

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ADLİ TIP ANABİLİM DALI**

**FARKLI KUMAŞ TÜRLERİ ÜZERİNDEKİ SEMEN LEKESİ**  
**YAŞININ FT-IR SPEKTROSKOPİ İLE TAYİNİ**

**Dr. Burak TAŞTEKİN**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA**  
**2021**



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ADLİ TIP ANABİLİM DALI**

**FARKLI KUMAŞ TÜRLERİ ÜZERİNDEKİ SEMEN LEKESİ**  
**YAŞININ FT-IR SPEKTROSKOPİ İLE TAYİNİ**

**Dr. Burak TAŞTEKİN**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Ramazan AKÇAN**

**ANKARA**  
**2021**



## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca sabırla ve anlayışla bana yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Ramazan Akçan'a,

Rutin işleyiş içerisinde unuttuğumuz her anda insani yönümüzü hatırlamamızı sağlayan, sıkıntılarımıza her daim ortak olan Anabilim Dalı Başkanım Prof. Dr. Aysun Balseven Odabaşı'na,

Bizi akademik ve sosyal olarak her daim destekleyen, geliştiren, yöneticiliği ve olaylara yaklaşımı ile örnek olan Prof. Dr. Ali Rıza Tümer'e,

Değerli bilgileri ve tecrübeleriyle uzmanlık eğitimim boyunca yardımcı ve yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Cavlak ve Doç. Dr. Mukaddes Gürler'e,

Spektroskopik çalışma sürecimde değerli fikirlerini paylaşan ve bana zaman ayıran Prof. Dr. Uğur Tamer, Öğr. Gör. Ayhan İbrahim Aysal ve Öğr. Gör. Dr. İrfan Çapan'a,

İstatistiksel analiz için benimle beraber yoğun mesai harcayan, fikirleriyle beni cesaretlendiren Öğr. Gör. Dr. H. Yağmur Zengin'e,

Spektroskopik analiz süresince gece gündüz demeden beni yalnız bırakmayan, yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. H. Canberk Aydoğan'a,

Berber çalışmaktan, birlikte vakit geçirmekten her daim keyif aldığım, acısıyla tatlısıyla pek çok anı biriktirdiğimiz uzman ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Hayatımın her alanında maddi-manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen anne-babama, kardeşime ve dedelerime,

Zaman zaman stresli geçen bu zorlu süreç boyunca bana olan inancını, desteğini hep hissettiren, başarabileceğim konusunda destek veren, eleştirileriyle eksik yönlerimi görmemi sağlayan değerli eşim Ecz. Nuriye Hilal Taştekin'e,

Zaman akıp giderken ve gözümün önünde adım adım büyürken, bana kişisel zaman tanıyan, işe gitmeme, ders çalışmama, tez çalışmalarımı gerçekleştirmeme izin veren, onunla bu süreçte daha az vakit geçirebildiğim, oynayabildiğim için üzülsem de bana küsmeyen biricik oğlum Yunus Ayhan Taştekin'e

Çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Taştekin, B., Farklı kumaş türleri üzerindeki semen lekesi yaşının FT-IR Spektroskopisi ile tayini, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Uzmanlık Tezi, Ankara, 2021.** Olay yerinde sıklıkla kan, semen, vajinal sekresyon ve tükürük gibi vücut sıvılarıyla karşılaşmaktadır. Cinsel saldırı suçlarında ise en güvenilir biyolojik kanıtlardan biri semen lekесidir. Semen lekесinin yaş tayini hem cinsel saldırıyı doğrulamak, hem şüphelileri tespit etmek, hem de suçun meydana geldiği zaman çerçevesini tahmin etmek için önemli bir rol oynamaktadır. Beş farklı kumaş türü üzerine damlatılan semen lekelerinde 8 haftaya kadar Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) Spektroskopisi kullanılarak oluştuğu zamanı belirleyebilmek için bir yöntem geliştirmek amaçlanmıştır. Temel bileşen analizi (PCA) ve kısmi en küçük kareler regresyonu (PLSR) kullanılarak oluşturulan modellerde yüksek  $R^2$  değerleri ve düşük kök-ortalama-kare hatası (RMSE) elde edilmiştir. Modellemede kumaş türlerine göre değişmekle birlikte 0-3 gün aralığında 0,18-0,32 gün arasında, 3-7 gün aralığında 0,56-1 gün arasında, 1-4 hafta aralığında 2,66-3,96 gün arasında, 4-8 hafta aralığında 4,74-6,56 gün arasında bir aralık ile yaş tahmininde bulunabildiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında, kemometri ile birleştirilen ATR-FTIR spektroskopisinin, spektrumdaki zamana bağlı değişikliklere dayalı olarak farklı kumaş türlerinde insan semen lekelerinin yaşını tahmin etmek için etkili bir yöntem olabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Adli Tıp, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, semen lekесi, yaş tayini, kemometri.

## ABSTRACT

**Taştekin, B., Determination of semen stain age on different fabric types by FT-IR Spectroscopy, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Forensic Medicine, Ankara, 2021.** Body fluids such as blood, semen, vaginal secretions, and saliva are frequently encountered at the crime scene. In sexual assault crimes, one of the most reliable biological evidence is semen stain. Age determination of the semen stain plays an important role in both confirming sexual assault, identifying suspects, and estimating the time frame in which the crime occurred. It is aimed to develop a method to determine the time of formation by using Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy for up to 8 weeks in semen stains dripped on five different fabric types. High  $R^2$  values and low root-mean-square error (RMSE) were obtained in models constructed using Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least-Squares Regression (PLSR). Although it varies according to fabric types in modeling, it has been observed that age estimation can be made with an interval between 0.18-0.32 days in the range of 0-3 days, between 0.56-1 days in the range of 3-7 days, between 2.66-3.96 days in the range of 1-4 weeks, 4.74-6.56 days in the range of 4-8 weeks. In this thesis, it has been shown that ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometrics can be an effective method for estimating the age of human semen stains on different fabric types based on time-dependent changes in the spectrum.

**Keywords:** Forensic medicine, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, age determination, semen stain, chemometrics

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iv</b>
<b>ÖZET</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER</b>	<b>xi</b>
<b>TABLolar</b>	<b>xiv</b>
<b>GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1.    Semen	4
2.2.    Adli Semen Yaşı Tayini	6
2.2.1.    Biyolojik Yaklaşımlar	7
2.2.2.    Kimyasal Yaklaşımlar	8
<b>FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ</b>	<b>10</b>
3.1.    Titreşim Spektroskopisi	10
3.1.1.    Elektromanyetik Radyasyon	10
3.1.2.    Kızılötesi Titreşim Spektroskopisi	13
3.1.3.    FTIR Enstrümantasyonu	15
3.1.4.    Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) Spektroskopisi	17
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>19</b>
4.1.    Numunelerin Hazırlanması	19
4.2.    Spektral Verilerin Toplanması	23



4.3.	Spektral Verilerin Ön İşlemden Geçirilmesi	25
4.4.	Kemometrik Analizler	25
	<b>BULGULAR</b>	<b>27</b>
	<b>TARTIŞMA</b>	<b>50</b>
	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>55</b>
	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>56</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>µl</b>	Mikro litre
<b>as</b>	Asimetrik titreşimler
<b>ATR</b>	Attenuated total reflectance – Azaltılmış toplam yansıtma
<b>c</b>	Işık hızı sabiti
<b>CV</b>	Cross-validation – Çapraz validasyon
<b>Di</b>	Elmas
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>FIR</b>	Uzak kızılötesi
<b>FT</b>	Fourier dönüşümü
<b>FTIR</b>	Fourier transform infrared – Fourier dönüşümlü kızılötesi
<b>Ge</b>	Germanyum
<b>GGT</b>	Gama glutamil transferaz
<b>HeNe</b>	Helyum-Neon
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IR</b>	Kızılötesi
<b>LDH</b>	Laktat dehidrogenaz
<b>LVs</b>	Latent variables – Gizli değişkenler
<b>MIR</b>	Orta kızılötesi
<b>miRNA</b>	Mikro RNA
<b>NIR</b>	Yakın kızılötesi
<b>PAP</b>	Prostatik asit fosfataz
<b>PC</b>	Temel bileşen
<b>PCA</b>	Principal component analysis – Temel bileşen analizi
<b>PLSR</b>	Partial least squares regression – Kısmi en küçük kareler regresyonu
<b>PMI</b>	Postmortem interval
<b>PSA</b>	Prostat spesifik antijen
<b>RMSE</b>	Root-mean-square error – Kök-ortalama-kare hatası
<b>RMSECV</b>	Root-mean-square error of cross-validation – Çapraz validasyonun kök-ortalama-kare hatası

<b>RMSEP</b>	Root-mean-square error of predictions – Tahminlerin kök-ortalama-kare hatası
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>rRNA</b>	Ribozomal RNA
<b>s</b>	Simetrik titreşimler
<b>Si</b>	Silikon/silisyum
<b>SNR</b>	Sinyal/gürültü oranı
<b>TCK</b>	Türk Ceza Kanunu
<b>UV</b>	Ultraviyole – Mor ötesi
<b>UV-vis</b>	Mor ötesi görünür bölge
<b>VIS</b>	Görünür
<b>ZnSe</b>	Çinko-Selenit
<b><math>\delta</math></b>	Bükülme titreşimleri
<b>v</b>	Gerilme titreşimleri
<b><math>\nu</math></b>	Frekans
<b><math>\lambda</math></b>	Dalga boyu

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Erkek ürogenital sistemi.....	4
Şekil 2.2. İnsan sperm hücresi anatomisi. ....	5
Şekil 3.1. Elektromanyetik dalga örneği. ....	11
Şekil 3.2. Elektromanyetik spektrum örneği. ....	12
Şekil 3.3. Kızılötesi spektrum bölgesi.....	13
Şekil 3.4. 3000–800 cm <sup>-1</sup> arasındaki biyomoleküler pikleri gösteren tipik biyolojik spektrum örneği.....	14
Şekil 3.5. Diatomik bir molekülün temel titreşim hareketleri. ....	15
Şekil 3.6. FTIR spektroskopi temel çalışma prensibi.....	16
Şekil 3.7. Kızılötesi radyasyonun ATR-FTIR kristalinde iç yansıma örneği.....	18
Şekil 4.1. Semen numunelerinin cam pipet yardımıyla kumaşlara damlatılması...	20
Şekil 4.2. Pamuk kumaş üzerine damlatılmış semen numuneleri. ....	20
Şekil 4.3. Polyester kumaş üzerine damlatılmış semen numuneleri. ....	21
Şekil 4.4. Karma tip kumaş üzerine damlatılmış semen numuneleri. ....	21
Şekil 4.5. İpek kumaş üzerine damlatılmış semen numuneleri. ....	22
Şekil 4.6. Yün kumaş üzerine damlatılmış semen numuneleri. ....	22
Şekil 4.7. Numunelerin saklandığı iklimlendirme kabini.....	23
Şekil 4.8. ATR ünitesine sahip Perkin Elmer Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR spektrometresi. ....	24
Şekil 4.9. ATR-FTIR’da kumaş üzerindeki semen lekesinin analizi. ....	25
Şekil 5.1. Pamuk kumaş üzerindeki semen lekesinin 4000-650 cm <sup>-1</sup> aralığında saat spektrumu.....	27
Şekil 5.2. Pamuk kumaş üzerindeki semen lekesinin tüm zaman noktalarındaki spektrumu. ....	28
Şekil 5.3. Polyester kumaş üzerindeki semen lekesinin tüm zaman noktalarındaki spektrumu. ....	28
Şekil 5.4. Karma kumaş üzerindeki semen lekesinin tüm zaman noktalarındaki spektrumu. ....	29
Şekil 5.5. İpek kumaş üzerindeki semen lekesinin tüm zaman noktalarındaki spektrumu. ....	29

<b>Şekil 5.6.</b> Yün kumaş üzerindeki semen lekesinin tüm zaman noktalarındaki spektrumu.....	30
<b>Şekil 5.7.</b> Kumaş türlerindeki 4. saat semen lekelerinin ATR-FTIR spektrumu. ...	30
<b>Şekil 5.8.</b> Pamuk kumaş üzerindeki semen lekesine ait 24. saat spektrumun ön işlemlerden önceki (A) ve ön işlemlerden sonraki (B) hali. ....	31
<b>Şekil 5.9.</b> Farklı kumaş türlerinde 8 hafta boyunca analiz edilen semen lekelerinin temel bileşen analizi sonuçları. ....	32
<b>Şekil 5.10.</b> Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 3 gün arasındaki PLSR modeli. ....	35
<b>Şekil 5.11.</b> Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin 3 gün – 7 gün arasındaki PLSR modeli. ....	36
<b>Şekil 5.12.</b> Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin 1 hafta – 4 hafta arasındaki PLSR modeli. ....	36
<b>Şekil 5.13.</b> Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 hafta – 8 hafta arasındaki PLSR modeli. ....	37
<b>Şekil 5.14.</b> Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 8 hafta arasındaki PLSR modeli. ....	37
<b>Şekil 5.15.</b> Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 3 gün arasındaki PLSR modeli. ....	38
<b>Şekil 5.16.</b> Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin 3 gün – 7 gün arasındaki PLSR modeli. ....	39
<b>Şekil 5.17.</b> Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin 1 hafta – 4 hafta arasındaki PLSR modeli. ....	39
<b>Şekil 5.18.</b> Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 hafta – 8 hafta arasındaki PLSR modeli. ....	40
<b>Şekil 5.19.</b> Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 8 hafta arasındaki PLSR modeli. ....	40
<b>Şekil 5.20.</b> Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 3 gün arasındaki PLSR modeli.....	41
<b>Şekil 5.21.</b> Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin 3 gün – 7 gün arasındaki PLSR modeli.....	42

<b>Şekil 5.22.</b> Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin 1 hafta – 4 hafta arasındaki PLSR modeli.....	42
<b>Şekil 5.23.</b> Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 hafta – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.....	43
<b>Şekil 5.24.</b> Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.....	43
<b>Şekil 5.25.</b> İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 3 gün arasındaki PLSR modeli.....	44
<b>Şekil 5.26.</b> İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin 3 gün – 7 gün arasındaki PLSR modeli.....	45
<b>Şekil 5.27.</b> İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin 1 hafta – 4 hafta arasındaki PLSR modeli.....	45
<b>Şekil 5.28.</b> İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 hafta – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.....	46
<b>Şekil 5.29.</b> İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.....	46
<b>Şekil 5.30.</b> Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 3 gün arasındaki PLSR modeli.....	47
<b>Şekil 5.31.</b> Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin 3 gün – 7 gün arasındaki PLSR modeli.....	48
<b>Şekil 5.32.</b> Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin 1 hafta – 4 hafta arasındaki PLSR modeli.....	48
<b>Şekil 5.33.</b> Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 hafta – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.....	49
<b>Şekil 5.34.</b> Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.....	49
<b>Şekil 6.1.</b> Semen lekesinin ATR-FTIR spektrumundaki majör piklerin tanımlanması. .....	52

**TABLolar**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 5.1.</b> Kumaş türlerine göre semen lekelerinin spektrumlarına bağlı PLSR modellerinin zaman aralıklarına göre karşılaştırması. ....	34
<b>Tablo 6.1.</b> Semen lekesinin ATR-FTIR spektrumundaki majör piklerin tanımlanması ve titreşimin kaynağı .....	51

## GİRİŞ

Adalet Bakanlığı Adli Sicil ve İstatistik Genel Müdürlüğü verilerine göre 2019 yılı içerisinde toplam 49057 adet cinsel dokunulmazlığa karşı suç işlendiği görülürken, bunların %46,3'ünü Türk Ceza Kanunu'nun (TCK) 103. maddesine göre "Çocukların Cinsel İstismarı", %32,3'ünü TCK 105. maddesine göre "Cinsel Taciz", %18,1'ini TCK 102. maddesine göre "Cinsel Saldırı" ve %3,3'ünü de TCK 104. maddesine göre "Reşit Olmayanla Cinsel İlişki" suçu oluşturmaktadır (1). Olay yerinde sıklıkla kan, semen, vajinal sekresyon ve tükürük gibi kanıt niteliği olabilecek vücut sıvılarıyla karşılaşmaktadır ve bu sıvılar adli soruşturmanın seyri açısından büyük bir öneme sahip olabilmektedir. Cinsel saldırı ve cinsel istismar gibi suçlarda ise en güvenilir vücut sıvısı semendir. Semen hem cinsel saldırıyı doğrulamak, hem şüphelileri tespit etmek, hem de suçun meydana geldiği zaman çerçevesini tahmin etmek için kullanılabilir (2-4). Bu vücut sıvılarının olay yerinde tespiti, vücut sıvısının ait olduğu kişinin kimliği deoksiribonükleik asit (DNA) profillemesi kullanılarak belirlenebileceğinden, önemli adli değere sahiptir. DNA profillemesi tekniğinin geliştirilmesi potansiyel şüphelilerin tespiti ve sorgulanacak kişilerin belirlenmesi açısından soruşturma evresinde önemli bir gelişimi sağlamıştır. Ancak DNA profillemesi tekniğinin olay yerinde tespit edilen vücut sıvılarının kaynağını tespit edememe veya vücut sıvısının olay yerinde ne zaman oluştuğunu belirleyememe gibi kısıtlılıkları mevcuttur.

DNA profillemesi göz önüne alındığında, bazı durumlarda DNA'nın hangi vücut sıvısından kaynaklandığı da DNA profilinin kendisi kadar öneme sahip olabilmektedir. Ancak, olay yerinde karşılaşılan ve DNA profili elde edilebilecek bazı vücut sıvısı lekeleri diğerleri kadar belirgin olmayabilir. Vücut sıvılarının lekelerinin görünürlüklerinin değişken olabilmesi nedeniyle bazı vücut sıvısı lekeleri kolaylıkla birbirlerinden ayırt edilemeyebilirler. Kan karakteristik kırmızı renge sahip olması nedeniyle diğer vücut sıvılarından rahatça ayırt edilebilirken, tükürük, vajinal sekresyon ve semen gibi vücut sıvılarının birbirinden ayrımı benzer renklere sahip olmaları ve görünümlerinin benzer olabilmesi nedeniyle zor olabilmektedir. Göz önünde bulundurulması gereken diğer bir önemli husus ise, suç mahallinde bulunan ve vücut sıvısı lekelerine benzer görünümde olan lekelerin aslında biyolojik olmayan bir kaynaktan gelebileceğidir. Bu sebeple hangi örneğin biyolojik delil olduğunu



anlayabilmek amacıyla olay yerinde ve sonrasında elde edilen numunelere tarama testleri uygulanarak ilgili lekenin ya da numunenin biyolojik kaynaklı bir delil olup olmadığı anlaşılmasına çalışılmaktadır (5). Adli incelemelerde semen lekesinin tespitinde prostatik asit fosfataz gibi tarama testleri ve spermatozoanın gözlenmesi gibi doğrulama testleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Semenolejin antijeninin ve prostat spesifik antijeninin (PSA) tespiti gibi protein temelli immünolojik assayler ile DNA ve ribonükleik asit (RNA) temelli assaylerin yanı sıra Mor Ötesi Görünür Bölge (UV-vis) Spektrofotometresi, Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopi ve Raman spektroskopi gibi yöntemler de vücut sıvılarının tespit ve ayırımında kullanılmaktadır (6-9). Tarama ve doğrulama testlerinin en önemli avantajı, delil niteliği taşımayan numunelerin dışlanarak DNA profili elde edilebilecek uygun biyolojik delillerin saptanması ve böylece gereksiz zaman ve ekonomik kayıpların önlenmesidir.

Vücut sıvılarının yaş tayini adli soruşturmalar için kritik bir öneme sahiptir. Olay yerinde tespit edilen bir biyolojik materyalin ne zaman vücut dışına çıktığının bilinmesi, olayın ne zaman meydana geldiğini çok büyük ölçüde aydınlatabilmektedir. Aksine, bilinen bir olay zamanı ile uyuşmayan vücut sıvısı örnekleri de zaman ve ekonomik kaybın önüne geçebilmek adına inceleme dışı bırakabilmektedir. Vücut sıvılarının yaşının tayin edilebilmesi suç ile ilişkisi olabilecek veya olamayacak kişi listesini daraltabilmekte, potansiyel şüphelilerin mazeretlerini destekleyebilmekte veya çürütebilmekte, vücut sıvısının suçtan önce mi yoksa sonra mı meydana geldiğini gösterebilmektedir. Özellikle mağdurların zihinsel engelli olduğu, görgü tanıklarının olmadığı veya mağdurların hayatta kalmadığı zorlu vakalarda suçun zaman dilimini belirlemek, dolaylı olarak şüphelileri azaltabilmekte ve postmortem interval (PMI) tahminine de katkıda bulunabilmektedir.

