

Olay yeri biyolojik örneklerinden yaş tahminini belirlemede DNA metilasyonunun etkinliği

AYŞEN TEZEL¹, DUYGU YAVUZ KILIÇASLAN¹

¹ Jandarma ve Sahil Güvenlik Akademisi, Adli Bilimler Bölüm Başkanlığı, Ankara, Türkiye

Öz

Olay yeri biyolojik örneklerinden yaş tahminini belirlemede DNA metilasyonunun etkinliği

Adli bilimler alanında en yaygın kullanılan epigenetik mekanizmalardan biri DNA metilasyonudur. Günümüzde insanlarda kronolojik yaş tahmin etmek için çok sayıda CpG bölgesinin yaşla ilişkili metilasyon analizleri gerçekleştirilmektedir.

Olay yerinden elde edilen biyolojik örneklerde yaş tahminini belirlemek hedeflenmiştir. Yapılan bu araştırma, aynı zamanda yaş tahmini çalışmaları için zemin oluşturacaktır.

Adli bir suç soruşturması safhasında tespit edilebilecek biyolojik örneklerden yaş tahmini yapılabilmektedir. Bu konuda PubMed, Scopus ve Google Scholar veritabanlarında, adli yaş tahminiyle ilgili detaylı çalışma yapılmıştır.

Yaş ile korelasyon sağlaması bakımından CpG bölgeleri, değişen yaş kategorilerinde kadın ve erkek gönüllüden alınan biyolojik örneklerde Bisüfit Dönüşüm yöntemi ile çalışılmıştır. Biyolojik yaş ile kronolojik yaş gruplarında tahmin edilen yaşın Ortalama Mutlak Sapma (MAD) veya Ortalama Mutlak Hata (MAE) değerleri tespit edilmiştir.

Yapay zekâ ile yapılan yaş tahminlerinin kan örneklerinde ortalama MAD değeri 3 ila 5 yıl arasında bulunmuştur. Ancak dokulara göre yaşa bağlılıklar tespit edilmiş, doğruluklarının kan örneklerine göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak adli uygulamalarda, olay yerinde elde edilen biyolojik materyalin türüne göre yaş tahmini yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: DNA metilasyonu, Yaş tahmini, Biyolojik örnekler, Epigenetik, Ortalama mutlak sapma, Ortalama mutlak hata

Abstract

The effectiveness of DNA methylation in determining age estimation from biological samples at the crime scene

DNA methylation is one of the most widely used epigenetic mechanisms in the field of forensic sciences. Today, numerous CpG sites are analyzed for their age-related methylation to estimate chronological age in humans.

The aim is to determine age estimation from biological samples obtained at the crime scene. This research will also serve as a foundation for future age estimation studies.

Age estimation can be performed from biological samples that can be detected during a forensic investigation. In this regard, a detailed study on forensic age estimation was conducted using the PubMed, Scopus, and Google Scholar databases.

CpG sites were studied using the Bisulfite Conversion method in biological samples obtained from male and female volunteers across different age categories to establish their correlation with age. The Mean Absolute Deviation (MAD) or Mean Absolute Error (MAE) values of the estimated age compared to biological and chronological age groups were determined.

Age estimations performed with artificial intelligence in blood samples yielded an average MAD value between 3 and 5 years. However, age dependencies according to tissue types were detected, and their accuracy was observed to be lower compared to blood samples. Therefore, in forensic applications, age estimation should be performed based on the type of biological material obtained at the crime scene. As a result of methylation analyses numerous age-related CpG sites are conducted to estimate chronological age in humans.

Keywords: DNA methylation, Age estimation, Biologic samples, Epigenetics, Mean Absolute Deviation, Mean Absolute Error

Nasıl Atıf Yapmalı: Tezel A, Kılıçaslan DY. Olay yeri biyolojik örneklerinden yaş tahminini belirlemede DNA metilasyonunun etkinliği. Adli Tıp Bülteni. 2025;30(3):254-264. <https://doi.org/10.17986/bml.1762>

Yazışma Adresi: Ayşen Tezel, Doktor Öğretim Üyesi, Jandarma ve Sahil Güvenlik Akademisi, Adli Bilimler Bölüm Başkanlığı, Ankara, Türkiye

Email: aysentezel@gmail.com **ORCID ID:** 0000-0001-8048-4284

Geliş: 30 Haz 2025

Kabul: 17 Kas 2025

GİRİŞ

Epigenetik, gen yapısındaki DNA dizi değişiklikleri ile açıklanamayan genetik yapıdaki değişiklikleri ifade eder (1). Yunanca “epi” (ἐπί) kelimesinden türetilmiş olup “üzerinde” veya “üstünde” anlamına gelir. Genlerin dizisindeki değişimlerin nasıl ve ne zaman aktif veya inaktif olacağı epigenetik modifikasyonların takibi ile olur. Bu epigenetik değişimler; DNA metilasyonu (DNAm), kromozomal yapılanma ve histon modifikasyonlarıdır. DNA ile ilişkili kromatin proteinlerinin aktivasyonu belirli protein üretimi faaliyeti için yalnızca gerekli genleri ifade eder.

DNAm, embriyonik gelişim için yeniden programlama, transkripsiyon, genetik imprinting (baskılama), kromozomal stabilite, kalıtsal olmayan genetik yapıda ve X kromozomu inaktivasyonunda önemli rol oynar (2). İnsan genomunda yaklaşık 28 milyon DNA metilasyon bölgesi bulunmakta ve bunlar zamanla değişime uğramaktadır. Hücre bölünmesi sırasında DNA dizisinin bir sonraki nesile aktarılmasıyla epigenetik yapı da aktarılır.

DNAm, DNA çift sarmalında 5’—3’ yönünde bulunan Sitozin molekülünün -5. Karbonuna metil (-CH3) eklenmesiyle oluşur. DNA’daki bu 5’—3’ yönlü CG metilasyon bölgelerine “CpG” dinükleotidleri denir. İnsan genomunda bu bölgeler büyük ölçüde metillenmiştir (3). Metillenmemiş CpG’ler ise “CpG adacıkları” olarak adlandırılır. Genellikle yüksek CG yoğunluğuna sahip (>%55 CG içeriği) 300–3000 baz çifti uzunluğunda kümeler hâlinde bulunurlar ve çoğunlukla yapısal genlerin promotör bölgelerinde yer alırlar (4).

Yaş ilerledikçe belirli CpG bölgelerinde sıklıkla hipermetillenme ve hipometillenme gözlenmektedir (5). Bireyler yaşlandıkça hipermetilasyon veya hipometilasyona uğraması, geliştirilmiş tahmin modellerinin yolunu açmıştır. Yapılan araştırmalar, DNAm’nun ergenliğe kadar, yetişkinlik dönemine kıyasla daha hızlı değiştiğini göstermiştir (6, 7). İnsan Genom Projesi ile birlikte bu araştırmalar daha da artmış ve insan genomunda 28 milyon CpG dinükleotidinden milyonlarcasının metilasyon durumlarının yaşla birlikte değiştiği görülmüştür. DNAm için çok çeşitli biyobelirteçler ve yöntemler çalışılmış ve hücre tipleri arasında farklı doğruluklar elde edilmiştir. Amaç, insanı tanımlamaya yardımcı olmak için sonuca en yakın yaş tahmin modelleri belirlemektir.

Adli bir olay gerçekleştiğinde kolluğun gerçekleştirdiği suç araştırmalarında sıklıkla biyolojik örnekler olarak kan, kıl, meni, tükürük vb. kalıntılara rastlanmaktadır. Soruşturma esnasında doğru yaş tahmininde bulunması, suçlu araştırma havuzunu daraltmaya yardımcı olacaktır.

