

SEMEN TESPİTİNDE FARKLI YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Mol. Bio. Hamdiye İrem SEYALIOĞLU (MSc)¹, Prof. Dr. Gürsel ÇETİN^{2,3}

¹ İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul

² İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, İstanbul

³ Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, İstanbul

Özet

Adli bilimler, cinsel saldırı olgularında çok büyük bir rol üstlenmektedir. Cinsel saldırı iddiasını kesin ispatlayacak, sanığa ait semen ve/veya spermatozoa, mağdurun vücut boşluklarından, giysilerinden ya da olay yerinden elde edilebilir. Vücut boşluklarındaki semen veya spermatozoa, drenajla veya kişinin yıkamasıyla dilüe olarak ya eser miktarda kalacaktır ya da yok olacaktır.

Bu çalışmada bu ölçüt göz önünde bulundurularak, rastgele seçilmiş 20 gönüllü katılımcıdan (yaş aralığı 20–57) cinsel perhizli ve perhizsiz örnekler alınmış ve farklı oranlarda dilüe edilmişlerdir. Çalışmanın ilk aşamasında spermatozoonlar, morfolojik olarak Corin-Stockis, Field Rapid Blue-Red ve Eosin-Nigrosin boyaları ile gösterilmiştir. İkinci aşamada ise adli bilimler açısından semenin ispatında önemli bir belirteç olan PSA, Seratec PSA Semiquant test kullanılarak gösterilmiştir.

Çalışmanın sonucunda, cinsel perhizli örneklerde daha fazla spermatozoa olduğu ve boyaların var olan spermatozoayı gösterdiği, ancak en iyi boyamanın Field Rapid Blue-Red boyası ile gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Çok yüksek dilüsyonlarda spermatozoayı morfolojik olarak göstermek mümkün olmaz iken PSA konsantrasyon ölçümü semenin varlığını ispatlamada başarılı olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Spermatozoa, semen, PSA, morfoloji boyası

COMPARISON OF DIFFERENT SEMEN DETERMINATION METHODS

Summary

Forensic science is a major role in solving sexual assault cases. The semen or spermatozoa that originated from the assailant, which will completely prove the sexual assault claim. The semen and/or spermatozoa can be collected from victim's body cavities, clothes and crime scene. The semen or spermatozoa in the body cavities can be diluted or destroyed by draining or showering by the victim.

Keeping this criterion in mind we configured the study accordingly. We first collected fresh semen samples from 20 randomly selected volunteer participants (age range 20-57). We obtained the semen samples in two states. The first semen sample was collected a minimum of 72 hours after ejaculation, the second sample was collected maximum 24 hours after ejaculation. We diluted the fresh semen samples with different ratios; we evaluated the samples with two different methods. In the first method of study we made the spermatozooids visible by staining them with Corin-Stockis, Field Rapid Blue-Red and Eosin-Nigrosin stains. In the second method we evaluated PSA concentration, which is a remarkable marker for forensic science in

demonstrating semen, with Seratec PSA Semiquant test.

In conclusion, we found out that, spermatozoa concentration in sexual absistance is high and all morphology stains make spermatozoa visible, but the most effective stain was Field Rapid Blue-Red stain. In high dilutions, spermatozoa can not be seen nor observed as morphologically however, evaluation of PSA concentration has great success to prove semen presence.

Keywords: *Spermatozoa, semen, PSA, morphology stain*

Giriş ve Amaç

Cinsel saldırı olaylarında mağdurdan ve olay yerinden alınan örneklerde saldırgana ait spermin bulunması, olayı aydınlatmada kullanılabilecek en önemli tıbbi delillerden bir tanesidir. Genellikle elbiseler, iç çamaşırları, saçlar, vücut yüzeyi, vagina, anüs, ağız ve olay yerindeki zemin, yatak, koltuk gibi eşyalar, çarşaf, yastıklar ve kılıfları, kullanılmış havlu, peçete, kağıt mendil gibi eşyalardan alınan örneklerde semen aranmaktadır (1,2). Semen bulunuşu, hem iddia edilen saldırı olayının ispatlanması hem de saldırganın kimliğinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

Türk Ceza Kanunu'nda 2005 yılında yapılan değişiklikle, hem cinsel saldırıların tanımlaması değiştirilmiş hem de bu tür suçların cezalarında önemli derecede artışlar getirilmiştir. Cezada artış getiren nitelikli haller arasında ise "cinsel amaçlı olarak vücut boşluklarına organ veya cisim sokulması" sayılmıştır (3). Dolayısıyla, vagina, anüs ve ağız gibi vücut boşluklarında semenin bulunması oldukça büyük önem taşımaktadır (1,2,4).

Bu çalışmanın amacı, yaşlarına göre ayrılmış olan denek gruplarında semen tayini için kullanılmakta olan Corin-Stockis boyası (5), Eosin-Nigrosin boyası (6), Diff-Quick kiti (7), P30 kiti (8-11), Asit fosfataz kiti (12) testlerinden hangisinin en iyi sonuç verdiğini saptamaktır. Alınan örneklerde semen tayini iki temel yolla yapılmaktadır. Bunlardan birincisi, kimyasal reaksiyonlara dayanarak diğer vücut sıvılarına göre derişimi daha yüksek olan kimyasal bileşik ya da enzim aranarak semen varlığının gösterilmesi (13); ikincisi ise, direkt olarak bakılan veya tercihen boyanan örneklerde spermin varlığının gösterilmesidir (5-7).

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, iki ayrı bölümde yapıldı.

1) Taze semen örnekleri, farklı dilüsyonlarda farklı morfolojik boyama yöntemleri ile boyandı.

2) Taze semen örneklerinde, Prostat Spesifik Antijen ELISA kiti ile PSA tayin edildi.

Çalışmaya, 20-24, 24-29, 30-34, 35 ve yukarıya yaş aralıklarındaki beşer kişilik gönüllü denekler katıldı. Çalışma, mastürbasyon yapıp semen örneğini vermeyi kabul eden gönüllü katılımcılar ile karşılıklı görüşme sonrası, aydınlatılmış onam formu imzalatılarak yapıldı.

Örnekler, 50ml'lik steril idrar kaplarına birisi 72 saatlik cinsel perhiz sonrasında; ikincisi son cinsel aktiviteden en fazla 24 saat geçtikten sonra mastürbasyon ile temin edildi. Örnekler, oda ısısında bekletildi ve en geç iki gün içerisinde incelendi.

1. Örneklerin Hazırlanması

Semenin farklı dilüsyonları, donörlerden 50ml'lik idrar kaplarında alınan semen örnekleri 1/100; 1/1000; 1/10,000; 1/30,000; 1/50,000; 1/100,000 oranlarında distile su ile seyreltilerek hazırlandı.

