

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ÇEŞİTLİ SIVI ORTAMLARA KONULAN İNSAN
EJAKULAT ÖRNEKLERİNDE SPERM HÜCRELERİNİN
VE PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI

Dr. Harun AKKAYA

Adli Tıp Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2010

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ÇEŞİTLİ SIVI ORTAMLARA KONULAN İNSAN
EJAKULAT ÖRNEKLERİNDE SPERM HÜCRELERİNİN
VE PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI

Dr. Harun AKKAYA

Adli Tıp Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yasemin BALCI

ESKİŞEHİR
2010

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Harun AKKAYA'ya ait “Çeşitli sıvı ortamlara konulan insan ejakülat örneklerinde sperm hücrelerinin ve prostat spesifik antijen varlığının araştırılması” adlı çalışma jürimiz tarafından Adli Tıp Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 24.09.2010

Jüri Başkanı Prof. Dr. Yasemin BALCI
Adli Tıp Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Başar ÇOLAK (Kocaeli Üni.)
Adli Tıp Anabilim Dalı

Üye Yrd. Doç. Dr. Tarık GÜNDÜZ
Adli Tıp Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun Tarih ve Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ
Dekan

TEŞEKKÜR

Uzun süren bir proje-tez sürecinde, bana her daim yardımcı olan proje yürütücümüz ve tez danışmanım sayın hocam Prof.Dr.Yasemin BALCI'ya, yine proje-tezde bizden desteklerini esirgemeyen Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan sayın hocam Prof.Dr.Varol ŞAHİNTÜRK'e, Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan sayın hocam Doç.Dr.Setenay ÖNER'e, eğitimime katkılarından dolayı Adli Tıp Anabilim Dalımız öğretim üyelerinden sayın hocam Yrd.Doç.Dr.Tarık GÜNDÜZ'e teşekkür ederim.

ÖZET

Akkaya, H. Çeşitli sıvı ortamlara konulan insan ejakülat örneklerinde sperm hücrelerinin ve prostat spesifik antijen varlığının araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2010. Cinsel saldırı mağdurlarının su ile temasının sperm tespit edilebilirliği ve prostat spesifik antijen(PSA) aktivitesi üzerine olumsuz etkilerinin olabileceği bilinmektedir. Temas edilen suyun özellikleri (kimyasal, biyolojik vs.) de önem arz etmektedir. Bu çalışmada, in vitro ortamda farklı sulara sperm tespiti ve PSA etkinliği üzerine araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada gönüllü ve aydınlatılmış onamı alınan 30 farklı genç yetişkin erkekte cinsel perhiz sonrasında alınan ejakülatlar farklı sıvı ortamlara konularak sperm hücreleri ve PSA pozitifliğinin zamana bağlı değişimleri incelenmiştir. Her biri mililitresinde 50 milyon sperm hücresi içerecek şekilde standardize edilen semen örnekleri, deniz suyu, çeşme suyu, distile su ve yöremizden geçen Porsuk Nehri'nin suyunu içeren 4 adet tüpte %20 oranında dilue edilmiştir. Dilue örneklerden günlük periyotlarla sperm sayımı yapılmıştır. Yine aynı miktarda ve farklı sular içeren 4 adet tüpe eşit hacimde ejakülat örneği konulmuştur. Aynı hacimde sperm içeren tüplerde $1/10^4$, $1/10^5$ ve $1/(5 \times 10^5)$ oranlarında dilüsyon işlemi yapılarak günlük periyotlarla PSA etkinlikleri değerlendirilmiştir. Sperm hücrelerinin çeşme suyu ve distile suda deniz suyu ve tatlı suya göre daha uzun süre tespit edilebildikleri saptanmıştır. Çeşme suyunda 1128.saate, deniz suyunda 888.saate, distile suda 1008.saate ve porsuk suyunda 792.saate kadar sperm hücresi görülebilmektedir. PSA etkinliğinin ise $1/10^4$ dilüsyonda; çeşme suyunda 1296.saate, distile suda 1008.saate, deniz suyunda 240.saate porsuk suyunda 264.saate kadar tespit edilebildiği, $1/10^5$ ve $1/(5 \times 10^5)$ oranlarındaki dilüsyonlarda da çeşme suyu ve distile sulara tespit edilebilen PSA etkinliğinin, deniz ve porsuk sularında tespit edilen süreden uzun olduğu görülmüştür. İncelenen örneklerde; aradan geçen süre, dilüsyon oranı, sıvının çeşidine göre sperm sayısında ne gibi değişikliklerin olduğu kaydedilmiştir. İn vitro ortamdaki sonuçların in vivo ortam sonuçları ile aynı olmayacağı bilinmekle birlikte değişik su örneklerinde sperm hücresi görülme ve PSA etkinliğiyle ilgili zamana bağlı değişimler tablolar ve şekiller halinde sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: sperm hücresi, PSA, dilüsyon, zaman, su farklılığı

ABSTRACT

Akkaya, H. The investigation of the presence of the sperm cell and the prostate specific antigen (PSA) in the samples of human ejaculates at the different liquid medium. Medical Faculty of Eskisehir Osmangazi University, Department of Forensic Medicine, Thesis of Specialty in Medicine, 2010. It's known that victims of sexual assault, contact with water, sperm and prostate-specific antigen(PSA) detection may have negative effects contact the water properties (chemical, biological, etc..) is also important. The aim of this study is to investigate in vitro settings the sperm detection and the effect of prostate specific antigen (PSA) presence at different liquids. In this study, volunteers received and informed consent 30 different young adults, after sexual abstinence ejaculates by putting the sperm cells different liquid environments, and PSA changes over time to was examined. in each milliliter will contain 50 million sperm cells in semen samples standartized and it was dilueted 20% with sea water, fountain water, distilled water and Porsuk River water from our region in 4 tubes. Sperm count with daily periods of dilue examples were made by sperm counting chamber. Equal volume samples of ejaculate were put into 4 tubes that containing the same amount of different waters. Dilution has been done rates of $1/10^4$, $1/10^5$ and $1/5 \times 10^5$ in the tubes containing the same volume of sperm and PSA activity was evaluated with daily period. Sperm cells were detected in the fountain water and distilled water longer than sea water and fresh water. The sperm cell could be seen in fountain water until at 1128 hour, in sea water until at 888 hour, in distilled water until at 1008 hour, in fresh water until at 792 hour. PSA activity was detected at $1/10^4$ dilution, in fountain water until at 1296 hour, in sea water until at 240 hour, in distilled water until at 1104 hour, in fresh water until at 264 hour. Also at $1/10^5$ and $1/(5 \cdot 10^5)$ dilutions, determined PSA activity was seen in the fountain water and distilled water longer than sea water and fresh water. The observed examples, it have been saved that the activity of the PSA test according to the dilution rate and the time and what kind of changes of sperm counting. It's known that the in vitro results and in vivo results are not same. Sperm cells are seen and events related to PSA, time-related changes in the various water samples are presented in the tables and figures.

Key Words: sperm cell, PSA, dilution, time, water difference

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM	6
4. BULGULAR	16
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACP	Asit Fosfataz
ark.	arkadaşları
bkz.	bakınız
BMI	Vücut kitle indeksi
BPH	Bening Prostat Hipertrofisi
C	Kontrol Bandı
DNA	Deoksiribonükleik asit
H&E	Hemotoksilen ve Eozin
mak.	maksimum
mil.	milyon
min.	minimum
ml.	mililitre
N	sayı
ng	nanogram
ort.	ortalama
pH	asitlik bazlık birimi
PSA	Prostat Spesifik Antijen
R	Referans Bandı
T	Test Bandı
vs.	vesaire
µl	mikrolitre
µm	mikrometre

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Elektron mikroskobunda sperm hücresinin görünümü	2
3.1. Bir kişiden alınan ejakulat örneğinden dilüsyonları elde etme aşamaları	9
3.2. Görüntü ataçmanlı mikroskop	10
3.3. Sperm sayma kamarası	11
3.4. Preperatlar ve PSA kitleri için kullanılan lam arşiv dolabı	11
3.5. Deneylerde kullanılan mikropipetler	12
3.6. Deney tüpleri ve sporları	12
3.7. Deney ortamından genel görünüm	13
3.8. PSA kiti	13
4.1. Zamana bağlı olarak farklı su türlerinde ortalama sperm konsantrasyonları	19
4.2. Zamana bağlı farklı sulardaki örneklerde sperm incelenmesinin sonlandığı olgu sayısının dağılımı	24
4.3. Tüm vakaların, farklı su örneklerindeki ortalama değerlerin zamana bağlı olarak değişimleri	25
4.4. Çeşme suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 0.saatte alınan görüntü	26
4.5. Çeşme suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 480.saatte alınan görüntü	26
4.6. Deniz suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 0.saatte alınan görüntü	27
4.7. Deniz suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 240.saatte alınan görüntü	27
4.8. Deniz suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 480.saatte alınan görüntü	28
4.9. Distile suda %20'lik semen dilüsyonunda 0.saatte alınan görüntü	28
4.10. Distile suda %20'lik semen dilüsyonunda 480.saatte alınan görüntü	29
4.11. Porsuk suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 0.saatte alınan görüntü	29
4.12. Porsuk suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 240.saatte alınan görüntü	30
4.13. Porsuk suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 480.saatte alınan görüntü	30
4.14. Çeşme suyu örneklerinde ilerleyen saatlere göre sperm görüntüleri	32
4.15. Deniz suyu örneklerinde ilerleyen saatlere göre sperm görüntüleri	33
4.16. Distile su örneklerinde ilerleyen saatlere göre sperm görüntüleri	34
4.17. Porsuk suyu örneklerinde ilerleyen saatlere göre sperm görüntüleri	35
4.18. Farklı su türlerinde ve farklı zamanlarda, sperm hücresi etrafında toplanan mikroorganizmalar	36

4.19. Porsuk suyu örneklerinde sperm hücresi ile izlenen diatomlar	37
4.20. Kendi etrafında toplanarak topluluk oluşturan sperm hücreleri	38
4.21. Çeşme suyu örneğine düşen bir kıl segmenti üzerine toplanan sperm hücreleri(240.saat)	39
4.22. Deniz suyu örneğinde kristalize yapılar ve sperm hücreleri	39
4.23. Çeşme ve distile sulardan manuel çalkalama kullanılmadan 720.saatte tüpün alt kısmındaki çöken tortudan alınan örnekler	40
4.24. Çeşme ve distile sulardan manuel çalkalama yapılarak 720.saatte alınan örnekler	40
4.25. Farklı su türlerinde ve farklı dilüsyonlardaki PSA aktivasyonunun ortalama bitiş süreleri	47