Epigenetik Saat ve Yaş Tahmin Ediciler

İnsanlarda ve farelerde yapılan çalışmalar, DNAm’na dayalı biyobelirteçlerin daha önce ulaşılamayan yaşlanmanın moleküler bir biyobelirteçler olma kriterlerini karşıladığını göstermektedir. Bu belirteçler, DNA’nın her türlü kaynağına (hücreler, dokular ve organlar) ve tüm yaş aralıklarına (doğum öncesi dokulardan yüz yaşını geçmiş bireylere kadar) uygulanabilmektedir. Keşiflerden bu yana DNAm belirteçleri; tıp, biyodemografi, endokrinoloji, diyet çalışmaları ve hücre biyolojisi gibi çeşitli alanlarda uzun süredir cevapsız kalan sorulara yanıtlar sağlamıştır. Aynı zamanda epigenetik saatler, türe özgü olarak da değerlendirilmiş, yaban hayatı yönetimi ve koruma biyolojisi ile ilgili çalışmalara da dahil edilmiştir (8).

Epigenetik mekanizmalar fetal dönemde başlar ve yaşam boyunca devam eder. Kronolojik yaş, doğumla beraber sürekli bir değişkenken; Biyolojik yaş, bireyin sağlığını ve yaşa bağlı biyolojik değişiklikleri ölçer (9). İnsanlar yaşlandıkça, farklı çevresel faktörlere maruz kalmaları sonucunda epigenetik profilleri değişmektedir. Son yıllarda yaş tayininde kullanılan birçok gen bölgesindeki CpG alanlarındaki DNA metilasyon seviyelerinin analizine dayalı yaş tayinine yönelik birçok panel ve kit geliştirilmiştir. Geliştirilen bu panel ve kitlerin adli araştırmalarda aktif olarak kullanılabilmesi için geçerliliklerinin yapılması ve uygulanabilirliğinin ölçülmesi gerekmektedir. Bu alanda yürütülen çalışmalar genelde seçilen epigenetik belirteçlerin duyarlılığı, insan özgüllüğü ve stabilitesi ile ilgili veri elde etmek, koşullarını ve sınırlamalarını belirlemek için gelişimsel doğrulama çalışmaları yapılması yönündedir. Özellikle de adli örnekler simüle edilip, geliştirilen panelin bozunmuş örneklerdeki başarısını ölçmek büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle kontrole ve validasyona dayalı çalışmalar, geliştirilen panelin güvenilirliği ve kullanılabilirliği açısından önemlidir.

Epigenetik “yaş tahmin ediciler”, CpG dizileri (başka bir deyişle “saat CpG’leri”), bu dizilere bağlı matematiksel algoritmadan oluşur. Bu sistem, bir DNA’nın hücre, doku veya organ seviyesinde kaynağına dayalı yaşı yıl cinsinden tahmin eder. Bu tahmini yaş; epigenetik yaş veya daha spesifik olarak DNAm yaşı olarak ifade edilir. Sadece kronolojik yaşı değil, aynı zamanda ilgili DNA kaynağının biyolojik yaşını da yansıtır. Bu nedenle, DNAm yaş tahmin ediciler genellikle “epigenetik saatler” olarak ifade edilir.

Yaş tahmininde kullanılmak üzere epigenetik saatler, telomer uzunluğu, transkriptom, proteom ve metabolom temelli tahmin araçları ile bileşik biyobelirteçler olmak üzere altı tip biyolojik yaş belirteci incelenmiştir. Ancak epigenetik saatin biyolojik yaşı moleküler düzeydeki en umut verici tahmin edicisi olduğu sonucuna varılmıştır.

Yaşlanma Saatleri

Son çalışmalarda bir bireyin biyolojik yaşını tahmin etmek için genetik diziden ziyade, epigenetik değişikliklere özellikle de DNAm'a önem verilmiştir. DNAm, yaşla birlikte öngörülebilir şekilde değişen kimyasal bir modifikasyondur. Bu değişiklikler, bireyin DNA'sı üzerinde yaşa bağlı "izler" bırakır ve bu da yaş tahmininde kullanılabilir. Yaş ilerledikçe, bazı CpG bölgelerinde metilasyon oranları artar veya azalır. Bu değişimler çok belirgin olduğundan, yaş tahmininde yüksek doğruluk sağlar. Yaş tahmini çalışmalarında epigenetik mekanizmalara yönelinmiştir. Bireyin görünümü ve kökeni kalıtsal özellik olarak ifade edilirken, yaş tamamen çevresel ve biyolojik süreçlerle ilişkilidir. Bu yüzden yaş tahmini, DNA dizisinden değil, DNA'nın kimyasal yapısından yararlanılarak yapılır. Yapılan çalışmalar yaşlanmayla birlikte farklı doku tiplerinde yüksek metillenmiş bölgeler üzerine olmuştur. Bu alanların genel olarak CpG'lerde, bivalent promotörlerde ve Polycomb hedef genlerinde olduğu bildirilmiştir (10,11,12). DNA metilasyon kalıpları farklı etki ve bölgelere göre değişim gösterebilir. Bu değişimler yaşa bağlı ya da çalışılan dokuya göre de değişiklik göstermektedir. 2015 yılından sonra yaş tahmini alanında çok sayıda yeni model geliştirilmiştir. Hepsisi farklı doğruluk seviyelerine sahip olsa da aynı temel prensibe dayanır. Yüksek boyutlu genom verilerinden tek bir yaş tahmini üretmek amaçlanmıştır. Çalışmaların ilk uygulama alanı kandaki DNA'dan yaş tahminidir. Yapılan çalışmalarda hata payının en düşük olduğu örneklerin kan, ağız içi sürüntüsü ve tükürük olduğu belirlenmiştir (13, 14). Bu nedenle son yıllarda tükürük, meni, kemik, hatta deri gibi farklı dokulara uygun modeller de geliştirilmiştir.

Alternatif olarak vücudun farklı bölgelerinde gözlenen yaşlanma hızındaki farklılıklar da araştırılmaktadır. Bu çalışmalardan biri olan Horvath saati, vücudun farklı bölgelerindeki yaşlanma hızlarını belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Horvath, Hannum ve arkadaşları ile McCrory ve arkadaşları farklı saat modellerini, farklı popülasyonlarda farklı doku tiplerini inceleyerek tahminler geliştirdiler (15). Bir bireyin doku ve organlarının çoğu genel olarak benzer epigenetik yaşlara sahiptir. Bu doku ve hücreler arasında yaş senkronizasyonu, özellikle beyin ve kan hücrelerinde çarpıcıdır. Bu iki hücre türü hücresel çoğalma ve yenilenme açısından uç noktalarda yer almaktadır. Fakat yine de benzer epigenetik yaş sonuçları verir. Ancak bazı istisnalar da vardır: Beyincik (cerebellum), diğer beyin bölgelerine göre epigenetik olarak daha gençtir. Kadın meme dokusu, vücudun diğer bölgelerine göre epigenetik olarak daha yaşlıdır. Buna karşın, bu saat sperm hücreleri için geçerli değildir. Ancak bu hücrelere özel, epigenetik yaş tahmin edicisinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır.

Hannum (16), Horvath (15), PhenoAge (17), EPM (18) ve Zhang19 ENPRED (19) olmak üzere beş yaşlanma saatinde

CpG bölgelerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Bu beş yerleşik yaşlanma saatinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ESTimage (ESTimation of Methylation Age) web sayfasından yararlanılmıştır (20).

DNA Metilasyon Yöntemleri

Yaş tahmini için en doğru DNAm belirteçlerini tespit etmek amacıyla çeşitli yöntemler araştırılmıştır. Bu yöntemler, adli analizlerde yaygın olarak kullanılan dokuları hedef almış ve farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Kullanılacak tekniklerin seçimi, belirlenen spesifik hedeflere bağlıdır. Yüzlerce lokusu taramak gerektiğinde DNA mikroarray teknolojilerinden yararlanılmalıdır.

DNAm çalışmalarında en küçük mutlak büzülme ve seçim analizleri Lasso (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) ve elastik ağ regresyon modelleri de yaş tahmininde kullanılmaktadır. Kullanılan en küçük mutlak büzülme analizinde, yaş tahmini için en uygun CpG'leri otomatik şekilde seçer ve denetimli makine öğrenimi analizleri gerçekleştirir.