Hazırlanan örneklerden, 25 µl lam üzerinde belli bir bölgeye damlatıldı. Lam ısıtıcı tablada 50–56°C’de içeriğindeki su dehidrate olup örnek leke haline gelinceye kadar beklendi. Tablalardan alınan lamlar cam kalem ile işaretlendi.

Spermatozoonları lamlara tespit etmek için, saç spreyi (Ethyl Alcohol, Propane, Butane, Vinyl Caprolactam, PVP, Dimethylaminoethyl Methacrylate Copolymer, Lauryl Pyrolidone, VP/VA Copolymer, Parfum, Benzyl Salicylate, Citronellol, Butylphenyl Methylpropional, Linalool, Hydroxymethylpentyl Cyclohexene Carboxaldehyde, Panthenol) uygulandı.

Her bir dilüsyon, üç farklı morfolojik boyama yöntemi ile (Corin-Stockis, Field Rapid Blue-Red, Eosin-Nigrosin) boyandı.

Seratec® PSA Semiquant kiti için dilüsyonlar Fosfat Tamponu (pH:7,0) ile hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltilerden mikropipet ile 200µl örnek alınıp testin örnek kuyusuna aktarıldı. Yaklaşık olarak 5–10 dakika inkübe edildi. Beliren çizginin renk şiddetine göre değerlendirmeler yapıldı. Testin güvenilirliği için kontrol çizgisi (C) gözlemlendikten sonra, test çizgisi (T) ile testin sonucu değerlendirildi. Seratec® PSA Semiquant membran test ile pozitif sonuç alınan örnekler, C ve T çizgileri arasında kalan 4ng/ml’ye ayarlı internal standart çizgisinin renk şiddetine göre değerlendirmesi yapıldı. Test çizgisi 4ng/ml’ye göre daha şiddetli olan sonuçlar T>q; eş şiddetli olan sonuçlar T=Q; az şiddetli olan sonuçlar t<Q olarak değerlendirildi.

2. Yöntemler

A. Morfolojik Boyama Yöntemleri

Corin-Stockis Boyama Yöntemi

Lama tespit edilmiş 25 µl semen örneğinin üzeri Corin-Stockis çözeltisi ile örtüldü, 15–20 dakika sonra distile su ile nazikçe yıkandı ve boyanın incelmesi sağlandı. Lam, kurumaya bırakıldı.

Field Rapid Blue- Red Boyama Yöntemi

Lama saç spreyi ile tespit edilmiş 25 µl semen örneğinin üzeri, Buffered Xanthene (Gül Biyoloji Laboratuvarı, İstanbul) Stain Solüsyon ile örtüldü, 10 saniye sonra uzaklaştırıldı. Hemen ardından lam bu sefer Buffered Thiazine Stain Solution (Gül Biyoloji Laboratuvarı, İstanbul) ile örtülüp 10 saniye sonra distile su ile nazikçe yıkanarak kurumaya bırakıldı.

Eosin – Nigrosin Boyama Yöntemi:

Morfolojik şokları engellemek için lamlar ısıtıcı tablada 37°C’de ısıtıldı. Lam ısındıktan sonra mikropipet ile 1µl Eosin-Nigrosin boyası kondu. 2µl semen örneği, boyanın yanına yerleştirilip pipet ucu ile nazikçe karıştırıldı. Lam ileri geri sallanarak veya ısıtıcı tabla üzerinde kurutuldu.

B. PSA ELISA Yöntemi:

Prostat Spesifik Antijen tayini için semiquantitative kitler kullanılmıştır.

Çalışmanın amacı, son noktaların belirlenmesi olduğundan; dilüsyonlar daha yüksek oranlardan başlandı. Yine firma tarafından dilüsyonlarda distile su yerine Fosfat Tamponu (pH: 7,0) önerilmiş ve kullanıldı.

Yaptığımız ön çalışmalarda PSA kitinin 1/500 oranında çok kuvvetli belirmesinden dolayı 1/1.000.000 oranından başlanmış ve meydana gelen sonuç çizgisinin şiddetine göre dilüsyon ya daha ileri oranlara yükseltilerek ya da düşürülerek son noktalar tayin edilmeye çalışıldı.

C. Mikroskopik inceleme

Preperatların tamamı, Olympus marka ışık mikroskobu ile 400X büyütmede incelendi. 1/100, 1/1000, 1/10000 oranındaki dilüe preparatlarda spermatozoa yoğunluğu nedeni ile daire

şeklindeki lekenin yalnızca rastgele seçilen 10 farklı görüntü alanındaki spermatozoonlar sayılarak ortalamaları alındı. 1/30000, 1/50000, 1/1000000 oranındaki dilüe preparatlarda sperm seyrekliği nedeni ile daire şeklindeki lekenin tamamındaki spermatozoonlar sayıldı. Sayım aşamasında, bütünlüğünü koruyan spermatozoonlar yanında anormal morfolojiye sahip spermatozoonlar, kuyruğundan veya başından ayrılmış, spermatozoon kuyruğu olduğundan emin olunan spermatozoon başı ve kuyrukları değerlendirmeye alındı.

D. Görüntülerin Alınması

Preparat görüntüleri, Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesi'nde Microdissection Laser System ile Zeiss marka mikroskop aracılığı ile (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Almanya) alındı.

PSA Semiquant Test sonuçları, Sony Super Steady Shot DSC-T10 7,2 Megapixels fotoğraf makinesi ile görüntülendi.

E. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin analizi SPSS 11,5 (Statistical Package for Social Sciences) paket programından Mann Whitney U testinden yararlanılarak değerlendirildi.

F. İzinler

Çalışmaya için, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Etik Kurul Başkanlığı'nın 26.01.2007 tarih ve 2007/95 sayılı iznini takiben T. C. Adalet Bakanlığı, Adli Tıp Kurumu Başkanlığı'nın 16.01.2007 tarih ve B.03.1.ATK.0.01.00.08 sayılı bilimsel kurul izni ile kurum laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Gönüllü katılımcılardan aydınlatılmış onam formu alındı.

Bulgular

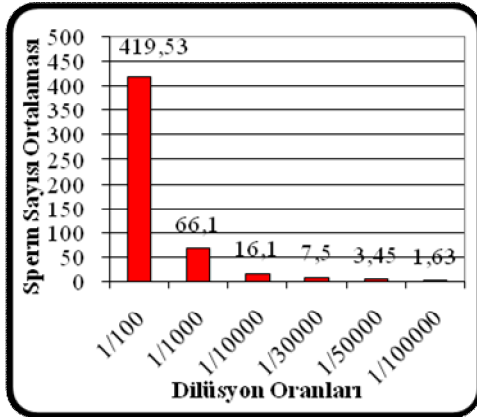
1. Demografik Özellikler

Katılımcıların yaş aralığı 20-57, yaş ortalaması 31,35 (SS: 9.33) olarak saptanmıştır. Yaş gruplarına dağılım 20-24, 25-29, 30-34, 35-ve üstü olarak ayarlanmıştır. Her grupta beşer kişi olmak üzere toplam 20 katılımcı ile çalışıldı.