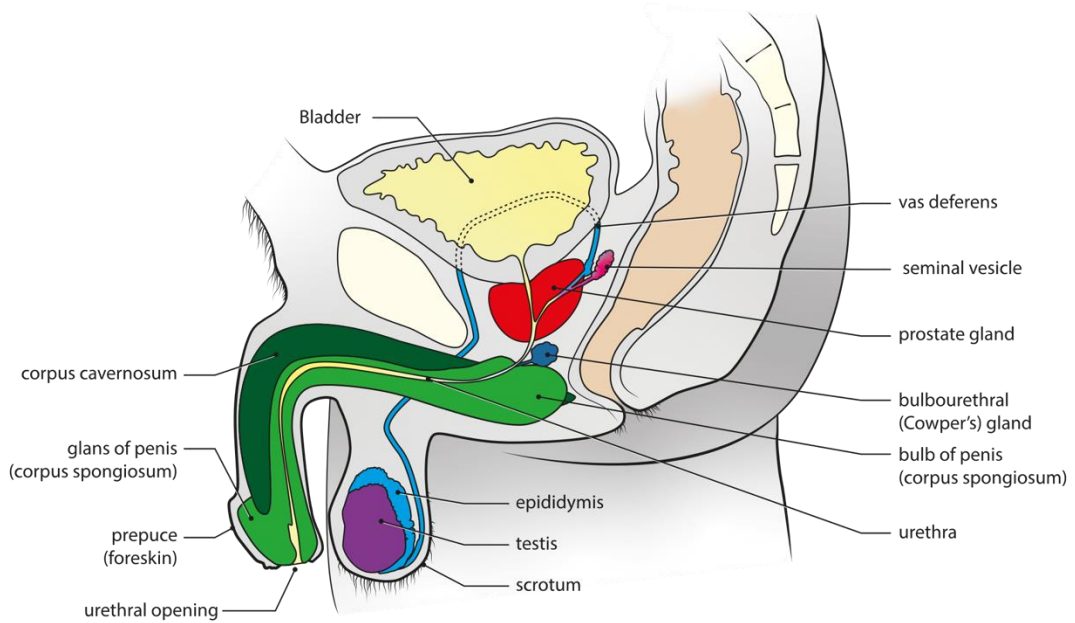
Literatür incelemesi yapıldığında, adli soruşturma açısından böylesine önemli bir konuda semen lekelerinin yaş tayini hakkında kısıtlı ve kapsamlı olmayan az sayıda çalışma bulunduğu görülmüştür. Adli bilimlerde semen lekesi yaşının tayini için rutin bir uygulama olmadığından bu çalışmada farklı kumaş parçaları üzerine damlatılan semen lekelerinin Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) Spektroskopisi kullanılarak oluşturduğu zamanı belirleyebilmek için bir yöntem geliştirmek, spektral veri analizinin doğruluğunu ve kullanılabilirliğini ortaya koyabilmek, 8 haftaya kadar önceden belirlenmiş zaman aralıklarında yaşlandırılmış

semen lekelerinin yaşını belirlemek için ATR-FTIR spektroskopisinin uygulanabilirliğini incelemek, zamanla semen lekesinde ve farklı kumaşlar üzerinde meydana gelen ince spektral farklılıkları tanımlayabilmek, kumaş çeşitleri arasında semen yaşının tahminin etkileyen bir etkileşim olup olmadığını gözlemleyebilmek amaçlanmış olup, elde edilen bu bilgileri tahmin modellerine dönüştürebilmek için güvenilir ve yaygın kullanılan bir yöntem olan kemometri kullanılması planlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

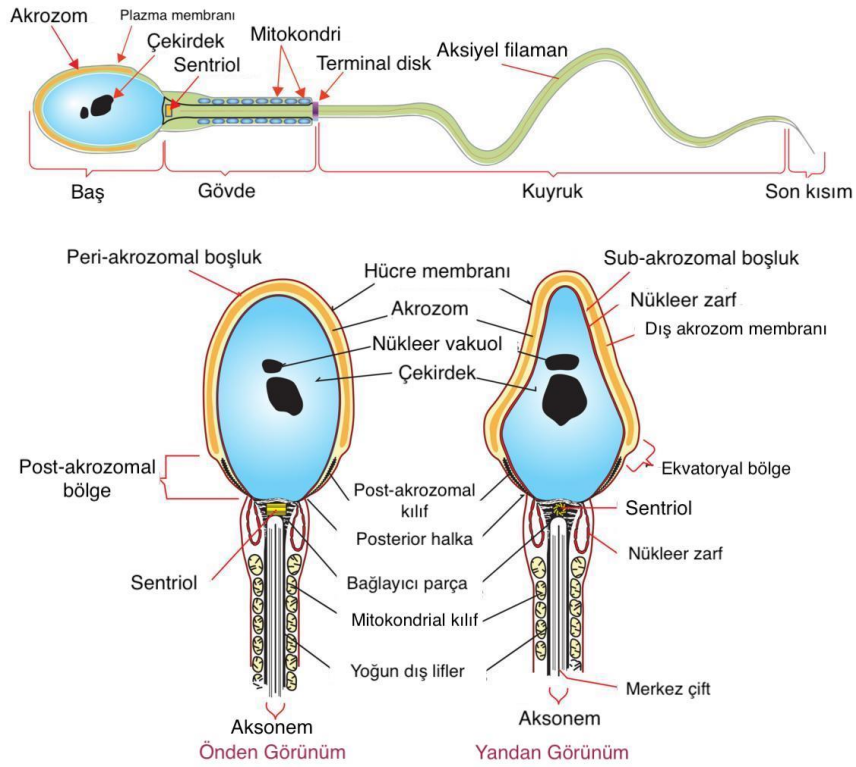
### 2.1. Semen

Semen erkek üreme organlarındaki (Şekil 2.1) seminal vezikül, prostat ve bulboüretal bezler gibi çeşitli bezler tarafından üretilen sıvılardan ve hücrelerden oluşan kompleks bir karışımdır. Dünya Sağlık Örgütü kılavuzuna göre sağlıklı bir erkeğin semen ejakülasyonu ortalama 1,5-5 ml hacminde olup 7,2-8 pH aralığındadır ve yaklaşık 200-500 milyon spermatozoa içermektedir (10, 11).



Şekil 2.1. Erkek ürogenital sistemi (12).

Semenin hücresel kısmı ağırlıklı olarak spermatozoa ya da kısaca sperm denilen bir hücre tipinden oluşmaktadır (Şekil 2.2). Spermatozoa, cinsel üreme için hayati öneme sahip genetik materyali taşıyan üreme hücreleridir. Spermatozoa yapısal olarak; kromozomla dolu çekirdek ve dölleme için gerekli olan enzimleri içeren akrozomal kepe sahip baş bölgesi, hareketlilik için gerekli olan enerjiyi sağlayan mitokondri içeren gövde kısmı ve spermin hareket etmesini sağlayan kuyruk bölgesi olmak üzere üç ana bölgeye ayrılarak incelenebilir (13).



**Şekil 2.2.** İnsan sperm hücresi anatomisi.

Seminal sıvı olarak da bilinen semenin sıvı kısmı kompleks bir yapıya sahiptir ve ejakülasyondan hemen sonra homojen olmadığı kabul edilmektedir (14). Seminal sıvının esas işlevi, ejakülasyondan sonra spermatozoa için koruyucu ve besinden zengin bir ortam sağlamaktır (15). Semen bileşiminin yaklaşık %65-75'ini seminal veziküllerden gelen fruktozdan zengin, sarımsı, viskoz bir sıvı oluşturmaktadır (16, 17). Seminal veziküller semendeki koagülasyon faktörlerinin ve yüksek miktarda bulunan fruktozun salınımından sorumludurlar. Fruktoz semende yaklaşık 272 mg/100 ml konsantrasyonunda bulunmakta olup spermatozoanın enerji ihtiyacının kaynağını oluşturmaktadır. Fruktoza ek olarak 102 mg/100 ml gibi daha düşük konsantrasyonlarda glukoz da enerji ihtiyacı için seminal veziküllerden salınmaktadır (14). Semendeki koagülasyon faktörleri ise ejakülasyondan sonra semeni jelatinöz bir yapı haline getirmekte ve bu sayede spermatozoanın semen içerisinde korunmasını sağlamaktadır.

Semen hacminin yaklaşık %25-30'luk kısmını prostattan gelen spermin, fibrinolizin, fibrinojenaz gibi proteolitik enzimler, albümin, sitrik asit, çinko, asit fosfataz, prostat spesifik antijen ve lipidleri içeren beyazımsı veya şeffaf bir sıvı meydana getirmektedir. Asit fosfataz esas olarak prostat tarafından üretilmekte ve semenin vajina gibi asidik ortamlarla baş edebilmesinde çok önemli bir rol oynayan proteindir. Prostat spesifik antijen ise prostat epitelinin bir ürünü olup ejakülasyon sonrasında koagülasyon proteini semenojelini hidrolize ederek semenin likefiye olmasını sağlamaktadır (13). Albümin, kanda da bulunan suda çözünür bir proteindir. Ancak seminal sıvıda albümin konsantrasyonları kana göre çok daha yüksektir ve seminal sıvı protein içeriğinin yaklaşık üçte birini albümin oluşturmaktadır (14). Albüminin seminal sıvıdaki esas rolü kapasitasyon esnasında sperm zarlarından ayrılan kolesterolü bağlamaktır (18).

Seminal sıvının yaklaşık %5'ini testis ve epididimlerden gelen spermden zengin sıvı, yaklaşık %2-5'ini ise bulboüretal (Cowper's) bezlerden gelen şeffaf renkli müsenden zengin kayganlaştırıcı sıvı oluşturmaktadır.

## **2.2. Adli Semen Yaşı Tayini**

Olay yerinde kan, semen, tükürük gibi çeşitli biyolojik sıvılar ile karşılaşılabilir. Özellikle cinsel saldırı olgularında semen lekесinin depozisyon zamanı ya da vücut sıvısının yaşının tespit edilmesi adli soruşturmanın seyri açısından çok büyük öneme sahiptir. Literatürde semen lekelerinden DNA profillemesi yapan veya semen lekelerinin diğer lekelerden ayrımını tartışan çok sayıda makale bulunurken, yaş tayininde yenilikçi ve yeni yöntemleri tartışan kısıtlı sayıda yayın bulunmaktadır. Bu yayınlardan bazıları RNA degradasyonu ile yaş tayini yöntemlerini tartışırken, bir kısmı da Raman spektroskopisi ile semenin zamanla degradasyonuna odaklanmıştır (6, 19-22).

## 2.2.1. Biyolojik Yaklaşımlar

### RNA Temelli Yaklaşım

Setzer ve arkadaşları, kan, tükürük, semen ve vajinal sekresyonlardan oluşan numuneleri 547 gün boyunca farklı çevresel koşullara maruz bırakmışlardır. 2008 yılında yayımlanan çalışmalarına göre ıslak koşullara maruz bırakılan vücut sıvılarının tümünde total RNA miktarında artış olduğu göstermişlerdir. Semen lekelerinde oda koşullarında 90 güne kadar, ıslak dış ortam şartlarında 1 güne kadar ve kuru dış ortam koşullarında ise 7 güne kadar S15 ribozomal RNA (rRNA) tespit edebilmişlerdir (20).

Simard ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları çalışmada 169 güne kadar kan, tükürük ve semen numunelerini yaşlandırmış, yaptıkları analizlerde kan ve semen numunelerinden yaşlandırma boyunca amplifikasyon için yeterli RNA miktarı elde edilebilmiştir. Çalışmada 29 güne kadar olan semen numuneleri, 56 günden daha fazla yaşlandırılmış semen numunelerinden ayırt edilebilmiştir (21).

Alshehhi ve Haddrill'in 2019 yılında yayımlanan çalışmasında ise 20 gönüllüden aldıkları tükürük ve semen numunelerini doğal yaşlanmayı simule edebilmek için oda sıcaklığında kuru ve karanlık bir ortamda 360 güne kadar bekletmişlerdir. Bu çalışmada her RNA markeri degradasyon davranışı analiz edilmiş ve her numunenin eşsiz bir degradasyon profiline sahip olduğu belirlenmiş, en yüksek stabiliteye ise mikro RNA (miRNA) ve U6 referans geninin olduğu ifade edilmiştir (22).

Yaş tayini için RNA analiz yöntemleri kullanılabilmesine rağmen RNA elde etmede yaşanan zorluklar ve elde edilen RNA'nın yaş tayini için geniş bir aralık sunması gibi kısıtlılıkları bulunmaktadır. Çeşitli çevresel koşulların vücut sıvılarının bütünlüğünü bozduğu ve özellikle dış ortama maruz bırakılan numunelerde RNA tespitinin önemli ölçüde zorlaştığı görülmüştür. Bu da özellikle dış ortamdaki suç mahallerinde bu yöntemin kullanılmasını önemli ölçüde kısıtlamaktadır.

## 2.2.2. Kimyasal Yaklaşımlar

### Enzimatik Temelli Yaklaşım

Jimenez-Verdejo ve arkadaşları 1994 yılında yayımlanan çalışmalarında, değişik koşulların degradasyon ve denaturasyon nedeniyle semen lekelerindeki bazı biyokimyasal parametrelerin stabilitesini etkilediğini ifade etmiş ve optimum şartlar altında semen lekelerinin yaşlarının tayin edilebileceğini ifade etmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada emici doğal bir kumaşa semen numunelerini tatbik ettikten sonra 3 farklı sıcaklıkta (5°C, 18-25°C, 38°C) 6 aya kadar muhafaza etmişlerdir. Daha sonra numunelerde gama glutamil transferaz (GGT), laktat dehidrogenaz (LDH), prostatik asit fosfataz (PAP) ve p30 veya PSA bakmışlar ve GGT'yi semen lekelerinin yaşını tahmin etmede en bilgilendirici parametre olarak tespit etmişlerdir. GGT her üç saklama koşulunda da 6 boyunca stabil olarak kalmış, diğer markerlerin ise buzdolabı koşullarında stabilken oda sıcaklığında ve 38°C'de stabil olmadığı saptanmıştır. Böylece çalışmaları saklama şartlarının markerların stabilitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

### Floresans Spektroskopisi

Protein ve lipid karışımlarının parmak izi bölgelerinde kimyasal reaksiyonlar gözlenmektedir. Achetib ve arkadaşları da 2019 yılında semen gibi başka protein-lipid karışımlarında da bu reaksiyonun gözlenebileceğini, bu reaksiyonu gözlemek için floresans spektroskopisi kullanılabileceğini ve buna bağlı olarak semen yaşının tahmin edilebileceğini öne sürmüşlerdir. Semen lekelerindeki rölatif floresans değişimlerine göre 16 güne kadar olan numunelerde 1,7 gün hata payıyla semen yaşı tahmininin yapılabileceğini ifade etmişlerdir (4).

### Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Kızılötesi spektroskopiler adli analizlerde giderek daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Yöntemin hızlı ve non-destrüktif olması, ayrıca çok az miktarda numune ile çalışabilmesi öne çıkmasını sağlamıştır. FTIR, biyolojik numunelerdeki makromoleküllerdeki değişimi tespit edebildiği ve yüksek sensitiviteye sahip olduğu için alanda önemini daha fazla göstermiştir (23, 24). Zha ve arkadaşları (25) 2019

yılında cam, doku ve selüloz liflerden oluşan kumaş üzerine semen numuneleri damlatmış ve yarım gün arayla 6 güne kadar ATR-FTIR ile analizini gerçekleştirmişlerdir. ATR-FTIR ile gelecekte çeşitli materyaller üzerindeki semen lekelerinde yaş tayini yapmak için yararlı bir araç olabileceğini belirtmişlerdir.



## **FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ**

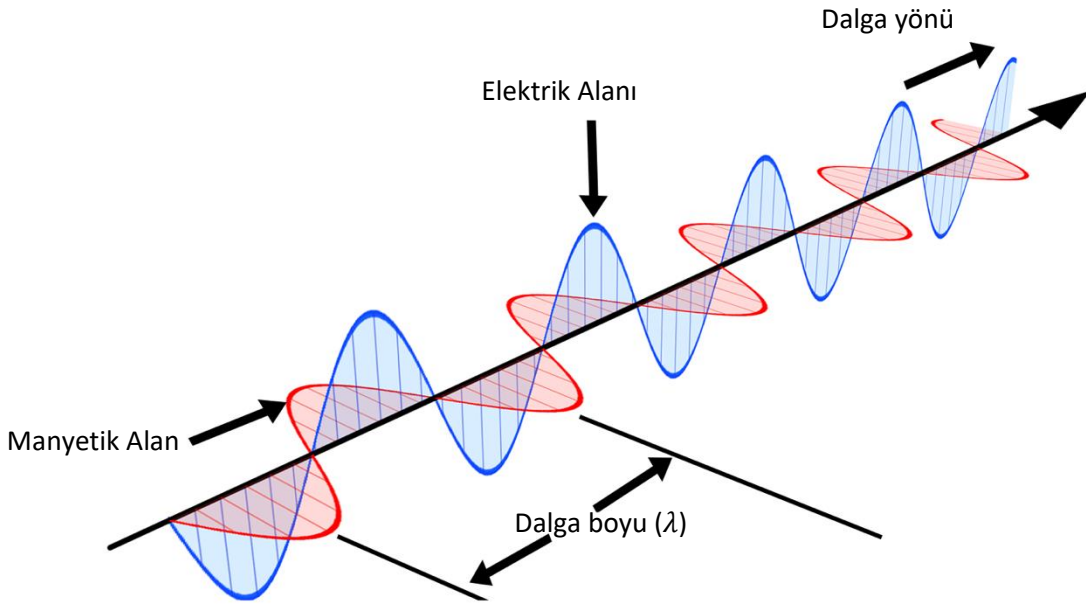
Fourier transform infrared spektroskopi ya da Türkçe adıyla Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi adli bilimler alanında ilaçların, kimyasalların, boyaların ve kumaş liflerinin analizinde rutin olarak kullanılmaktadır.

### **3.1. Titreşim Spektroskopisi**

Spektroskopi, dalga boyuna bağlı olarak elektromanyetik radyasyon ile madde arasındaki etkileşimi inceleyen bir analitik metottur. Bu etkileşimin sonucu olarak spektrum olarak adlandırılan, farklı dalga boylarında farklı pikler ortaya çıkmaktadır. Spektrum, dalga boyunun bir fonksiyonudur ve numuneleri ve bileşenlerini tanımlamak için kullanılmaktadır.

#### **3.1.1. Elektromanyetik Radyasyon**

Elektromanyetik radyasyon, birbirine ve hareket yönüne dik olarak hareket eden elektrik ve manyetik titreşim hareketlerinden oluşan bir enerji şeklidir (Şekil 3.1). Elektromanyetik radyasyon genellikle bir vakumda aynı hızda hareket eden farklı frekans ve boylardaki dalgalar olarak kabul edilmektedir (26).



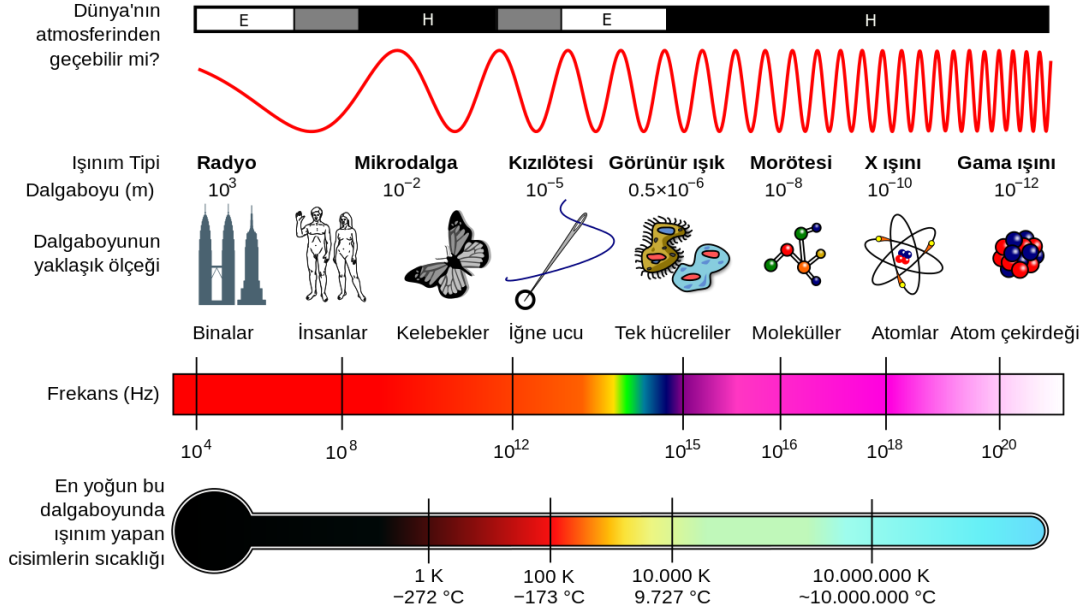
**Şekil 3.1.** Elektromanyetik dalga örneği (27).

Elektromanyetik radyasyon dalgasının dalga boyu ( $\lambda$ ), aynı yöndeki dalgaların tepe noktaları arasındaki mesafedir ve bu aynı zamanda bir tam salınım olarak da tanımlanabilmektedir. Elektromanyetik radyasyon dalgasının frekansı ( $\nu$ ), birim zamanda meydana gelen salınımların sayısını ifade etmektedir ve genellikle  $s^{-1}$  cinsinden Hertz (Hz) ile ifade edilmektedir (26). Elektromanyetik radyasyonun frekansı ile dalga boyu arasındaki ilişki Formül 3.1 ile gösterilmiştir.

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad c: \text{Işık hızı sabiti} \quad (3.1)$$

Elektromanyetik radyasyon dalgalarının dalga sayısı, 1 cm içindeki dalga sayısını ifade ettiği için genellikle  $cm^{-1}$  olarak ifade edilmektedir (26, 28). Elektromanyetik radyasyon, belirli frekanslar ve dalga boylarıyla karakterize edilebilen bir dizi farklı enerjiyi veya dalga boyunu kapsamaktadır. Elektromanyetik radyasyon spektrumu, belirli dalga boyu aralıklarına karşılık gelen mor ötesi (UV), görünür bölge (VIS), kızılötesi (IR), yakın kızıl ötesi (NIR) gibi farklı bölgelere

ayrılmıştır. Bu bölge gruplarını gösteren elektromanyetik spektrum aralığı Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Elektromanyetik spektrum örneği.

Elektronların enerji seviyeleri arasındaki geçiş, elektromanyetik radyasyon dalgası ile madde arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. Molekülün toplam enerjisi Formül 3.2’deki gibi ifade edilebilir:

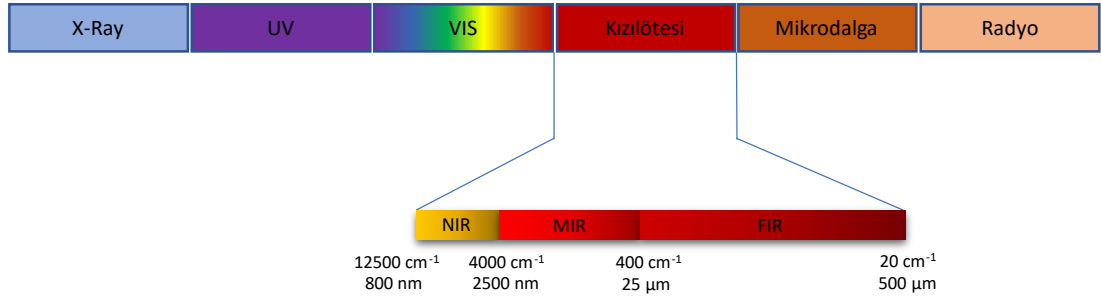
$$E_{moleküler} = E_{elektronik} + E_{titreşim} + E_{dönme} + E_{öteleme} \quad (3.2)$$

Elektronik, rotasyonel ve titreşim spektroskopisi, enerjilerin nicelendirilmesi esasına dayanmaktadır. Elektronik enerji seviyeleri arasındaki geçiş UV absorpsiyonu ile sonuçlanırken, titreşim seviyeleri arasındaki geçiş VIS / IR absorpsiyonu ile, dönme seviyeleri arasındaki geçiş ise mm dalga bölgesi absorpsiyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, kızılötesi spektroskopisi titreşim seviyelerindeki değişiklikleri incelemektedir.