Adli olaylarda rutin yaş tahmini için az miktarda DNA ile analiz yapılmasını sağlayan, yüksek hassasiyet ve doğruluk oranını koruyan minimum sayıda DNA belirtecinin kullanılması hedeflenmektedir. Yaş tahmininde kullanılmak üzere çeşitli biyolojik belirteçler belirlenmiştir. Telomer tekrar uzunluğu (21), sinyal bileşimli T reseptör eksizyon döngüsü (sjTREC'ler) (22), ileri glikasyon ürünlerinin birikimi (23), aspartik asit rasemizasyonu ve DNAm (24), bu belirteçler arasındadır. Bu belirteçlerin yaşla bağlantısı biliniyor fakat çoğunda düşük doğruluk ve belirli dokularda görülmesi nedeniyle uygulamada fazla tercih edilmemektedir. Bu belirteçler arasında en umut verici yaş tahmini biyobelirteçler olarak DNAm belirteçleri görülmektedir. DNAm çalışmalarında ilk basamak bisülfid dönüşümüdür. Sonrasında ise dizileme yöntemleri kullanılır. Bu yöntem, DNA metilasyon analizinde altın standart olarak kabul edilir ve günümüzdeki çoğu yöntem, CpG bölgelerini tespit etmek için bu işlemi başlangıç aşaması olarak kullanmaktadır. Bu işlem sırasında, deaminasyon süreci gerçekleşir. Metillenmemiş sitozinler urasile dönüşürken, metillenmiş sitozinler değişmeden kalır ve sonrasında gerçekleştirilen amplifikasyonda urasil, timin olarak çoğalır (25). Böylece, metillenmiş ve metillenmemiş sitozinler arasındaki fark, DNA dizilimindeki değişikliklerle gözlemlenebilir (26). Bisülfid dönüşümünden yararlanma sınırlıdır. En büyük dezavantajlarından biri, DNA'nın ciddi şekilde bozulmasına yol açarak, sonraki analizler için elde edilebilecek DNA miktarını azaltması ve dizileme bilgilerinin kaybolmasına neden olmasıdır. Ayrıca, örneklerin tam olarak dönüşmemesi ve yeniden birleşme (reannealing) gibi dönüşüm sorunları, dikkat edilmesi gereken önemli faktörlerdir. Bunun yanı sıra, DNA'nın kalitesi, başarılı bir bisülfid dönüşümü için kritik bir faktördür. Bu durum

özellikle adli olaylar için bir sınırlama teşkil edebilir (27). Buna rağmen, bisülfid dönüşümü, DNA metilasyon analizinin gelişiminde önemli bir rol oynamıştır. Günümüzde, DNA bisülfid dönüşümü yapmak için çeşitli ticari kitler mevcuttur ve bu kitlerin performansı farklı araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (28).

Bisülfid değişiminden sonra dizileme yöntemi için farklı metotlar uygulanmaktadır. Metilasyon çalışmalarında mikroarray ve büyük paralel dizileme teknolojileri (Massive Parallel Sequencing technologies -MPS), Sanger, Pirosekanslama, Multipleks Minidizileme (SNaPshot), Metilasyon Spesifik PCR (MSP), Metilasyona Duyarlı Yüksek Çözünürlüklü Erime (MS-HRM), EpiTYPER, Nanopore sekanslama, Damlacıklı Dijital PCR (Droplet Digital PCR, ddPCR), Illumina mikrodizi teknolojisi (BeadArray) gibi DNA metilasyon değişikliklerini daha spesifik tespit eden bir yöntemlerdir.

Sanger ile Bisülfid Dizileme; en eski DNA metilasyon analizi yöntemidir. Uygulanabilirliği açısından kolaydır ancak birden fazla bölge incelemelerinde dezavantajdır. Primer tasarımının iyi yapılması gerekmektedir (26).

MSP; metilasyon durumunu değerlendirmek için kullanılan PCR tabanlı bir yöntem kullanılarak metilasyon durumu değerlendirilir. Yöntem basit ve DNA miktarının az olmasından etkilenmemesi açısından adli laboratuvarlar için uygundur (26).

Pirosekanslama; DNAm çalışmalarında kullanılan bu yöntemde, farklı doku tiplerinde karşılaştırma amaçlı kullanılmış çalışmalar bulunmaktadır (29, 30). Bisülfid değişiminden sonra uzayan DNA zincirine eklenen bir nükleotitle pirofosfat salınımı olur ve ışık yayılımı gerçekleşir. Kamera tarafından algılanan ışık T ve C nükleotitlerinin oranını, bir dizideki her CpG bölgesindeki metilasyonu belirler. Uzayan zincire bir nükleotid eklendiğinde pirofosfatın salınmasına neden olur ve ışıma gerçekleşir. Bu yöntem ışıma tespitine dayanan bir yöntemdir. Normal okuma uzunluğu 40 nükleotidden azdır ve aynı parçada yalnızca yakın konumlu CpG bölgeleri analiz edilebilir (31). Düşük metilasyon oranını belirler ancak multipleks analiz için çok tercih edilmemektedir.

SNaPshot; hedef nükleotit dizisinin 1 bç uzağına bağlanan primere floresan işaretli ddNTP eklenmesiyle dizinin sonlanması prensibine dayanır. Bu basamak bisülfid değişimin ardından gerçekleşir. Ancak floresan yoğunlukları farklı olan ddNTP'lerin bağlanmasıyla metilasyon değerini değiştirebilir. Bu durum aslında bu yöntemin kısıtlılıklarından kaynaklanır (32).

MS-HRM; metillenmiş ve metillenmemiş bölgeler arasındaki erime eğrilerinin karşılaştırıldığı yöntemdir (26).

EpiTYPER; 100-600 baz çiftinden oluşan genomik bölgelerdeki çoklu CpG'lerin DNAm'nu nicel olarak değerlendirmek için kullanılan bir teknolojidir (33). Bu yöntem ayrıca fazla sayıda örnek veya bölgenin ölçülmesini gerektiren durumlarda da kullanılmaktadır. Bu yöntemde bisülfid dönüştürülmüş DNA'nın PCR ile çoğaltılması ardından kütle tabanlı yeniden dizilenmesidir. Bu işlemin ilk basamağı bisülfid değişimi ardından bisülfid PCR yapılır. PCR sırasında eklenen T7 promotörü ile PCR ürününü ters iplikten transkribe etmek için kullanır ve tek iplikli bir RNA ürünü elde edilmiş olunur. Bu tek iplikli RNA, RNaz ile kesilir ve metilasyon yüzdesi hesaplanır. Bu yüzde ise, metillenmiş parçayı temsil eden tepe noktasının yüzey alanının hem metillenmiş hem de metillenmemiş parçanın tepe noktalarının toplam yüzey alanına bölünmesiyle hesaplanır (33).

Nanopore sekanslama; Nanopordan geçen DNA elektrik akımında dalgalanmalara neden olur. Bu yöntemde elektrik akımındaki dalgalanmanın ölçümü ile dizileme yapılmaktadır. Bu yöntemde bisülfid dönüşüm yapılmasına gerek olmadan metillenmiş ve metillenmemiş sitozini ayırmak mümkündür (34, 35).

ddPCR; yenilikçi bir kantitatif yöntemdir. Bisülfid dönüşümünden sonra DNA mikro damlacıklarına ayrılır ve PCR amplifikasyonu ile damlacıkların analiz edildiği kantitatif bir yöntemdir (26). Adli araştırmalar için de uygundur. Hızlı bir yöntemdir. Adli tıpta, bu yöntemin kan örneklerinde ve tükürük örneklerinde geçerliliği vardır.

BeadArray; silika mikroboncuklar kullanır. Tek bir birey için milyonlarca genotip aynı anda analiz edilebilen, mikrokuyucuklarda muhafaza edilen minik silika boncuklar ile belirli bir lokusu hedef alan teknolojidir. Karmaşık bir biyoinformatik analiz gerektirmektedir.

Kullanılan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Pirosekanslama, MSP ve doğrudan Sanger dizilemesi, tek bir genin promotör bölgesi veya bir CpG adası gibi hedeflenen bölgelerin analizi için en yaygın kullanılan yöntemlerdendir ancak nicel olarak düşük doğruluk, kısa okuma uzunluğu ve düşük örnek verimi bu yöntemlerin dezavantajlarındandır (36).