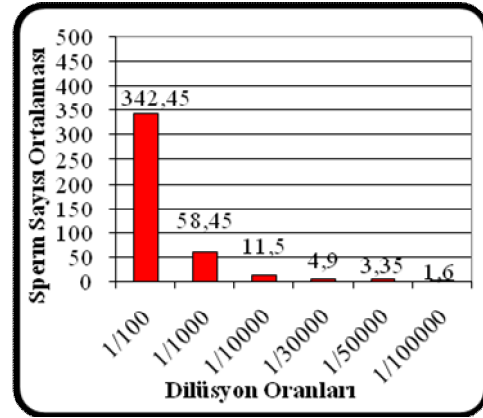
2. Farklı Boyama Yöntemlerine Göre Sperm Ortalamaları

Cinsel Perhizli ve Cinsel Perhizsiz Örneklerin Ortalaması

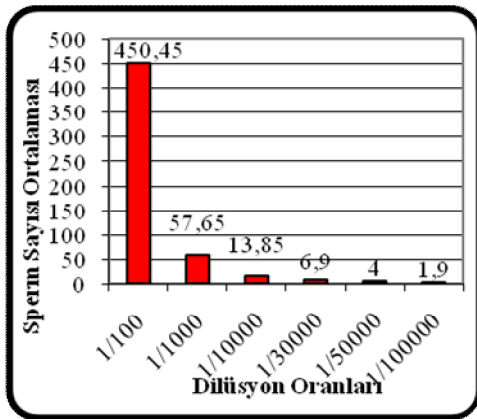
Çalışmada Corin-Stockis, Field Rapid Blue Red, Eosin Nigrosin boyaları kullanılarak cinsel perhizli örneklerin ve cinsel perhizsiz örneklerin farklı dilüsyonları değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre, Corin-Stockis ile boyanan 1/100 oranındaki dilüe örneklerden 1 katılımcı ve 1/10,0000 oranındaki dilüe örneklerden 1 katılımcı aglütinasyon nedeni ile değerlendirmeye alınamadı. Eosin-Nigrosin boyası kullanılarak hazırlanan cinsel perhizli ve perhizsiz örnekler daha küçük hacimlerde çalışıldığından sperm sayısı ortalamaları daha düşük bulundu (Grafik 1-6).



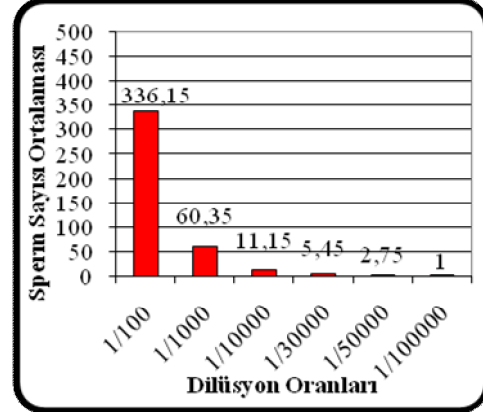
Grafik 1. Cinsel perhizli alınan, farklı dilüsyonlarda hazırlanan ve Corin-Stockis ile boyanan örneklerin değerlendirilmesi



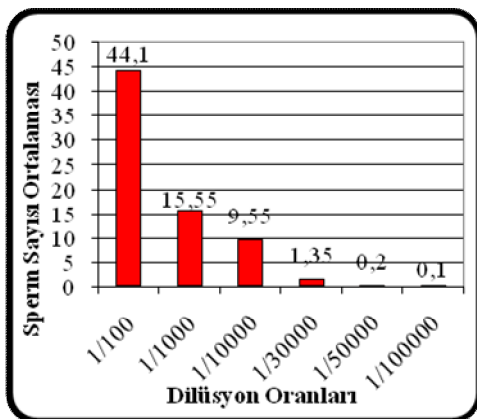
Grafik 2. Cinsel perhizsiz alınan, farklı dilüsyonlarda hazırlanan ve Corin-Stockis ile boyanan örneklerin değerlendirilmesi



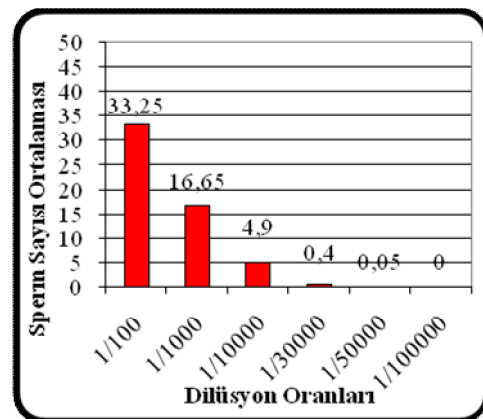
Grafik 3. Cinsel perhizli alınan, farklı dilüsyonlarda hazırlanan ve Field Rapid Blue-Red boyası ile boyanan örneklerin değerlendirilmesi



Grafik 4. Cinsel perhizsiz alınan, farklı dilüsyonlarda hazırlanan ve Field Rapid Blue-Red ile boyanan örneklerin değerlendirilmesi



Grafik 5. Cinsel perhizli alınan, farklı dilüsyonlarda hazırlanan ve Eosin-Nigrosin Boyası ile boyanan örneklerin değerlendirilmesi



Grafik 6. Cinsel perhizsiz alınan, farklı dilüsyonlarda hazırlanan ve Eosin-Nigrosin boyası ile boyanan örneklerin değerlendirilmesi