TABLÖLAR

	Sayfa
4.1. Zamana göre farklı sulardaki ortalama sperm konsantrasyonlarının dağılımı	16
4.2. Zamana göre farklı sulardaki ortalama sperm konsantrasyonlarının dağılımı, standart sapma ve minimum-maksimum değerleri	17
4.3. Zamana göre farklı su türlerinde sperm konsantrasyonları arasındaki farklılık durumu	20
4.4. Zamana bağlı farklı sulardaki örneklerde sperm incelenmesinin sonlandığı olgu sayısının dağılımı	23
4.5. 1/10.000 ejakulat dilüsyonun çeşitli sularda PSA aktivitesinin ortadan kaybolduğu ortalama sürelerin(saat) dağılımı	43
4.6. 1/10.000 ejakulat dilüsyondaki farklı su çeşitlerinin PSA aktivitesi açısından birbirleri ile karşılaştırmaları	43
4.7. 1/100.000 ejakulat dilüsyonun çeşitli sularda PSA aktivitesinin ortadan kaybolduğu ortalama sürelerin(saat) dağılımı	44
4.8. 1/100.000 ejakulat dilüsyondaki farklı su çeşitlerinin PSA aktivitesi açısından birbirleri ile karşılaştırmaları	44
4.9. 1/500.000 ejakulat dilüsyonun çeşitli sularda PSA aktivitesinin ortadan kaybolduğu ortalama sürelerin(saat) dağılımı	45
4.10. 1/500.000 ejakulat dilüsyondaki farklı su çeşitlerinin PSA aktivitesi açısından birbirleri ile karşılaştırmaları	45
4.11. Farklı dilüsyonlardaki PSA aktivasyonunun, farklı su türlerindeki minimum ve maksimum bitiş süreleri	46
4.12. Farklı su türlerinde ve farklı dilüsyonlardaki PSA aktivasyonunun ortalama bitiş süreleri	46

1. GİRİŞ

Cinsel suç mağdurlarının önemli bir kısmı, yaşadıkları bir cinsel travma sonrası yıkandıktan sonra hekim karşına gelmektedir. Yıkanmanın yani dilüsyonun sperm tespit edilebilirliğine etkisi tartışılan adli tıp konularındandır. Cinsel suç mağdurlarında vücut boşluklarından alınan örneklerde, cinsel eylemden en fazla kaç saat sonrasına kadar canlı ya da ölü sperm tespit edilebileceği konusundaki literatür bilgileri farklıdır. Ayrıca; cinsel suç sonrası mağdurların farklı niteliklerde su içeren ortamlara (deniz, göl vb.) atılabileceği düşünülerek suda kalmanın dilüsyona bağlı olarak sperm tespitini güçleştirebileceği unutulmamalıdır.

Cinsel saldırı olaylarında saldırı sonrası geçen süre, yıkanma veya mağdurun öldürülüp suya atılması gibi sperm tespitini güçleştiren durumlarda, meniye özgü PSA (Prostatik Spesifik Antijen) varlığının değerlendirilmesi önemlidir. Dünya çapında konuyla ilgilenen adli bilimciler, şüpheli örneğin, insan menisine özgü PSA içerip içermediği açısından, eczanelerden alınarak kullanılan gebelik testine benzer, renk ayırıcına dayalı PSA testini kullanmaktadır. Her bir inceleme için tek kullanımlık olan bu testin ülkemizde, İstanbul Adli Tıp Kurumu'nda rutin olarak kullanıldığı bilinmektedir.

Çalışmada; suda kalmanın, sperm yoğunluğunu ne kadar sürede, nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu çalışmanın literatür kapsamındaki diğer çalışmalardan farkı, değişik su örneklerinin kullanılmış olması ve bu su örneklerinde hem zaman hem de dilüsyon faktörüne göre sperm tespit edilebilirliği ile PSA etkinliğinin araştırılmış olmasıdır.

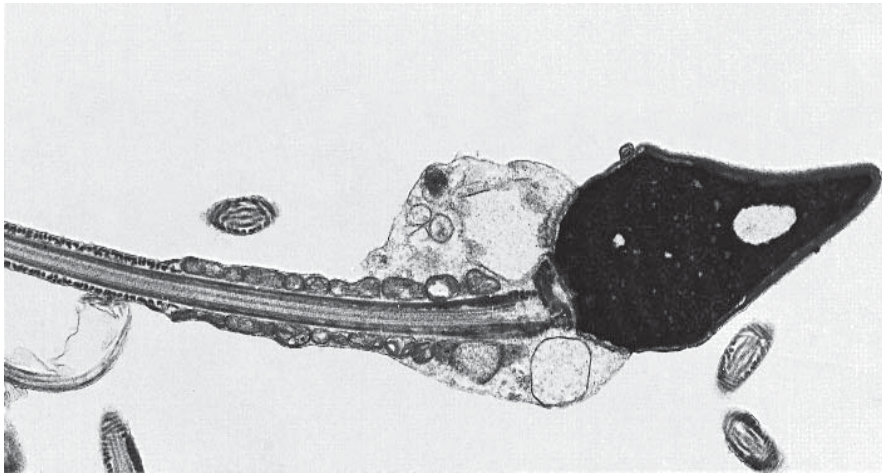
Çalışmanın amacı kısaca cinsel suç mağdurlarından delil elde edilmesiyle ilgili olarak dilüe edilmiş insan ejakülat örneklerinde zamana ve dilüsyon oranına bağlı olarak sperm hücresi tespit edilebilirliğini belirlemek, ayrıca insanlara ait sperm hücresi tespit edilemeyen örneklerde insan ejakülatına özgü prostat spesifik antijen (PSA) varlığını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Sperm Hücresi İle İlgili Genel Bilgi ve Literatür Bilgisi

Spermatozoon diğer adıyla sperm hücresi, 23 kromozomlu erkek üreme hücresidir. Testislerde üretilen sperm hücresi, epididimis kısmında gelişimini tamamlar(1). Sperm hücresinin boyu yaklaşık 25 μm . uzunluğunda olup hızı ise 17 ile 67 $\mu\text{m/s}$ arasında değişmektedir(2). Bir sperm hücresi, baş ve kuyruk (flagellum) kısımlarından meydana gelir. Baş ve kuyruk kısımları sperm plazma membranı (plasmalemma) tarafından sarılmış durumdadır. Baş kısmı deoksiribonükleik asit (DNA) içerir. Kuyruk kısmı ise sperm hücresinin hareket etmesini sağlayan yapıdır. Kendine özgü 9+2 mikrotübüller flagellar aksonemden meydana gelmiş, topolojik olarak boyun kısmı, orta kısım, ana kısım ve son kısım olmak üzere 4 bölümden oluşan yapıya sahiptir. Orta kısmında, sperm hareketi için enerji sağlamakla görevli, 75-100 adet sperm mitokondrisi bulunmaktadır(3). (Şekil 2.1.) Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen alt limit normal semen değerlerine göre; 2-5 günlük cinsel perhiz sonrası alınan ejakulatın volümünün 1,5 ml.'ye eşit veya üzeri olması, pH değerinin 6,4 ile 8,0 arası olması, konsantrasyonun ise 15 mil/ml. ve üzeri olması şeklinde tanımlanmıştır(4).

Şekil 2.1. Elektron mikroskopisi ile 17.000 kez büyütülmüş sperm görüntüsüne aittir. Baş bölümü içindeki beyaz kısım nükleer vezikülü, kuyruk bölümünün başlangıç kısmında da sırayla dizilmiş sperm mitokondrileri izlenmektedir(5).



Şekil 2.1. Elektron mikroskopunda sperm hücresinin görünümü

Cinsel saldırı mağdurlarında, saldırıdan en fazla kaç saat sonrasına kadar canlı ya da ölü spermier tespit edilebileceği konusundaki literatür bilgileri farklıdır, buna göre; bazı yazarlar spermatozoonun vajinada 36 saate kadar(6), bazı yazarlar ise 24 saate kadar motilitesini gösterebildiğini(7), yine vajinada bazı yazarlar 72 saate kadar(6), bazı yazarlar ise 120 saate kadar(8) tespit edilebildiğini, bu nedenle cinsel suçlarda adli muayenenin ilk 72 saatte yapılmasının önemli olduğunu vurgulamışlardır. Willott ve ark., sperm hücrelerini anüste 46 saate kadar, rektumda 65 saate kadar alınan swaplarda tespit etmişlerdir(8). Oral kavitede ise ağız çalkalama ve dişleri fırçalama yapılmaksızın 6 saate kadar kalabildiği bildirilmiştir(6,8).

Gerek ülkemizde gerekse uluslar arası düzeyde, farklı niteliklerdeki suların zamana göre sperm tespit edilebilirliğine etkisini gösteren ve sperm hücrelerinin ne oranda azaldığına dair araştırmaya rastlanmamıştır.

Prostat Spesifik Antijen İle İlgili Genel Bilgi ve Literatür Bilgisi

Prostat Spesifik Antijen (PSA), insan prostat dokusundan salgılanan yaklaşık 33000-34000 dalton ağırlığında olan bir glikoproteindir. PSA, zimojen formu olan proPSA şeklinde salgılandıktan sonra trypsin-like proteazlar yardımıyla aktivasyona uğrayarak semen içinde PSA şeklini almaktadır. Başlıca fonksiyonu serin proteaz görevi görerek seminal sıvının likefaksiyonunu sağlamaktır(9). Bu glikoprotein keşfedilmesi sırasında literatürdeki PSA teriminin farklı bilim adamlarınca farklı adlar koyduklarını görmekteyiz. Önce -seminoprotein, sonra 30 kilodalton ağırlığında saptanması nedeniyle P30 isimlerini almış daha sonra bu isimlerdeki protein yapılarının aynı olduğu kabul edilmiş ve Prostat Spesifik Antijen adı altında toplanmıştır(10). Prostat dokusundan salgılandığı 1979 yılında Wang ve ark. tarafından gösterilmiştir. PSA, seminal sıvıda yaklaşık 0.5-3 mg/ml. konsantrasyonunda bulunmaktadır. Kana geçen PSA molekülleri ise daha düşük oranlarda bulunur. Kanda bulunan konsantrasyonun yükselmesi Benign Prostat Hipertrofisi(BPH) ve prostat kanserlerinde ortaya çıkar(11-14). PSA'nın, etnik yapılara göre ve vücut kitle endeksine(BMI) göre de değişkenlik gösterdiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur(15,16). PSA'nın prostat kanseri ile ilişkisini ilk defa 1981 yılında Nadji ve ark. tespit etmişler ve bu çalışmalarından sonra PSA değerli bir tümör markeri olarak kullanılmaya başlanmıştır(17). Önceleri sadece erkeklerde saptanması beklenen PSA'nın, 1980'lerin sonlarına doğru yapılan araştırmalar çerçevesinde; idrar kesesi tümörlerinde, adneksal ve meme tümörlerinde, kadınlardaki paraüretral glandların(Skene's gland) tümörlerinde artışın olduğu saptanmıştır(10). 1976 yılında Schumann ve ark.(18), prostatik asit fosfatazın cinsel suçlarda araştırılması gereken bir kanıt olabileceğini önermişler, 1984 ve 1985 yıllarında ise Poyntz ve ark.(19) ile Graves ve ark.(20), PSA'nın cinsel saldırıya uğrayanların araştırılmasına yönelik uygulamalarda da kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Sensabaugh GF ve ark(21,22) 1978 ve 1990 yıllarında vazektomize olan ya da azoospermik olan erkek bireylerin olası bir cinsel saldırı sonunda bırakabilecekleri kanıtların en değerlisinin P30 olduğunu ileri sürmüşlerdir ve bu tarihlerden itibaren güçlü bir tümör markeri olarak kullanılan PSA, aynı zamanda cinsel suçların kriminal incelemelerinde de yer almaya başlamıştır(9).