Adli Uygulamalarda Kullanılan Temel Yaş Tahmin Modelleri

Yaşlanma saatleri, epigenetik saatler, pek çok tıp alanında kullanılmıştır. Adli olaylarda ise özellikle olay yerinde bulunan biyolojik örneklerden yaş tespitinde kullanılması önemli bir adımdır. Olay yerinde bulunan biyolojik bir örneği, karşılaştırılacak bir referans örnek olmadığı zaman kişinin özelliklerini tahmin etmek zorlaşmaktadır. DNAm çalışmaları özellikle referansı olmayan vakalara yardımcı olmaktadır. Literatürdeki çalışmalar DNAm ile kronolojik yaş tahmini, monozygot ikizlerini ayırt etmek ve dokuları tiplerini tanımlamaya yönelmiştir (37-40).

Adli alanda yaş belirlemede kullanılan spesifik yaş belirleme modelleri araştırılmıştır. Bunlardan ELOVL2 (Elongation of Very Long Chain Fatty Acids Protein 2) kan, diş, kemik ve ağız içi sürüntüleri ile çalışılmış ve yaş ile güçlü pozitif korelasyonlar gösterdiği bildirilmiştir (26, 41).

DNAM'dan yaş tahmini çalışmaları günümüzde artmaya başlamıştır. Bu çalışmalar hem farklı dokular hem de farklı yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalardır.

Kan Örneklerinde Yaş Tahmini Çalışmaları

Olay yerinde en fazla karşılaşılan örneklerden ilki kan örnekleridir. Bu nedenle adli genetik analizlerin ilk uygulama çalışmalarında olduğu gibi DNAM ile yaş tahmini çalışmalarının ilki de kan örnekleriyle olmuştur. Yaş tahmini biyobelirteçlerden ilk kullanılan ELOVL2'nin pirosekanslama kullanarak 100 postmortem kan örneğinden çalışıldığı öncül çalışmada 2 CpG bölgesi ortaya konmuş ve 10,2 yıllık bir tahmin hatası ve 7,1 yıllık bir ortalama mutlak sapma olduğu bildirilmiştir (42).

19 ila 101 yaşları arasındaki 656 kan örneğinden 450.000'den fazla CpG bölgesi BeadArray teknolojisi ile çalışılmış ve bağımsız veri setlerinde doğrulandığı belirtilmiştir (16). Kan ile yapılan bir başka çalışmada sadece bisülfite pirosekanslama yöntemiyle 3 CpG bölgesinde DNAM seviyelerinin bisülfite dizilemesi ile ölçülmesini gerektiren epigenetik yaşlanma imzası geliştirdiklerini bildirmişlerdir (21). Ergenlerde ve genç yetişkinlerde araştırmalar sınırlıdır. Kan örnekleriyle yapılan çalışmalardan biri de ergenler ve genç yetişkinler için Ergenler ve Genç Yetişkinler için Yaş Tahmincisi (PAYA) önermişlerdir. Bu çalışmada kan örneklerinde 267 CpG metilasyon bölgesi araştırılmış ve karşılaştırma için 18 yaşındaki bireylerden oluşan bağımsız bir doğrulama veri seti kullanılarak 0.7 yılın biraz altında bir medyan mutlak sapma elde ettiklerini bildirmişlerdir (43).

Bisülfite pirosekanslama kullanarak 427 kan örneğinde ELOVL2 genindeki 7 CpG'nin metilasyonun çalışıldığı bir çalışmada 5,75'lik bir MAD ile yaş tahminine olanak sağladığını ve 4 haftalık oda sıcaklığında beklemeden sonra bile hiçbir metilasyon değişikliği olmadığını bildirmişlerdir (44). Aynı grup tarafından bir diğer çalışmada da pirosekanslama kullanarak 420 kan örneğinde 41 CpG'nin analizi yapılmış, ELOVL2, TRIM59, C1orf132/MIR29B2CHG, KLF14 ve FHL2 genlerinden beş belirteci kullanan yaş tahmin modeli üretmişlerdir (45).

Pirosekanslama kullanılarak yapılan yaş tahmin modelleri öncü çalışmalardan birinde, 151 kan örneği analiz edilmiş ve ITGA2B, ASPA ve PDE4C genlerindeki 3 CpG bölgesinde 5 yıldan az bir MAD elde ettiklerini bildirmişlerdir (21). Pirosekanslama ve makine öğrenme algoritmasında kullanılan Random Forest Regresyonu'na dayalı analizlerle yapılan çalışmada

0,1 ng genomik DNA ile 10-79 yaşlarındaki 128 erkek ve 113 kadından alınan kan lekesi kullanılarak 6 genden 46 CpG bölgesinin metilasyon seviyelerini incelediklerinde her model için 3 yıldan az bir mutlak sapma olduğu, bunun da adli vakalarda kullanılabilirliği belirlenmiştir (46).

Postmortem bir çalışmada 36 postmortem kan örneğinde, varyasyonun %74'ünü 10,2 yıllık bir tahmin hatası ve 7,1 yıllık bir ortalama mutlak sapma (MAD) olduğu bildirilmiştir (47).

SNaPshot yönteminin kullanıldığı çalışmalardan birinde 448 örnek kullanarak bağımsız yaş tahmin modelleri ve 5 CpG bölgesi (ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132/MIR29B2C ve TRIM59) incelenmiş ve kan örnekleri için 3,48 yıllık bir MAD elde ettikleri bildirilmiştir (48). Çin Han popülasyonundan alınan 310 kan örneğinin analizinin yapıldığı çalışmada ASPA, EDARADD, KLF14, CCDC102B, ZNF423, ITGA2B, KLF14 ve FHL2 genlerinden 7 CpG belirteci kullanılmış ve destek vektör regresyon modelinin en doğru yöntem olduğu ve 80 test setinde 5,56'lık bir MAD elde ettikleri raporlanmıştır (49). Farklı popülasyonlardaki sonuçları karşılaştırmak için Onofri ve arkadaşları İtalyan popülasyonunda ELOVL2, FHL2, KLF14, MIR29B2C ve TRIM59 genlerindeki 5 CpG bölgesini SNaPshot yöntemiyle çalışmış ve test setinde 3,01 yıllık bir MAD elde ettiklerini bildirmişlerdir (50).

EpITYPE yöntemi kullanarak 15-75 yaş arasındaki 390 Çinli kan örneğinde 21 genomik bölge içindeki 153 yaşa bağlı CpG bölgesi araştırılmıştır. Bu çalışmada ELOVL2, TRIM59, MIR29B2CHG, PDE4C, CCDC102B, RASSF5 genlerinde bulunan 9 CpG bölgesini yaş tahmini için en uygun bölge olarak tanımlamışlardır (51).

Yaş tahminleri ile ilgili farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalar mevcuttur. Türk popülasyonunda yapılan çalışmalarla ilgili olarak; 100 gönüllüden alınan kan örnekleri ile 2024 yılında Filoğlu ve arkadaşları tarafından Türk popülasyonu için geliştirilen yeni bir yaş tahmin modelini sunulmuştur. Bu çalışmada kan örneklerinde TOM1L1, ELOVL2, ASPA, FHL2, C1orf132, CCDC102B, cg07082267 ve RASSF5 lokuslarındaki 8 CpG bölgesi çalışılmış ve duyarlılık analizi, ≥ 1 ng DNA ile güvenilir bir performans gösterdiği, çoklu doğrusal regresyon kullanan istatistiksel modellemenin, ELOVL2, ASPA, FHL2, C1orf132, CCDC102B ve RASSF5 için güvenilirliğini bildirmişlerdir (52).

Felaket kurbanlarının kimliklendirilmesinde yanmış cesetlerde DNA analizleri oldukça zordur. Buna rağmen, yanmış cesetlerden elde edilen kandan DNAM ile yaş tahmini çalışması yürütülmüştür. Bu çalışmada yanmış cesetlerden alınan 29 kan örneklerinde Tek Baz Uzama (SBE) testi ile analizler yapılmış, %79,3'ünde doğru tahmin yapılırken, 6 vakada yanlış tahmin yapılmıştır. Bunun da örneklerdeki bozulmalardan kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir (53).