### 3.1.2. Kızılötesi Titreşim Spektroskopisi

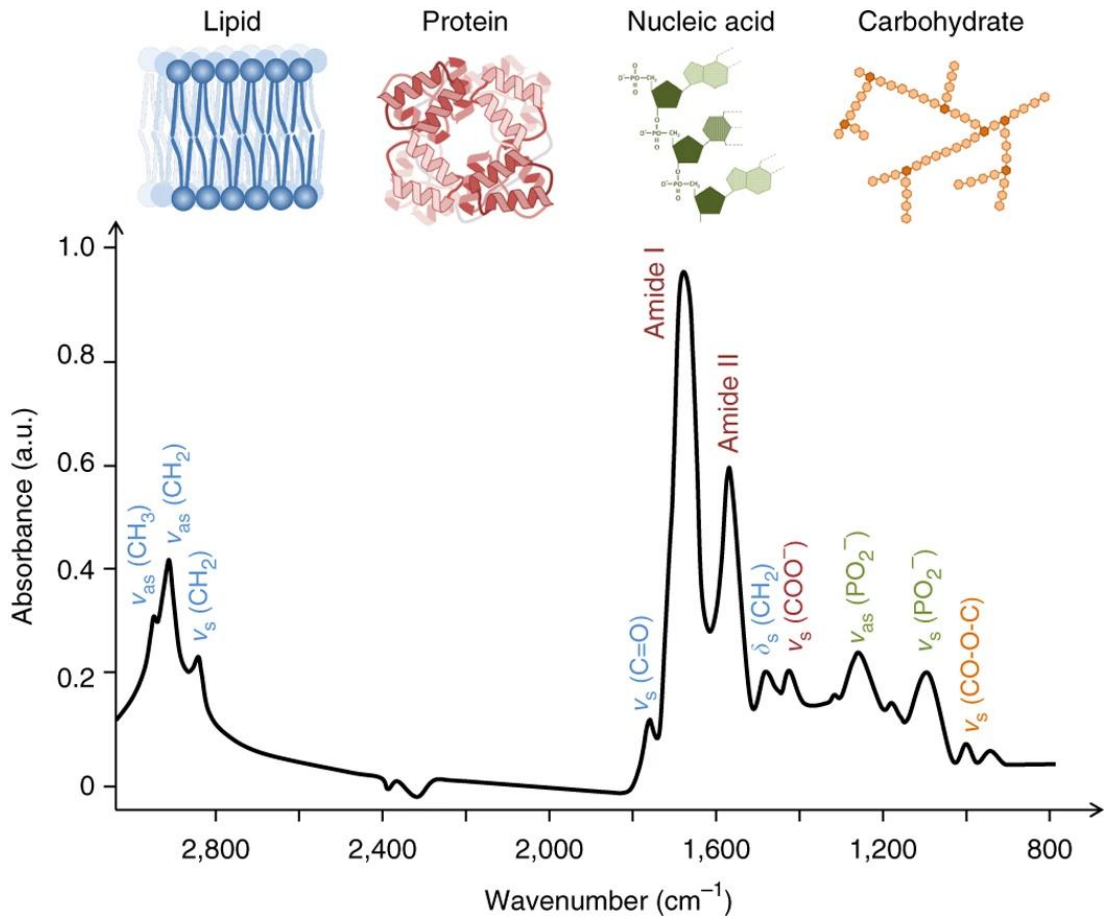
Kızılötesi spektroskopisi, son yıllarda kullanımını artıran en önemli tekniklerden biridir. Herhangi bir haldeki numunelerin (sıvı, toz vb.) numuneye zarar vermeden incelenebilmesi diğer tekniklere göre önemli bir avantaj sağlamaktadır. Kızılötesi spektrometreler 1940'lardan beri piyasada kullanılmaktadır. Fourier Dönüşümünün spektroskopiyeye uyarlanması ile yüksek tarama hızlarına ulaşılarak numunelerin hızlı bir şekilde analizi mümkün hale gelmiştir (26).

Titreşim spektroskopisi Raman spektroskopisi ve FTIR spektroskopisi olmak üzere iki teknik olarak sınıflandırılabilir. Bu tekniklerin her biri, enerjiyi absorbe eden farklı bileşenlerin spektral özelliklerini gözlemlemek için örnekler elektromanyetik spektrumun farklı bölgelerinden gelen ışınları göndermektedirler (29). Raman, elektromanyetik spektrumun görünür (VIS), yakın kızılötesi (NIR) ve ultraviyoleye yakın bölgelerinde tek dalga boyundan meydana gelen monokromatik ışığı kullanırken, FTIR kızılötesi bölgeden gelen ışığı kullanmaktadır (30). Kızılötesi spektroskopisi özellikle kızılötesi ışık gönderildiğinde belirli dalga boylarında veya frekanslarda titreşen kimyasal bağların enerji absorpsiyonlarını tespit etmektedir (29).



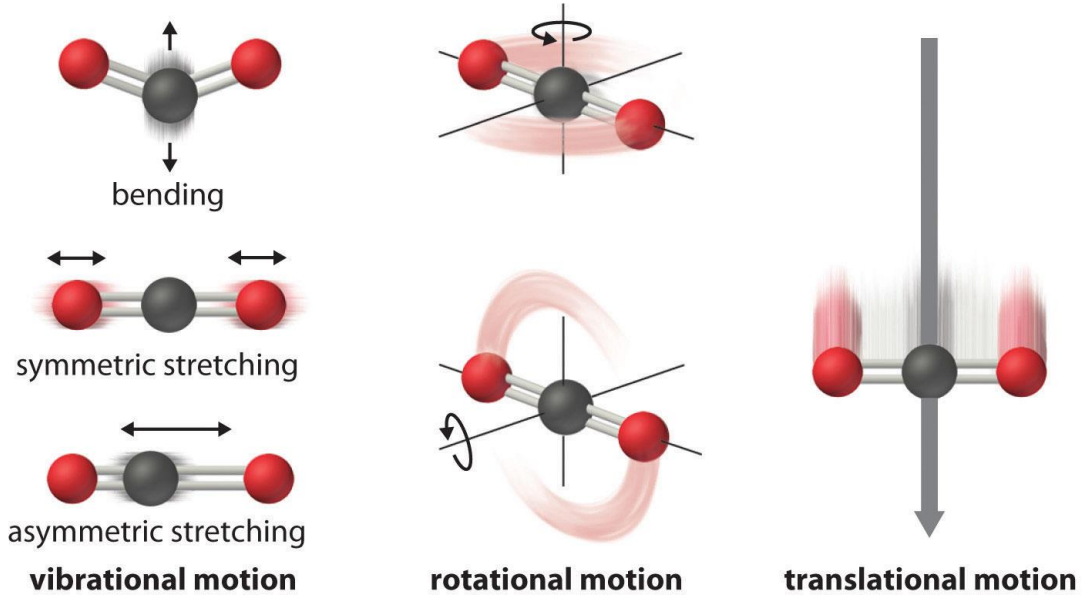
Şekil 3.3. Kızılötesi spektrum bölgesi.

Kızılötesi spektrumları moleküler titreşimler hakkında bilgiler sağlamaktadır.  $0.7 \mu\text{m}$  ile  $1000 \mu\text{m}$  dalga boyuna ( $10 \text{ cm}^{-1}$  -  $10000 \text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı) sahip fotonların oluşturmuş olduğu kızılötesi spektrum bölgesi, dalga boyu ve frekans bakımından yakın kızılötesi (NIR), orta kızılötesi (MIR) ve uzak kızılötesi (FIR) olmak üzere üç bölgeye ayrılmaktadır (Şekil 3.3). En sık kullanılan kızılötesi bölgesi  $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$  aralığı sahip olan MIR bölgesidir. Biyolojik örneklerde en önemli bölgeler; kızılötesi spektrumdaki değişimlere bağlı olarak moleküllerin yapısı ve kendisi tanınabildiği için “parmak izi” bölgesi diye tabir edilen  $1800\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$  bölgesi, Amit I ve Amit II için  $1500\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$  bölgesi ve gerilme titreşimleri (S-H, C-H, N-H ve O-H gibi) için  $2550\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$  bölgesidir (30). Bu bölgeler spektrum üzerinde Şekil 3.4’te gösterilmiştir.



**Şekil 3.4.**  $3000\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$  arasındaki biyomoleküler pikleri gösteren tipik biyolojik spektrum örneği.  $v$  = gerilme titreşimleri,  $\delta$  = bükülme titreşimleri,  $s$  = simetrik titreşimler ve  $as$  = asimetric titreşimler (24).

Kızılötesi spektroskopide, absorpsiyon fonksiyonuna bağlı olarak molekülde farklı titreşim ve dönme hareketleri meydana gelmektedir. Bu hareketler molekülün momentinde net bir değişime neden olarak, farklı moleküllerin birbirlerinden farklı olan bağ uzunluğu, bağ açısı ve molekül simetrisi hakkında, ayrıca molekülün kimyasal ve fiziksel özellikleri olan bağ kuvvetleri, molekül içi ve moleküller arası kuvvetler, molekülün elektronik dağılımı gibi yapısal özellikleri hakkında bilgi vermektedir. N atomdan oluşan bir molekül, 3 boyutlu uzayda  $3N$  hareket serbestliğine sahiptir. 3 öteleme ve 3 dönme titreşimi bulunmaktadır. Bu hareketler Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Böylece bir molekül  $3N-6$  hareket serbestliğine sahip olurken eğer molekül düzlemsel ise bu hareket serbestliği  $3N-5$  olmaktadır (28).



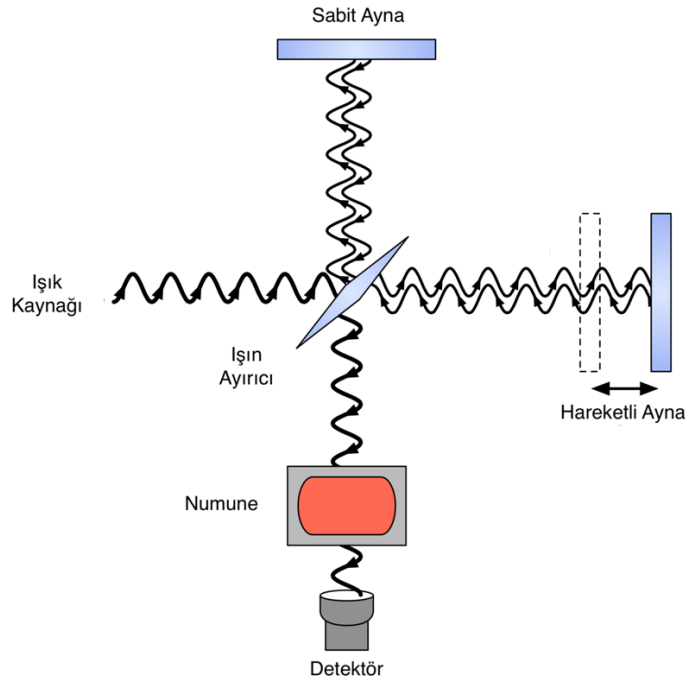
**Şekil 3.5.** Diatomik bir molekülün temel titreşim hareketleri (31).

### 3.1.3. FTIR Enstrümantasyonu

Fourier dönüşümü (FT), 1800'lü yılların başında Jean Baptise Fourier tarafından geliştirilmiş ve günümüz biliminde kullanılan en yaygın matematiksel formüllerden biri haline gelmiştir (32, 33). FT, karmaşık enerji dalgalarını frekans bileşenlerine çevirebilen matematiksel bir işlemdir ve genellikle FTIR

spektroskopisinde olduğu gibi moleküler bileşenlerin titreşimlerinin görselleştirilmesini sağlamak için bilgisayar yazılımı içindeki dijital algoritmalara dahil edilmektedir (33). FT'den önce, spektrometreler ışığı dağıtan ve ardından her dalga boyunu ayrı ayrı algılayan prizmalar ve ızgaralardan oluşmakta iken, daha sonra tüm dalga boylarının interferometreye (girişim ölçer) girip birlikte tespit edilebildiği Michelson interferometre bulduran ve ardından Fourier dönüşümü uygulanarak frekans alanında sonuç veren spektrometreler kullanılmaya başlanmıştır.

FTIR, kızılötesi bölgesinde var olan elektromanyetik ısınların numuneye gönderilmesi sonucu moleküllerde meydana gelen titreşimleri ölçen, oluşan farklı titreşim gruplarının görüntülenmesini sağlayan ve böylece moleküllerin yapıları hakkında bilgi veren bir tekniktir. Bir FTIR spektrometresi temel olarak bir ışık kaynağı, Michelson interferometresi, numune alanı ve bir dedektörden oluşmaktadır. Işık kaynağı olarak genellikle yaklaşık 5 kHz frekansı olan bir helyum-neon (HeNe) lazer kullanılmaktadır. Bu lazer analiz altındaki numunelerdeki titreşim bileşenlerini incelemek için kullanılan kızılötesi radyasyonun da kaynağını oluşturmaktadır. Işık kaynağından gelen ışın, biri sabit, diğeri ise sabit bir hızla ileri geri hareket eden iki ayna ve bir ışın ayırıcıdan oluşan interferometre (Şekil 3.6) ile ikiye ayrılmaktadır (28, 34).



**Şekil 3.6.** FTIR spektroskopi temel çalışma prensibi.

Taramalı (dağıtıcı) spektrometre ile karşılaştırıldığında FTIR spektrometresinin bazı avantajları bulunmaktadır:

- Öncelikle, multipleks ilkesi olarak da bilinen Fellgett avantajı sayesinde ölçümler eş zamanlı şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bu sayede bütün spektrumun hızlı bir şekilde toplanması ve çok sayıda taramanın kısa bir sürede yapılabilmesi sağlanmaktadır. Bu da yüksek sinyal/gürültü oranını (SNR) sağlamaktadır.
- Bir diğer avantajı ise verimlilik avantajı olarak da bilinen Jacquinot avantajıdır. Dispersif tekniklerde enerji verimi yarıkların sayısı ile sınırlanırken, interferometrik teknikte kısa zaman diliminde daha yüksek SNR elde edilebilmektedir.
- Üçüncü avantaj, HeNe lazer tarafından sağlanan her bir tarama için dahili referans olan dalgaboyu doğruluğu veya Connes avantajı olarak bilinmektedir. Bu lazerin dalga boyu iyi bilinmektedir ve bu sayede kalibrasyon, dispersif tekniklere kıyasla çok daha hassas bir şekilde ve uzun süre stabil olacak şekilde yapılabilmektedir.
- Diğer avantajı ise herhangi bir ızgara olmadığı için spektrumda kesinti olmaması olarak sayılabilir (28).

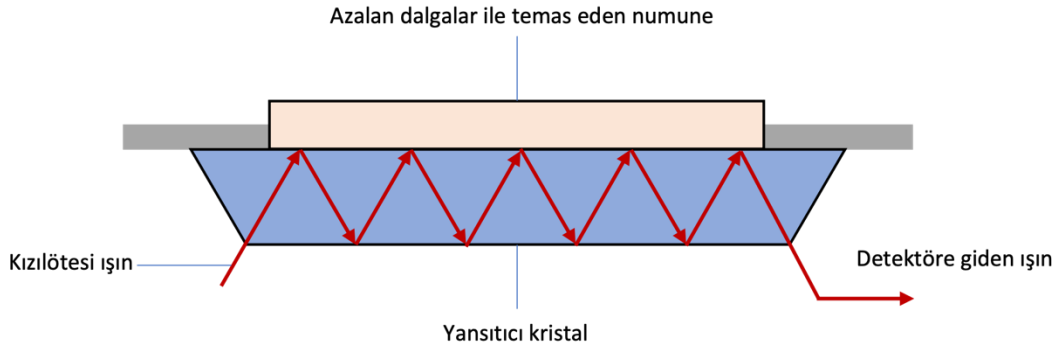
#### **3.1.4. Azaltılmış Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (ATR-FTIR) Spektroskopisi**

Azaltılmış toplam yansıtma FTIR spektroskopisi en yaygın olarak kullanılan spektroskopi tekniği olarak geleneksel tekniği geride bırakmıştır. ATR-FTIR spektroskopi kimya, adli bilimler ve eczacılık gibi pek çok alanda kimyasal ve biyolojik numunelerin analizinde kullanılmaktadır. Klasik FTIR spektroskopinin aksine neredeyse hiç numune hazırlık evresi gerektirmemesi, tekniğin numune üzerinde non-destrüktif olması, in situ ve in vitro analize imkan vermesi, hem kalitatif hem de kantitatif analiz yapılabilmesi nedeniyle ATR-FTIR kullanımını giderek yaygınlaştırmaktadır. Böylece numunelerin katı, yarı katı, sıvı veya bir madde üzerine emdirilmiş olmasına bakılmaksızın analizi mümkün kılmaktadır (28).

ATR-FTIR'da kızılötesi ışını numune üzerine gönderilirken rölatif olarak daha yüksek kırıcılık indeksine sahip bir kristal kullanılmaktadır. Kırıcılık indeksindeki



değişimden dolayı kızılötesi ışını kristalin iç yüzeyinden yansıtır ve azalan bir dalga formasyonu meydana getirir. Meydana gelen bu azalan dalgalar, ATR kristalinin üzerinde temas halinde bulunan numuneye yönlendirilirler (Şekil 3.7). Bu dalgaların enerjisinin bir kısmı numune tarafından absorbe edilirken, bir kısmı da kristal üzerine geri yansıtılmaktadır. ATR, numuneye giden ve numuneden yansıyan bu kızılötesi ışınlardaki değişimi ölçmektedir (28).



**Şekil 3.7.** Kızılötesi radyasyonun ATR-FTIR kristalinde iç yansıma örneği.

ATR ünitesinde germanyum (Ge), silikon/silisyum (Si), elmas (Di) ve çinko-selenit (ZnSe) gibi birçok farklı kristal yansıtıcı olarak kullanılabilir. Seçilecek olan kristal, numune türüne ve kullanılmak istenen IR bölgesine göre tercih edilmektedir (28).

Numuneleri ATR-FTIR spektroskopisi ile analiz ederken, elde edilen spektrumun yalnızca numuneyi temsil etmesi için, numune ile kristal arasında tam temas sağlanmalıdır. Kristal ile teması olan veya kızılötesi ışının nüfuz etme derinliği içinde bulunan herhangi bir yabancı madde veya kontaminant elde edilen spektrumun sonucunu değiştirebilmektedir. Bu sorunun önüne geçebilmek için, pek çok ATR ünitesinde numune ile kristalin tam temasını sağlayarak numuneyi sabitlemek için bir mengene sistemi kullanılmaktadır. Numunenin kristal yüzeyini tam olarak kaplamadığı durumlarda mengene düzeneği de spektrum sonuçlarında interferansa neden olabilmektedir. Bu nedenle ATR ile numune analizi yaparken, numunelerin kristal yüzeyini dolduracak kadar yeterince büyük olduğundan ve kristal ile numunenin yeterince temas ettiğinden emin olunmalıdır (28).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adli Toksikoloji Laboratuvarı'nda Adli Tıp Uzmanlık tezi olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamız, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 29.01.2020 tarihli toplantısında GO 20/121 proje numarasıyla değerlendirilmiş ve 2020/03-32 karar numarasıyla etik açıdan uygun bulunmuştur.

### 4.1. Numunelerin Hazırlanması

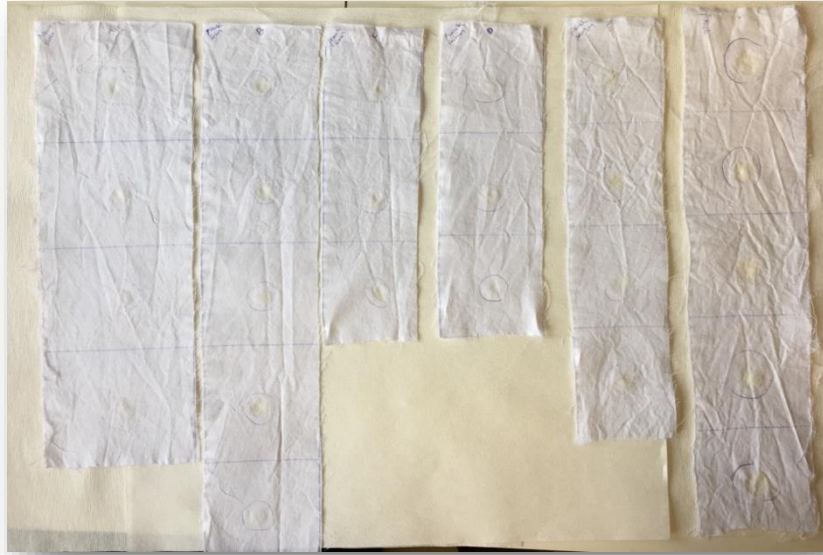
Semen örnekleri yaşları 28 ile 35 arasında değişen altı sağlıklı yetişkin erkek gönüllüden alınmıştır. Rastgele dört gönüllü kalibrasyon grubu için seçilirken, diğer iki gönüllü eksternal validasyon grubu için seçilmiştir. En az 3 günlük cinsel perhize sahip gönüllülere çalışmanın amaçlarından bahsedilerek yazılı bir aydınlatılmış onam formu imzalatılmış ve gönüllülere kapaklı steril kap verilerek masturbasyon yoluyla meni vermeleri istenmiştir.

Olay yerinde sıklıkla karşılaşılan depozisyon ortamları arasında olan kumaş türlerini simüle etmek amacıyla %100 pamuklu kumaş, %100 polyester kumaş, %65 pamuk / %35 polyesterden oluşan karma tip kumaş, %100 ipek kumaş ve %100 yün kumaş türleri seçilmiştir. Semen lekelerinin kumaş üzerine depozisyonundan önce, kumaş üzerindeki muhtemel kalıntıları gidermek amacı ile kumaşlar iki saat saf su, iki saat de metanol içerisinde bekletilip oda sıcaklığında kendiliğinden kurumaya bırakılmıştır.

Gönüllülerden alınan semen numuneleri, 3x3 cm karelere ayrılmış her bir kumaş türü üzerine her gönüllüden en az 3 farklı damla olacak şekilde cam pipet yardımıyla 50 µl damlatılmıştır (Şekil 4.1-4.6). Kalibrasyon grubunun semen örneklerinin damlatılmış olduğu kumaşlar, analiz için geçen süreler dışında numunelerde sabit sıcaklık ve nem ortamını sağlamak amacıyla sıcaklık 23°C, ışık 10000 lux ve nem %40 olacak şekilde Anabilim Dalımızda bulunan Mikrotest® MIT 120 İklimlendirme Kabini (Şekil 4.7) içerisinde tutulmuştur. Eksternal validasyon grubundaki numuneler ise havalandırması bulunan ve sıcaklığı (13-27°C) ile nem oranı (%35-80) sabit tutulmayan bir odada bekletilmiştir.



**Şekil 4.1.** Semen numunelerinin cam pipet yardımıyla kumaşlara damlatılması.



**Şekil 4.2.** Pamuk kumaş üzerine damlatılmış semen numuneleri.



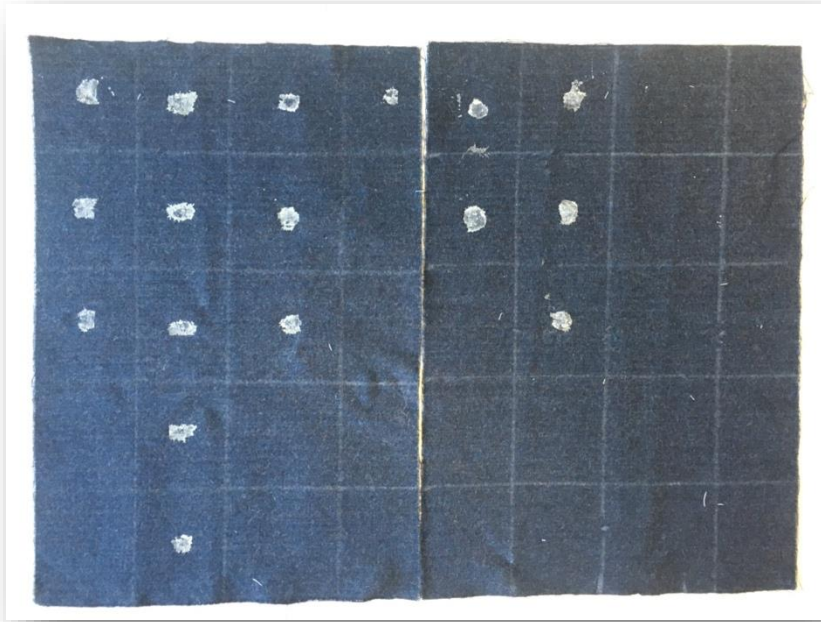
**Şekil 4.3.** Polyester kumaş üzerine damlatılmış semen numuneleri.