Literatür incelendiğinde; kanda, serumda yada idrarda bulunan PSA'yı ölçmek için kullanılan devasa makinelerle karşı kullanımını daha kolay olan, gebelik testi kitlerine benzeyen ve immunokromatografik yolla çalışan test kitlerinin bulunduğu ve çalışmaların da bu kitlerle yapıldığını görmekteyiz. Hochmeister(23), Maher(24), Levine(25), Sato(26), Yokota(27) ve Simich(28) bu kitlerle çalışmalarını yapmışlardır. Yine çalışmalar incelendiğinde; Yokota ve ark., PSA dilüsyonları üzerinde durmuş $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$ ve $1/10^6$ şeklinde PSA dilüsyonlarında $1/10^6$ 'lık dilüsyonda hiç pozitif sonuç alınmadığını, $1/10^5$ 'lık dilüsyonda kısmen pozitif sonuç alındığını, diğer dilüe örneklerde de pozitifliğin saptandığını belirtmişlerdir(27). Sato ve ark. ise $1/(2 \times 10^5)$ dilüe PSA örneğinde pozitiflik bulmuş ancak $1/(3 \times 10^5)$ dilüe örnekte pozitiflik bulamamıştır(26). Her iki araştırmacı da örnek sayısını az tutmuş ve dilüsyonu oluşturduktan sonra deneyi yapmışlardır.

Bu araştırmacılardan sonra hem süre hem de dilüsyonun etkisinin birlikte değerlendirildiği çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmada; bu iki araştırmacının(26,27) çalışmalarına değer vererek daha fazla olgu sayısı ile birlikte zaman faktörünü ekleyerek zamanla pozitiflikten negatifliğe geçen süreyi günlük periyotlarla kaydederek sonuçlar çıkarılmıştır. Kısaca farklı su türlerindeki farklı dilüsyonlarda bulunan PSA pozitifliğinin geçen zamana bağlı olarak değişimleri kaydedilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Dilüsyon Oranını Saptamak Amaçlı Yapılan Ön Hazırlıkların Gereç ve Yöntemi

Literatürde örnekleri olmayan bu çalışmanın ejakulat dilüsyon oranlarını belirlemek amacıyla in vitro ortam ile in vivo ortam arasındaki en iyi uyum gösterebilecek hazırlık çalışmaları yapılmıştır. Bu ön çalışmalarda deneylerin 30 olgusunu da kapsayacak dilüsyon oranları elde edilmeye çalışılmıştır. Ön çalışmalar için de gönüllü ve aydınlatılmış onamı alınan genç yetişkin erkeklerden ejakulat örnekleri alınmıştır. İlk olarak, sperm sayımı yapılacak ve sperm morfolojisi incelenecek tüplerdeki dilüsyon oranları, %50 su (çeşme, deniz, distile ya da porsuk), %50 ham ejakulat olarak seçilmiş olup yapılan mikroskopik gözlemlerinde ham ejakulattan çok da farklı bir sonuç çıkmamış, sperm sayılarının oldukça fazla olduğu ve anlamlı bir düşüşe sahip olmadığı izlenmiştir. Ayrıca materyalin (ejakulat ve su) 3 hafta sonrasında buharlaştığı görülmüş, sperm sayısındaki azalmanın tespit edilebileceği miktarda materyalin kalmaması nedeni ile bu dilüsyon oranının kullanılmasından vazgeçilmiştir. Daha sonra %66.6 su oranı ile %33.3 oranında ejakulat örnekleri 2/1 oranında ayarlanarak mikroskopik gözlemler yapılmış ancak ilk denemedeki (1/1 dilüe) olumsuz sonuçlara benzer şekilde verilerin çıkması nedeniyle bu orandan (2/1 dilüe) da vazgeçilmiştir. Bu sırada 1/100 oranında (1 birim ham ejakulat-99 birim su) dilüe ettiğimiz örnekler inceleme altına alınmıştır. Bu dilüe örneklerde de 2-4 gün arasında sperm hücrelerinin görülememesi nedeniyle morfolojik değerlendirmenin sağlıklı yapılamayacağı düşünülmüş, bu orandaki (99/1 dilüe) deney de son bulmuştur.

Daha sonra, vajina hacminin büyüklüğü, koitus sonrası vajina içerisinde kalan ejakulatin miktarı, koitus sonrası kurbanı ölü veya diri suya atma gibi senaryolar düşünülmüş ve en son olarak dilüsyon oranının %20 olarak yapılmasına karar verilmiştir. 1 birim ejakulata 4 birim farklı sulardan biri ilave edilerek hazırlanan bu ön çalışmalar bize hem sperm morfolojisini daha iyi değerlendirmeyi hem de in vitro ortam ile in vivo ortam arasındaki uyumluluğu daha iyi yakalamamızı sağlamıştır.

Sperm Tespiti İçin Gereç ve Yöntem

Gönüllü ve aydınlatılmış onamı alınan 20-35 yaşları arasındaki genç yetişkin 30 erkekten, 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında ejakulat örnekleri steril idrar kaplarına alınmıştır. Örneklerin yaklaşık 45-60 dakika sonra likefaksiyon süresini takiben öncelikle, ejakülatların içerdiği sperm sayıları sperm sayma kamarası (Macler Chamber®) ile sayılıp ejakulatın 1 mililitresinde kaç milyon sperm hücresi olduğu kaydedilmiştir. Deney tüplerinde, ejakulatın mililitresinde 50 milyon sperm hücresinin dilüsyonu üzerinden çalışılacağından sayımda sperm konsantrasyonu 50 milyonun altında çıkan örnekler çalışmaya dahil edilmemiştir. Sayım sonucu steril idrar kabı içerisinde bulunan ejakulat örneği, bir dizi hesaplamalardan sonra üzerine distile su katılarak mililitrede 50 milyon sperm hücresi içerek şekle getirilmiş olup diğer su örneklerinde aynı işlemler sırasıyla yapılmıştır.

Yapılan matematiksel işlemler aşağıda örneklerle sunulmuştur.

Örnek 1: Sperm sayma kamarası kullanılarak bir vakanın ejakulatının mililitresinde 50 milyon sperm hücresi tespit edilmişse; ejakulattan her biri 2 ml. su çeşidi içeren tüplere 0.5 ml. aktarılmıştır. Ejakulatın kendisi zaten mililitresinde 50 milyon sperm hücresi içermekte olduğundan ejakulat örneğinde standardizasyon amaçlı dilüsyona gidilmemiştir.

0.5 ml. ejakulat	2 ml. çeşme, deniz, distile ya da porsuk suyu
------------------	---

Örnek 2: Sperm sayma kamarası kullanılarak bir vakanın ejakulatının mililitresinde 70 milyon sperm hücresi tespit edilmişse; elde etmek istediğimiz mililitresinde 50 milyonu bulmak için $50/70 = 0.714$ 'ü bularak, 1 mililitreye ne kadar distile su ilave edilmesi gerektiği $1-0.714 = 0.286$ işlemi ile hesaplanarak, 0.286 ml. distile su ilavesi ile ejakulatın mililitresinde 50 milyon sperm hücresi oluşturulmuştur. Diğer bir deyişle mililitresinde 70 milyon sperm hücresi saptanan bir vakanın 0.714 ml. ham ejakulatının 0.286 ml. distile su ilavesi sonucu elde edilen örnek, mililitresinde 50 milyon sperm hücresi içerir hale gelmiştir. Her bir tüpe de 0.5 ml. ejakulat örneği aktarıldığından 1 ml. üzerinden hesapladığımız 0.714 ml. ejakulat ve 0.286 ml. distile

su değerleri ikiye bölünmüş $0.714/2 = 0.357$ ml. ejakulat ve $0.286/2 = 0.143$ ml. distile su olarak en son değerleriyle aktarılmıştır.

0.357 ml. ejakulat 0.143 ml. distile su Toplam 0.5 ml. dilüe edilmiş ejakulat rneği	2 ml. eşme, deniz, distile ya da porsuk suyu
---	---

rnek 3: Sperm sayma kamarası kullanılarak bir vakanın ejakulatının mililitresinde 80 milyon sperm hresi tespit edilmişse; elde etmek istediğimiz mililitresinde 50 milyonu bulmak için $50/80 = 0.625$ 'i bularak, 1 mililitreye ne kadar distile su ilave edilmesi gerektiği $1-0.625 = 0.375$ işlemi ile hesaplanarak, 0.375 ml. distile su ilavesi ile ejakulatın mililitresinde 50 milyon sperm hresi oluşturulmuştur. Diğer bir deyişle mililitresinde 80 milyon sperm hresi saptanan bir vakanın 0.625 ml. ham ejakulatının 0.375 ml. distile su ilavesi sonucu elde edilen örnek, mililitresinde 50 milyon sperm hresi içerir hale gelmiştir. Her bir tüpe de 0.5 ml. ejakulat rneği aktarıldığından 1 ml. zerinden hesapladığımız 0.625 ml. ejakulat ve 0.375 ml. distile su değerleri ikiye bölünmüş $0.625/2 = 0.3125$ ml. ejakulat ve $0.375/2 = 0.1875$ ml. distile su olarak en son değerleriyle aktarılmıştır.

0.3125 ml. ejakulat 0.1875 ml. distile su Toplam 0.5 ml. dilüe edilmiş ejakulat rneği	2 ml. eşme, deniz, distile ya da porsuk suyu
---	---

Distile su ile hazırlanan ve mililitresinde 50 milyon sperm hresi içeren ejakulat örneğinden, 4 adet tüpe 0.5'er mililitreler halinde aktarılarak üzerine; deniz suyu, eşme suyu, distile su ve yremizden geçen Porsuk Nehri suyundan 2 ml. ilave edilerek %20 oranında dilue edilmiştir. Daha sonra, dilue örneklerden günlük periyotlarla sperm sayma kamarası aracılığı ile sperm sayımı yapılmıştır. 30 örneğin, farklı sulardaki mikroskobik incelemeleri sperm hreleri görülmeyinceye kadar günlük periyotla takip edilmiştir.