Tükürük ve Ağız İçi Sürüntü Örneklerinde Yaş Tahmini Çalışmaları

Bocklandt ve arkadaşları, 21-55 yaşları arasındaki 34 erkek tek yumurta ikizi çiftinin tükürüğünde sitozin metilasyon derecesinin yaşla önemli ölçüde ilişkili olduğunu ve bir bireyin yaşını ortalama 5,2 yıl doğrulukla tahmin edebilen bir regresyon modeli oluşturmuşlardır (54). 21 ila 69 yaşları arasındaki bireylerden alınan ağız içi sürüntüsünün kullanıldığı başka çalışmada, PDE4C, ELOVL2, ITGA2B, ASPA, EDARADD, SST, KLF14 ve SLC12A5 bölgelerinde bulunan 88 CpG bölgesi yaşa bağlı metilasyon pirosekanslama ile analiz edilmiş, doğrusal regresyon analizi yapılmış ve incelenen 3 CpG bölgesini içeren bir yaş tahmin modeli oluşturularak tahmin edilen yaş ile kronolojik yaş arasındaki ortalama mutlak sapmanın, 5,11 yıl olduğu belirlenmiştir (55).

Farklı hücre kompozisyonları ve dokularının yaşa bağlı değişimini inceleyen çalışmalar da vardır. Bu çalışmalardan birinde, tükürük örneklerindeki farklı hücre kompozisyonunu kullanarak 55 ağız içi sürüntüde pirosekanslama yöntemiyle PDE4C, ASPA ve ITGA2B CpG bölgelerinde çalışılmış, 7,03'lük bir MAD elde edilmiş ve ayırım yapmak için lökosit ve epitel hücrelere özgü 2 CpG belirteci bakılmış 5,09 ve 5,12'lik MAD'ler elde edilmiş, hücre tipine özgü CpG modelinin daha fazla doğruluk gösterdiği tespit edilmiştir (56). Bir başka çalışmada ise 184 kişiden alınan tükürük ve yanak hücresi olmak üzere toplam 368 örnekle Illumina HumanMethylation450 BeadChip metoduyla iki dokuya özgü belirteç olan HUNK ve RUNX1 ile 7 CpG bölgesi (cg10501210, LHFPL4, ELOVL2, PDE4C, HOXC4, OTUD7A ve EDARADD) analiz edilmiştir. SNaPshot metoduyla da dokuya özgü birleşik yaş tahmin modelleri geliştirilmiş; 91 tükürük, 93 yanak hücresi bulunan test setinde 3,66'lık bir MAE elde edilmiştir (56). Bu çalışmaya dokuya özgü belirteçler eklendiğinde yaş tahmininde bir değişim ya da iyileşme görülmediği belirlenmiştir. Bu da hücrel kompozisyonların daha önemli olduğunu göstermektedir (57).

ddPCR teknolojisinin kullanıldığı ilk metilasyon çalışması tükürük örnekleriyedir. Bu çalışmada tükürük örneklerinde SST, KLF14, TSSK6 ve SLC12A5 genleri içinde bulunan 4 CpG bölgesinde bulunan metilasyon oranları analiz edilmiş ve 76 kişiden alınan tükürük örneklerinde 3,3'lük bir MAD tahmini veren modeli geliştirmişlerdir (58).

Meni Örneklerinde Yaş Tahmini Çalışmaları

Cinsel saldırı vakalarının bir numaralı delillerinden biri meni örnekleridir. Kimliklendirmenin dışında elde referans örneği yoksa yaş tahmini çalışmaları önem arz etmektedir. Bu bağlamda DNA metilasyon yaş belirlemesi için meni örnekleriyle de çalışmalar yapılmıştır. Literatürde genel olarak 11. kromozomda bulunan Folat Hidrolaz 1b'yi kodlayan FOLH1B geni, menide yaş tahmini belirlemede

çok çalışılmıştır. Meni örneklerinden DNAm kullanılarak yapılan ilk yaş tahmini çalışması 2015 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada 20 ila 73 yaşlarındaki bireylerden alınan 68 meni örneğinde seçilen CpG bölgelerinde, TTC7B genindeki cg06304190, NOX4 genindeki cg06979108 ve cg12837463'de tahmin edilen yaş ile kronolojik yaş arasında yaklaşık 5 yıllık ortalama mutlak farkla yüksek bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (59). 2021'de yapılan bir başka çalışmada SH2B2, EXOC3, IFITM2 ve GALR2 ve pek çok çalışmada seçilen FOLH1B genindeki 6 CpG belirtecini, meni örneklerinde en kullanışlı model olduğunu ve yaklaşık 5,1 yıllık mutlak hata ile yaş tahmini yapılabildiğini bildirmişlerdir (60).

Er ve arkadaşları (61) meni örneklerinde 12 CpG bölgesinden (PARP14, C5orf25, cg23488376, MXRA5, PFKFB3, DLL1, NOX4, cg12837463, TTC7B, KCNA7, NKX2-1 ve SYNE4) oluşan bir multipleks panel geliştirmişlerdir. Bu çalışmada 20-71 yaş aralığındaki bireylerden meni örnekleri alınmış ve SNaPshot testi kullanarak 3,81 ila 4,1 yıl arasında değişen ortalama mutlak hatalarla güvenilir doğruluk elde ettiklerini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada meni lekelerinin farklı kumaşlardaki yıkama ve çevre maruziyeti sonrası metilasyon analizleri de araştırılmış ve dayanıklılık gösterdiği de tespit edilmiştir. Meni örnekleriyle yapılan başka bir çalışmada da 22, 32 ve 44 yaşlarındaki 3 kişiden meni örnekleri alınmış, farklı kumaşlardaki meni lekelerini 1 yıl beklettikten ve farklı sıcaklıklarda yıkadıktan sonra bile yaş tahminleri yapılabilmektedir (62).

Diş ve Kemik Örneklerinde Yaş Tahmini Çalışmaları

Özellikle feth-i kabir olgularından gelen örnekler kemik ve diş örnekleridir. Diğer vücut sıvılarına göre daha az da olsa DNAm ile yaş tahmini çalışmaları bu örneklerde yapılmıştır. 19-70 yaş aralığında 29 kişiden alınan diş örneklerinde daha önce kanda çalışılmış ASPA, PDE4C, ELOVL2 ve EDARADD bölgeleri analiz edilmiş ve 4,86 yıllık bir MAD bildirmişlerdir (30). Başka bir çalışmada, 17 ila 77 yaş arasında 21 kişiden alınan dişlerde ELOVL2, FHL2 ve PENK genlerinde bulunan belirli CpG'lerin MALDI-TOF kütle spektrometrisini kullanarak DNA metilasyon seviyelerini analiz edilmiş ve kişilerin kronolojik yaşı ile DNA metilasyon değerleri ile bulunan tahmini yaşlar arasındaki farkın, dişin minesini ve pulpasından çalışılırsa 1,20 yıl, sadece pulpasından çalışılırsa 2,25 yıl, sadece mineden çalışılırsa 2,45 yıl ve sadece dentinden çalışılırsa 7,07 yıl olduğunu bildirmişlerdir (63). Kan örneklerinde çalışılmış CpG'lerin dişlerde çalışıldığı başka çalışmada MSP metodu kullanılarak ELOVL2 çalışılmış kronolojik ile tahmini yaş arasında ortalama 8,94 yıllık mutlak sapma ile orta düzeyde doğruluk gösterdiği bildirilmiştir (64). 15 ila 85 yaş arasındaki bireylere ait 65 diş örneğinde yapılan bir çalışmada, ELOVL2, ASPA ve PDE4C seçilmiş, telomer uzunluğunun, tahmin hatalarında çok az iyileştirmeye katkıda bulunduğu, DNAm'na dayalı yaş tahmini için tamamlayıcı bir belirteç olabileceği

değerlendirilmiştir (65). NPTX2, KLF14 ve SCGN'in kullanıldığı başka bir çalışmada da 1,5-2,13 yıllık bir Ortalama Mutlak Hata (MAE) sağladığı bildirilmiştir (66). 2022 yılında yapılan başka bir çalışmada ise 59 diş örneğinde DNA metilasyon seviyesi analiz edilmiş ve ELOVL2 metilasyon değerinin, yaşla pozitif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (67).