**Şekil 4.4.** Karma tip kumaş üzerine damlatılmış semen numuneleri.



**Şekil 4.5.** İpek kumaş üzerine damlatılmış semen numuneleri.



**Şekil 4.6.** Yün kumaş üzerine damlatılmış semen numuneleri.

Semen damlatılmış kumaş örneklerinde 4 (0,17 gün), 12 (0,5 gün), 24 (1 gün), 36. (1,5 gün) saatlerde, 2, 3, 4, 5, 6, 7. günlerde, 2 (14 gün), 3 (21 gün), 4 (28 gün), 5 (35 gün), 6 (42 gün), 7 (49 gün) ve 8. (56 gün) haftalarda toplam 17 farklı zaman noktasında ATR-FTIR spektroskopisi ile ölçümler gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 4.7.** Numunelerin saklandığı iklimlendirme kabini.

#### **4.2. Spektral Verilerin Toplanması**

Belirlenmiş zaman noktaları gelen semen lekeli pamuk, polyester, ipek, karma ve yün kumaş numuneleri iklimlendirme kabininden çıkarıldıktan sonra numunelere herhangi bir ön hazırlık işlemi yapılmadan doğrudan “Universal ATR Sampling Accessory” ünitesine sahip Perkin Elmer Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR (Şekil 4.8) spektrometresinin elmas kristalinin üzerine yerleştirilmiştir. Numune spektrumları sabit basınç altında  $4000-650\text{ cm}^{-1}$  spektrum aralığında  $4\text{ cm}^{-1}$  çözünürlükte 4 tarama sayısı ile Spectrum 10.5.4 (Perkin Elmer Inc., Norwalk, CT, ABD) yazılımı kullanılarak elde edilmiştir.





**Şekil 4.8.** ATR ünitesine sahip Perkin Elmer Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR spektrometresi.

Her zaman noktasında 6 farklı gönüllünün örneklerinden, numunenin farklı yerlerinden olmak üzere 3 spektrum elde edilmiş ve bu spektrumların ortalaması alınmıştır. Kumaş farklılıklarının semen lekesi üzerine etkisini ortadan kaldırmak için kumaşın semen lekesi olmayan boş bir bölgesinden arka plan (background) spektrumu alınmış ve elde edilen bu spektrum semen lekeli kumaş spektrumundan yazılım yardımıyla otomatik olarak çıkartılmıştır. Bu işlem her farklı örneğe geçişte tekrarlanmıştır. Numuneler arasında çapraz kontaminasyonu engellemek amacıyla her bir numune analizi öncesinde ve sonrasında numune konulan yüzey metanol ile silinmiş ve kuruması beklenmiştir.



**Şekil 4.9.** ATR-FTIR’da kumaş üzerindeki semen lekesinin analizi.

### 4.3. Spektral Verilerin Ön İşlemden Geçirilmesi

Ölçümlerden elde edilen numunelere ait ham spektrum verileri incelenmiş ve aynı numuneye ait alınan ölçümlerin ortalaması alınmıştır. Daha sonra spektrum verileri ön işlemden geçirilmiştir. Ön işlem olarak öncelikle spektrum verilerinde 13 noktalı Savitsky-Golay yumuşatma (smoothing), birim vektör normalizasyonu (unit vector normalization), temel çizgi düzeltmesi (baseline correction) ve 13 noktalı Savitsky-Golay birinci derece türev ön işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çeşitli ön işlem yöntemleri denenerek kemometrik analizlerde en doğru sonucu veren ve herhangi bir spektral veri kaybına yol açmadığı gözlenen bu ön işlem kombinasyonu kullanılmıştır. Tüm işlemler spektroskopide parmak izi (bio-fingerprint) bölgesi olarak tabir edilen  $1800-900\text{ cm}^{-1}$  bölgesinde gerçekleştirilmiştir. Bu bölge protein, lipid, nükleik asit ve şekerler gibi biyomoleküller hakkında çok değerli bilgileri içermektedir (35).

### 4.4. Kemometrik Analizler

Ön işlem basamaklarının ardından spektral verileri analiz etmek ve farklı substratların etkilerini değerlendirmek için temel bileşen analizi (principle component



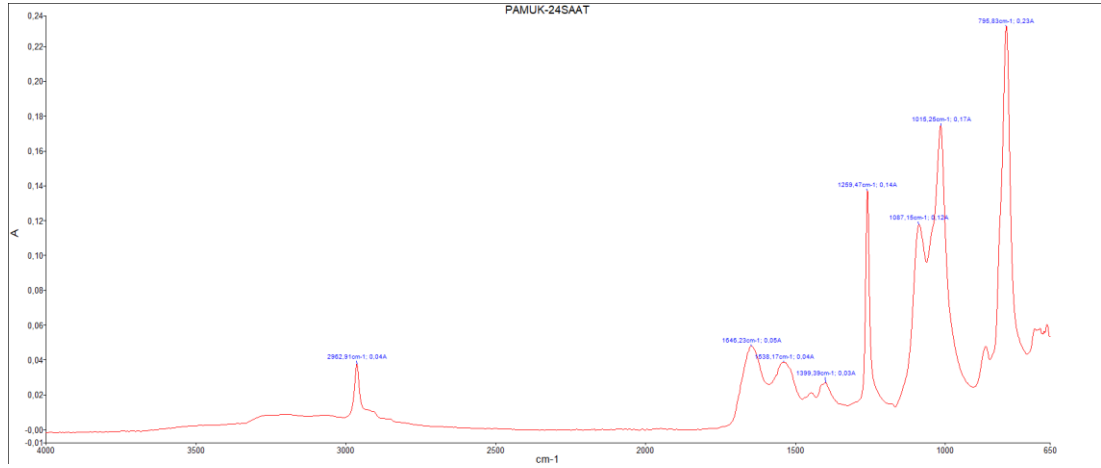
analysis - PCA) ve kısmi en küçük kareler regresyonu (partial least squares regression - PLSR) kullanılmıştır. PCA, bir dizi ilişkili değişkeni çıkaran ve bunları ham spektrumlardan oluşan temel bileşenler (PC) adı verilen daha küçük bir ilişkisiz değişkenler kümesine dönüştüren bir modelleme yöntemidir (36). PCA, özelliklerin boyutunu ve hesaplamaların karmaşıklığını azaltabilmekte, maksimum varyans arayarak daha uygun bir sınıflandırma ve küme analizi yaklaşımı sağlayabilmektedir. PCA sayesinde spektrumların ne kadar benzer veya farklı olduğu görselleştirilebilmektedir. Bu çalışmada, substratların spektral analize karışmamasını sağlamak ve aykırı değerleri belirlemek için spektral veri setleri PCA ile iki boyutlu skor grafiklerine dönüştürülmüştür. Gruplardaki aykırı değerler tespit edilmiş ve yüksek kaldıraç değerleri (leverage values) ve Q kalıntılarına (Q-residuals) sahip 20 anormal numune (toplam örneklemin %1,3'ü) aykırı değer olarak kabul edilmiş ve regresyon modellemesinden önce çalışma dışında bırakılmıştır (37).

PLSR ise, X ve Y değişkenleri arasındaki doğrusal ilişki sayesinde yüksek verime sahip çoklu regresyon modelleri oluşturabilmektedir (36). Bu çalışmada semen lekelerinin yaşı ile ilişkili olan Y değişkenlerinin değerleri, spektral verilen oluşturduğu geniş bir X değişkenleri kümesinden tahmin edilebilmektedir. Modelin optimizasyonu için çok önemli bir adım olan gizli değişkenlerin (latent variables - LV) sayısını belirlemek için, birini dışarıda bırakarak (leave-one-out) çapraz doğrulama (CV) kullanılmıştır. CV'nin kök-ortalama-kare hatası (RMSE) değeri (RMSECV) %5'in altında olacak şekilde en iyi LV sayısı seçilmiştir (38).

PLSR modellerinin değerlendirilmesi için kalibrasyon ve eksternal validasyonda  $R^2$  değerlerinin yanı sıra RMSECV ve tahminlerin RMSE'si (RMSEP) de ayrı ayrı kullanılmıştır. Bu modellemeyi yaparken yüksek  $R^2$  değerine ve düşük RMSE değerine sahip güvenilir bir PLSR modeli bulmak amaçlanmıştır.

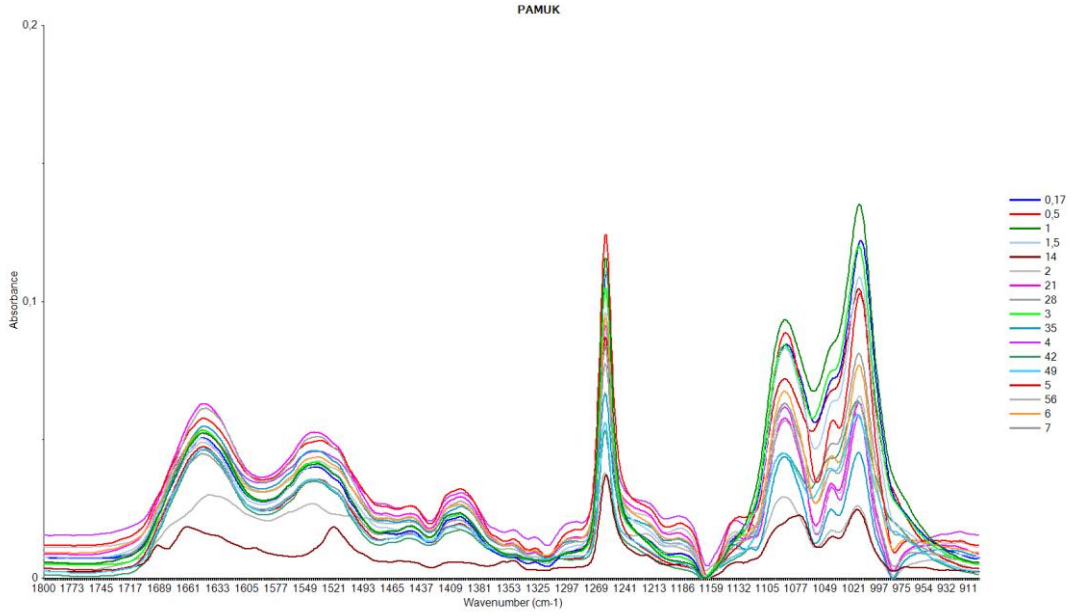
## BULGULAR

Çalışmamızda 6 kişiden toplanan semen numuneleri 5 farklı kumaş türü üzerine en az 3 damla olacak şekilde damlatılmış ve 17 farklı zaman noktasında analiz edilerek toplamda 1530 spektrum elde edilmiştir. Şekil 5.1’de çalışmamızda elde edilen semen spektrumundaki belirgin pikler gösterilmiştir.

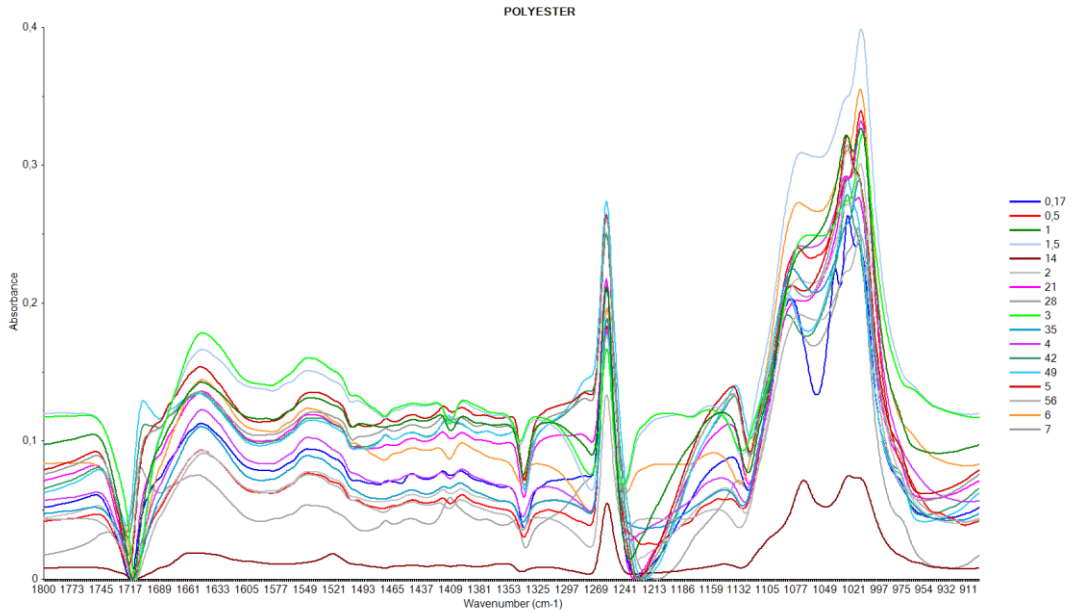


**Şekil 5.1.** Pamuk kumaş üzerindeki semen lekesinin 4000-650  $\text{cm}^{-1}$  aralığında 24. saat spektrumu.

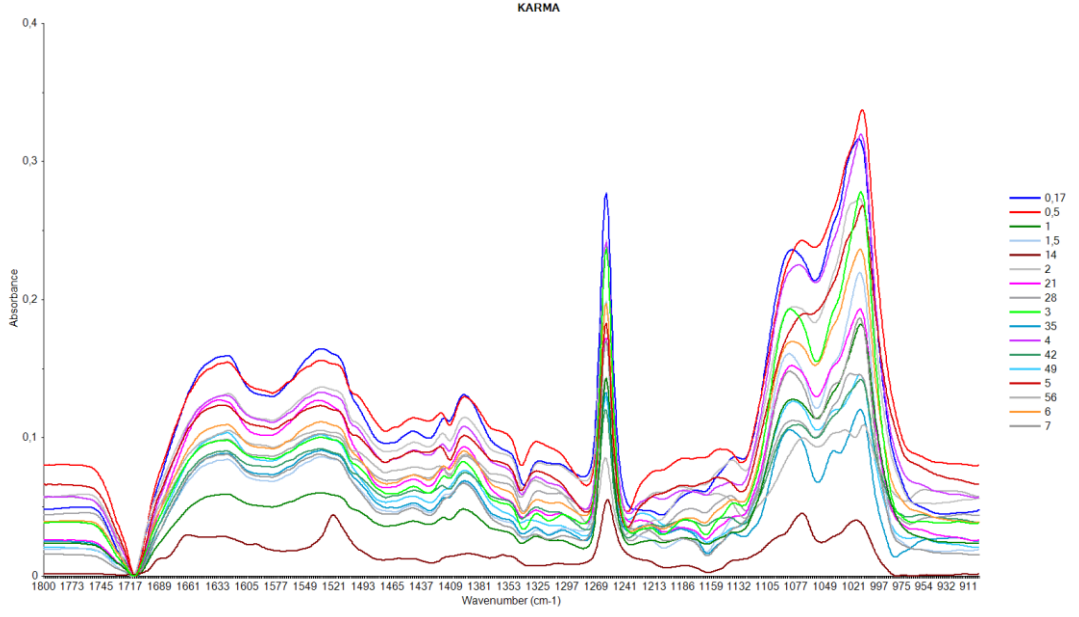
Çeşitli dalga sayısındaki piklerin absorbans değerleri spektroskopide parmak izi bölgesi olarak tabir edilen 1800-900  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde analiz edilmiş ve zamanla değişim olup olmadığı incelenmiştir. Pamuk, polyester, karma, ipek ve yün kumaşlar üzerindeki semen lekelerinin 1800-900  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki spektrumları Şekil 5.2-5.6’da verilmiştir.



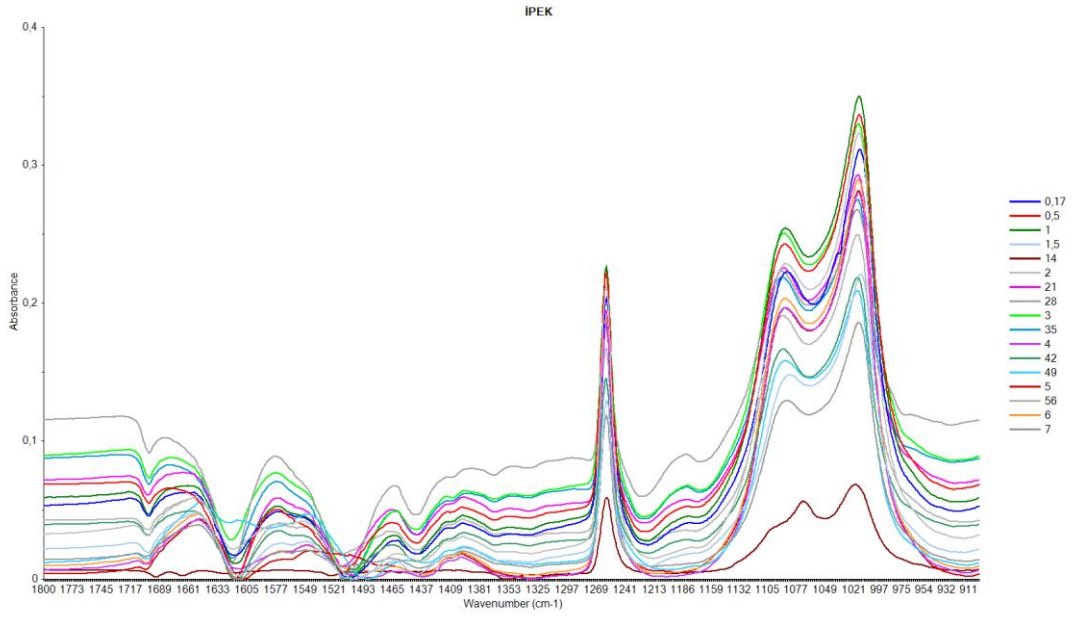
**Şekil 5.2.** Pamuk kumaş üzerindeki semen lekesinin tüm zaman noktalarındaki spektrumu.



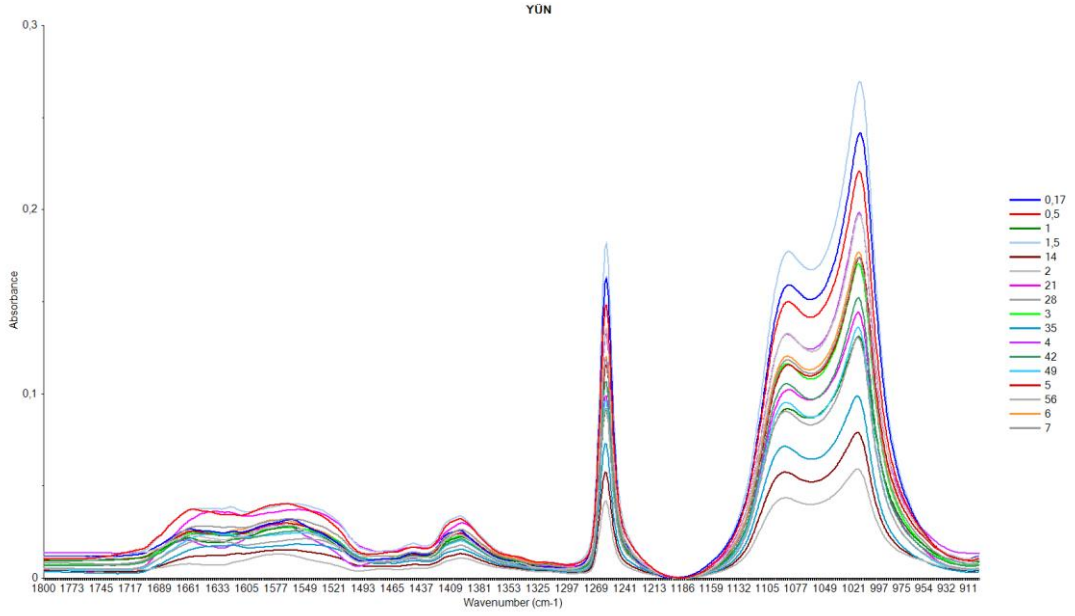
**Şekil 5.3.** Polyester kumaş üzerindeki semen lekesinin tüm zaman noktalarındaki spektrumu.