3. Cinsel Perhizli ve Cinsel Perhizsiz Örneklerinin Farklı Dilüsyonlarla İlişkisi

Corin-Stockis boyası ile boyanan perhizli örneklerin yaş ile ilişkisi değerlendirildiğinde, 1/100 oranında dilüe edilmiş perhizli örnekler arasında ve aynı boyanın perhizsiz örneklerindeki boyamasında 1/50000 ve 1/100000 oranlarında dilüe perhizsiz örnekler arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). Diğer konsantrasyonlarda ise istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Corin-Stockis boyaması ile hazırlanan cinsel perhizli ve perhizsiz örneklerin farklı dilüsyonları arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve aralarında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Corin-Stockis boyaması ile hazırlanan cinsel perhizli ve perhizsiz 1/100 oranındaki dilüsyon örnekleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). Diğer konsantrasyonlarda ise istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Field Rapid Blue-Red boyası ile boyanan perhizli örneklerin yaş ile olan ilişkisi değerlendirildiğinde, istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Field Rapid Blue-Red boyası ile boyanan perhizsiz örneklerin yaş ile olan ilişkisi değerlendirildiğinde, 1/1000 oranında dilüe perhizsiz örnekler arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0.05$). Diğer konsantrasyonlarda ise istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Field Rapid Blue-Red boyaması ile hazırlanan cinsel perhizli ve perhizsiz örneklerin farklı dilüsyonları arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve aralarında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Eosin-Nigrosin boyası ile boyanan perhizli ve perhizsiz örneklerin yaş ile olan ilişkisi değerlendirildiğinde, istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Eosin-Nigrosin boyaması ile hazırlanan cinsel perhizli ve perhizsiz örneklerin farklı dilüsyonları arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve aralarında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Eosin-Nigrosin boyası ile hazırlanan cinsel perhizli ve perhizsiz örneklerin arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, 1/50000 dilüsyon örnekleri ile arasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0.01$). Diğer konsantrasyonlarda ise istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

4. Cinsel Perhizli ve Perhizsiz Örneklerin Farklı Dilüsyonlarda PSA Semiquant Test ile Değerlendirilmesi

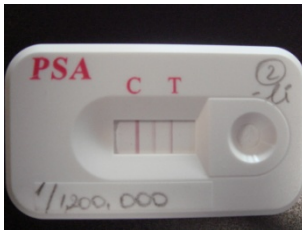
Cinsel perhizli ve perhizsiz alınan sıvı semen örneklerinden hazırlanan farklı dilüsyonlardaki stok çözeltilerde PSA konsantrasyonları değerlendirilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Sıvı semen dilüsyonlarında PSA konsantrasyon değerlendirmesi

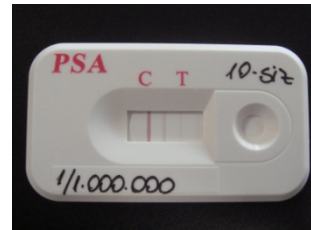
GÖNÜLLÜ	Perhizli PSA	Dilüsyon	Perhizsiz PSA
1	T=Q	1/600 000	T=Q
	T>q	1/1000 000	t<Q
2	T>q	1/600 000	T=Q
	T=Q	1/1200 000	T=Q
3	T>q	1/500	T>q
	t<Q	1/100 000	t>Q
4	T=Q	1/600 000	T=Q
	t<Q	1/1200 000	t<Q
5	T=Q	1/1200 000	T>q
	t<Q	1/1600 000	t<Q
6	t<Q	1/600 000	t<Q
	t<Q	1/100 000	T=Q
7	t<Q	1/600 000	t<Q
	t<Q	1/1200 000	t<Q
8	t<Q	1/800 000	T=Q
	t<Q	1/1000 000	t<Q
9	T=Q	1/ 600 000	T=Q
	t<Q	1/1000 000	t<Q
10	T=Q	1/600 000	T=Q
	t<Q	1/1000 000	t<Q
11	t<Q	1/600 000	T=Q
	t<Q	1/1000 000	t<Q
12	t<Q	1/600 000	t<Q
	t<Q	1/1000 000	t<Q
13	T=Q	1/600 000	t<Q
	t<Q	1/1000 000	T=Q
14	t<Q	1/600 000	t<Q
	T=Q	1/1000 000	t<Q
15	t<Q	1/600 000	T=Q
	t<Q	1/1000 000	t<Q
16	T=Q	1/600 000	t<Q
	t<Q	1/1000 000	t<Q
17	T=Q	1/600 000	T>q
	t<Q	1/1000 000	T=Q
18	t<Q	1/600 000	T=Q
	t<Q	1/1000 000	T=Q
19	t<Q	1/600 000	t<Q
	t<Q	1/1000 000	t<Q
20	T=Q	1/600 000	t<Q
	t<Q	1/1000 000	t<Q

*Seratec® PSA Semiquant membran testi ile pozitif sonuç alınan örnekler, 4ng/ml'ye göre renk şiddeti değerlendirilmiştir. Test çizgisi 4ng/ml'ye göre daha şiddetli olan sonuçlar T>q; eş şiddetli olanlar T=Q; az şiddetli olan sonuçlar t<Q olarak değerlendirilmiştir.

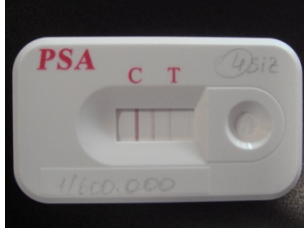
5. Dilüe Semen Seratec PSA Semiquant Test ile PSA Konsantrasyon Değerlendirmesi



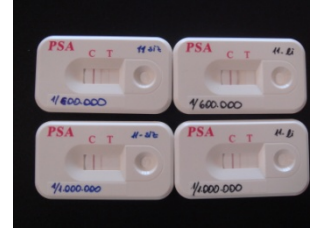
Şekil 1. T>q olarak değerlendirilmiş cinsel perhizli örnekte 1/120000 oranındaki dilüsyonda PSA konsantrasyonu



Şekil 3. t<Q olarak değerlendirilmiş cinsel perhizsiz örnekte 1/1000000 oranındaki dilüsyonda PSA konsantrasyonu



Şekil 2. T=Q olarak değerlendirilmiş cinsel perhizsiz örnekte 1/600000 oranındaki dilüsyonda PSA konsantrasyonu



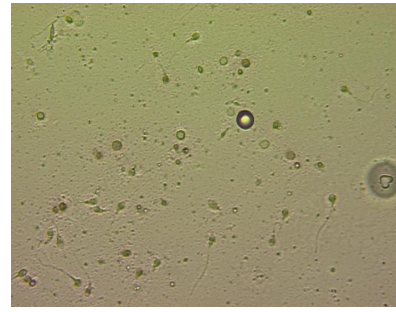
Şekil 4. Aynı kişiye ait cinsel perhizli ve cinsel perhizsiz örneklerde hazırlanan 1/600000 ve 1/1000000 oranlarındaki dilüsyonlarda PSA konsantrasyon karşılaştırılması

6. Spermatozoonların Lazer Mikroskop ile Gösterilmesi

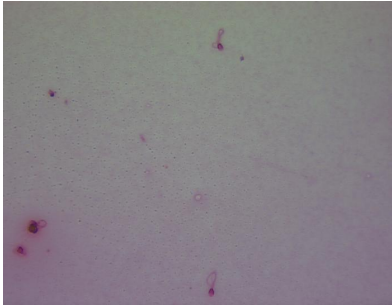
Spermatozoa görüntüleri, Microdissection Laser System ile Zeiss marka mikroskop kullanılarak 400X büyütme alındı.