Kemikler de dişler gibi güncel çalışmalarda kullanılan örneklerdir. Aynı belirteçler, kemiklerde analiz edilmeye başlanmıştır. Kemiklerde ELOVL2, KLF14, PDE4C ve ASPA'dan 6 CpG analiz edilen çalışmada 3,4 yıllık MAE ile yaş tahmin ettiği bildirilmiştir (68). Portekizli kişilerden alınan kemik örneklerinde ELOVL2, EDARADD ve MIR29B2C genlerinde 6 CpG Sanger dizilimi ve multipleks SNaPshot ile analiz edilmiş, kronolojik yaştan ortalama mutlak sapma (MAD) 2,56 yıl olarak belirlenmiştir (69).

TARTIŞMA

Epigenetik saat, yaşlanma saati, DNA metilasyon çalışmaları kronolojik yaştan farklı olarak biyolojik yaştaki sapmaları incelemektedir. Çünkü kronolojik yaşla biyolojik yaş her zaman aynı olmamaktadır. Nitekim biyolojik yaşı, kişinin yaşam şartı, beslenmesi, alışkanlıkları ve hastalıklarından da etkilenmektedir. Bu anlamda metilasyon geri döndürülebilir de bir değişimdir (70). DNAm'ndaki regresyon analizleri bazı durumlarda özellikle kişinin hastalığı veya çevresel şartlardan kaynaklı yaş tahmininde yeterli olmayabilmektedir. Çevresel şartların analizleri etkilemesine ilişkin yapılan bir çalışmada 3 kişiden alınan kan örnekleri 3 farklı yüzeyde farklı sürelerde bekletilmiştir. 8 CpG bölgesi (ELOVL2, ASPA, TOM1L1, C1orf132, RASSF5, FHL2, CCDC102B ve cg07082267) SNaPshot yöntemi ile analiz edilmiştir. Çalışmada yaş tahmini analizlerinin 6 aya kadar bekleyen örneklerde yapılabildiği; UV de bekletme süresine bağlı olarak 30 dakika bekleyen örnekte lokus kayıpları olduğu, 60 dakika bekleyen örnekte analizlerin yapılamadığı; 95 °C'de 15 dakika bekletilen örnekte analiz yapılamadığı bildirilmiştir (71). Bu çalışma, çevresel etkenlerin analizlere etkisini değerlendirmek açısından önemli bir çalışmadır. Bu çalışmaların arttırılması ile analizler için standartlar belirlenebilir. Bu anlamda analizlerin derinleşmesi açısından yapay zekanın kullanımı ile ilgili çalışmaların artması gerekmektedir. Bu anlamda yapılan bir çalışmada DeepAge programı kullanılmış ve daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür (72). Makine öğrenmesi yapılan başka bir çalışmada ise belirlenen CpG bölgeleri üç farklı yapay zekâ modeline aktarılıp popülasyonlar, cinsiyetler ve sağlık koşulları arasında karşılaştırılabilecek doğruluk elde ettiklerini bildirmişlerdir (73).

Analizlerde kullanılan yöntemler geliştirilmeli ve aynı örnekler farklı yöntemlerle karşılaştırılarak doğrulaması yapılmalıdır. Son zamanlarda yaş tahmini çalışmalarında NGS kullanımı artmıştır. 2025 yılında yapılan bir çalışmada metilasyon analizlerinde NGS kullanımına oldukça uygun

daha basit bir yaklaşım olan EpiAgePublic tanıtılmıştır. Bu program, geleneksel yöntemlerdeki örnek kalitesi ve işleme varyasyonlarından kaynaklanan sorunlar ve hataları ortadan kaldırmaya yöneliktir. Çalışmada 4.600'den fazla kişide HIV enfeksiyonu ve stres gibi faktörlerin yaşlanmayı nasıl etkilediği araştırılmış ve oluşturulan modelin yaşlanmanın en hassas belirtilerini saptayabildiğini bildirmişlerdir (74). İstatistiksel yöntemlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada 2-104 yaş aralığında 895 İspanyoldan kan örneği alınmış, 7 CpG bölgesi Agena Bioscience EpiTYPER® teknolojisi kullanılarak analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada kantil regresyon (QR), kantil regresyon sinir ağı (QRNN) ve kantil regresyon destek vektör makinesi (QRSVM) olmak üzere 3 istatistiksel yöntem karşılaştırılmış ve en doğru tahminlerin QRNN veya QRSVM kullanıldığında elde edildiği bildirilmiştir (32).

Günümüzde yaş tahmini geleneksel yöntemler olarak kabul edilen kemik ve diş incelemelerine göre gerçekleştirilmektedir. Kişilerin kemik gelişimi ve dişlerin durumu gibi incelemeler, belirteçlere göre yapılmaktadır. Bunun için de olay yerinde bu örneklerin bulunması veya referans örnekleriyle karşılaştırılması gerekmektedir. Bazı durumlarda doğum tarihi bilinmeyen canlı bireylerin muayene edilerek ölçüm yapılması da gerekebilmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, DNA metilasyon çalışmaları, adli bilimler alanında monozygotik ikizlerin ayrımı, dokularının analizi gibi konularda destekleyici olabileceği gibi geleneksel yöntemlerin aksine olay yerinde bulunan herhangi bir vücut sıvısının kullanımı ile kişinin yaş tahmininin yapılmasına imkân verebilecek çalışmalardır (75). Bu anlamda çalışmaların geliştirilmesi, günümüz teknolojisi yapay zekâ programıyla entegre edilmesi, failin ya da olay yerinde bulunan diğer kişilerin yaş tahmininin yapılmasında büyük kolaylık sağlayacaktır. Böylece genomda yer alan metilasyon farklılıklarının belirlenmesi ile monozygotik ikizlerin ayrımı, vücut sıvısı ve dokuların analizi ile biyolojik materyalden yaş tahmini yapılabilecektir.

BİLDİRİMLER

Değerlendirme

Dahili çift kör danışmanlık

Çıkar Çatışması

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek

Bu sözlü bildiri sunumu Tübitak 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinlikleri Katılım Desteği almıştır..

Etik Beyan

Bu çalışma derleme niteliğinde bir makale olduğu için etik kurul onayına ihtiyaç bulunmamakta olup Helsinki Bildirgesi kriterleri göz önünde bulundurulmuştur.

Tebliğ

Bu çalışmanın bir bölümü, 10-13.04.2025 tarihinde Antalya'da düzenlenen, 5. Uluslararası 21. Ulusal Adli Bilimler Kongresinde "Olay Yeri Biyolojik Örneklerinden Yaş Tahminini Belirlemede DNA Metilasyonunun Etkinliği" başlığı ile sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Yazarlık Katkısı

Fikir: AT, Tasarım: AT, DYK, Gözetim: AT, DYK, Veri toplama ve işleme: AT, DYK, Analiz ve yorumlama: AT, DYK, Literatür tarama: AT, DYK, Yazma: AT, DYK K, Eleştirel inceleme: AT, DYK.