**Şekil 5.4.** Karma kumaş üzerindeki semen lekesinin tüm zaman noktalarındaki spektrumu.

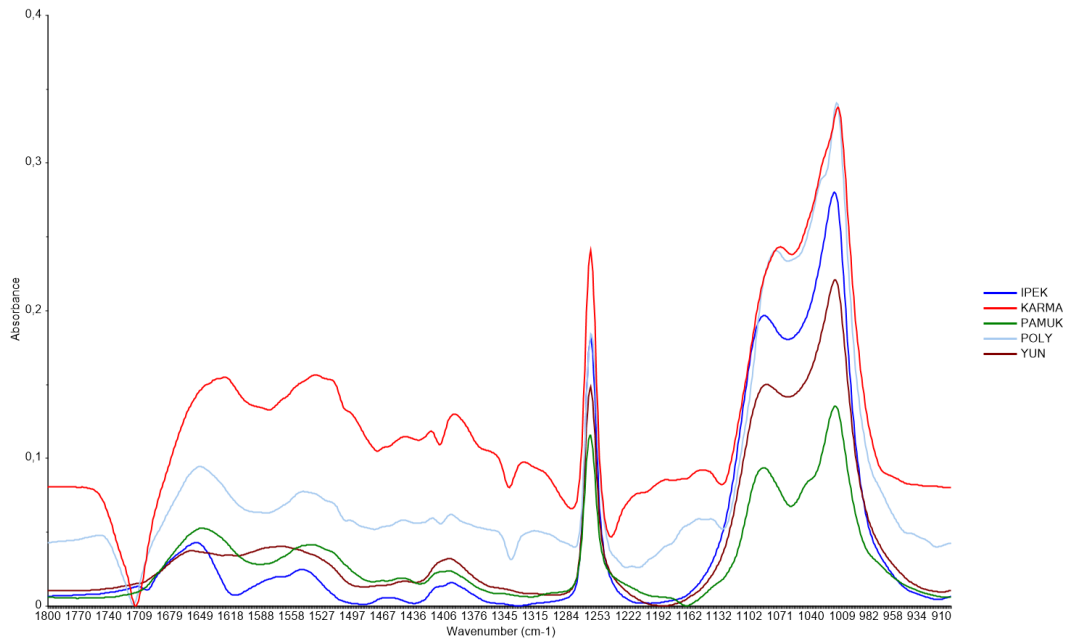


**Şekil 5.5.** İpek kumaş üzerindeki semen lekesinin tüm zaman noktalarındaki spektrumu.



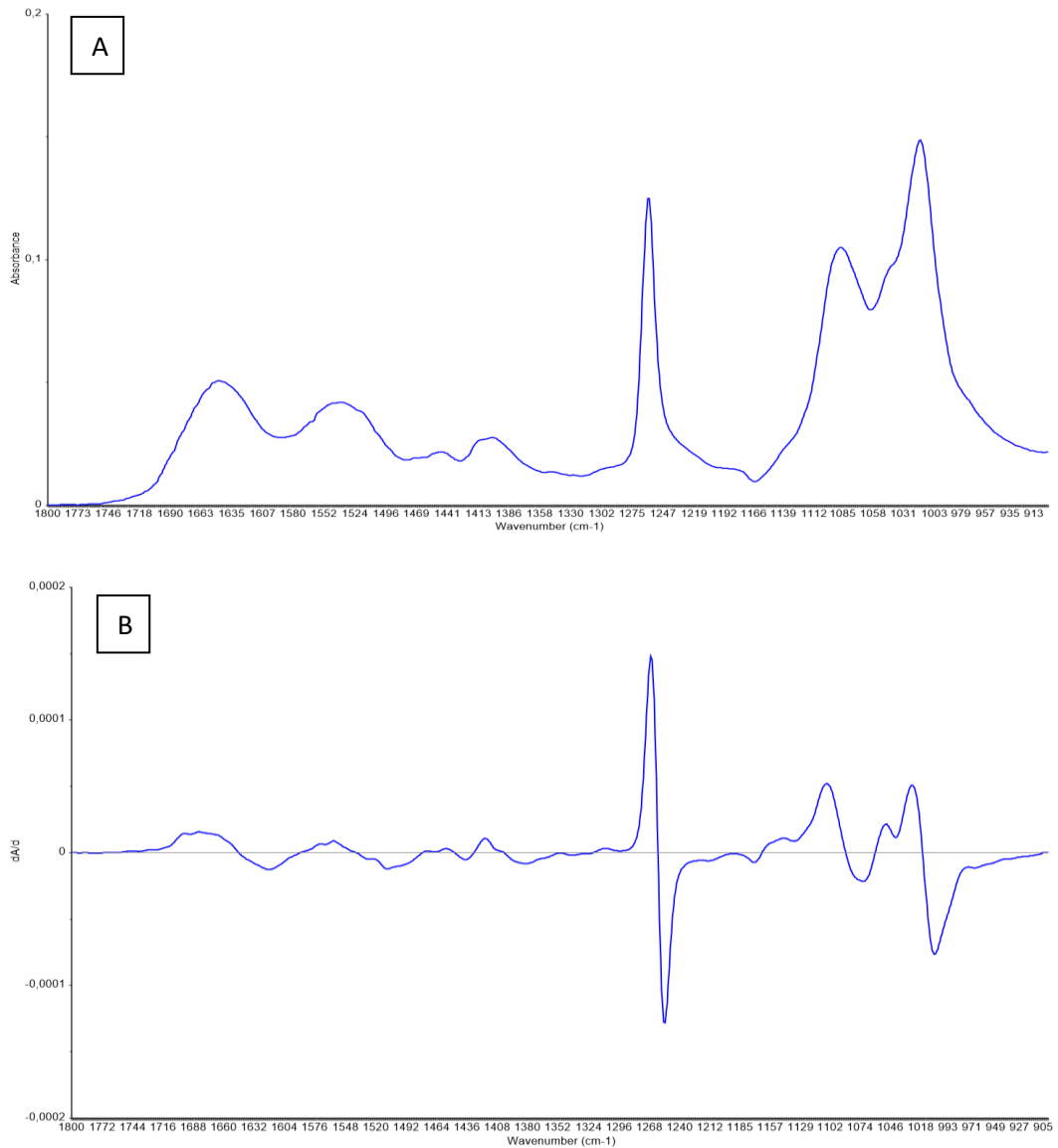
**Şekil 5.6.** Yün kumaş üzerindeki semen lekesinin tüm zaman noktalarındaki spektrumu.

Şekil 5.7’de tüm kumaş türlerinde 4. saatteki (0,17 gün) semen lekelerinin 1800-900  $\text{cm}^{-1}$  aralığında ATR-FTIR spektrumlarının ortalaması gösterilmiştir.



**Şekil 5.7.** Kumaş türlerindeki 4. saat semen lekelerinin ATR-FTIR spektrumu.

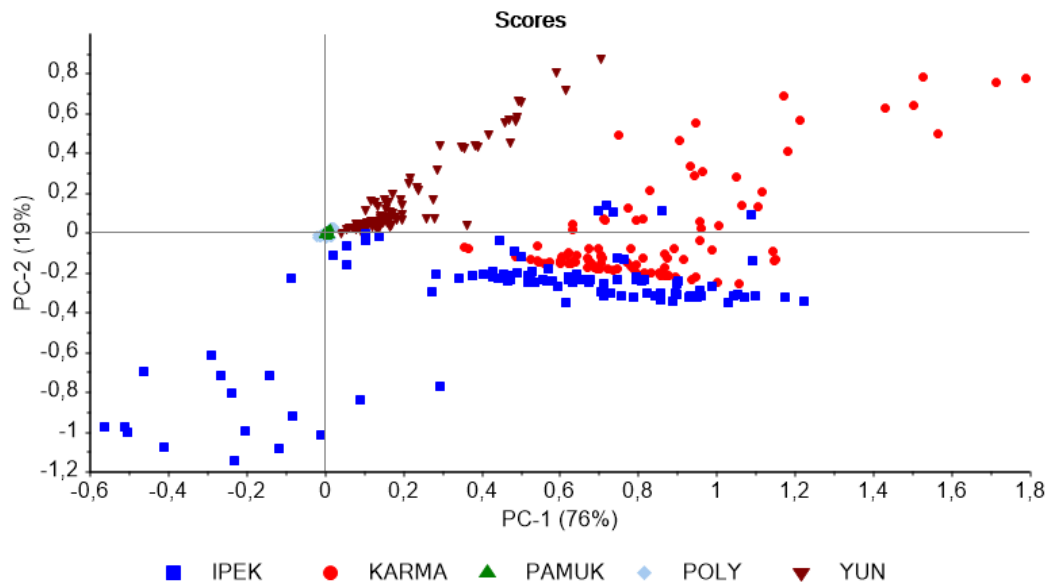
Çalışmamızda semen lekelerinde zamana bağlı olarak semen içerisindeki proteinlerin degradasyonunu ve yapısal değişimlerini belirlemek amacıyla Amit I ve Amit II bölgesini de içine alan parmak izi spektrum bölgesine ek ön işlemler uygulanmıştır. Veri setindeki numunelere ait spektrumun 1800-900  $\text{cm}^{-1}$  bölgesine sırasıyla yumuşatma (smoothing), normalleştirme (normalization), temel çizgi düzeltmesi (baseline correction) ve birinci derece türev ön işlemleri uygulanmıştır. Ön işlemlerden önce ve sonra elde edilen 24. saat pamuk kumaş üzerindeki semen lekesine ait spektrum örneği **Şekil 5.8**'de gösterilmiştir.



**Şekil 5.8.** Pamuk kumaş üzerindeki semen lekesine ait 24. saat spektrumun ön işlemlerden önceki (A) ve ön işlemlerden sonraki (B) hali.

Zaman içerisinde piklerin absorbans değerlerinde değişimlerin olduğu izlenmiştir. Ancak, spektrumlardaki değişimi açıklayabilmek ve yalnızca birkaç pikteki değişikliklere dayanarak semen lekelerinin yaşını tahmin etmek çok verimli olmayabileceği için spektral verilerden daha spesifik bilgi elde etmek amacıyla semen lekelerinin regresyon modelleri ve çok değişkenli kemometrik yöntemler kullanılmıştır. İleri kemometrik analizler ile spektrumdaki piklerin absorbans değerlerindeki değişim incelenmiştir. Yapılan kemometrik analizler sonucunda, tüm kumaş türlerindeki semen lekelerinde zamana bağlı olarak yapısal ve içeriksel değişimlerin olduğu ATR-FTIR spektroskopisi ile gösterilmiştir.

Numunelerin sabit koşullar altında tutulduğunda zamana göre birbirlerinden ayrılıp ayrılmadığını incelemek amacıyla, numunelere ait spektrumlara PCA uygulanmıştır. Bu yöntem sayesinde numunelerdeki spektral değişimlere göre çalışılan örneklem gruplarının sınıflandırılması ve aykırı örneklerin tespit edilerek ileri analizlerde analiz dışı bırakılması sağlanmıştır. Beş farklı kumaş üzerindeki semen lekelerinin 8 haftalık temel bileşen analizi **Şekil 5.9**'da gösterilmiştir.



**Şekil 5.9.** Farklı kumaş türlerinde 8 hafta boyunca analiz edilen semen lekelerinin temel bileşen analizi sonuçları. PC: Principle component (temel bileşen)

8 hafta boyunca analiz edilen semen lekelerin karşılaştırılmış ve %76 ve %19 olmak üzere en yüksek açıklama varyansına sahip iki komponent üzerinden analiz edilmiştir. Temel bileşen analizi toplamda tüm örneklemin %95'ini açıklama varyansına sahiptir. Beş farklı kumaş arasında özellikle karma, ipek ve yünün birbirlerinden rahat şekilde ayrılabilir olduğu izlenmiş olup, aralarındaki varyasyonun bu modelleme için ihmal edilebilir olduğu ve bunların regresyon modellerinin oluşturulmasındaki faktörünün bu çalışmada dikkate alınmayabileceği anlaşılmıştır. Elde edilen PCA sonuçları, semen lekelerindeki makromoleküllerin zamanla değiştiğini ve sonraki regresyon modelleri için etkili bir şekilde kullanılabilceğini göstermiştir.

Temel bileşen analizi sonuçlarına göre aykırı gözlemler çalışma dışı bırakıldıktan sonra PLSR analizine geçilmiş olup, 8 hafta (56 gün) boyunca semen lekelerinin yaş tahmini için regresyon modellerinde parmak izi bölgesinin FTIR spektrumu kullanılmıştır. Her bir kumaş için kendi içerisinde regresyon modelleri oluşturularak modellemenin her kumaş için yeterli sonuç verip vermediği araştırılmıştır. Kumaşlardaki semen lekeleri için gerçekleştirilen PLSR analizi için  $R^2$  ve RMSE değerleri Tablo 5.1'de özetlenmiştir.

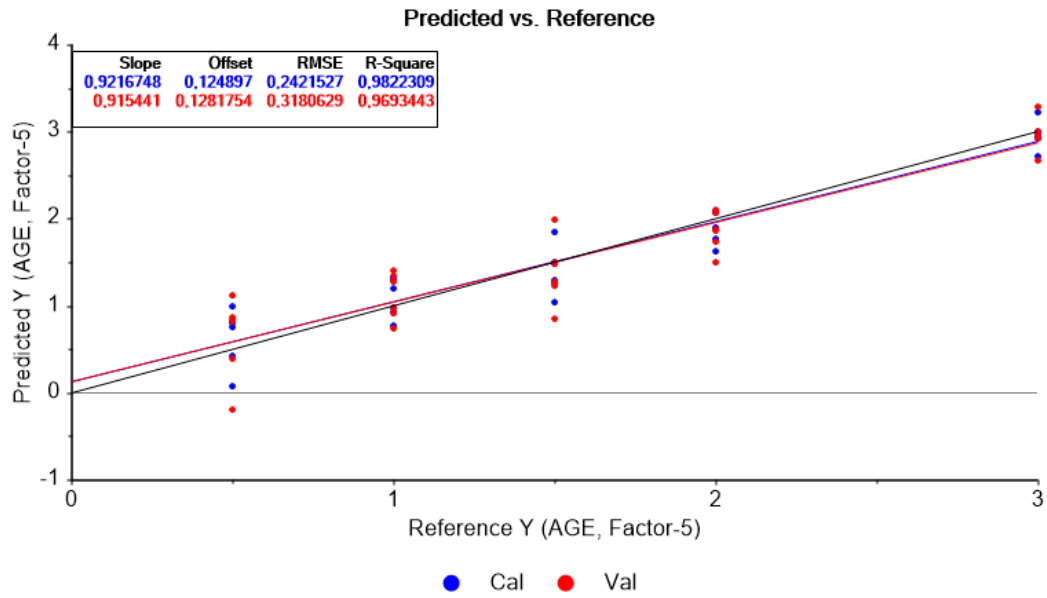


**Tablo 5.1.** Kumaş türlerine göre semen lekelerinin spektrumlarına bağlı PLSR modellerinin zaman aralıklarına göre karşılaştırması.

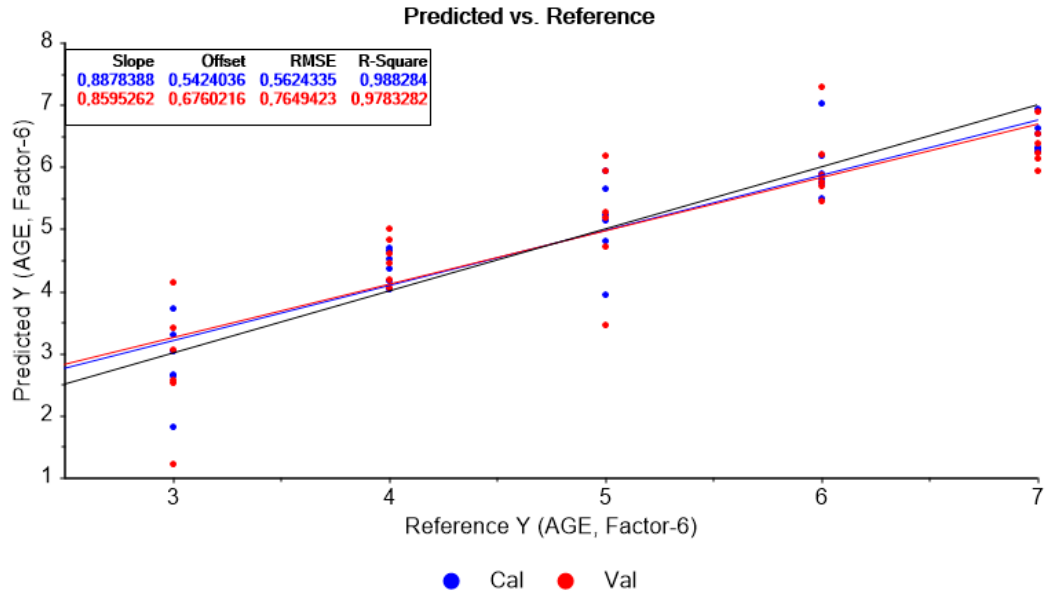
<i>Kumaş Türü</i>	<i>Aralık</i>	<i>Kalibrasyon</i>		<i>Validasyon</i>	
		<i>R<sup>2</sup></i>	<i>RMSECV (gün)</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>RMSEP (gün)</i>
<i>Pamuk</i>	0-3 gün	0,98	0,24	0,97	0,32
	3-7 gün	0,99	0,56	0,98	0,76
	1-4 hafta	0,99	1,62	0,98	2,96
	4-8 hafta	0,99	3,20	0,98	5,42
	0-8 hafta	0,97	4,26	0,95	5,53
<i>Polyester</i>	0-3 gün	1,00	0,03	0,99	0,18
	3-7 gün	0,99	0,57	0,98	0,70
	1-4 hafta	0,98	2,90	0,96	3,96
	4-8 hafta	0,99	4,80	0,98	6,36
	0-8 hafta	0,96	4,61	0,95	5,71
<i>Karma</i>	0-3 gün	0,99	0,16	0,98	0,25
	3-7 gün	0,99	0,39	0,99	0,56
	1-4 hafta	0,99	2,18	0,97	3,69
	4-8 hafta	0,98	5,70	0,98	6,56
	0-8 hafta	0,96	4,65	0,95	5,75
<i>İpek</i>	0-3 gün	0,99	0,17	0,98	0,23
	3-7 gün	0,97	0,83	0,96	1,00
	1-4 hafta	0,98	2,36	0,98	2,93
	4-8 hafta	0,99	3,21	0,99	4,74
	0-8 hafta	0,98	3,51	0,96	4,62
<i>Yün</i>	0-3 gün	0,98	0,22	0,97	0,28
	3-7 gün	0,99	0,49	0,99	0,61
	1-4 hafta	0,99	1,62	0,98	2,66
	4-8 hafta	0,99	3,59	0,98	6,04
	0-8 hafta	0,93	6,31	0,92	6,96

RMSECV: Çapraz validasyonun kök-ortalama-kare hatası; RMSEP: Tahminlerin kök-ortalama-kare hatası.

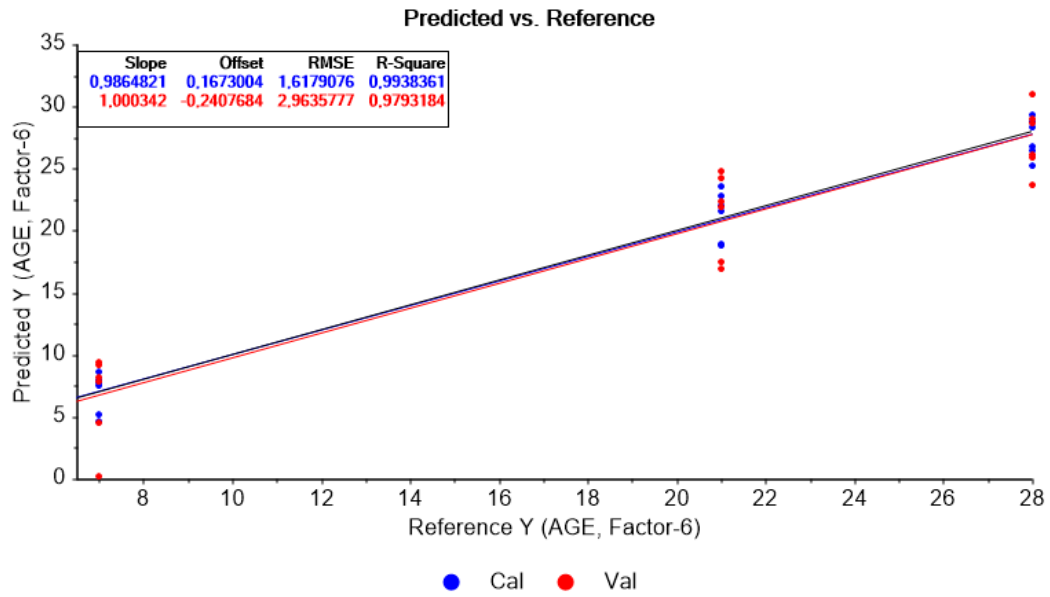
Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin PLSR modelinde kalibrasyon ve validasyon için sırasıyla  $R^2$  değerleri 0-3 gün için 0,98 ve 0,97 olduğu, 3-7 gün için 0,99 ve 0,98 olduğu, 7-28 gün için 0,99 ve 0,98 olduğu, 28-56 gün için 0,99 ve 0,98 olduğu, 0-56 gün için 0,97 ve 0,95 olduğu bulunurken, RMSE değerleri 0-3 gün için 0,24 ve 0,32 gün olduğu, 3-7 gün için 0,56 ve 0,76 gün olduğu, 7-28 gün için 1,62 ve 2,96 gün olduğu, 28-56 gün için 3,20 ve 5,42 gün olduğu, 0-56 gün için 4,26 ve 5,53 gün olduğu saptanmıştır (Şekil 5.10-14).



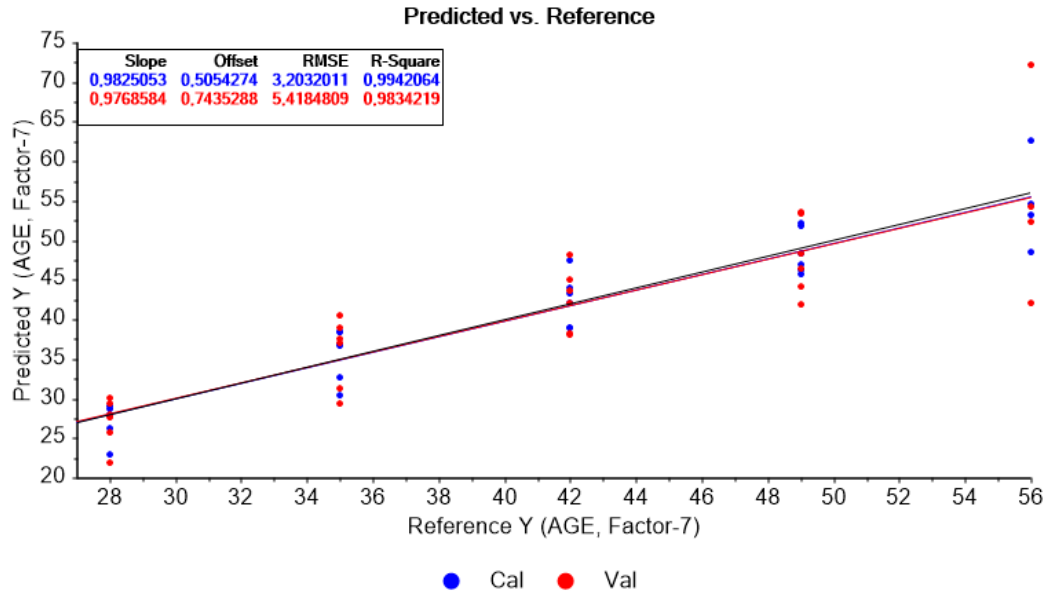
**Şekil 5.10.** Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 3 gün arasındaki PLSR modeli.



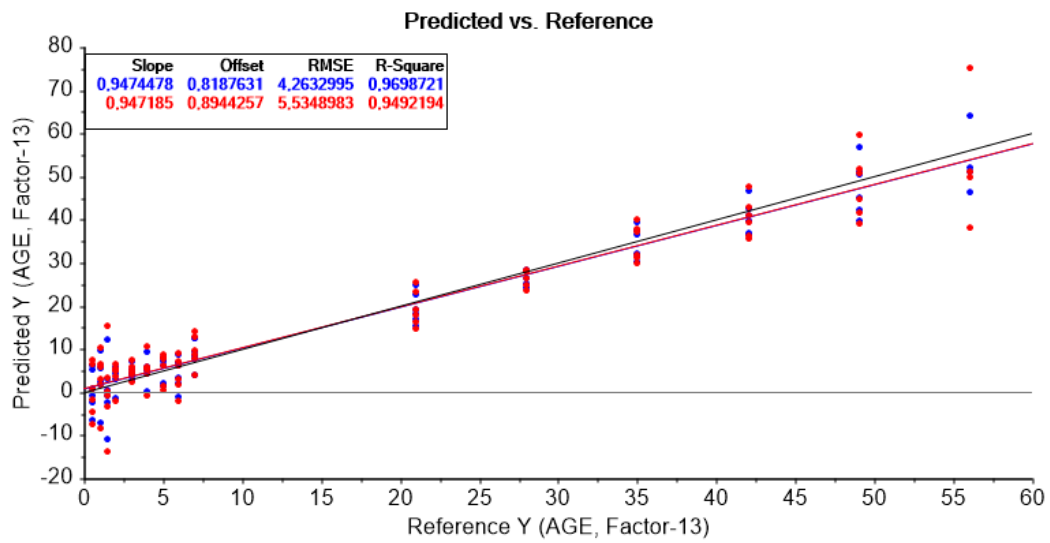
**Şekil 5.11.** Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin 3 gün – 7 gün arasındaki PLSR modeli.