PSA Tespiti İçin Gereç ve Yöntem

Bu çalışmanın benzerlerine literatürde rastlamak mümkünse de zamana bağlı olarak PSA etkinliğinin dilüe sulardaki tespiti de yine literatür taramalarında karşımıza çıkmamıştır. Öncelikle; sperm hücresi tespiti için hazırlanan örneklerden biraz daha farklı olarak bu deney düzeneklerinde sperm sayısı esas alınmayıp ejakulat hacmi esas alınmıştır. Sperm sayımı yapılan bireyin ham ejakulatından 1 µl. ejakulat mikropipetle alınarak içerisinde 9999 µl. su bulunan tüpe aktarılmıştır. Böylece ilk tüpteki dilüsyon oranı 1/10000 ($1/10^4$) şeklinde olmuştur. İlk tüpte hazırlanan örnekten 1 ml. alınarak, ikinci bir tüpe aktarılmış ve üzerine de 9 ml. su ilave edilmiştir. İkinci tüpteki dilüsyon oranı 1/100000 ($1/10^5$) olmuştur. Yine ikinci tüpten de 1 ml. alınarak, üçüncü bir tüpe aktarılmış, onun üzerine de 4 ml. su ilave edilmiş ve böylece son tüpte dilüsyon oranı 1/500000 ($1/5.10^5$) halini almıştır. Sonuçta bir şahıstan alınan ejakulat örneğinden, bir su çeşidinde 3 farklı dilüsyon oluşturulmuş, deney aşamasında 4 farklı su kullanıldığından toplam 12 tüp içerisinde sular hazırlanmıştır. Şekil 3.1.'de belirtilen dilüsyon işlemleri her farklı su çeşidi (çeşme suyu, distile su, deniz suyu ve porsuk suyu) için ayrı ayrı uygulanmıştır.

Dilüsyon Oranları			
	1/10000($1/10^4$)	1/100000($1/10^5$)	1/500000($1/5.10^5$)
Yapılan işlem	1 µl. ejakulat + 9999 µl. su	1 ml. $1/10^4$ oranındaki dilüe ejakulat + 9 ml. su	1 ml. $1/10^5$ oranındaki dilüe ejakulat + 4 ml. su

Şekil 3.1. Bir kişiden alınan ejakulat örneğinden dilüsyonları elde etme aşamaları

Kullanılan Malzemeler, Cihazlar, Laboratuvar Ortamı ve Deneyler

Deneyleerde kullanılan Porsuk suyu, Eskişehir içinden geçen Porsuk Nehri'nden alınmıştır. Porsuk Nehri, şehrin girişlerinde tutulduğu için akarsudan ziyade daha çok gl suyunu andırır özelliktedir. Burada, nehre atılan cesetler üzerindeki cinsel suç kanıtlarının tespiti araştırılmak istenmiştir. şehrin deniz kıyısı olmadığı için deniz suları Aydın ilinin Kuşadası ilçesinin Davutlar köyü koyundan getirilmiştir. Distile su ise hastanenin Nefroloji Anabilim Dalı'na ait Dializ nitesi'nden temin edilmiştir. Tüm suların ayrı kapları ve kapakları olup sadece deney esnasında kapakları açılmış, havayla temasları normal zamanlarda kesilmiştir. eşme suyu ise deneyden bir gün önce kaplara alınarak dinlendirildikten sonra deneyleerde kullanılmıştır. Kullanılan su çeşitlerinin biyokimyasal analizleri yapılmamıştır. Porsuk suyu ve deniz suyu 5'er litrelik kaplarda tutulmuş, deney tüplerine aktarılmadan önce homojenizasyon sağlamak amacıyla çalkalanmıştır.

Laboratuvar içerisinde önceden mevcut olan görüntü ataçmanlı mikroskobun gerekli bakım ve onarımları yapılmıştır. Yine önceden mevcut olan 4 adet mikropipet ve bunların steril uçları hazırlanmış 3 defa kalibrasyon düzeyleri kontrol ettirilmiştir. Proje bütçesi ile sperm sayma kamarası, lam arşiv dolabı gibi makine-teçhizat sınıfı materyaller ve PSA kitleri gibi sarf malzemeleri şeklinde materyaller temin edilmiştir.

Aşağıdaki şekillerde laboratuvar malzemeleri ve ortamı tanıtılmıştır.



şekil 3.2. Görüntü ataçmanlı mikroskop



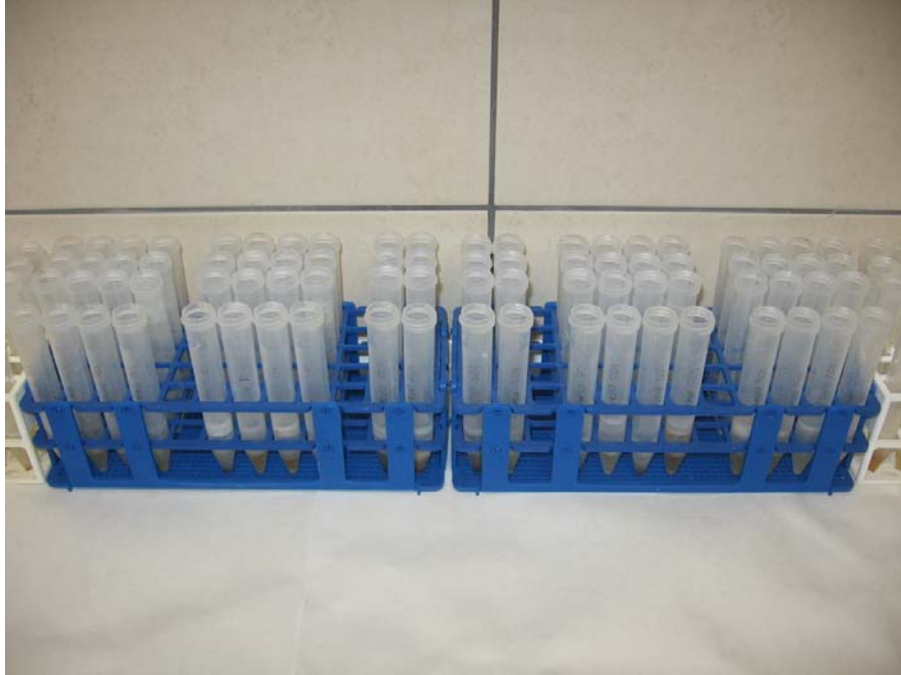
Şekil 3.3. Sperm sayma kamarası



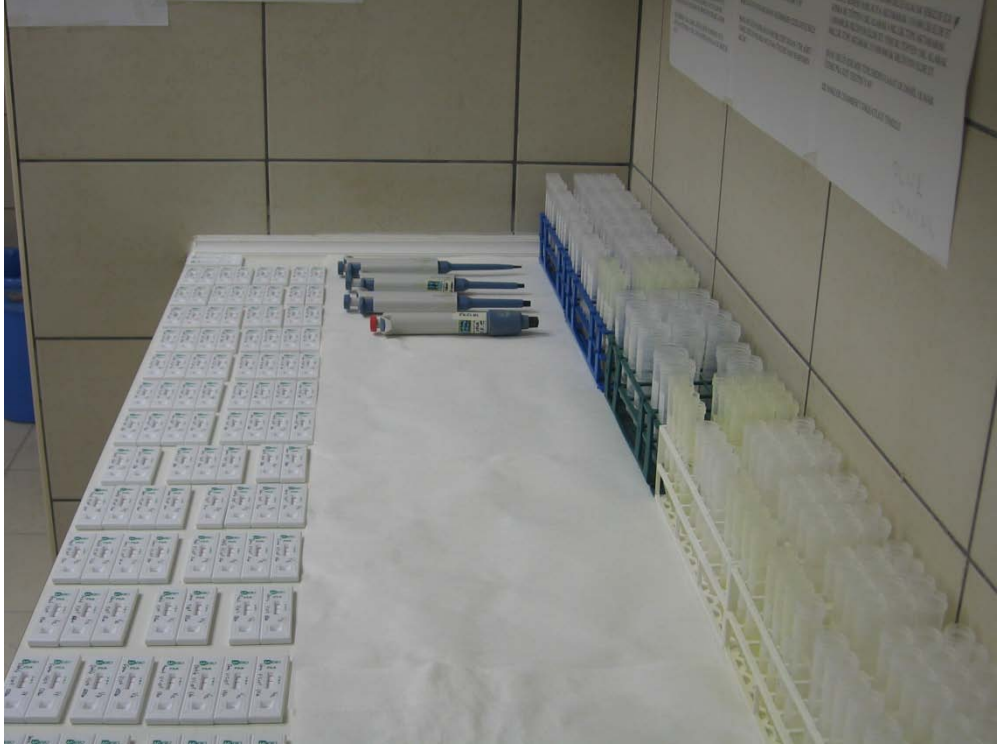
Şekil 3.4. Preperatlar ve PSA kitleri için kullanılan lam arşiv dolabı



Şekil 3.5. Deneylerde kullanılan mikropipetler



Şekil 3.6. Deney tüpleri ve sporları



Şekil 3.7. Deney ortamından genel görünüm



Şekil 3.8. PSA kiti

PSA kitleri, tek kullanımlık, kullanımı kolay olan, gebelik testi kitlerine benzeyen ve immunokromatografik yolla çalışan membran testleridir. Bunun için MK-BIO Rapid Test ® kullanılmıştır. Kullanımı gayet kolay olup çift çizgi çıkması durumunda pozitif sonuç gösterdiği anlamına gelmektedir. Tüm kitler öncelikle PSA'nın tümör markerı olarak kullanılması ile kanda bulunan üst değeri olan 2 ng/ml.'nin üzerindeki değerleri tespit etmek amacıyla üretilmişlerdir. Deneylerde kullandığımız kitlerin de pozitif gösterdikleri en küçük değer 4 ng/ml. olarak belirtilmektedir.

Aşağıda kitin çalışma esasları örneklerle anlatılmıştır.



a) Kullanıma hazır kittir. Henüz üzerine örnek damlatılmamıştır. C; Kontrol bandını, R; Referans bandını, T ise Test bandını belirtmektedir.

b) Örnek sıvı damlatıldığında; C ve R bantları belirginleşir. Eğer T bandında çizgisel olarak bir görünüm yoksa test negatiftir ya da örnek içindeki sıvının PSA konsantrasyonu 4 ng/ml'nin altındadır. Yani b şikkında verilen örnek negatiftir.

c) Eğer T bandı, R çizgisinden daha açık renkte ise çıkan değer 4 ila10 ng/ml arasında, T ve R çizgileri aynı koyulukta ise çıkan değer 10 ng/ml, T bandı R çizgisinden koyu renkte ise çıkan değer 10 ng/ml.'nin üzerinde olduğu söylenebilir. Yani c şikkında verilen örnek pozitif ve PSA konsantrasyonu 10 ng/ml.'nin üzerindedir.