KAYNAKLAR

- Deans C, KAM. What do you mean, "epigenetic" Genetics. 2015;199(4):887-896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>
- Tezel A, Arıkan Çevik M, Yüce Z. Non-mendelian inheritance: genomic imprinting. Marmara Medical Journal. 1996;9(2):85-88.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, Mccune RA, ve ark. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Res. 1982;10(8):2709-21. <https://doi.org/10.1093/nar/10.8.2709>
- Maulani C, Auerkari Eİ. Age estimation using DNA methylation technique in forensics: a systematic review. Egyptian Journal Of Forensic Sciences. 2020;10: 1-15. <https://doi.org/10.1186/s41935-020-00214-2>
- Zhang FF, Cardarelli R, Carroll J, Zhang S, Fulda KG, Gonzalez K, ve ark. Physical activity and global genomic DNA methylation in a cancer-free population. Epigenetics. 2011;6(3):293-299. <https://doi.org/10.4161/epi.6.3.14378>
- Wu X, WC, Lin F, Huang Q, JZ, Gao H, ve ark. DNA methylation profile is a quantitative measure of biological aging in children. Aging (Albany Ny). 2019;11(22):10031-10051. <https://doi.org/10.18632/aging.102399>.
- Mcewen LM, O'Donnell KJ, McGill MG, Edgar RD, Jones MJ, Macisaac JL, ve ark. The pedbe clock accurately estimates DNA methylation age in pediatric buccal cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(38):23329-23335. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820843116>.
- Newediuk L, Richardson ES, Bohart AM, Roberto-Charron A, Garroway CJ, & Jones MJ. Designing epigenetic clocks for wildlife research. Molecular Ecology Resources. 2025;e14120. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.14120>
- Srouf L, Bejaoui Y, She J, Alam T, & El Hajj N. Deep aging clocks: AI-powered strategies for biological age estimation. Ageing Research Reviews. 2025;102889. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2025.102889>
- Slieker RC, Itersen MV, Luijk R, Beekman M, Zhernakova DV, Moed MH, ve ark. Age-related accrual of methylomic variability is linked to fundamental ageing mechanisms. Genome Biology. 2016;17(191). <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1053-6>
- Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, ve ark. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(26):10522-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120658109>
- Beerman I, Bock C, Garrison BS, Smith ZD, Gu H, Meissner A, ve ark. Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. Cell Stem Cell. 2013;12(4):413-25. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.017>
- Carlsen L, Holländer O, Danzer MF, Vennemann M, CA. DNA methylation-based age estimation for adults and minors: considering sex-specific differences and non-linear correlations. Int J Legal Med. 2023;137(3):635-643. <https://doi.org/10.1007/s00414-023-02967-6>
- Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome Biol. 2013;14:R115. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
- Ibáñez de Opakua A, Conde R, de Diego A, Bizkarguenaga M, Embade N, Lu SC., ... & Millet O. Metabolomic-based aging clocks. npj Metabolic Health and Disease. 2025;3(1), 35. <https://doi.org/10.1038/s44324-025-00078>
- Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda S, ve ark. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. Mol Cell. 2013;49(2):359-367. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>
- Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, ve ark. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. Aging (albany NY). 2018;10(4):573 <https://doi.org/10.18632/aging.101414>.
- Snir S. Epigenetic pacemaker: closed form algebraic solutions. BMC genomics. 2020;21:1-11. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6606-0>
- Zhang Q, Vallerga CL, Walker RM, Lin T, Henders AK, Montgomery GW, ve ark. Improved precision of epigenetic clock estimates across tissues and its implication for biological ageing. Genome Medicine. 2019;11:54. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0667-1>

20. Stelvio . Estimage [internet]. Estimage; 2025 [Erişim tarihi: 05.05.2025]. Erişim adresi: <https://public.estimage.com/about-us>
21. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, Bauerschlag DO, Jöckel KH, Erbel R, Mühleisen TW, Zenke M, Brümmendorf TH, Wagner W. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome biology*. 2014;15:1-12. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r24>
22. Zubakov D, Liu F, Kokmeijer I, Choi Y, Meurs JBV, Ijcken WFV, ve ark. Human age estimation from blood using mrna, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Science International: Genetics*. 2016;24:33-43. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.05.014>
23. Wochna K, Bonikowski R, Śmigielski J, JB. Aspartic acid racemization of root dentin used for dental age estimation in a polish population sample. *Forensic Sci Med Pathol.* 2018;14(3):285–294. <https://doi.org/10.1007/s12024-018-9984-8>
24. Freire-Aradas A, Phillips C, Lareu MV. Forensic individual age estimation with DNA: from initial approaches to methylation tests. *Forensic Sci Rev*. 2017;29(2):121-144. <https://doi.org/1042-7201/29-2/July 2017/121>
25. Unnikrishnan A, Jackson WMFJ, Porter JDWH, Richardson A. The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacol Ther*. 2019;195:172-185. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.001>
26. Castagnola MJ, Medina-Paz F, Zapico SC. Uncovering forensic evidence: a path to age estimation through DNA methylation. *Int J Mol* .2024;25(9):4917. <https://doi.org/10.3390/ijms25094917>.
27. Pajares MJ, Palanca-Ballester C, Urtasun R, Alemany-Cosme E, Lahoz A, Sandoval J. Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Methods*. 2021;187:3-12. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.06.021>
28. Leontiou CA, Hadjidaniel MD, Mina P, Antoniou P, Ioannides M, Patsalis PC. Bisulfite conversion of DNA: performance comparison of different kits and methylation quantitation of epigenetic biomarkers that have the potential to be used in non-invasive prenatal testing. *Plos One*. 2015;10(8):0135058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135058>
29. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico S, Voorde WVD, Decorte R. A selective set of DNA -methylation markers for age determination of blood, teeth and buccal samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2015;5:144-145. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1080413>
30. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Voorde WVD, Decorte R. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*. 2015;10(10):922-30. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015>
31. MRR1, Kampmann M, NM, Tfelt-Hansen J, Børsting C, Pereira V. Prediction of chronological age and its applications in forensic casework: methods, current practices, and future perspectives. *Forensic Sci Res*. 2023;8(2):85-97. <https://doi.org/10.1093/fsr/owad021>
32. Freire-Aradas A, Pośpiech E, Aliferi A, Girón-Santamaría L, Mosquera-Miguel A, Pisarek A, ve ark. A comparison of forensic age prediction models using data from four DNA methylation technologies. *Front Genet*. 2020;19(11):932. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00932>
33. Suchiman HED, Sliker, RC, Kremer D, Slagboom PE, Heijmans BT, Tobi EW. Design, measurement and processing of region-specific DNA methylation assays: the mass spectrometry-based method EpiTYPER. *Frontiers in genetics* 2015;6: 287 <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00287>
34. Delahaye C, Nicolas J. Sequencing DNA with nanopores: troubles and biases. *Plos One* . 2021;16(10):0257521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257521>
35. Yuen ZWS, Shanmuganandam S, Stanley M, Jiang S, Hein N, Daniel R, vd. Profiling age and body fluid DNA methylation markers using nanopore adaptive sampling. *Forensic Sci Int Genet*. 2024;71:103048. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2024.103048>
36. Barros-Silva D, Marques CJ, Henrique R, Jerónimo C. Profiling DNA methylation based on next-generation sequencing approaches: new insights and clinical applications. *Genes* 2018;9(9): 429 <https://doi.org/10.3390/genes9090429>
37. Vidaki A, López CD, Carnero-Montoro E, Ralf A, Ward K, Spector T, ve ark. Epigenetic discrimination of identical twins from blood under the forensic scenario. *Forensic Sci Int Genet*. 2017;31:67-80. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.014>
38. Vidaki A, Kalamara V, Carnero-Montoro E, Spector TD, Bell JT, Kayser M. Investigating the Epigenetic Discrimination of Identical Twins Using Buccal Swabs, Saliva, and Cigarette Butts in the Forensic Setting. *Genes* 2018;9:252. <https://doi.org/10.3390/genes9050252>
39. Vidaki A, Giangasparo F, Syndercombe Court D. Discovery of potential DNA methylation markers for forensic tissue identification using bisulphite pyrosequencing. *Electrophoresis* 2016;37: 2767–2779. <https://doi.org/10.1002/elps.201600261>