**Şekil 5.12.** Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin 1 hafta – 4 hafta arasındaki PLSR modeli.

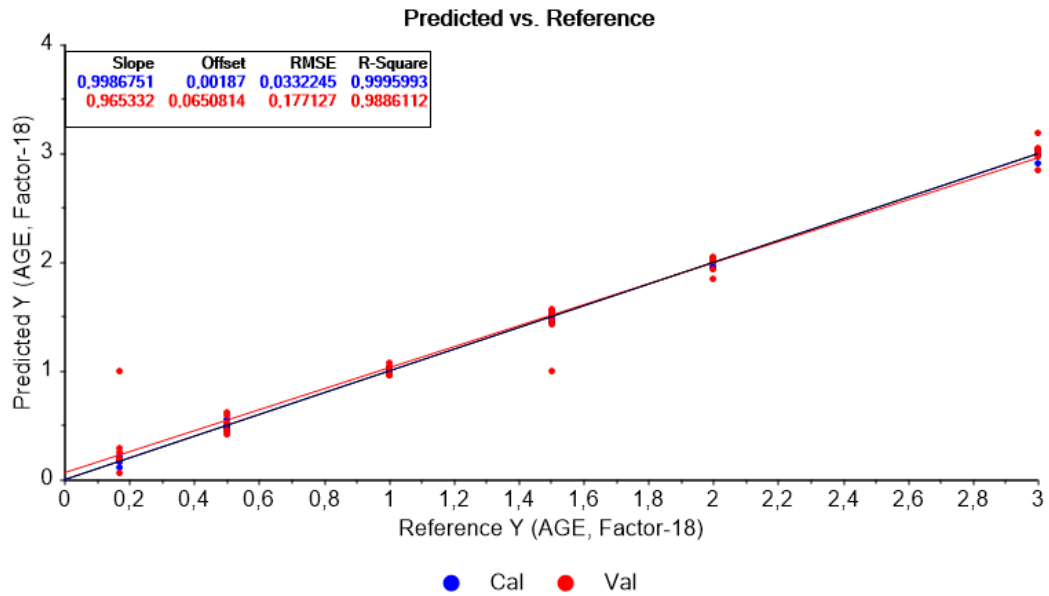


**Şekil 5.13.** Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 hafta – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.

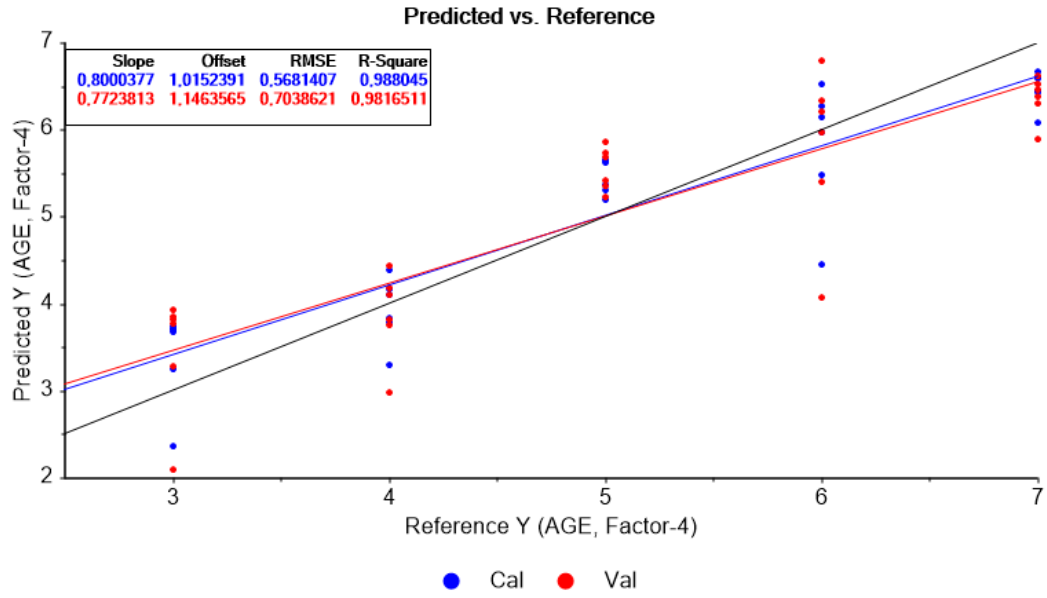


**Şekil 5.14.** Pamuk kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.

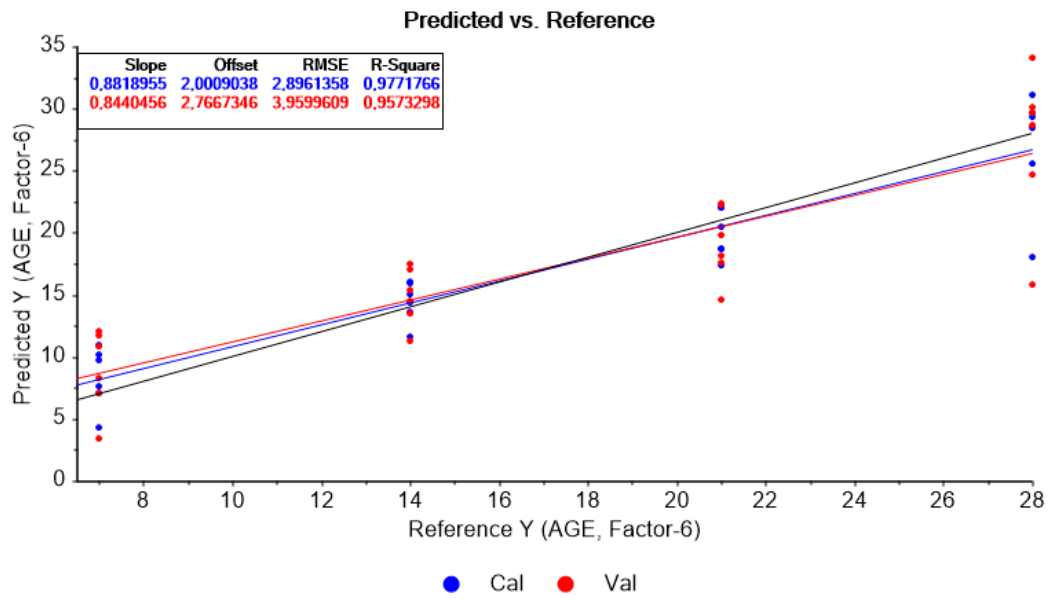
Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin PLSR modelinde kalibrasyon ve validasyon için sırasıyla  $R^2$  değerleri 0-3 gün için 1,00 ve 0,99 olduğu, 3-7 gün için 0,99 ve 0,98 olduğu, 7-28 gün için 0,98 ve 0,96 olduğu, 28-56 gün için 0,99 ve 0,98 olduğu, 0-56 gün için 0,96 ve 0,95 olduğu bulunurken, RMSE değerleri 0-3 gün için 0,03 ve 0,18 gün olduğu, 3-7 gün için 0,57 ve 0,70 gün olduğu, 7-28 gün için 2,90 ve 3,96 gün olduğu, 28-56 gün için 4,80 ve 6,36 gün olduğu, 0-56 gün için 4,61 ve 5,71 gün olduğu saptanmıştır (Şekil 5.15-19).



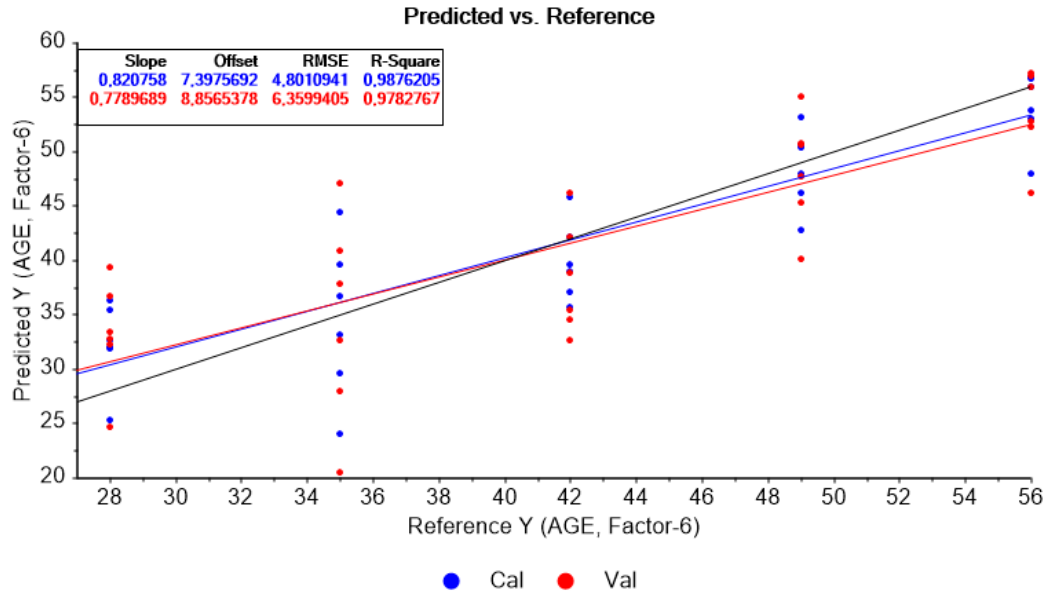
**Şekil 5.15.** Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 3 gün arasındaki PLSR modeli.



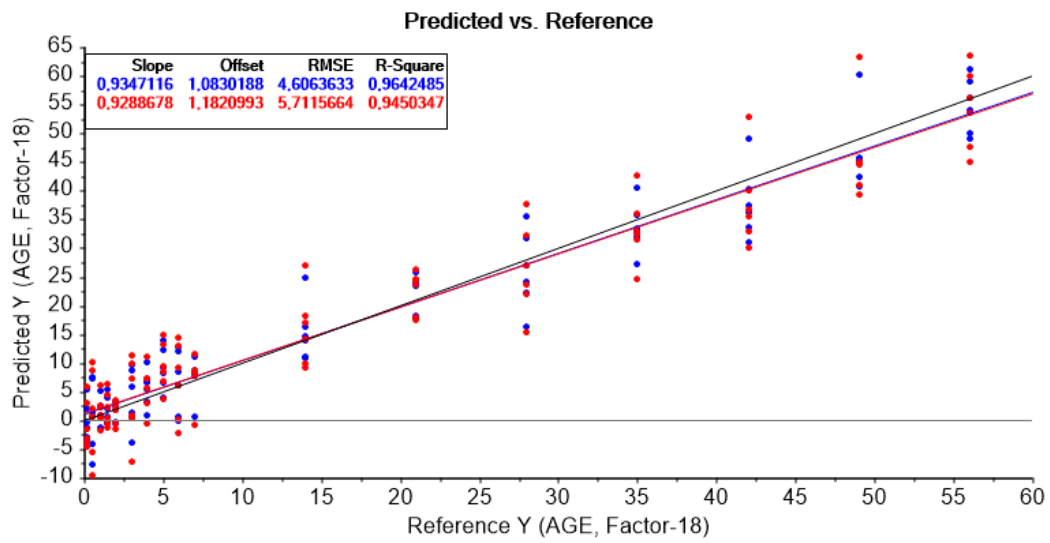
**Şekil 5.16.** Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin 3 gün – 7 gün arasındaki PLSR modeli.



**Şekil 5.17.** Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin 1 hafta – 4 hafta arasındaki PLSR modeli.

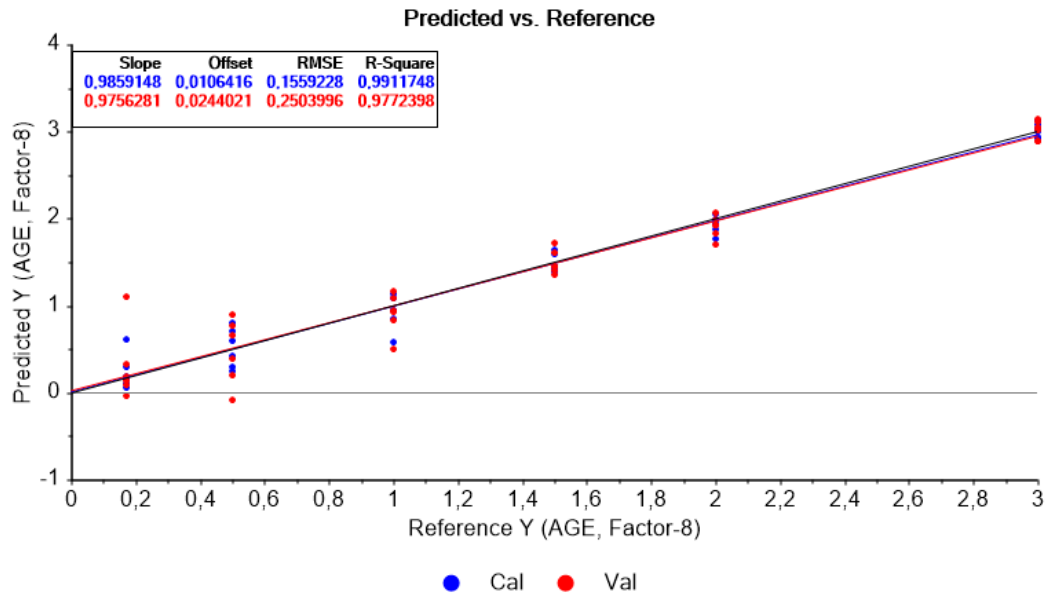


**Şekil 5.18.** Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 hafta – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.



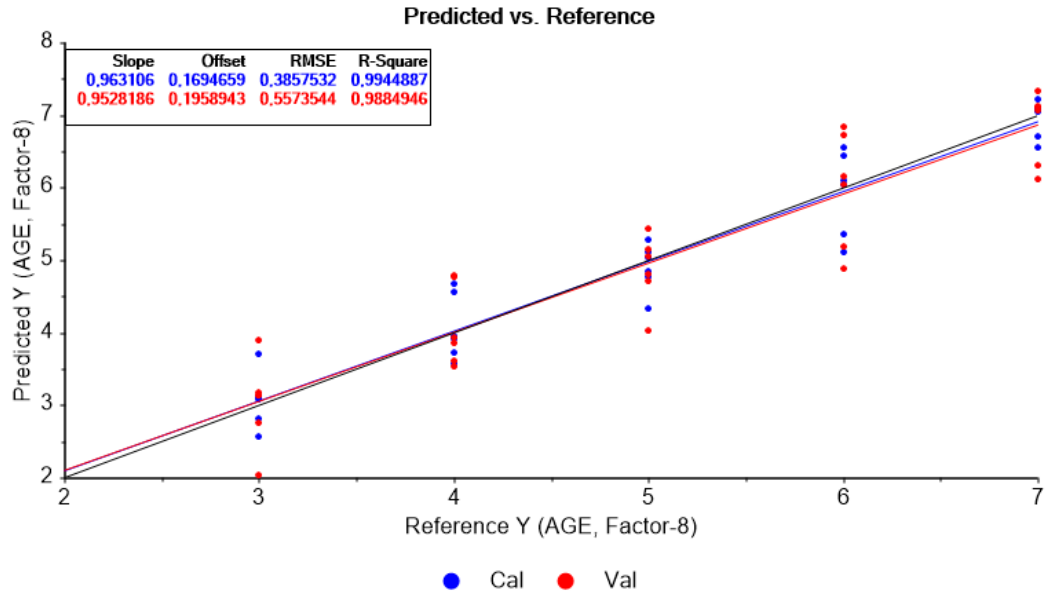
**Şekil 5.19.** Polyester kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.

Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin PLSR modelinde kalibrasyon ve validasyon için sırasıyla  $R^2$  değerleri 0-3 gün için 0,99 ve 0,98 olduğu, 3-7 gün için 0,99 ve 0,99 olduğu, 7-28 gün için 0,99 ve 0,97 olduğu, 28-56 gün için 0,98 ve 0,98 olduğu, 0-56 gün için 0,96 ve 0,95 olduğu bulunurken, RMSE değerleri 0-3 gün için 0,16 ve 0,25 gün olduğu, 3-7 gün için 0,39 ve 0,56 gün olduğu, 7-28 gün için 2,18 ve 3,69 gün olduğu, 28-56 gün için 5,70 ve 6,56 gün olduğu, 0-56 gün için 4,65 ve 5,75 gün olduğu saptanmıştır (Şekil 5.20-24).

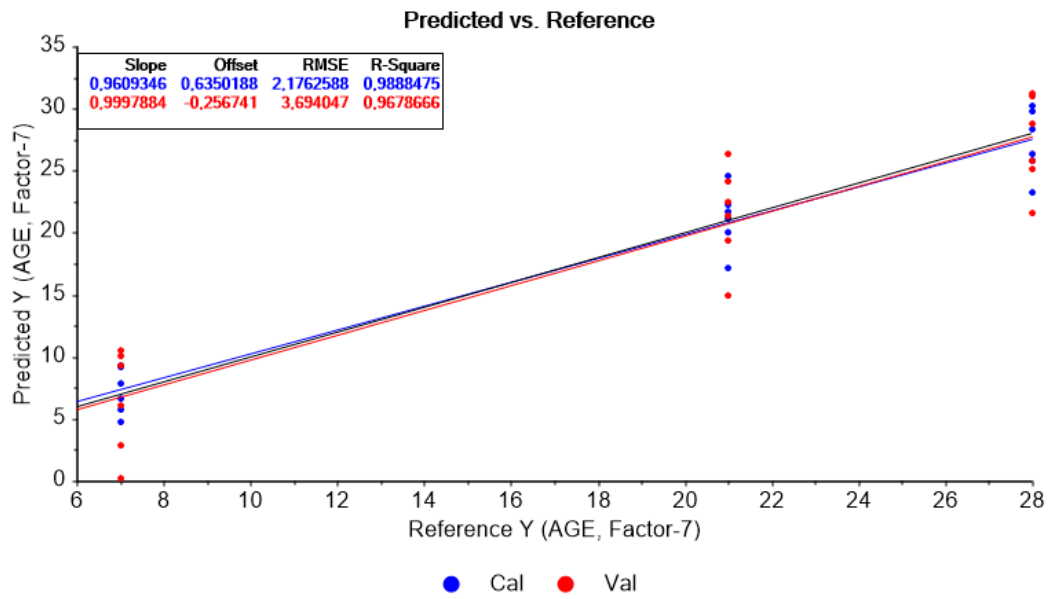


**Şekil 5.20.** Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 3 gün arasındaki PLSR modeli.

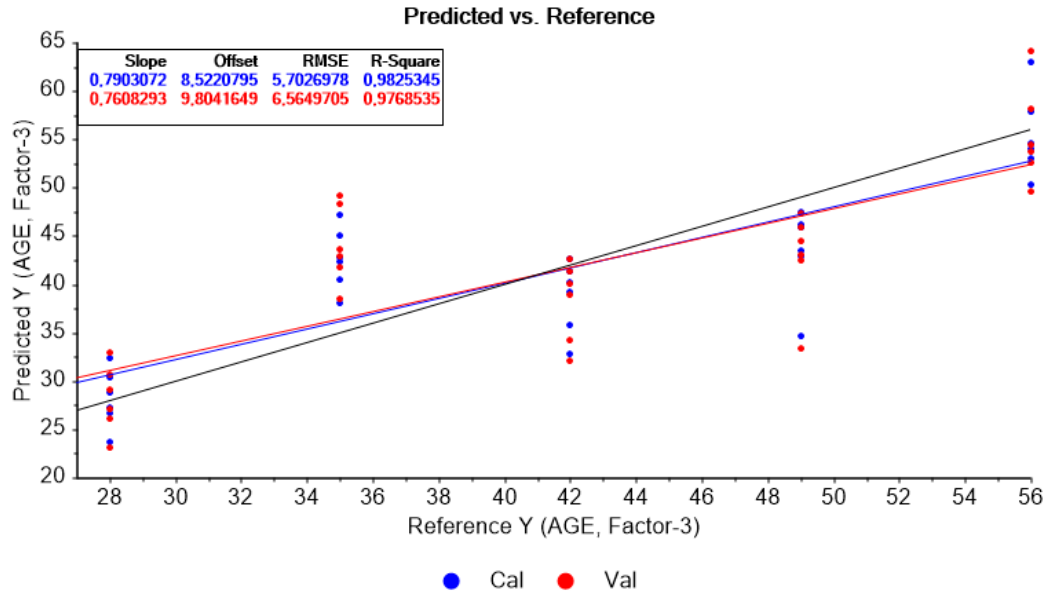




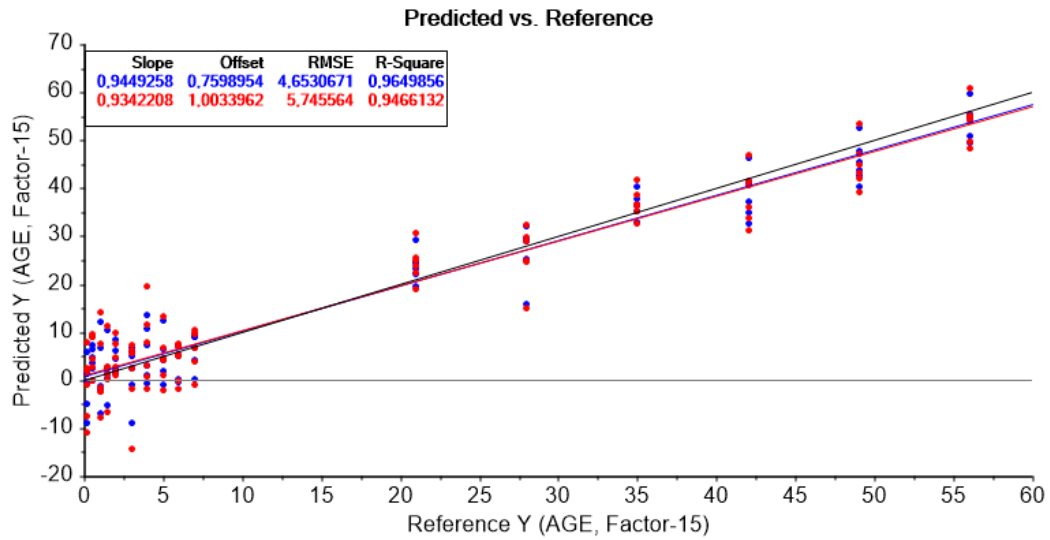
**Şekil 5.21.** Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin 3 gün – 7 gün arasındaki PLSR modeli.



**Şekil 5.22.** Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin 1 hafta – 4 hafta arasındaki PLSR modeli.

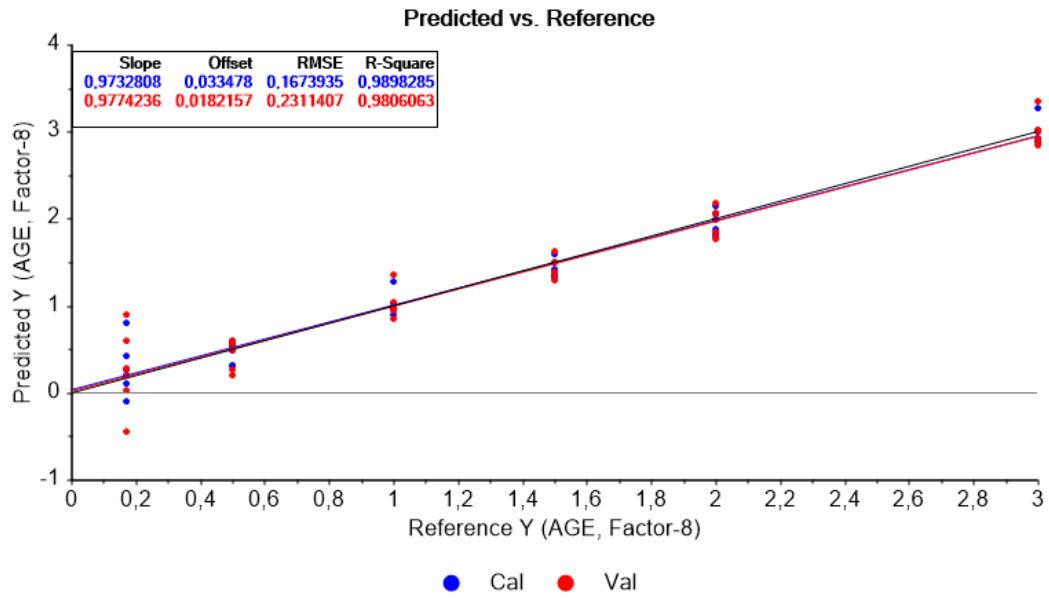


**Şekil 5.23.** Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 hafta – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.