Deneyle, konik tabanlı vidalı tüplerle çalışılmıştır. Test tüp sporlarında dik vaziyette ve ağzı açık olarak tutulmuştur. Örnek alarak inceleme sırasında ise tüplerdeki materyallerin sıvı alt yüzeye çöktükleri izlenmiştir. Bu yüzden tüpler manuel olarak yavaşça sağa sola ve aşağıya yukarıya şeklinde karıştırılmıştır. Bu işlem tüplerin içindeki materyallerin tam olarak karışmasını ve içindeki sıvıya tam olarak dağılmasını sağlamak amacıyla yapılmıştır. Deneyle ön aşamalarında birkaç kez santrifüj işlemi denenmiş ancak sperm hücrelerinin morfolojilerini bozduğu düşüncesiyle iptal edilmiştir.

Deneyle 2009 yılının Aralık ayı ile 2010 yılının Ocak, Şubat ve Mart aylarında yapılmıştır. Laboratuvar içinde klima ve ısıtıcı bulunmamakla beraber termometre ile her gün ölçülen hava sıcaklığı anılan dört ay boyunca 19 ila 22 santigrat derecede kaydedilmiştir.

Pratik uygulamalarda, sperm sayma kamarasındaki 100 kareden sadece 10 tanesindeki sperm hücresi sayılıp bulunan sayı mililitrede milyon cinsinden belirtilirken, deneylelerimiz sırasında 100 karenin hepsini de değerlendirerek bulunan sayı yüzbin cinsinden kaydedilmiştir.

Yukarıda anlatılan işlemler sonucu bir insan ejakulatının farklı tüplerde hazırlandıktan sonra ilk 0.saatte farklı su içeren tüplerden bir damla sperm sayma kamarasına aktarılarak sayımları yapılmıştır. Bundan sonra bu işlem sperm hücresinin artık görülemediği güne kadar 24 saatlik periyotlarla devam etmiştir. Mikroskoptaki görüntüler ataçman yardımıyla dijital fotoğraf olarak bilgisayara aktarılmıştır. Her 24 saatte alınan örnekler preparatlara yayılarak Hemotoksilen&Eozin boyanması ve daha ileri gözlem ve tespit amacıyla Histoloji Anabilim Dalı'na gönderilmiştir.

Yine 0. saatte başlamak suretiyle PSA kitlerinin uygulanmasına dilüe edilen tüplerde aktivasyonun izlenmediği günlere kadar 24 saatlik periyotlarla devam edilmiştir. Kullanılan tüm PSA kitleri üzerlerinde olguya ait bilgiler yazılı olarak lam arşiv dolabında saklanmaktadır.

ESOGÜ Tıp Fakültesi Etik Kurul Kararları'nın 10.06.2008 tarih ve 2008/301 sayılı yazısı gereği proje-tezin yapılmasının ve uygulanmasının uygun olduğu kayıtlıdır. Yapılan tez; 2008/11032 nolu proje olarak Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir.

4. BULGULAR

Sperm İncelemelerine Ait Bulgular

Otuz vakanın her birinin, 4 farklı sudaki standardize edilmiş mililitrede 50 milyon sperm olacak şekilde %20'lik dilüsyonlu tüplerden günlük periyotlarla alınan örneklerin incelenmesinden elde edilen sonuçlar yapılan biyoistatistik analizler ile belirlenmiş, tablo ve grafikleri çıkarılmıştır. Mikroskobik olarak en erken 288.saatte deniz suyunda sperm hücresinin görülemediği saptanmıştır. Bundan dolayı istatistik verilerinin sağlıklı sonuçlar verebilmesi için öncelikle tüm vakaların 288. saatine kadar olan verileri değerlendirilmiştir. Veriler, istatistik olarak Two Way Repeated Measures ANOVA yöntemiyle değerlendirilmiş olup dilüsyonlu 0.saatten 288.saate kadar 24 saatlik periyotlarla tüm farklı sulardaki sperm konsantrasyonlarının ortalama değerleri incelenmiştir. Bunun yanında, aynı su türü içerisindeki zamana bağlı değişimlerin anlamlı olup olmadıkları ve su türlerinin de birbirleri arasındaki karşılaştırmaları incelenmiştir. Zamana bağlı farklı sulardaki ortalama sperm konsantrasyon değerleri Tablo 4.1.'de, aynı değerlerin standart sapmaları ile minimum ve maksimum değerleri ise Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Zamana göre farklı sulardaki ortalama sperm konsantrasyonlarının dağılımı

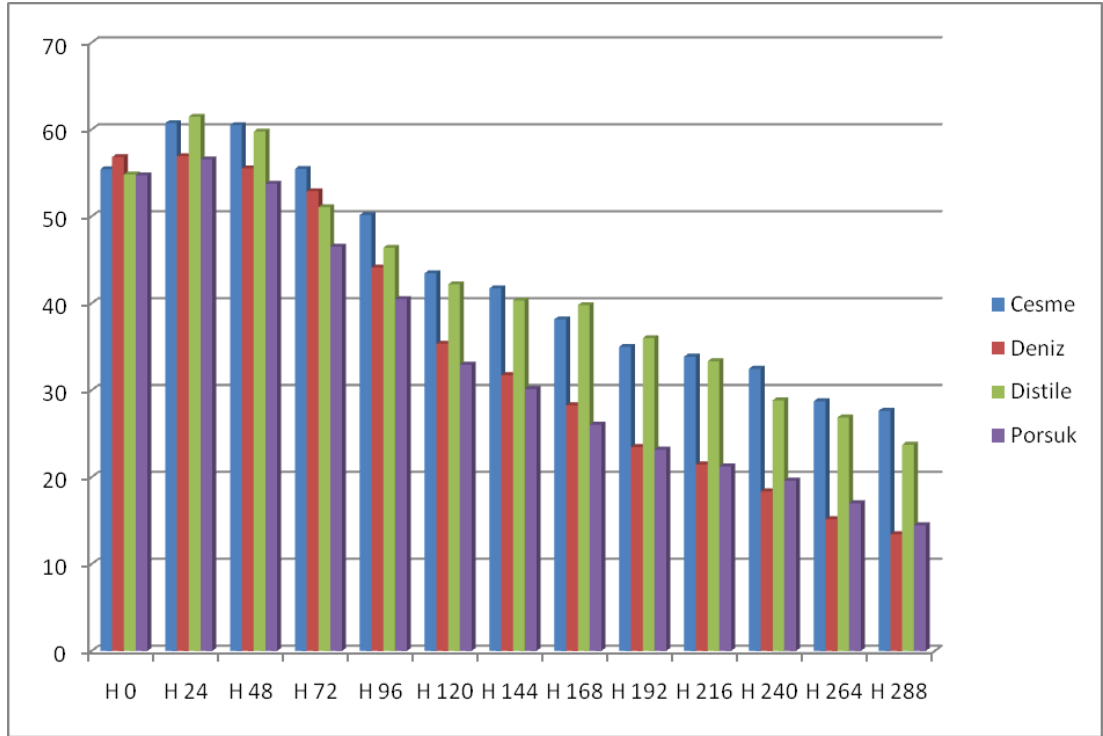
	Çeşme (N:30) ortalama (x100.000)	Deniz(N:30) ortalama (x100.000)	Distile(N:30) ortalama (x100.000)	Porsuk (N:30) ortalama (x100.000)
0.saat	55,43	56,83	54,83	54,73
24.saat	60,73	56,93	61,46	56,56
48.saat	60,50	55,53	59,76	53,76
72.saat	55,46	52,90	51,07	46,53
96.saat	50,17	44,13	46,40	40,50
120.saat	43,47	35,37	42,20	32,93
144.saat	41,73	31,73	40,33	30,13
168.saat	38,17	28,27	39,80	26,03
192.saat	35,00	23,47	36,00	23,17
216.saat	33,87	21,47	33,33	21,23
240.saat	32,47	18,37	28,83	19,60
264.saat	28,73	15,17	26,87	17,00
288.saat	27,63	13,43	23,73	14,47

Tablo 4.2. Zamana göre farklı sulardaki ortalama sperm konsantrasyonlarının dağılımı, standart sapma ve minimum-maksimum değerleri

Saatler	Su çeşidi	Ort. (x10 ⁵)	Standart sapma	Standart hata	Minimum (x10 ⁵)	Maksimum (x10 ⁵)
0.saat (N:30)	Çeşme	55,43	24,89	4,54	25,00	145,00
	Deniz	56,83	32,76	5,98	19,00	195,00
	Distile	54,83	27,47	5,01	19,00	140,00
	Porsuk	54,73	23,80	4,34	22,00	135,00
24.saat (N:30)	Çeşme	60,73	19,58	3,57	17,00	107,00
	Deniz	56,93	20,82	3,80	27,00	114,00
	Distile	61,46	21,37	3,90	31,00	109,00
	Porsuk	56,56	19,20	3,50	24,00	108,00
48.saat (N:30)	Çeşme	60,50	19,52	3,56	21,00	95,00
	Deniz	55,53	20,24	3,69	13,00	101,00
	Distile	59,76	25,25	4,61	20,00	119,00
	Porsuk	53,76	26,11	4,76	17,00	142,00
72.saat (N:30)	Çeşme	55,46	21,41	3,91	22,00	105,00
	Deniz	52,90	22,36	4,08	25,00	112,00
	Distile	51,07	19,68	3,59	20,00	95,00
	Porsuk	46,53	22,24	4,06	13,00	125,00
96.saat (N:30)	Çeşme	50,17	16,80	3,06	15,00	89,00
	Deniz	44,13	18,41	3,36	18,00	95,00
	Distile	46,40	16,19	2,95	21,00	83,00
	Porsuk	40,50	16,95	3,09	12,00	89,00
120.saat (N:30)	Çeşme	43,47	13,74	2,51	19,00	72,00
	Deniz	35,37	14,4	2,63	15,00	68,00
	Distile	42,20	19,03	3,47	21,00	94,00
	Porsuk	32,93	15,93	2,91	9,00	75,00
144.saat (N:30)	Çeşme	41,73	12,70	2,31	20,00	69,00
	Deniz	31,73	14,25	2,60	12,00	60,00
	Distile	40,33	17,74	3,23	12,00	91,00
	Porsuk	30,13	15,33	2,80	3,00	71,00
168.saat (N:30)	Çeşme	38,17	16,67	3,04	16,00	78,00
	Deniz	28,27	11,79	2,15	8,00	48,00
	Distile	39,80	19,63	3,58	15,00	120,00
	Porsuk	26,03	13,68	2,49	10,00	64,00
192.saat (N:30)	Çeşme	35,00	14,37	2,62	15,00	77,00
	Deniz	23,47	10,58	1,93	5,00	44,00
	Distile	36,00	17,67	3,22	12,00	114,00
	Porsuk	23,17	11,81	2,15	8,00	53,00
216.saat (N:30)	Çeşme	33,87	17,73	3,23	13,00	108,00
	Deniz	21,47	10,85	1,98	3,00	42,00
	Distile	33,33	20,13	3,67	13,00	121,00
	Porsuk	21,23	10,22	1,86	8,00	48,00
240.saat (N:30)	Çeşme	32,47	17,63	3,21	8,00	95,00
	Deniz	18,37	10,02	1,82	3,00	39,00
	Distile	28,83	19,39	3,54	14,00	115,00
	Porsuk	19,60	11,09	2,02	3,00	51,00
264.saat (N:30)	Çeşme	28,73	15,80	2,88	9,00	90,00
	Deniz	15,17	9,37	1,71	1,00	34,00
	Distile	26,87	18,65	3,40	11,00	111,00
	Porsuk	17,00	9,76	1,78	4,00	44,00
288.saat (N:30)	Çeşme	27,63	14,77	2,69	10,00	83,00
	Deniz	13,43	9,32	1,70	,00	37,00
	Distile	23,73	18,99	3,46	3,00	107,00
	Porsuk	14,47	8,78	1,60	2,00	42,00