40. Lee HY, Jung S, Lee EH, Yang WJ, KS. DNA methylation profiling for a confirmatory test for blood, saliva, semen, vaginal fluid and menstrual blood. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;24:75-82. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.06.007>
41. Thong Z, Tan JYY, Loo ES, Phua YW, Chan XLS, Syn CK. Artificial neural network, predictor variables and sensitivity threshold for DNA methylation-based age prediction using blood samples. *Sci. Rep.* 2021;1:744. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81556-2>
42. Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Gori D, Giuliani C, Mari D, Di Blasio AM, Gentilini D, Vitale G, Collino S, et al. Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell* 2012;11:1132–1134. <https://doi.org/10.1111/ace.12005>
43. Aanes H, Bleka Ø, Dahlberg PS, Carm KT, Lehtimäki T, Raitakari O, et al. A new blood based epigenetic age predictor for adolescents and young adults. *Scientific reports,* 2023;13(1): 2303. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29381-7>
44. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Makowska Z, Spas A Parys Proszek A, Kucharczyk K, Płoski R, Branicki W. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015; 14: 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.002>
45. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Makowska Z, Spas A Parys Proszek A, Kucharczyk K, Płoski R, Branicki W. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015;17: 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.001>
46. Yang F, Qian J, Qu H, Ji Z, Li J, Hu W, Cheng F, Fang X, Yan J. DNA methylation-based age prediction with bloodstains using pyrosequencing and random forest regression. *Electrophoresis.* 2023;44: 835–844. <https://doi.org/10.1002/elps.202200250>
47. Sukawutthiya P, Sathirapatya T, Vongpaisarnsin K. A minimal number CpGs of ELOVL2 gene for a chronological age estimation using pyrosequencing. *Forensic Sci. Int.* 2021;318:110631 <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110631>.
48. Jung SE, Lim SM, Hong SR, Lee EH, Shin KJ, Lee HY. DNA methylation of the ELOVL2, FHL2, KLF14, C1orf132/ MIR29B2C, and TRIM59 genes for age prediction from blood, saliva, and buccal swab samples. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2019;38: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.09.010>
49. Pan, C, Yi S, Xiao C, Huang Y, Chen X, Huang D. The evaluation of seven age-related CpGs for forensic purpose in blood from Chinese Han population. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2020;46:102251. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102251>
50. Onofri M, Delicati A, Marcante B, Carlini L, Alessandrini F, Tozzo P, Carnevali E. Forensic Age Estimation through a DNA Methylation-Based Age Prediction Model in the Italian Population: A Pilot Study. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24: 5381. <https://doi.org/10.3390/ijms24065381>
51. Feng L, Peng F, Li S, Jiang L, Sun H, Ji A, Zeng C, Li C, Liu F. Systematic feature selection improves accuracy of methylation-based forensic age estimation in Han Chinese males. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2018;35: 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.03.009>
52. Filoglu G, Sımsek SZ, Ersoy G, Can K, Bulbul O. Epigenetic-based age prediction in blood samples: model development. *Criminalistics; Pathology/Biology.* 2024;1–11. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15478>
53. Grignani P, Bertoglio B, Monti MC, Cuoghi Costantini R, Ricci U, Onofri M, et al. Age estimation of burnt human remains through DNA methylation analysis. *International Journal of Legal Medicine.* 2024;1-11. <https://doi.org/10.1007/s00414-024-03320-1>
54. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E. Epigenetic predictor of age. *PloS one* 2011;6(6): e14821 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014821>
55. Schwender K, Hollander O, Klopffleisch S, Eveslage M, Danzer M.F, Pfeiffer H, Vennemann M. Development of two age estimation models for buccal swab samples based on 3 CpG sites analyzed with pyrosequencing and minisequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2021;53: 102521. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102521>
56. Eipel M, Mayer F, Arent T, Ferreira MR, Birkhofer C, Gerstenmaier U, Costa IG, Ritz-Timme S, Wagner W. Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures. *Aging* 2016;8: 1034–1048. <https://doi.org/10.18632/aging.100972>
57. Ambroa-Conde A, Girón-Santamaría L, Mosquera-Miguel A, Phillips C, Casares de Cal MA, Gómez-Tato A, Álvarez-Dios J, de la Puente M, Ruiz-Ramírez J, Lareu MV, et al. Epigenetic age estimation in saliva and in buccal cells. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2022; 61: 102770. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102770>

58. Lee MH, Hwang JH, Seong KM, Ahn JJ, Kim SJ, Hwang SY, Lim SK. Application of droplet digital PCR method for DNA methylation-based age prediction from saliva. *Legal Medicine*. 2022;54: 101992. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2021.101992>
59. Lee HY, Jung SE, Oh YN, Choi A, Yang WI, Shin KJ. Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: A preliminary study. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015;19: 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.014>.
60. Pisarek A, Pośpiech E, Heidegger A, Xavier C, Papież A, Piniewska-Róg D, Kalamara V, Potabattula R, Bochenek M, Sikora-Polaczek M, et al. Epigenetic age prediction in semen—marker selection and model development. *Aging*. 2021;13:19145–19164. <https://doi.org/10.18632/aging.203399>
61. Er S, Abik Z, Ersoy G, Filoglu G, Ozkara H, Bulbul O. A semen-specific deoxyribonucleic acid methylation model for epigenetic age estimation and its robustness under environmental challenges. *Electrophoresis*. 2024;45:1820–1833. <https://doi.org/10.1002/elps.202400054>
62. Abik Z. Çevresel koşullara maruz bırakılan semen lekelerinde DNA metilasyonu ile yaş tahmini [Yüksek lisans tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa; 2024.
63. Giuliani C, Cilli E, Bacalini MG, Pirazzini C, Sazzini M, Gruppioni G, ve ark. Inferring chronological age from DNA methylation patterns of human teeth. *Am J Phys Anthropol*. 2016;159(4):585-95. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22921>
64. Kondo M, Aboshi H, Yoshikawa M, Ogata A, Murayama R, Takei M, ve ark. A newly developed age estimation method based on cpg methylation of teeth-derived DNA using real-time methylation-specific pcr. *J Oral Sci*. 2020;63(1):54-58. <https://doi.org/10.2334/josnusd.20-0138>
65. Márquez-Ruiz AB, González-Herrera L, Luna JDD, AV. DNA methylation levels and telomere length in human teeth: usefulness for age estimation. *Legal Med*. 2020;134(2):451-459. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02242-7>
66. Zapico SC, Gauthier Q, Antevska A, Mccord BR. Identifying methylation patterns in dental pulp aging: application to age-at-death estimation in forensic anthropology. *J Mol Sci*. 2021;22(7):3717. <https://doi.org/10.3390/ijms22073717>
67. Ogata A, Kondo M, Yoshikawa M, Okano M, Tsutsumi T, HA. Dental age estimation based on DNA methylation using real-time methylation-specific pcr. *Forensic Sci Int Genet*. 2022;340:111445. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111445>
68. Woźniak A, Heidegger A, Piniewska-Róg D, Pośpiech E, Xavier C, Pisarek A, ve ark. Development of the visage enhanced tool and statistical models for epigenetic age estimation in blood, buccal cells and bones. *Aging (Albany Ny)*. 2021;13(5):6459-6484. <https://doi.org/10.18632/aging.202783>
69. Dias HC, Corte-Real F, Cunha E, Manco L. DNA methylation age estimation from human bone and teeth. *Australian Journal Of Forensic Sciences*. 2020;54(1):1-14. <https://doi.org/10.1080/00450618.2020.1805011>
70. Levy JJ, Diallo AB, Montivero MKS, Gabbita S, Salas LA, Christensen BC. Insights to aging prediction with ai based epigenetic clocks. *Genomics*. 2025;17(1):49-57. <https://doi.org/10.1080/17501911.2024.2432854>
71. Şaşmaz BM. Yaş tayininde kullanılan DNA metilasyon belirteçlerinin yapay oluşturulmuş olay yeri kan örneklerinde uygulanabilirliği [Yüksek lisans tezi]. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa; 2024.
72. Dip SA, Ma D, Zhang L. Deepage: harnessing deep neural network for epigenetic age estimation from DNA methylation data of human blood samples. *Symposium Series*. 2024;4(1):267-274. <https://doi.org/10.1101/2024.08.12.607687>;
73. Mathew JA, Paul G, Jacob J, Kumar J, Dubey N, Philip NS. A new robust ai/ml based model for accurate forensic age estimation using DNA methylation markers. *Sci Med Pathol*. 2025;1(18). <https://doi.org/10.1007/s12024-025-00985-x>
74. Cheishvili D, Carmo SD, Caraci F, Cuello MGAC, Szyf M. Epiage: a next-generation sequencing-based elovl2 epigenetic clock for biological age assessment in saliva and blood across health and disease. *Ging (Albany Ny)*. 2025;17(1):131-160. <https://doi.org/10.18632/aging.206188>
75. Er S. Semen örneklerinde DNA metilasyonu ile yaş tahmini [Yüksek lisans tezi]. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa; 2022.