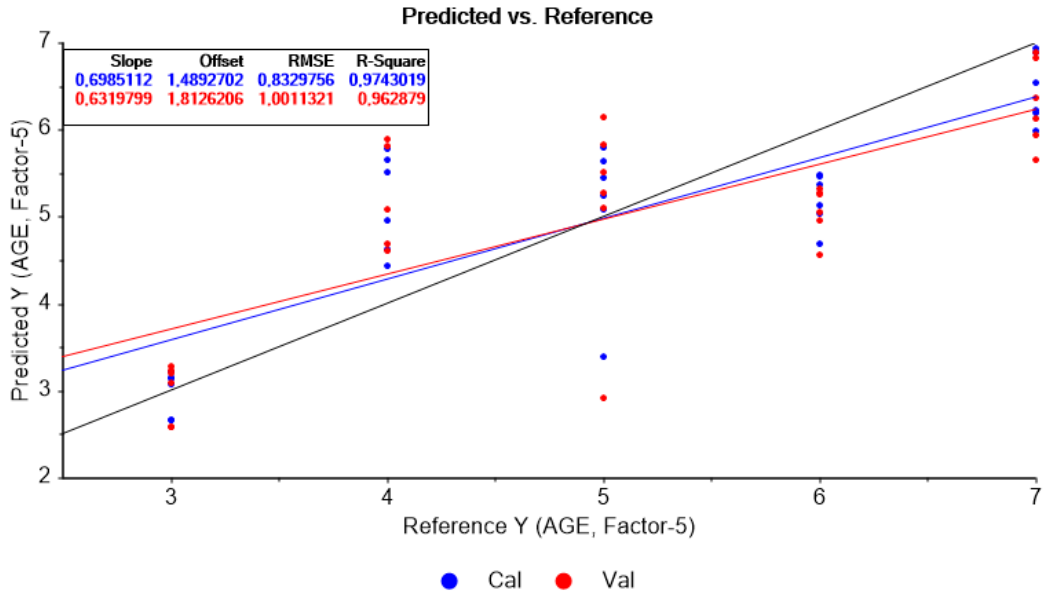


**Şekil 5.24.** Karma kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.

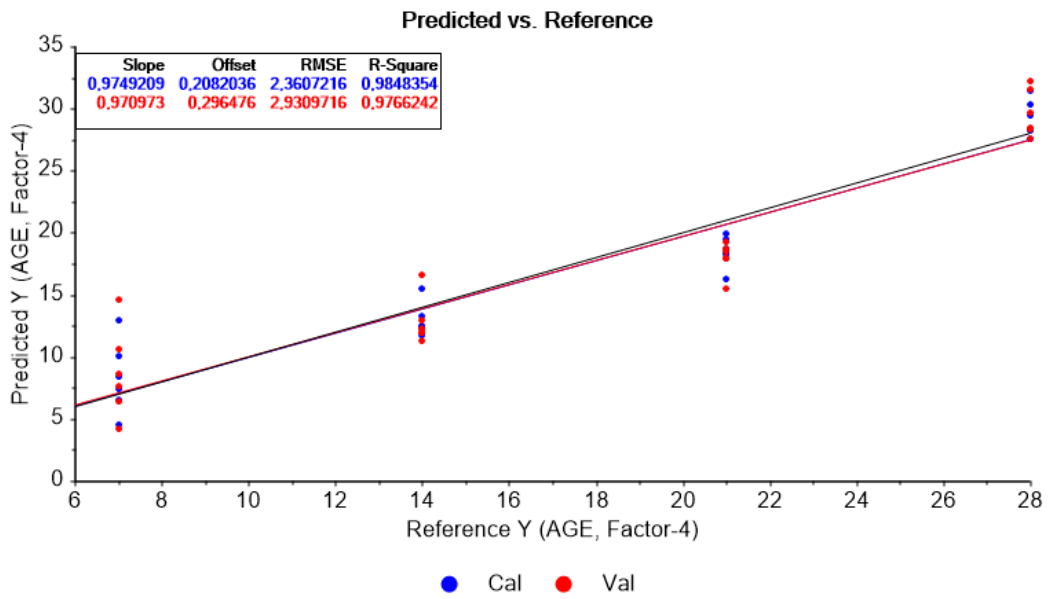
İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin PLSR modelinde kalibrasyon ve validasyon için sırasıyla  $R^2$  değerleri 0-3 gün için 0,99 ve 0,98 olduğu, 3-7 gün için 0,97 ve 0,96 olduğu, 7-28 gün için 0,98 ve 0,98 olduğu, 28-56 gün için 0,99 ve 0,99 olduğu, 0-56 gün için 0,98 ve 0,96 olduğu bulunurken, RMSE değerleri 0-3 gün için 0,17 ve 0,23 gün olduğu, 3-7 gün için 0,83 ve 1,00 gün olduğu, 7-28 gün için 2,36 ve 2,93 gün olduğu, 28-56 gün için 3,21 ve 4,74 gün olduğu, 0-56 gün için 3,51 ve 4,62 gün olduğu saptanmıştır (Şekil 5.25-29).



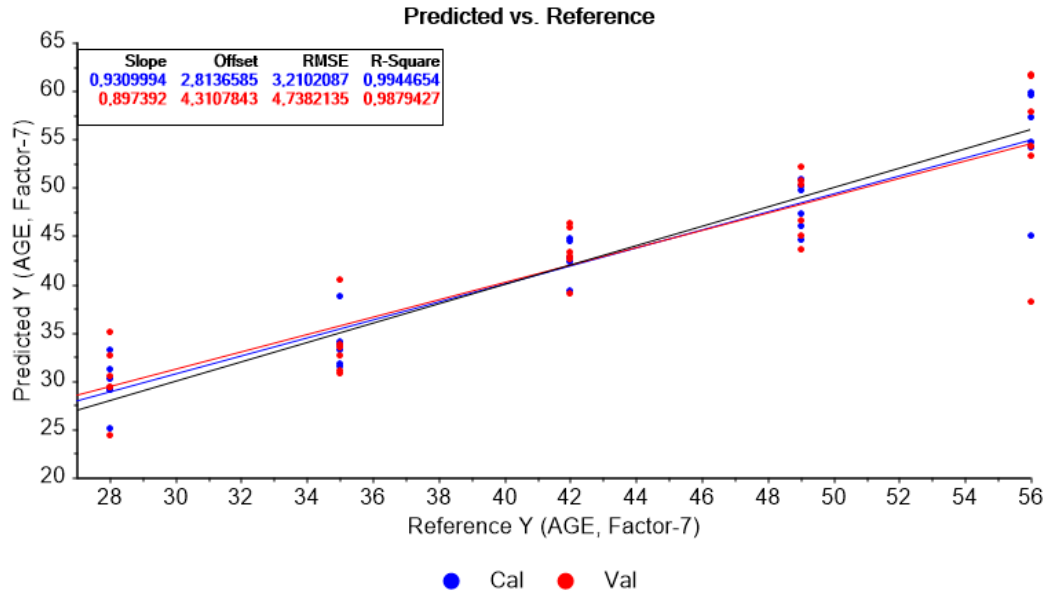
**Şekil 5.25.** İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 3 gün arasındaki PLSR modeli.



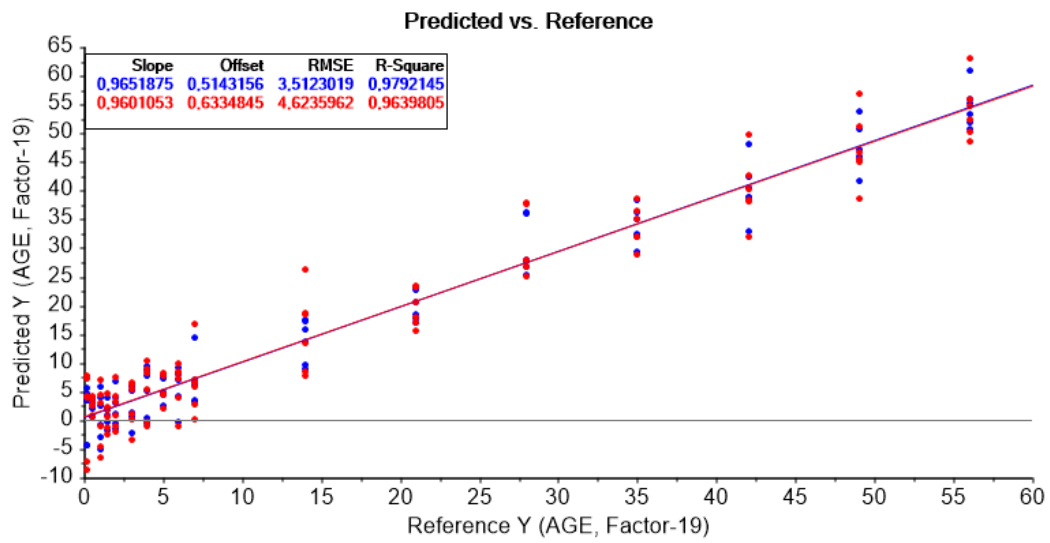
**Şekil 5.26.** İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin 3 gün – 7 gün arasındaki PLSR modeli.



**Şekil 5.27.** İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin 1 hafta – 4 hafta arasındaki PLSR modeli.

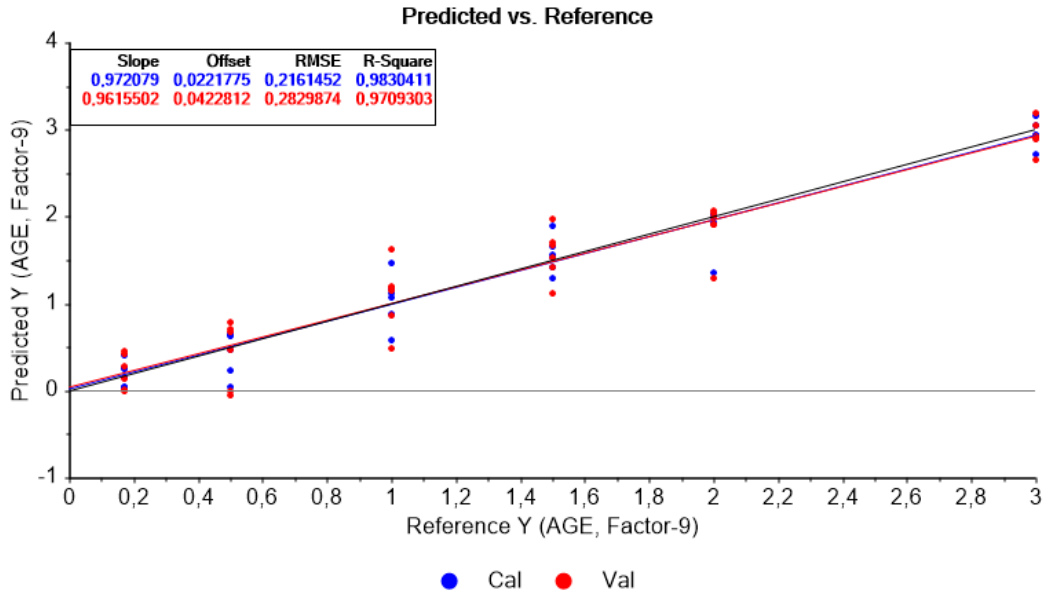


**Şekil 5.28.** İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 hafta – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.

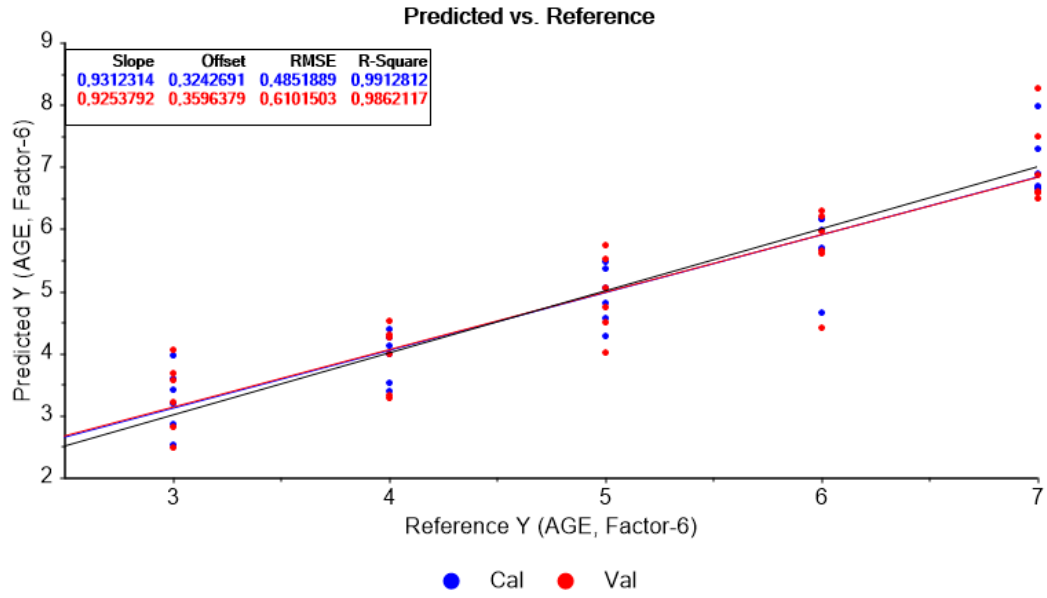


**Şekil 5.29.** İpek kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.

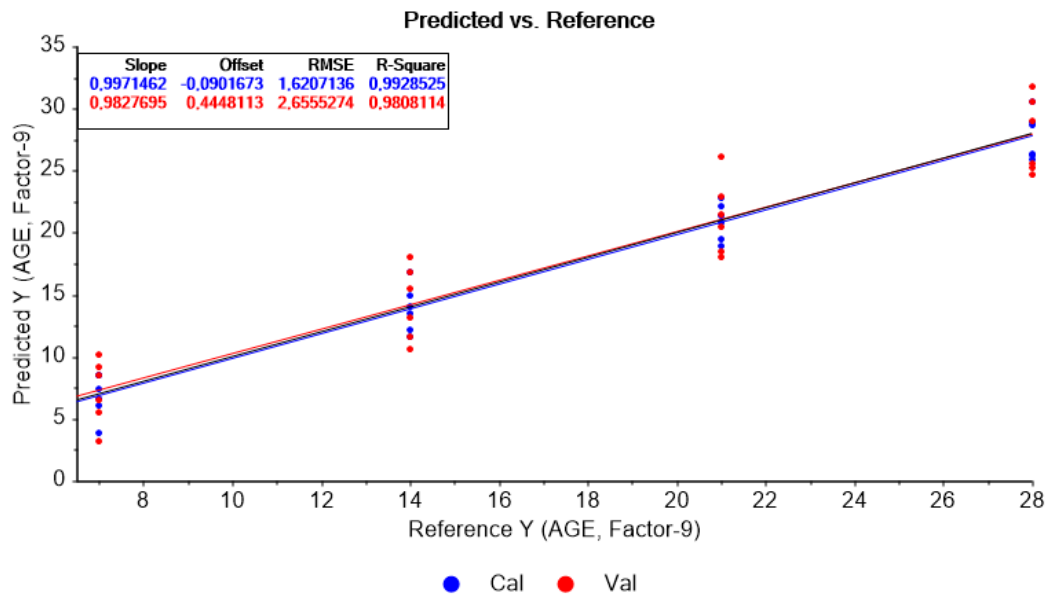
Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin PLSR modelinde kalibrasyon ve validasyon için sırasıyla  $R^2$  değerleri 0-3 gün için 0,98 ve 0,97 olduğu, 3-7 gün için 0,99 ve 0,99 olduğu, 7-28 gün için 0,99 ve 0,98 olduğu, 28-56 gün için 0,99 ve 0,98 olduğu, 0-56 gün için 0,93 ve 0,92 olduğu bulunurken, RMSE değerleri 0-3 gün için 0,22 ve 0,28 gün olduğu, 3-7 gün için 0,49 ve 0,61 gün olduğu, 7-28 gün için 1,62 ve 2,66 gün olduğu, 28-56 gün için 3,59 ve 6,04 gün olduğu, 0-56 gün için 6,31 ve 6,96 gün olduğu saptanmıştır (Şekil 5.30-34).



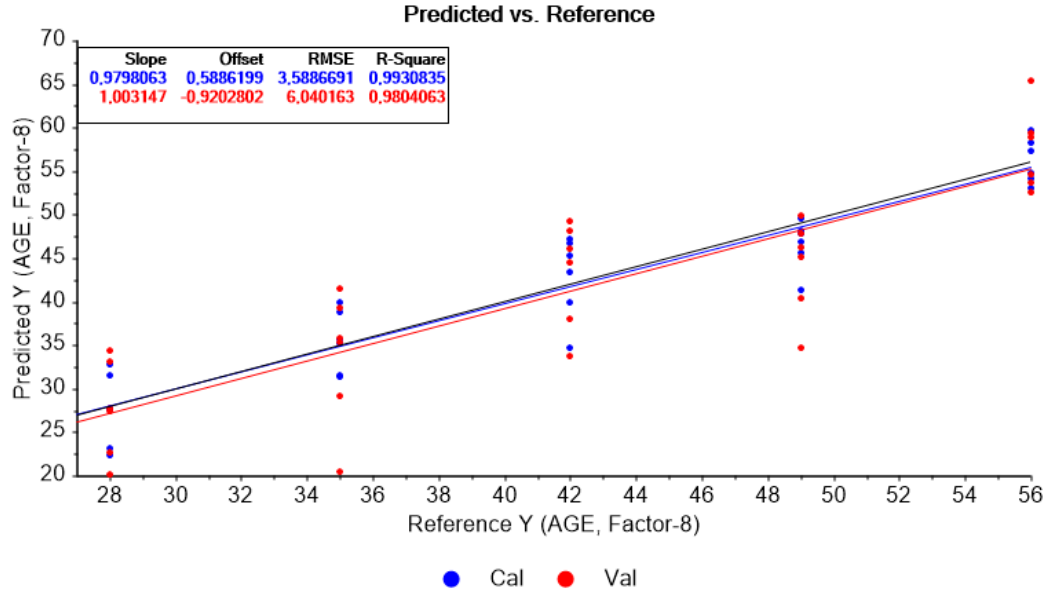
**Şekil 5.30.** Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 3 gün arasındaki PLSR modeli.



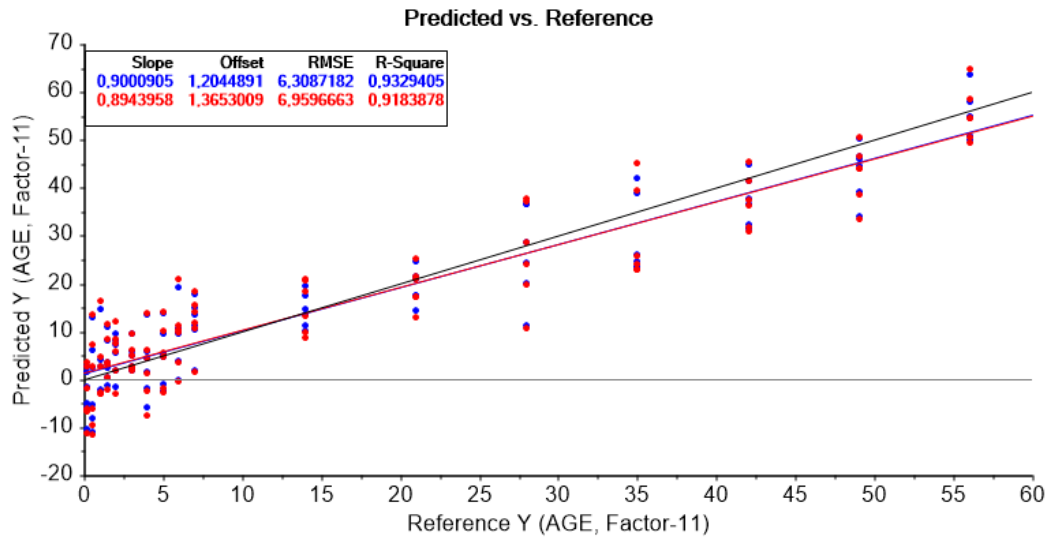
**Şekil 5.31.** Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin 3 gün – 7 gün arasındaki PLSR modeli.



**Şekil 5.32.** Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin 1 hafta – 4 hafta arasındaki PLSR modeli.



**Şekil 5.33.** Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 hafta – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.



**Şekil 5.34.** Yün kumaş üzerindeki semen lekelerinin 4 saat – 8 hafta arasındaki PLSR modeli.



## TARTIŞMA

Olay yerinde, özellikle cinsel saldırı olgularında biyolojik delillerin belki de en önemlisi semen lekesidir. Suçun işlendiği zaman aralığının belirlenebilmesi için semenin depozisyon zamanının tespit edilmesi adli soruşturmanın seyri açısından çok büyük öneme sahiptir. Semen lekesinin diğer vücut sıvılarından ayırt edilmesine veya semen lekesinden DNA profillemesi yaparak kişinin tespit edilmesine yönelik geçmişten günümüze pek çok teknik ve yöntem geliştirilmiştir. Semen lekesinin yaşının tayin edilmesine yönelik literatürdeki çalışma sayısı ise oldukça kısıtlıdır. Bu çalışmalarda RNA temelli yaklaşımlar, enzimatik temelli yaklaşımlar ve floresans mikroskopisi gibi yöntemler denenmiştir. Ancak bu yöntemler RNA elde etmede yaşanan zorluklar ve elde edilen RNA'nın yaş tayini için geniş bir aralık sunması gibi nedenlerle günümüz adli tıp pratiğinde rutin olarak kullanılamamaktadır. Olay yerindeki semen lekelerinin herhangi bir ön işleme ihtiyaç duymadan hızlı bir şekilde analiz edilebilmesi amacıyla ve rutin adli tıp pratiğinde kullanılacak ve adli olayların zaman aralığının çözülmesine yardımcı olabilecek yöntem ve tekniklere ihtiyaç duyulması nedeniyle vücut sıvılarının yaş tayininin tespit edilmesinde son zamanlarda sıkça kullanımı araştırılmaya başlanan spektroskopik yöntemlerin başında kızılötesi spektroskopisi gelmektedir.