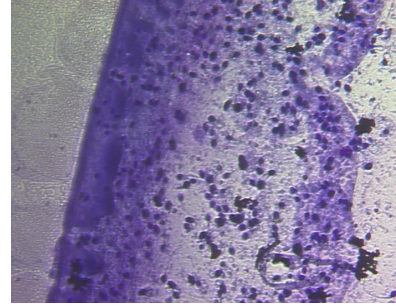
Şekil 5. Field Rapid Blue-Red boyası ile boyanan 1/100 oranında dilüe örnek görüntüsü.



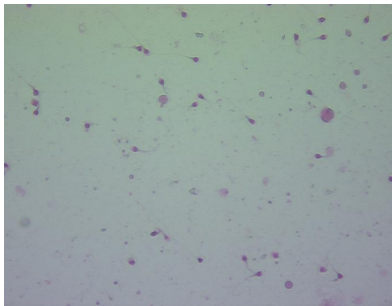
Şekil 8. Eosin-Nigrosin boyası ile boyanan direkt örnekte boyalı ve boyasız spermatozoa görüntüsü.



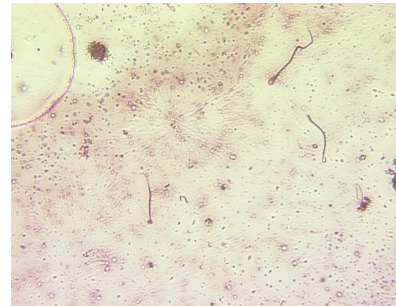
Şekil 7. Corin-Stockis boyası ile boyanan 1/1000 oranında dilüe örnek görüntüsü.



Şekil 9. Field Rapid Blue-Red boyası ile boyanan 1/100 oranında dilüe örnekte sınırdaki spermatozoa görüntüsü.



Şekil 6. Corin-Stockis boyası ile boyanan 1/100 oranında dilüe örnek görüntüsü.



Şekil 10. Eosin-Nigrosin boyası ile boyanan 1/1000 oranında dilüe örnekte spermatozoa baş morfoloji defekti görüntüsü.

Tartışma

Bir cinsel saldırı olayında semenin varlığının gösterilmesi iki temel yol ile olabilmektedir. Bunlardan birincisi, semenin içindeki spermatozoanın morfolojik olarak görüntülenmesi, ikincisi ise, semenin içerisinde bulunan biyokimyasal belirteçlerin incelenen materyalde belli bir oranda bulunduğunun gösterilmesidir. Bu iki temel yöntemin birbirine göre üstünlükleri vardır.

Spermatozoanın morfolojik olarak gösterilmesi semenin varlığına daha kesin delil teşkil etmekte ve DNA analizi ile spermin kimliklendirilmesine olanak sağlamakta iken, semenin dilüe olduğu durumlarda veya semenin içerisinde spermatozoanın az olduğu veya bulunmadığı hallerde yanlış negatif sonuçlar elde edilmesine yol açabilmektedir. Oysa biyokimyasal belirteçler daha hassas oluşları ve pozitif sonuç elde etmek için spermatozoaya ihtiyaç göstermemeleri sebebi ile daha büyük avantaj sağlarken daha az kesinlik dezavantaj oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmada spermatozoanın morfolojik olarak görüntülenmesinde kullanılan üç farklı boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemler ile belirli oranlarda dilüe edilen semen örneklerindeki spermatozoonlar görüntülenmeye çalışılmıştır. Buradaki ilk ilginç nokta hazırlanan preparatlarda dilüe örneklerden elde edilen lam üzerindeki lekelerin tespitinde yaşanmıştır.

Ön çalışmada hiç sulandırmadan lamların üzerine konan ve boyama yapılmadan direkt olarak ışık mikroskobunda incelenen preparatlarda lekenin bulunduğu her mikroskop alanında yüzlerce spermatozoa görülebilen preparatlar her üç boya ile de boyandığında lamın üzerinde kalan spermatozoa sayısının önemli oranda azaldığı dikkati çekmiştir. Bu açıdan yapılan araştırmada spermatozoa mevcut leke alanının dışına kaçtıkları ve bir kısmının lamın kenarlarına takılı olarak kaldığı saptanmıştır. Bu durum, incelemenin amacına göre sorun yaratabilir veya yaratmayabilir. Ancak özellikle semenin az spermatozoa içerdiği veya aşırı dilüe olduğu durumlarda böyle bir kaybın adli olgularda yanlış değerlendirmelere yol açacağı açıktır.

İncelenen numune ile kontrol numunesi arasında saptanan azalmanın, yeterli fiksasyonun sağlanamamasından kaynaklandığı düşünülerek boyamanın özelliğine göre kullanılan fiksatif oranları, fiksasyon süresi, yıkama süresi gibi hataya yol açabilecek bütün etkenler değiştirildiği halde bu sakınca ortadan kaldırılamamıştır. Fiksatiflerin yüzdelerinin değiştirilmesi, uzun süre fiksasyon, fiksatifin lekenin üzerine damlatılması veya lamın bütünüyle fiksatifin içine daldırılması, yıkamanın az veya çok, kısa veya uzun süre yapılması önemli bir farklılık yaratmamıştır. Bunun üzerine fiksasyon için kliniklerde pratik olarak kullanılan saç spreyi lamın üzerindeki lekenin üzerine uygulanmış ve boyamadan sonra spermatozoa sayısında azalma olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçla bu tür boyamalarda fiksasyon için saç spreyi kullanılmasının çok daha faydalı sonuçlar vereceği kanaatine varılmıştır.

Saç spreyi ile tespit dilüe edilmiş örneklerle ait preparatlarda daha iyi sonuçlar vermektedir. Semen fazla olduğu ve kuruduğunda leke oluşturduğu durumlarda fiksasyonun yine tam olarak sağlanamadığı dikkati çekmiştir. Ancak bu durumun adli bilimler uygulamaları açısından herhangi bir sorun yaratmayacağını düşünüyoruz.

