huang L, Huang M, Fu L, Liu C, Chen L. Integrating the salivary microbiome in the forensic toolkit by 16S rRNA gene: potential application in body fluid identification and biogeographic inference. *Int J Legal Med.* 2022;136(4):975–85. <https://doi.org/10.1007/s00414-022-02831-z>
76. Lewis CA, Seashols-Williams SJ. A combined molecular approach utilizing microbial DNA and microRNAs in a qPCR multiplex for the classification of five forensically relevant body fluids. *J Forensic Sci.* 2024;69:282–90. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15400>