Kızılötesi spektroskopisi, enerjiyi absorbe eden farklı bileşenlerin spektral özelliklerini gözlemlemek için örneklere elektromanyetik spektrumun kızılötesi bölgesinden gelen ışınları göndermektedir. Bu ışınların numune tarafından absorblanması sayesinde numunenin fonksiyonel gruplarının belirlenmesi sağlanırken, biyolojik numunelerde mevcut olan karbonhidrat, protein, lipid, genetik materyal gibi moleküllerin farklı dalga boylarında pik vermesi sayesinde zamanla bu moleküllerdeki değişim tespit edilebilmektedir. Herhangi bir haldeki numunenin herhangi bir ön işlem gerektirmeden ve numuneye zarar vermeden incelenebilmesi diğer tekniklere göre önemli bir avantaj sağlamaktadır. Kızıl ötesi spektroskopilere Fourier dönüşümünün uyarlanması ile yüksek tarama hızlarına ulaşılarak numunelerin hızlı bir şekilde analizi de mümkün hale gelmiştir (26).

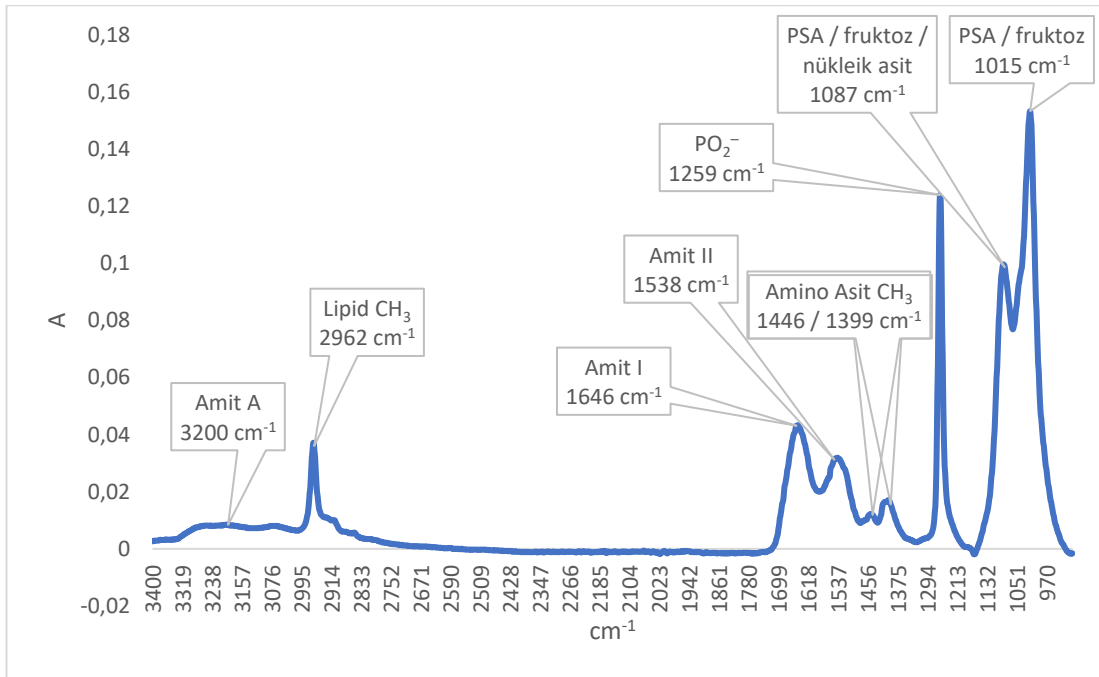
Çalışmamızda hangi dalga sayısında piklerin gözlemlendiği ve bu piklerin hangi bileşenlere ait olduğu **Tablo 6.1** ve Şekil 6.1'de verilmiştir.

**Tablo 6.1.** Semen lekесinin ATR-FTIR spektrumundaki majör piklerin tanımlanması ve titreşimin kaynağı

<i>Dalga sayısı (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Tanımlanan bileşen</i>	<i>Titreşim modu</i>
<b>3200</b>	Amit A (39, 40)	Simetrik N–H gerilimleri
<b>2962</b>	Lipitlerdeki metil grupları (39)	CH <sub>3</sub> gerilimleri
<b>1646</b>	Amit I: α-heliks (39-41)	C=O gerilimi
<b>1538</b>	Amit II: β-yaprak (39, 40, 42)	C–N gerilmesine bağlı N–H bükülmesi
<b>1446</b>	Aminoasit yan zincirlerindeki metil grupları (40, 42)	CH <sub>2</sub> ve CH <sub>3</sub> gruplarındaki C–H bükülme titreşimleri
<b>1399</b>	Yağ asitleri ve polisakkarit grupları (40, 42)	COO <sup>-</sup> 'da simetrik C=O titreşimi
<b>1259</b>	Nükleik asitleri fosfat grubu (39-41)	Asimetrik PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> gerilimi
<b>1087</b>	PSA / fruktoz / nükleik asit (39, 43)	CH <sub>2</sub> OH gruplarında simetrik C–O gerilimi ve COH gruplarının bükülmesi, simetrik PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> gerilimi
<b>1015</b>	PSA / fruktoz (44)	Karbonhidratlardaki simetrik C–O gerilimi

Yapılan analizler sonucunda majör olarak 3200, 2962, 1646, 1538, 1446, 1399, 1259, 1087 ve 1015 cm<sup>-1</sup>'de pikler saptanmıştır. 1646 cm<sup>-1</sup> ve 1538 cm<sup>-1</sup> dalga sayısında gözlenen piklerin sırasıyla Amit I ve Amit II grubuna ait olduğu düşünülmüştür. Quinn ve arkadaşlarına (45) göre Amit I bandı ve Amit II bandı tek bir tepe şeklinde görünebilirken, Orphanou (46), Gregorio ve arkadaşları (47) ile Elkins (48) ise bu piklerin bizim çalışmamızla benzer şekilde belirgin olarak ayrılabilirdiği belirtmişlerdir. Amit I bandı 1700-1600 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında bulunan, %80'i proteinlerin peptid bağlı yapısındaki C=O gerilme, %20'si ise C-N gerilme ve N-H bükülme titreşimlerinden kaynaklanan, organik moleküllerin

kızılötesi spektrumlarında en yoğun gözlenen, proteinlerin sekonder yapısı ile ilgili en fazla bilgiyi sağlayan banttır. Amit II bandı ise genellikle FTIR spektrumlarında ikinci en yoğun pik olarak  $1550-1500\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında gözlenmekte, %46-60 N-H bükülme ve %18-40 C-N gerilme titreşimlerinden oluşmaktadır (40, 43).  $3200\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki pikin Amit A'ya ait olduğu değerlendirilirken,  $2962\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki pikin lipitlerdeki metil gruplarının gerilmesinden kaynaklandığı,  $1446$  ve  $1399\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki piklerin proteinlerin amino asit yan zincirlerindeki simetrik metil kıvrımlarının göstergesi olduğu,  $1259\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki pikin nükleik asitlerdeki fosfat grubunun asimetrik gerilmesine bağlı olduğu,  $1087$  ile  $1015\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki piklerin ise semenin içerisindeki glukoz ve fruktoz gibi şekerlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ancak,  $1087\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki pik aynı zamanda DNA ve RNA içerisindeki şeker fosfat gruplarına ait olabileceği gibi, glikoproteinlerin içerisindeki PSA gibi şeker kısımlarına da ait olabileceği literatürde ifade edilmiştir (8, 39, 43).



**Şekil 6.1.** Semen lekesinin ATR-FTIR spektrumundaki majör piklerin tanımlanması.

Amit A piki spektrumda geniş tabanlı bir pik olarak gözlenirken diğer pikler daha dar tabanlı pikler olarak gözlenmektedir. Amit A, Amit I ve Amit II pikleri biyolojik sıvıların spektrumunda en sık gözlenen pikler olurken şekilleri ise numuneden numuneye farklılık gösterebilmektedir. Elde ettiğimiz pikler ile literatürdeki diğer çalışmalarda yer alan pikler arasındaki farklılıklar ise semen donörlerinden, çevresel şartlardan ve deney şartlarından kaynaklanabilmektedir.

Zaman içerisinde tüm kumaş türlerinde piklerde değişim gözlenmiştir. Özellikle 1646 ve 1538  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısında tespit ettiğimiz Amit I ve Amit II piklerinde meydana gelen değişimin insan dokularında, kan lekelerinde ve diğer vücut sıvılarında yer alan proteinlerin ve diğer makro moleküllerin degradasyonuna bağlı olabileceği ifade edilmiştir (49, 50). 1446 ve 1399  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısındaki piklerde meydana gelen değişim peptit zincirlerin yıkılması ve serbest yağ asitlerinin artmasından dolayı ortaya çıkan metil ve karboksil gruplarından kaynaklanabilir. 1259  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısındaki fosfat grubunun neden olduğu pikin ise sperm hücrelerinin zamanla yıkılmasına ve degradasyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür. Spermin baş bölgesinde yer alan DNA iplikçiklerinin yıkılmasıyla açığa çıkan nükleik asitlerdeki fosfat gruplarının bu pikin değişiminde rol aldığı ifade edilmiştir. Dondurulmuş veya geleneksel yöntemle ön işlemden geçirilmiş kişilerin sperm hücrelerinde bu DNA yıkımının arttığı belirtilmiştir (51). Bu nedenle hem suç mahallini canlandırabilmek hem de bu DNA yıkım etkisinden kaçınmak amacıyla çalışmamızda taze semen numuneleri kullanılmış ve herhangi bir ön işlemden geçirilmemiştir. Ancak DNA iplikçiklerindeki yıkım sadece bu faktörlerle sınırlı olmayıp, oksidasyon ve diğer çevresel faktörlerin etkisiyle de meydana gelebilmektedir. Bu da zamanla seminal plazmada serbest fosfat moleküllerinin artmasına ve fosfat pikindeki değişimlere neden olmaktadır.

Orphanou (46) 2015 yılında yapmış olduğu tez çalışmasında kan, tükürük, semen ve vajinal sekresyonları 6 ila 18 ay arasında analiz etmiş, ATR-FTIR spektroskopisinin 18 aya kadar pamuk kumaş üzerindeki veya ekstrakte edilmiş vücut sıvılarını başarılı bir şekilde tanımlamak ve ayırt etmek için kullanılabileceğini ancak ATR-FTIR spektrumlarından elde edilen pik yoğunlukları ve oranlarının kan lekeleri dışında tükürük, semen veya vajinal sekresyon lekelerinin yaşını belirlemek için uygun olmadığını ifade etmiştir.

Zha ve arkadaşları (25) ise 2019 yılında cam, doku ve selüloz liflerden oluşan kumaş üzerine semen numuneleri damlatmış ve yarım gün arayla 6 güne kadar ATR-FTIR ile analiz etmişlerdir. PLSR modellemesi sonucunda kalibrasyon grubunda ham absorbans spektrumunda 0,8 gün, ikinci türev spektrumunda 0,77 gün RMSECV değeri elde ederken, validasyon grubunda ham absorbans spektrumunda 1,06 gün, ikinci türev spektrumunda ise 1,02 gün RMSEP değeri elde edebilmişlerdir. ATR-FTIR'ın gelecekte çeşitli materyaller üzerindeki semen lekelerinde yaş tayini yapmak için yararlı bir araç olabileceğini belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise farklı kumaş türlerindeki lekelerde 0-3 gün aralığında 0,18-0,32 gün, 3-7 gün aralığında 0,56-1 gün, 1-4 hafta aralığında 2,66-3,96 gün, 4-8 hafta aralığında 4,74-6,56 gün, 0-8 hafta aralığında ise 4,62-6,96 gün RMSEP değerleriyle semen lekesi yaşı tahmini gerçekleştirilebilmiştir.

Literatür özetinde de belirtildiği gibi daha önce DNA ve RNA üzerinden semen yaşı tayini için analiz yöntemleri kullanılabilmesine rağmen RNA elde etmenin zor olması ve elde edilen genetik materyalin yaş tayini için geniş bir aralık sunması gibi kısıtlılıkları bulunmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda ATR-FTIR ile çok daha az ve dar bir aralıkta yaş tahmin modellemesi kurulabilmiştir. Çeşitli çevresel koşulların vücut sıvılarının bütünlüğünü bozduğu ve özellikle dış ortama maruz bırakılan numunelerde genetik materyal tespitinin önemli ölçüde zorlaştığı göz önünde bulundurulduğunda herhangi bir ön işlem gerektirmemesi ve dış ortamdan genetik materyal analizlerine göre daha az etkilenmesi spektroskopik yöntemleri ön plana çıkarmaktadır. Bu da özellikle dış ortamdaki suç mahallerinde genetik materyal üzerinden yaş tayini yöntemlerinin kullanılmasını önemli ölçüde kısıtlamaktadır.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, kemometri ile birleştirilen ATR-FTIR spektroskopisinin, spektrumdaki zamana bağlı değişikliklere dayalı olarak insan semen lekelerinin yaşını tahmin etmek için etkili bir yöntem olabileceği gösterilmiştir. PCA ve PLSR sonuçlarına göre, pamuk, polyester, karma, ipek ve yün gibi beş farklı kumaş üzerindeki semen lekelerinin yaşı 8 haftaya kadar tahmin edilmiştir. Yaş tahmini için, spektrumdaki parmak izi bölgesinde gerçekleştirilen PLSR analizi tatmin edici bir tahmin oranı sağlamıştır. Ayrıca, PLSR'den elde edilen grafikler sayesinde, proteinlerle ilgili zamana bağlı değişikliklerin hangi spektral bölgelerinde gerçekleştiği tanımlanmıştır.

Bu alanda yapılan nadir çalışmalardan biri olan bu çalışmada, PLSR modellerimiz 28 ila 35 yaş aralığında sağlam ve güvenilir olarak kabul edilebilir. Yine de bu modellememizin rutin adli tıp pratiğinde uygulamaya geçmesi için daha geniş popülasyonda ve daha geniş yaş aralığında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Olay mahallerinde, bizim çalışmada kullandığımız beş farklı kumaş türünden çok daha farklı materyaller üzerinde semen lekeleri tespit edilebilmektedir. Daha kalın kumaş türleri, toprak, ahşap ve diğer karmaşık malzemeler gibi malzemelerin üzerindeki semen lekelerinde, semen lekesini tespit etme ve yaş tahmininde bulunmada daha büyük zorluklarla karşılaşılabilir. Gelecekteki çalışmalarda örneklem sayısının, semen tatbik edilen materyal sayısının ve semen numunesi alınan kişilerin yaş aralığının artmasına, soğuk, sıcak, ıslak, kuru gibi çevresel faktörlerin ve kontaminasyonların etkilerinin göz önünde bulundurulmasına ve gelişmiş çok değişkenli analizlerin birleştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Adli İstatistikler 2019. Ankara: Adalet Bakanlığı Adli Sicil ve İstatistik Genel Müdürlüğü; 2020.
2. Silva CS, Pimentel MF, Amigo JM, Honorato RS, Pasquini C. Detecting semen stains on fabrics using near infrared hyperspectral images and multivariate models. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2017;95:23-35.
3. Singh B, Gautam I, Yadav V, Mohapatra B. Detection of Human seminal stains in one minute by modified acid phosphatase test. *European Journal of Forensic Sciences*. 2015;2(3).
4. Achetib N, Wilk LS, Schwarz JCV, Lambrechts SAG, van Leeuwen TG, Aalders MCG ve ark. Estimating the Time of Deposition of Semen Traces using Fluorescence Protein-Lipid Oxidation Signatures. *Anal Chem*. 2019;91(5):3204-8.
5. 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.
6. Liu KL, Tsai LC, Lin YC, Huang NE, Yang LJ, Su CW ve ark. Identification of spermatozoa using a novel 3-plex MSRE-PCR assay for forensic examination of sexual assaults. *Int J Legal Med*. 2020.
7. Zapata F, Fernández de la Ossa MÁ, García-Ruiz C. Emerging spectrometric techniques for the forensic analysis of body fluids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015;64:53-63.
8. Orphanou CM, Walton-Williams L, Mountain H, Cassella J. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. *Forensic Sci Int*. 2015;252:e10-6.
9. Virkler K, Lednev IK. Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids. *Forensic Sci Int*. 2008;181(1-3):e1-5.

10. Organization WH. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed2010.
11. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM ve ark. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update. 2010;16(3):231-45.
12. Dewaele R, Abdulcadir J, Brockmann C, Fillod O, Valera-Kummer S. Schemas © [Internet]. 2019. Erişim Adresi: [www.unige.ch/ssi](http://www.unige.ch/ssi)
13. Li R. Forensic biology. Amerika Birleşik Devletleri: CRC Press; 2015.
14. Owen DH, Katz DF. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. J Androl. 2005;26(4):459-69.
15. Huang Z, Chen X, Chen Y, Chen J, Dou M, Feng S ve ark. Raman spectroscopic characterization and differentiation of seminal plasma. J Biomed Opt. 2011;16(11):110501.
16. Mann T. The biochemistry of semen: London : Methuen & Co. Ltd. ; New York : John Wiley & Sons, Inc.; 1954. xiv + 240 pp. p.
17. Hall JE, Hall ME. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 14th ed: Elsevier Health Sciences; 2020.
18. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. Biol Reprod. 1998;59(1):7-11.
19. Doty KC, Muro CK, Bueno J, Halámková L, Lednev IK. What can Raman spectroscopy do for criminalistics? Journal of Raman Spectroscopy. 2016;47(1):39-50.
20. Setzer M, Juusola J, Ballantyne J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. J Forensic Sci. 2008;53(2):296-305.



21. Simard A-M, DesGroseillers L, Sarafian V. Assessment of RNA Stability for Age Determination of Body Fluid Stains. *Canadian Society of Forensic Science Journal*. 2012;45(4):179-94.
22. Alshehhi S, Haddrill PR. Estimating time since deposition using quantification of RNA degradation in body fluid-specific markers. *Forensic Sci Int*. 2019;298:58-63.
23. Li C, Wang Q, Zhang Y, Lin H, Zhang J, Huang P ve ark. Research progress in the estimation of the postmortem interval by Chinese forensic scholars. *Forensic Sci Res*. 2016;1(1):3-13.
24. Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler HJ, Dorling KM ve ark. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc*. 2014;9(8):1771-91.
25. Zha S, Wei X, Fang R, Wang Q, Lin H, Zhang K ve ark. Estimation of the age of human semen stains by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a preliminary study. *Forensic Sciences Research*. 2019:1-7.
26. Stuart B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2004.
27. How do electromagnetic waves wave? [Internet]. [Erişim Tarihi 25 Mart 2021]. Erişim Adresi: <https://physics.stackexchange.com/users/73010/ahemmetter>
28. Griffiths PR, De Haseth JA. *Fourier transform infrared spectrometry*: John Wiley & Sons; 2007.
29. Crowe J, Bradshaw T. *Chemistry for the biosciences: the essential concepts*. 3rd ed: Oxford University Press; 2014.
30. Housecroft CE, Constable EC. *Chemistry : an introduction to organic, inorganic, and physical chemistry*. 4th ed. Harlow, England ; New York: Pearson Prentice Hall; 2010.

31. Larsen D. Vibrational Spectroscopy of Diatomic Molecules [Internet]. Libretexts; 2020 [Güncellenme Tarihi 13 Kasım 2020; Erişim Tarihi 23 Mart 2021]. Erişim Adresi: <https://chem.libretexts.org/@go/page/39041>
32. Heideman MT, Johnson DH, Burrus CS. Gauss and the History of the Fast Fourier-Transform. *Archive for History of Exact Sciences*. 1985;34(3):265-77.
33. Bracewell RN. *The Fourier transform and its applications*: McGraw-Hill New York; 1986.
34. Jaggi N, Vij DR. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy* 2006. p. 411-50.
35. Martin FL, Kelly JG, Llabjani V, Martin-Hirsch PL, Patel, II, Trevisan J ve ark. Distinguishing cell types or populations based on the computational analysis of their infrared spectra. *Nat Protoc*. 2010;5(11):1748-60.
36. Vongsvivut J, Heraud P, Zhang W, Kralovec JA, McNaughton D, Barrow CJ. Rapid Determination of Protein Contents in Microencapsulated Fish Oil Supplements by ATR-FTIR Spectroscopy and Partial Least Square Regression (PLSR) Analysis. *Food and Bioprocess Technology*. 2013;7(1):265-77.
37. Ziegel ER. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. *Technometrics*. 2004;46(1):108-10.
38. Wang L-L, Lin Y-W, Wang X-F, Xiao N, Xu Y-D, Li H-D ve ark. A selective review and comparison for interval variable selection in spectroscopic modeling. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2018;172:229-40.
39. Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman DI. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2008;43(2):134-79.
40. Garidel P, Schott H. Fourier-transform midinfrared spectroscopy for analysis and screening of liquid protein formulations. Part 2: Detailed analysis and applications. *BioProcess Int*. 2006;1:48-55.

41. Barcot O, Balarin M, Gamulin O, Jezek D, Romac P, Brnjac-Kraljevic J. Investigation of spermatozoa and seminal plasma by fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 2007;61(3):309-13.
42. Wood BR, Quinn MA, Tait B, Ashdown M, Hislop T, Romeo M ve ark. FTIR microspectroscopic study of cell types and potential confounding variables in screening for cervical malignancies. *Biospectroscopy.* 1998;4(2):75-91.
43. Olszynska-Janus S, Szymborska-Malek K, Gasior-Glogowska M, Walski T, Komorowska M, Witkiewicz W ve ark. Spectroscopic techniques in the study of human tissues and their components. Part I: IR spectroscopy. *Acta of Bioengineering and Biomechanics.* 2012;14(3):101-15.
44. Beekes M, Lasch P, Naumann D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Vet Microbiol.* 2007;123(4):305-19.
45. Quinn AA, Elkins KM. The Differentiation of Menstrual from Venous Blood and Other Body Fluids on Various Substrates Using ATR FT-IR Spectroscopy. *J Forensic Sci.* 2017;62(1):197-204.
46. Orphanou CMR. A bioanalytical approach to forensic body fluid identification & age determination: Staffordshire University; 2015.
47. Gregorio I, Zapata F, Garcia-Ruiz C. Analysis of human bodily fluids on superabsorbent pads by ATR-FTIR. *Talanta.* 2017;162:634-40.
48. Elkins KM. Rapid presumptive "fingerprinting" of body fluids and materials by ATR FT-IR spectroscopy. *J Forensic Sci.* 2011;56(6):1580-7.
49. Zhang J, Li B, Wang Q, Li C, Zhang Y, Lin H ve ark. Characterization of postmortem biochemical changes in rabbit plasma using ATR-FTIR combined with chemometrics: A preliminary study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2017;173:733-9.

50. Wang Q, Zhang Y, Lin H, Zha S, Fang R, Wei X ve ark. Estimation of the late postmortem interval using FTIR spectroscopy and chemometrics in human skeletal remains. *Forensic Sci Int.* 2017;281:113-20.
51. Lusignan MF, Li X, Herrero B, Delbes G, Chan PTK. Effects of different cryopreservation methods on DNA integrity and sperm chromatin quality in men. *Andrology.* 2018;6(6):829-35.