Tablo 4.2.'de dikkati çeken bir nokta; aynı su türündeki minimum ve maksimum değerleri arasındaki açıklıktır. Örneğin 120.saatte porsuk suyu incelemelerinde bir vakanın sayımı $9(x100.000)$ çıkmışken başka bir vakanın sayımı $75(x100.000)$ çıkmıştır. Buna benzer minimum ve maksimum değerleri tabloda net olarak izlenmektedir. Bu farklılığın ana sebebi semenin su içerisinde homojen dağılmamasından ortaya çıkmaktadır. Bu homojenitenin sağlanması amacıyla da örnek alınmadan manuel olarak tüpler çalkalanmıştır. Homojenite dışında etkileyebilecek faktörlere de tartışma kısmında değinilmiştir.

Yukarıdaki tabloda belirtilen maksimum değerleri irdelediğimiz zaman; bir vakada 0.saatte deniz suyunda sperm konsantrasyonunun mililitrede $195(x100.000)$ olduğu, bunun dışında 288.saatte dahi sperm konsantrasyonunun $100(x100.000)$ 'ün üzerinde olduğu vakalara rastlanmıştır. Aynı şekilde minimum değerleri incelendiğinde; bir vakanın 144.saatte porsuk suyunda sperm konsantrasyonunun $3(x100.000)$ 'e düştüğü, yine ilk saatlerdeki incelemelerde farklı sulardaki sperm konsantrasyonunun $20(x100.000)$ 'nin altındaki vaka örnekleri görülmüştür. Bu vakalar uç değerler olup otuz vakanın ortalama sperm konsantrasyon değerleri alındığında zamana bağlı olarak düşüşleri izlenmektedir. Zamana bağlı olarak farklı su türlerinde ortalama sperm konsantrasyonlarındaki düşüş Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Zamana bağlı olarak farklı su türlerinde ortalama sperm konsantrasyonları

Yukarıdaki tabloda yatay eksen zamanı, dikey eksen de sperm konsantrasyonlarını gösterdiğine göre; farklı sulardaki ortalama sperm konsantrasyonlarının lineer bir şekilde azaldıkları rahatlıkla söylenebilir. Tabloda dikkat edilecek iki görünüm mevcuttur. Bunlardan biri ilk 0.saat değerlerinin 24. ve 48. saatlerden düşük olduğudur ki bu homojenizasyonun tamamlanmamasıyla örtüşür. Semen in likefaksiyonu tamamlanır tamamlanmaz örnek suların içerisinde aktarılması ve 0.saat örneklerinin vakit kaybedilmeden bu örneklerden yapılması 0.saat değerlerinin 24. ve 48.saat değerlerine göre biraz daha düşük çıkmasına, sonrasında semen örneğinin sular içerisinde daha homojen dağılması ile beklenen lineer düşüşün izlenebildiği tabloda görülebilir. Tabloda dikkat edilecek ikinci husus ise çeşme ve distile sularındaki düşüşün, deniz ve porsuk sularındaki düşüşe göre daha yavaş olmasıdır. Yine bu farklılık da tablodan rahatlıkla ayıt edilebilir. Yapılan Two Way Repeated Measures ANOVA yöntemi sonrasında Holm-Sidak metodu uygulanarak bu farklılıkların hangi su türünün, hangi su türü ile hangi saatlerde ortaya çıktığı Tablo 4.3.'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Zamana göre farklı su türlerinde sperm konsantrasyonları arasındaki farklılık durumu

Saatler	Karşılaştırma	Farklılık (p<0.05)
168.saat	Distile su - Porsuk suyu	Var
	Çeşme suyu - Porsuk suyu	Var
	Distile su – Deniz suyu	Yok
	Çeşme suyu – Deniz suyu	Yok
	Deniz suyu - Porsuk suyu	Yok
	Distile su – Çeşme suyu	Yok
192.saat	Distile su - Porsuk suyu	Var
	Distile su – Deniz suyu	Var
	Çeşme suyu - Porsuk suyu	Var
	Çeşme suyu – Deniz suyu	Var
	Distile su – Çeşme suyu	Yok
	Deniz suyu - Porsuk suyu	Yok
216.saat	Çeşme suyu - Porsuk suyu	Var
	Çeşme suyu – Deniz suyu	Var
	Distile su - Porsuk suyu	Var
	Distile su – Deniz suyu	Var
	Çeşme suyu - Distile su	Yok
	Deniz suyu – Porsuk suyu	Yok
240.saat	Çeşme suyu – Deniz suyu	Var
	Çeşme suyu - Porsuk suyu	Var
	Distile su – Deniz suyu	Yok
	Distile su - Porsuk suyu	Yok
	Çeşme suyu - Distile su	Yok
	Porsuk suyu - Deniz suyu	Yok
264.saat	Çeşme suyu – Deniz suyu	Var
	Çeşme suyu - Porsuk suyu	Yok
	Distile su - Deniz suyu	Var
	Distile su – Porsuk suyu	Yok
	Çeşme suyu - Distile su	Yok
	Porsuk suyu – Deniz suyu	Yok
288.saat	Çeşme suyu - Deniz suyu	Var
	Çeşme suyu – Porsuk suyu	Var
	Distile su - Deniz suyu	Yok
	Distile su - Porsuk suyu	Yok
	Çeşme suyu - Distile su	Yok
	Porsuk suyu - Deniz suyu	Yok

Farklı su türleri arasındaki sperm konsantrasyonlarındaki anlamlı farklılıklar 168.saatte başlamaktadır. 168.saate kadar su türleri arasında farklılık saptanamamıştır. 168.saatte porsuk suyu ile çeşme ve distile sulardaki konsantrasyonlar arasında anlamlı farklılık ortaya çıkmış, 192 ve 216.saatlerde de çeşme suyu ve distile su ile porsuk ve deniz suları arasındaki farklılıklar belirginleşmiştir. 240.saatte distile suda da meydana gelen düşüşten dolayı distile suyun, porsuk ve deniz suları arasındaki farklılığı ortadan kalkmıştır. Bu saatlerden sonra tüm su türlerindeki azalmalardan dolayı karşılaştırmaların anlamlı olmadığı görülmüştür.

Aynı su türlerinin de zamana bağlı olarak kendi içlerinde zaman faktörü kullanılarak yapılan analizlerinde; çeşme suyunda ve distile suda 120.saate kadar 0.saat verileri ile anlamlı bir fark ortaya çıkmadığı, deniz suyu ve porsuk suyunda ise 96.saate kadar 0.saat verileri ile anlamlı bir fark ortaya çıkmadığı saptanmıştır. Diğer bir deyişle; çeşme ve distile sulardaki örneklerin 120.saatten sonra anlamlı düşüş gösterdikleri, deniz ve porsuk sularındaki örneklerin de 96.saatten sonra anlamlı düşüş gösterdikleri tespit edilmiştir.

288.saate kadar olan bu çalışmalar bize su türleri arasındaki farklılıkları ve sperm konsantrasyonlarındaki düşüşler hakkında yol göstermektedir. 288.saatten sonraki zaman dilimi incelendiğinde, farklı sulardaki örneklerde sperm hücresi görülmeyinceye kadar tüm vakaların incelenmesine devam edilmiştir. En uzun süre olarak; çeşme suyundan alınan örneklerde bir vakada 1128.saate kadar, deniz suyundan alınan örneklerde bir vakada 888.saate kadar, distile sudan alınan örneklerde bir vakada 1008.saate kadar, porsuk suyundan alınan örneklerde bir vakada 792.saate kadar sperm görülebilmektedir.

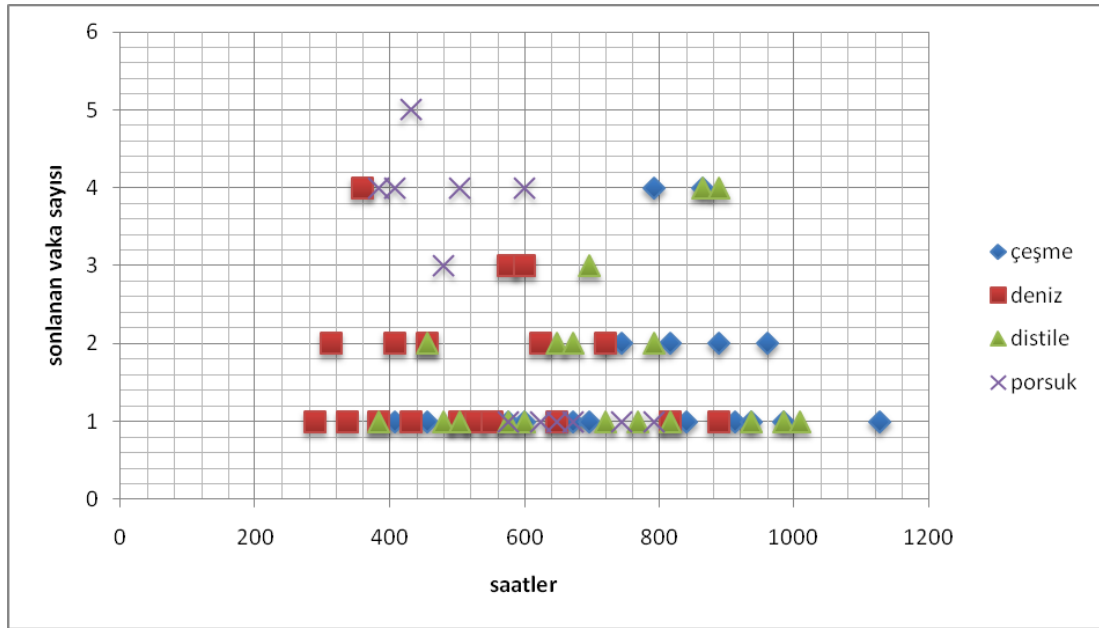
1128 saat(47.günün sonu) oldukça uzun bir süredir ve bu süreye kadar da çeşme suyundan alınan örneklerde sperm sayma kamarasından sperm hücreleri seçilebilmiştir. Sperm hücrelerinin görebildiği en uzun süre, diğer bir deyişle 30 vakanın farklı su türlerindeki örneklerinde yapılan sperm incelemesinin sonlanma zamanları, frekans dağılımı Tablo 4.4. ve Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Buna göre; 30 vakanın sperm incelenmesinin çeşme suyunda 408.saatten başlayıp 1128.saate kadar geçen zaman diliminde sonlandığı, deniz suyunda 288.saatten başlayıp 888.saate kadar geçen zaman diliminde sonlandığı, distile suda 384.saatten başlayıp 1008.saate