Kullanılan üç boyama yöntemi arasında hazırlama ve spermatozoa görülebilmesi açısından önemli bir farklılık saptanamamıştır. Sadece Field Rapid Blue-Red boyama yöntemi, preparatın hazırlanış süresinin daha kısa oluşu açısından bir avantaj sağlamaktadır. Kullanılan her üç boyama yöntemi ile de 1/100, 1/1000 ve 1/10000 oranındaki dilüsyonlarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu dilüsyonlarda semenin içerisindeki spermatozoa azlığının yani kişiden kaynaklanan bir oligospermi veya azospermi durumunun olmaması halinde başarılı sonuçlar alınabileceği ve var olan spermatozoonların morfolojik olarak rahatlıkla gösterilebileceği söylenebilir. Aksi durumda preparat üzerinde tüm alanları kapsayan daha fazla süre alan ve daha fazla dikkat sarf edilmesi gereken bir inceleme yapılmalıdır.

Her üç boya ile yapılan incelemelerde 1/30000, 1/50000, 1/100000 oranlarındaki dilüsyonlarda yapılan incelemelerde her mikroskop görüntü alanında spermatozoaya rastlanmamış olup, bu dilüsyonlarda yukarıda bahsedildiği gibi negatif sonuçlara varmadan önce tüm preparatın dikkatlice ve zaman harcayarak incelenmesi gerekecektir.

Her üç boyama yönteminden elde edilen sonuçlara göre semenin ortalama olarak 1/100000 oranının üzerinde dilüe olması durumunda mevcut olması muhtemel az sayıda spermatozoanın morfolojik olarak gösterilebilme şansı son derece azalmaktadır. Böyle bir durumda mevcut örneğin nereden alındığına ve durumuna bağlı olarak bu örnekten elde edilen sıvının santrifüje edilmesi ve hazırlanacak preperatların santrifüj sedimentindeki materyal ile hazırlanması ve boyanması şarttır (14).

Adli bilimler pratiğinde bir cinsel saldırı iddiasında özellikle aradan süre geçen durumlarda vaginadan, anüsten, ciltten ve özellikle ağızdan alınacak swaplarda spermatozoa aranacak ise mevcut semenin ileri derecede azalacağı ve/veya dilüe olacağı, bu dilüsyonun da kolaylıkla 1/100000'i aşacağı dikkate alınarak bu tür örneklerden hazırlanacak preparatlarda sıvının santrifüje edilmesine özen gösterilmesi gerekecektir.

Uygulamada cinsel saldırganın cinsel saldırıyı gerçekleştirdiği esnadan ne kadar önce bir cinsel aktivite yaşadığı ve ejakülasyonun gerçekleştiği bilinemeyeceği için yapılan çalışmada gönüllü deneklerden cinsel perhizli ve perhizsiz olarak örnek toplanmıştır.

Mikroskobik incelemeler sonrasında kişinin cinsel perhizli olması morfolojik olarak spermatozoonların görülmesinde avantaj sağlamaktadır. Cinsel perhizli olarak alınan örneklerde gerek seçilen görüntü alanlarında gerekse tüm alanlarda perhizsize göre daha fazla sayıda spermatozoa görülmüştür. Nitekim istatistiksel olarak da aralarında anlamlı bir farklılık olduğu saptanmıştır. Bu bulgu konu ile ilgili literatür bilgisi ile uyum göstermektedir (15–17).

Çalışmada kullanılan üç boyama yönteminin, araştırmacıya sağladığı mikroskobik inceleme kolaylığı açısından değerlendirilmesinde farklılıklar ortaya çıkmıştır.

Corin-Stockis boyama yöntemi ile hazırlanan preparatlarda spermatozoanın baş, boyun ve kuyruk kısımları ile arka plan yaklaşık aynı tonda pembeye boyandığı için spermatozoanın görülebilmesi nispeten güçleşmektedir. Boyanın inkübasyonu sırasında boyanın oluşturduğu artefaktlar da değerlendirmede sorun yaratmaktadır. Kuyruğun kopmuş ve sadece baş kısmının bulunduğu durumlarda ayırım yapmak daha da güçleşmektedir.

Field Rapid Blue-Red boyasında akrozom pembemsi kırmızı, sperm boynu kirli gri pembemsi kırmızı, sperm çekirdeği kirli mavimsi siyah, sperm çekirdek çevresi pembemsi kırmızı boyanmakta olup, bu farklılık avantaj sağlamaktadır. Özellikle kuyruğun kopmuş olduğu durumlarda mikroskobun mikro vidası ile oynanarak elde edilen refle ayırımı kolaylık sağlamaktadır.

Eosin-Nigrosin boyası kullanılarak hazırlanan preparatlarda Eosin'in canlılık testi olmasından dolayı, boyanın nüfuz edemediği canlı spermatozoaya rastlanmıştır. Bu sonuca göre mağdurdan elde edilecek olan ağız, vagina veya anüs örnekleri incelendiğinde canlı spermatozoonlar, zaman tayini açısından büyük fayda sağlayacaktır. Ayrıca Nigrosin'in arka

planı koyu boyamasından ötürü kontrast sağlanmakta ve spermatozoanın seçilimi kolaylaşmaktadır.

Bu çalışmada boyayarak spermatozoanın morfolojik olarak görüntülenmesi dışında semiquantitative ELISA kit kullanılarak farklı dilüsyonlarda PSA konsantrasyonu test edilmiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi semendeki PSA konsantrasyonları bireyler arasında farklılık göstermektedir. Ancak ortalama olarak 1/600000 oranındaki dilüsyona kadar net pozitif sonuç alındığı söylenebilir. Bu oranın 1/1200000'e kadar yükselebildiği görülmektedir. Bu oranlar oldukça yüksektir. 1/100000'den sonra morfolojik görüntülemenin güç olacağı dikkate alındığında bu kadar yüksek bir dilüsyonda pozitif sonuç alınmasının uygulamada çok büyük avantajlar yaratacağı açıktır. Burada sadece dilüsyon açısından değil, saldırganın oligospermik veya daha önemlisi azospermik olduğu durumlarda bu tür bir yöntemin ön tanı açısından büyük önem taşıyacağı şüphesizdir.

Burada dikkatli olunması gereken bir nokta vardır. Daha önceden prostata spesifik olduğu düşünülen ve bu nedenle Prostat-Spesifik Antijen adı verilen antijenin sadece prostata spesifik olmadığı ve kadın erkek fark etmeden vücut sıvılarında bulunduğu anlaşılmıştır (14,18–20). Bu nedenle önemli olan testin hassasiyet sınırının çok düşük olması değil, diğer vücut sıvılarındaki antijen ile semendeki antijeni ayırabilecek noktada bulunmasıdır.

Nitekim üretici firmalar bunu göz önünde bulundurarak testin hassasiyet sınırını çok aşağılara çekmemektedir (20–22). Kullandığımız kiti üreten firma, Seratec Firması bu sınırı ~0.5ng/ml olarak belirlemiştir (20).