kadar geçen zaman diliminde sonlandığı, porsuk suyunda ise 384.saatten başlayıp 792.saate kadar geçen zaman diliminde sonlandığı görölmüştür. Hem Tablo 4.4.'te hem de şekil 4.2.'de porsuk suyunda sperm görölme durumunun daha kısa ve daha dar zaman diliminde sonlandığı net bir şekilde görölebilir. Buradaki bulgular da yukarıda bahsedilen 288.saate kadar yapılan analizlerle paraleldir. Önceki değinilen analiz sonuçlarında deniz ve porsuk sularındaki düşüşün, çeşme ve distile sulardaki düşüşten daha önce ve daha fazla olduğu belirtilmişti. Yine burada da önce deniz ve porsuk sularındaki örneklerde incelemeler sonlanmış, sonra da distile ve çeşme sularındaki örneklerde son bulmuştur.

Tablo 4.4. Zamana bağı farklı sulardaki örneklerde sperm incelenmesinin sonlandığı olgu sayısının dağılımı

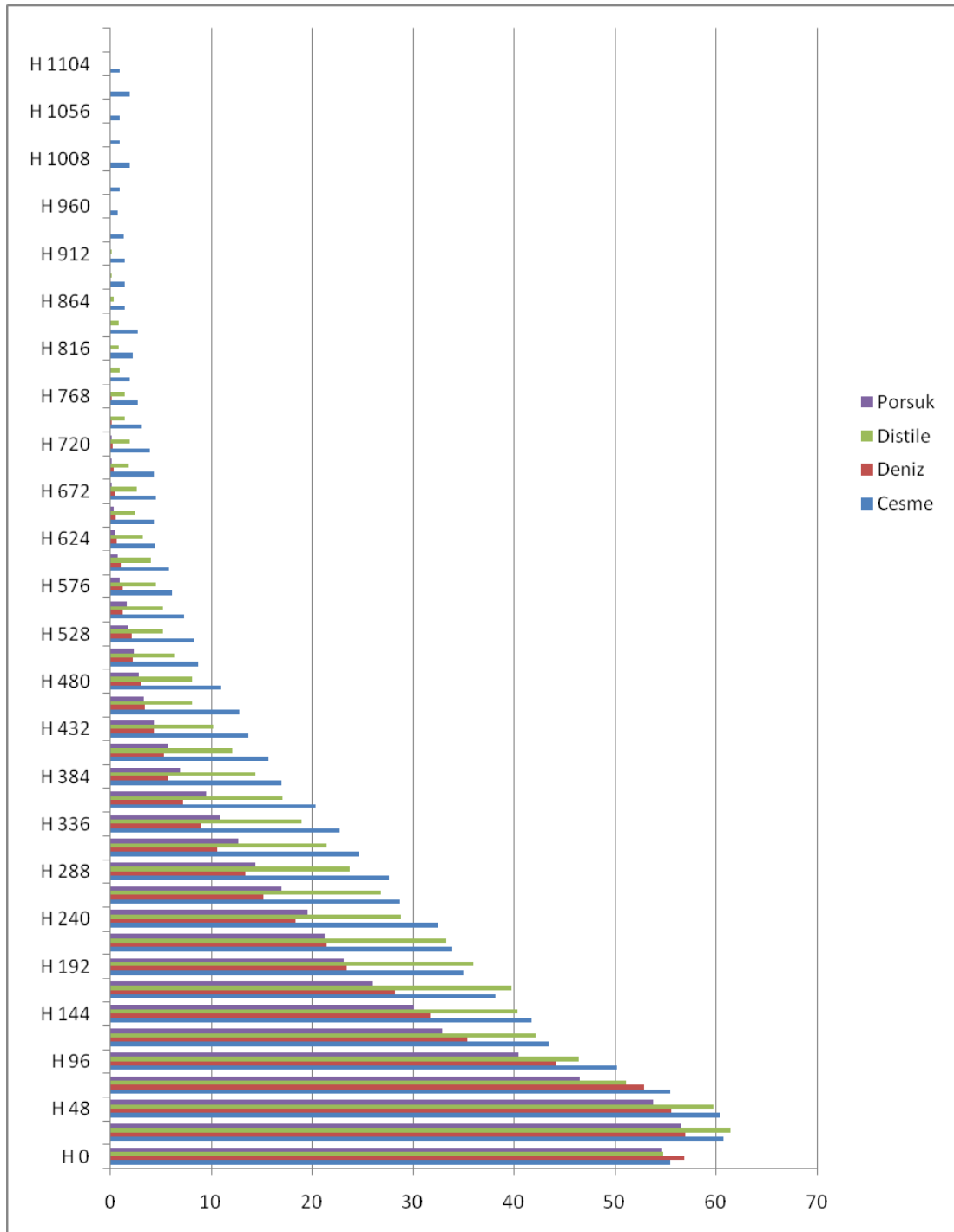
Saatler	Çeşme suyu	Deniz suyu	Distile su	Porsuk suyu
288		1		
312		2		
336		1		
360		4		
384		1	1	4
408	1	2		4
432		1		5
456	1	2	2	
480			1	3
504		1	1	4
528		1		
552		1		
576	1	3	1	1
600	1	3	1	4
624		2		1
648	1	1	2	1
672	1		2	1
696	1		3	
720	2	2	1	
744	2			1
768			1	
792	4		2	1
816	2	1	1	
840	1			
864	4		4	
888	2	1	4	
912	1			
936	1		1	
960	2			
984	1		1	
1008			1	
1128	1			
Toplam	30	30	30	30

Şekil 4.2.'de gösterilen grafikte, sonlanma dağılımının aynı günlere isabet etmesi nedeniyle distile, deniz ve çeşme sularındaki belirteçlerin zor seçildiği ancak porsuk suyunda sonlanan vakaların kısa sürede ve sayılarının da fazla olması nedeniyle kolaylıkla seçilebildiği görülmüştür. Yine de tüm sulardaki dağılım tablo ile değerlendirildiğinde sonuçların ilk analizlerle de uyumlu bir şekilde anlamlı olduğu izlenmektedir.



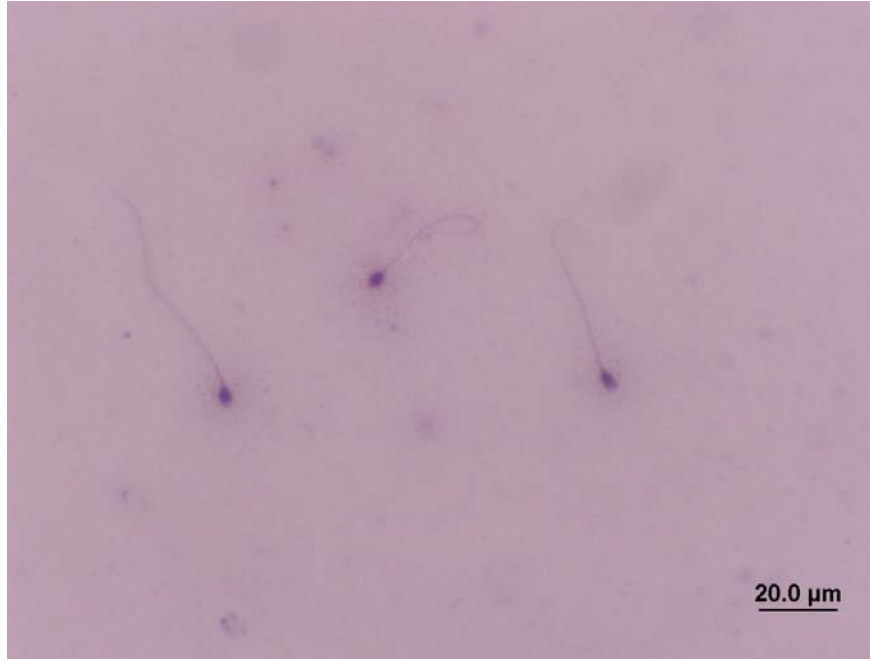
Şekil 4.2. Zamana bağlı farklı sulardaki örneklerde sperm incelenmesinin sonlandığı olgu sayısının dağılımı

288.saatten sonra, sperm sayımının devam ettiği su türlerindeki değerler ortalaması alınarak sonlanma noktalarına kadar bir grafikte toplandığında, eğrilerin lineer bir şekilde düştükleri, baştaki azalış farklılıklarının sonlarda da devam ettiği izlenmektedir. Aşağıda verilen şekil 4.3.'te tüm vakaların, su örneklerindeki ortalama değerlerin zamana bağlı olarak değişimleri görülmektedir.