Tablo 1 incelendiğinde görüleceği gibi bazı değerler $t < Q$ 'dur. Bu, incelenen sıvıdaki PSA konsantrasyonunun çok düşük olduğunu göstermektedir. Böyle bir değer karşısında uygulamada semenin varlığına kesin olarak hükmetmek hatalı bir davranış olacaktır. Ancak bu konuda yapılan çalışmalar ve semene bağlı olmayarak elde edilen değerlerin oran ve yüzdeleri göz önüne alındığında (20) zayıf pozitif değerlerin bile önemli bir uyarıcı ve yol gösterici olması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Konu ile ilgili literatürde semen dışında hangi vücut sıvılarında hangi oranlarda PSA bulunacağı, kadınlarda bunun menstrual siklus ile nasıl bir değişim göstereceği konusunda bilgiler mevcuttur (20,23–31). Yapılan bir çalışmaya göre partnerinin semeni ile insemine olan kadının, vaginal sıvısındaki PSA miktarı zamanla azalır (25). Cinsel saldırıdan 14-47 saat sonrasına kadar vaginada PSA tayin edilebileceğini belirtmiştir (20,26,25). Pozitif sonucun menstrual döngü ile de ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Pozitif sonuçlar genellikle menstrual döngüden 3 gün önce veya mesntruasyon döneminde elde edilmiştir (3 gün boyunca test yapılmıştır) (20,23).

Tükürükteki PSA konsantrasyonu değer aralığı: <0.03 ng/ml $0.02-0.34$ ng/ml'dir (26). Kontraseptif kullanan kadınların tükürüğünde daha yüksek PSA oranına (ortalama, 0.099 ± 0.016 ; değer aralığı, $0.04-0.34$) rastlanmıştır (27). Menstrual döngü esnasında serum ve tükürük içindeki PSA konsantrasyon değişimlerini belirlenmiş, en yüksek değer 9. günde (foliküler faz) ve 14. günde (döngü ortası) sırasıyla 0.024 ± 0.01 ve 0.029 ± 0.013 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada 0.06 ng/ml'den daha büyük bir konsantrasyon ile karşılaşılmamıştır (20).

Kadın üresinde ortalama olarak 0.29 ngPSA/ml değer aralığı, $0.12-1.06$ ng/ml arasındadır. (20,28). Erkek üresinde maksimum PSA konsantrasyonu 800 ng/ml olarak tahmin edilmiştir. 12 yaş ve üstü erkek çocuklarda üre pozitif sonuç vermiştir (28).

Kadın serumunda ortalama PSA değeri 0.046 ± 0.07 ng/ml (değer aralığı $0.02-0.16$). Kontraseptif kullanmanın serumdaki PSA seviyesine etkisi yoktur. En yüksek değerler foliküler ve döngü ortasında elde edilmiştir (sırasıyla 0.032 ± 0.014 ve 0.035 ± 0.015 ng/ml) (30). Çocuk

serumunda 144 aylığa kadar kız ve erkek çocukları sabit konsantrasyonda PSA göstermiştir (maksimum 0,0064 ng/ml). 144 aydan büyük kız çocuklarında serum PSA seviyesi düşük kalmaya devam ederken, erkek çocuklarda serumdaki PSA artış göstermiştir (0.0141-0.143 ng/ml) (29). Sağlıklı erkek serumunda PSA seviyeleri <4ng /ml olarak görülmüştür (20).

Gerekirse literatür bilgileri göz önüne alınarak ve örneğin bir kadının menstrual döngüsü hesaba katılarak veya hangi örnekte çalışıldığı dikkate alınarak yorumlamalar yapılmalıdır. Kanaatimizce böyle bir durumda muhakkak surette dilüe örneğin santrifüj edilmesi ve ısrarlı morfolojik araştırmaların yapılması gerekecektir.

Uygulamada spermatozoanın morfolojik olarak görüntülenmesi için boyama yöntemlerinin mi yoksa semenin varlığının gösterilmesi için biyokimyasal belirteçlerin varlığını gösteren testlerin mi öncelikle kullanılması gerektiği hususunda bir tartışma ortaya çıkabilir. Elbette ki böyle bir durumda her olgunun kendi özelliğine göre hareket edilecektir.

İncelemeyi yapan uzman olayın oluşum şekli, örnek alınan yer ve aradan geçen süreyi göz önünde tutarak ve ne tür bulgulara ulaşabileceğini tecrübesini de ortaya koyarak değerlendirecektir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre ve uygulamada genel olarak hedeflenen amaç göz önüne alındığında öncelikle boyama yöntemlerinin kullanıldığı ve spermatozoanın morfolojik olarak görüntülediği bir durumda ikinci olarak biyokimyasal belirteçlerin aranmasının ve semenin varlığına yönelik testler uygulanmasının bir anlamı olmayacaktır.

Öncelikle boyama yöntemlerinin kullanılıp negatif sonuçların alındığı yani morfolojik olarak spermatozoanın görüntülenemediği her durumda ise biyokimyasal belirteçlere yönelik incelemelerin yapılması şarttır. Çünkü bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre 1/100000'ün üzerindeki bir dilüsyonda dahi morfolojik görüntüleme mümkün olmayacak ve hatalı sonuçlara varılacaktır.

Öncelikle biyokimyasal belirteçlere yönelik testlerin yapılması ve anlamlı düzeyde pozitiflik elde edilmesi halinde muhakkak surette morfolojik olarak spermatozoanın gösterilmesi yoluna gidilmelidir. Zayıf pozitiflik elde edilmesi halinde de aynı yol denenmeli ancak araştırmanın negatif kalma olasılığı akıldan çıkarılmamalıdır.

Sonuç

Yapılan çalışmada şu sonuçlara varılmıştır:

- 1) Adli bilimler uygulamasında sıklıkla karşılaşılan cinsel saldırı olgularında semen araştırması yaparken morfolojik olarak boyama yöntemlerinin negatif sonuçlandığı durumlarda PSA konsantrasyon testi yapılması, kesinlikle gereklidir.
- 2) Santrifüj uygulanmadan hazırlanacak preparatlarda 1/100000 oranındaki dilüsyonların üzerinde morfolojik olarak spermatozoanın boyama yöntemleri ile gösterilme şansı çok düşüktür.
- 3) PSA Semiquant test ile 1/1200000 oranındaki dilüsyonlara kadar semenin varlığının gösterilmesi, zayıf pozitif reaksiyonlarda yorum yapmak kaydı ile mümkündür.
- 4) Corin-Stockis, Field Rapid Blue-Red, Eosin-Nigrosin boya yöntemleri ile yapılan incelemelerde spermatozoanın morfolojik olarak gösterilebilmesi açısından önemli bir farklılık saptanmamıştır.
- 5) İnceleme esnasında özellikle kuyruğu kopmuş veya pin-head spermatozoonların tanısında Field Rapid Blue-Red boyası avantaj sağlamaktadır.

6) Hangi boyama yöntemi kullanılırsa kullanılsın spermatozoonları, preparat hazırlanırken lamın üzerine tespit etmek için saç spreyi kullanılması önemli bir avantaj sağlamaktadır.

7) Semen incelemelerinde spermatozoonlar morfolojik olarak görüntülenirken saptanacak spermatozoa sayısı semenin ait olduğu kişinin cinsel perhizli olup olmaması ile ilişkilidir.

Kaynaklar

1. Turvey, B., "A-Utopic determination of oral sex in forensic science," *Knowledge Solutions Library*, 1995, Electronic Publication, URL: <http://www.corpus-delicti.com/oralsex.html>
2. <http://www.aets.org/article130.htm>
3. 5237 sayılı yeni Türk Ceza Kanunu, Legal Yayıncılık 2004
4. Grossin C, Sibille I, Grandmaison G, Banasr A, Brion F, Durigon M. Analysis of 418 cases of sexual assault, *Forensic Sci Int.*, 2003, 131, 125-130
5. Gök Ş, Meni Sperm Lekesi, Adli Tıp Pratiği, Filiz Kitabevi, 1984,47-48
6. L. Björndahl, I. Söderlund, U. Kvist, Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment, *Hum. Rep.*, 2003, 18(4), 813-816
7. Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. , A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl.* 1987;18(3):275-7
8. Khaldi N, Miras A, Botti K, Benali L, Gromb S. Evaluation of three rapid detection methods for the forensic identification of seminal fluid in rape cases, *J Forensic Sci.* 2004;49(4):749-53
9. Hochmeister MN, Budowle B, Rudin O, Gehrig C, Borer U, Thali M, Dirnhofer R., Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid *J Forensic Sci.* 1999;44(5):1057-60
10. Johnson ED, Kotowski TM, Detection of prostate specific antigen by ELISA, *J Forensic Sci.* 1993;38(2):250-8
11. Gartside B, Brewer K, Strong C. Estimation of prostate-specific antigen (PSA) extraction efficiency from forensic samples using the seratec PSA semiquantitative membrane test, *Forensic Science Communications*, 2003; 5(2) Elektronik yayın, URL: <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2003/index.htm> (Erişim tarihi: 19.04.2006)
12. Schiff AF Follow-up on the Berg acid phosphatase test, *Am J Forensic Med Pathol.* 1998;19(1):67-8
13. Atasoy S, Lekelerde sperm identifikasyonu, *Adli Tıp Dergisi*, 1989, 5,49-66
14. Corea, M., Campagnone, J., Sigman, M. The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation, *Fertil Steril*, 2005, 83(4):920-2.
15. Yıldırım, M., İnsan Anatomisi Erkek Üreme Sistemi, s.175 Beta Basım Yayım, 1994 İstanbul
16. Taşçı, A.İ., Samastı, M. İnfertilite laboratuvar ve uygulamaları, hayat sağlık ve sosyal hizmetler vakfı 1997, s.1-30, İstanbul
17. http://www.androloji.info/azoospermi_guncel_tanimi.php (Erişim tarihi: 20.02.2006)
18. Yu, H., Berkel, H. Prostat-spesific antigen (PSA) in woman, *J. La State Med. Soc.* 1999, 151 (4) : 209-13
19. Diamanis, E.P., Yu, H. Nonprostatic sources of prostate spesific antigen, *Urol. Clin. North Am.* 1997, 24 (2) : 275-82.
20. Seratec® Diagnostica. Seratec® PSA Semiquant membrane test for detection of seminal fluid. Seratec® Diagnostica, 2000 Göttingen, Germany.
21. Yokota, M., Mitani, T., Tsujita, H., Kobayashi, T., Higuchi, T., Akane, A., Nasu, Masao. Evaluation of prostate -spesific antigen (PSA) membrane test for forensic examination of semen, *Leg Med* 2001, 3(3): 171-176.
22. Chang, Dok.A., Yoshiki, T., Lee, G., Okada, Y. Evaluation of a rapid qualitative prostate-spesific antigen , assay, the One Step PSA™ test, *Cancer Lett*, 2001,162:135-139
23. Denison, S.J., Lopes, E.M., D'Costa, L., Newman, J.C. Positive prostate-spesific antigen (PSA) results in semen free samples, *Can. Soc. Forensic Sci. J.* 2004, 37(4):197-206
24. Kafarowski, E., Dann, K., Frappier, J.R.H., Newman, J.C. Examination of semen free vaginal swabs for p30 using the Seratec PSA test kit: A further evaluation of the spesifity of p30/PSA for semen identification, 2004 , MAAFS, MAFS, SAFS, CSFS Joint Meeting, 19-24, Orlando, Florida
25. Sato, I., Sagi, M., Ishiwari, A., Nishijima, E.T, Mukai, T. Use of "Smitest" PSA card to identify the presence of prostate-spesificantigen in semen and male urine, *Forensic Sci. Int.* 2002; 127(1-2) 71-74.
26. Lövgren, J., Valtonen-Andree, C., Marsal, K., Lilja, H., Lundwall, A. Measurement of prostate specific antigen and human glandular kallikrein 2 in different body fluids, *J. Androl*, 1999; 20:348-355

27. Macaluso, M., Lawson, L., Akers, R., Valappil, T., Hammond, K., Blazckwell, R., Hortin, G. Prostate Specific antigen in vaginal fluid as a biological marker of condom failure, *Contraception*, 1999; 59:195-201
28. Manello, F., Condem, L., Cardinal, A., Bianchi, G., Gazzanella, G. High concentration of prostate specific antigen in urine of women receiving oral contraceptives, *Clin. Chem*, 1998; 44:181-183
29. Schmidt, S., Franke, M., Lehman, J., Loch, T., Stockle, M., Weichert-Jacobsen, K. Prostate-specific antigen in female urine: a prospective study involving 271 women, *Urology*, 2001; 57:717-720
30. Antoniou, A., Papanastasiou, P., Stephanidis, A., Diamendis, E., Androulakakis, P.A. Assessment of Serum Prostate-Specific Antigen in childhood, *BJU Int*, 2004; 93:838-840
31. Manello, F., Bianchi, G., Gazzanella, G. Immunoreactivity of prostate-specific antigen in plasma and saliva of healthy women, *Clin. Chem*, 1996; 42:1110-1111

İletişim Adresi: Mol. Bio. H. İrem SEYALIOĞLU
İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü
İstanbul
e-mail : irem1446@gmail.com