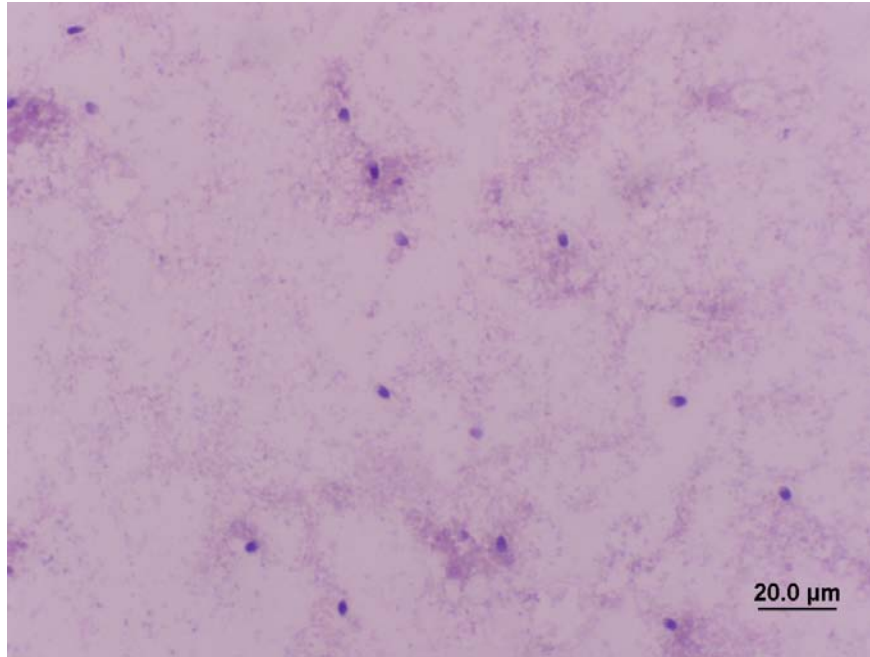


Şekil 4.3. Tüm vakaların, farklı su örneklerindeki ortalama değerlerin zamana bağlı olarak değişimleri

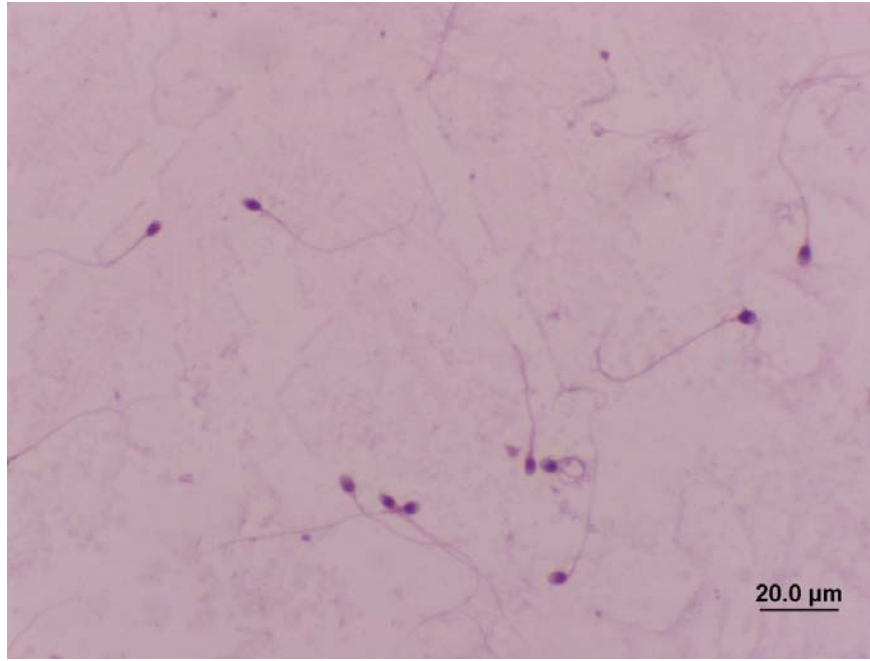
Sperm İncelemelerinde Alınan Mikroskopik Görüntüler



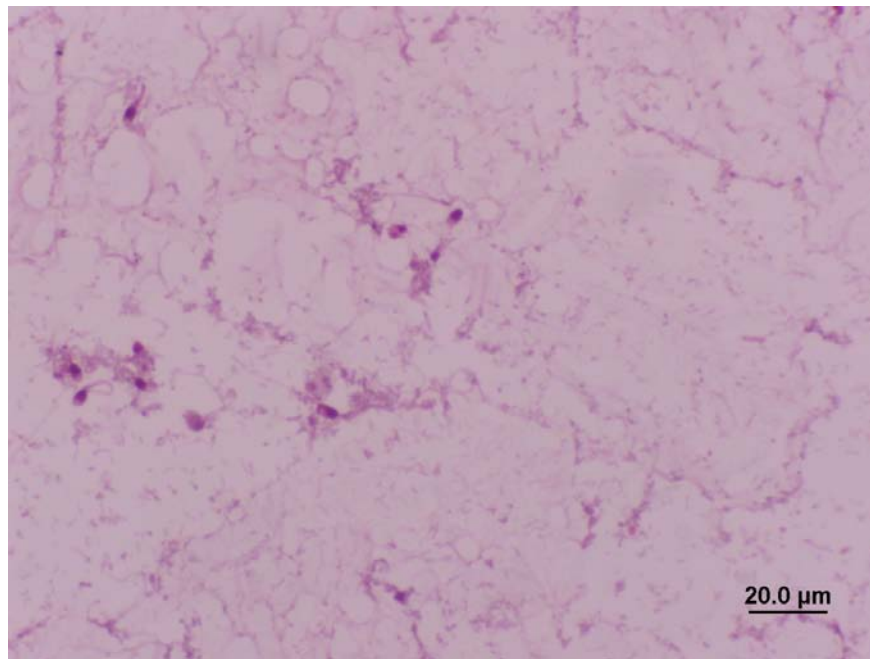
Şekil 4.4. Çeşme suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 0. saatte alınan görüntü (vaka 4)



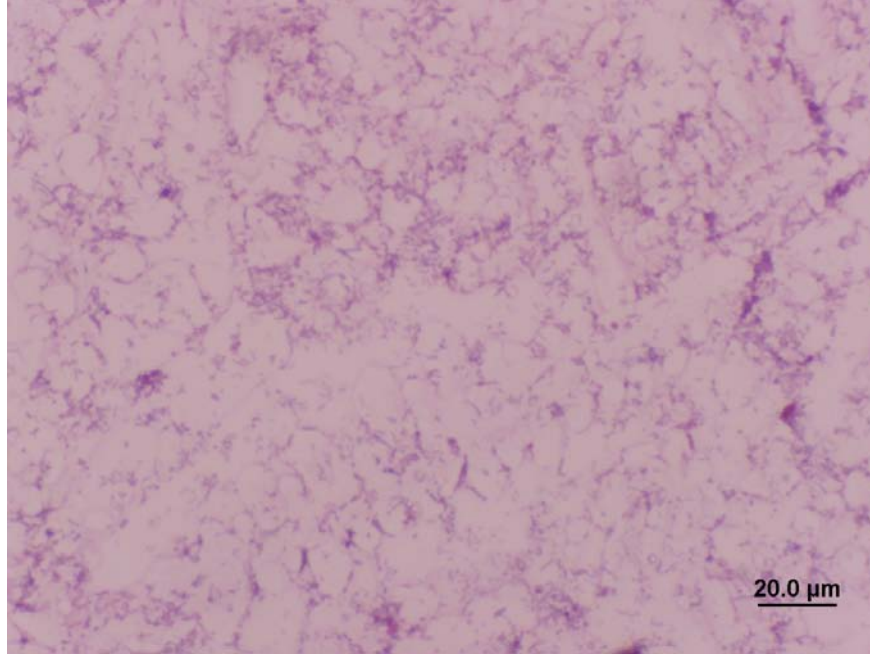
Şekil 4.5. Çeşme suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 480. saatte alınan görüntü (vaka 4)



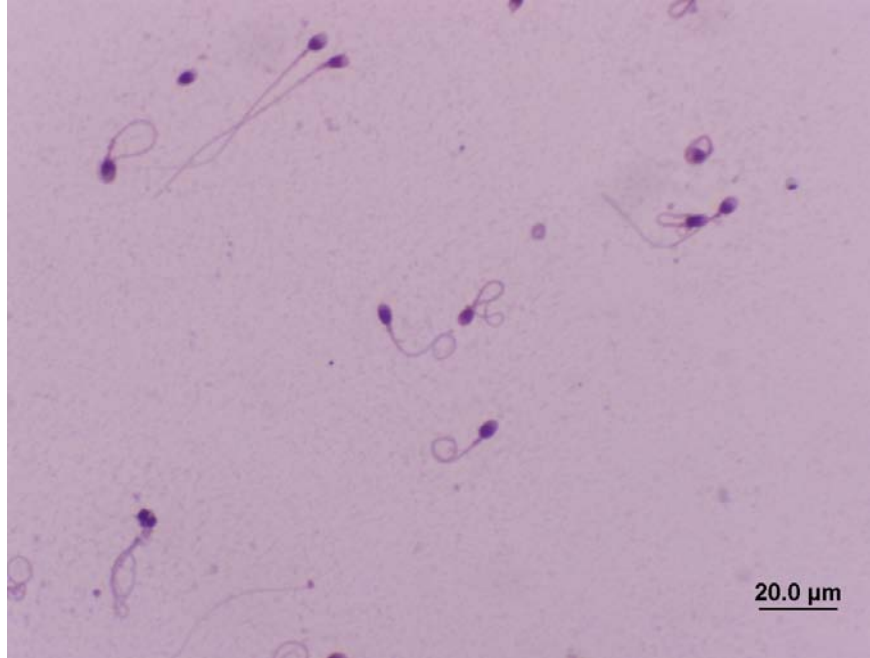
Şekil 4.6. Deniz suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 0. saatte alınan görüntü (vaka 4)



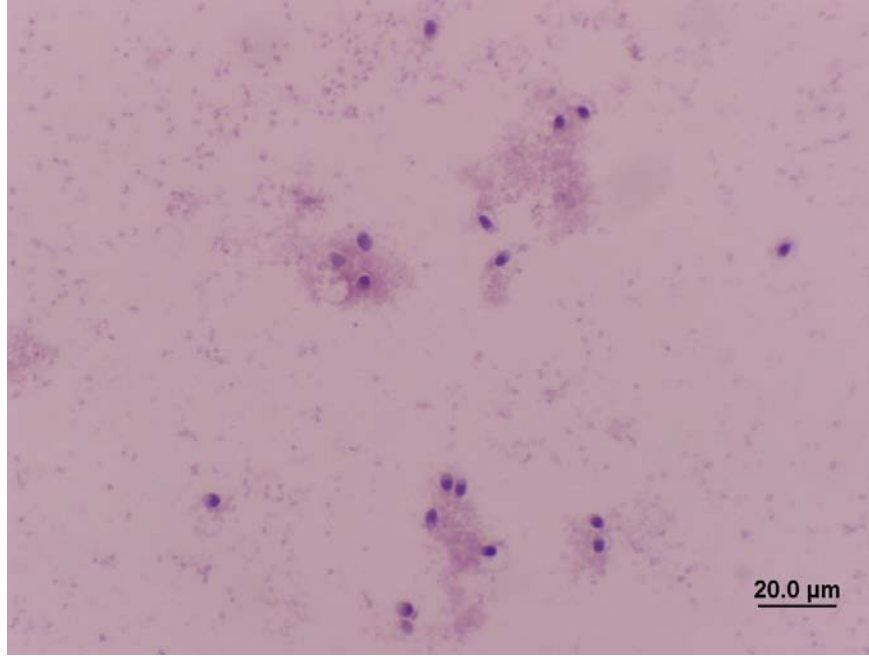
Şekil 4.7. Deniz suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 240. saatte alınan görüntü (vaka 4)



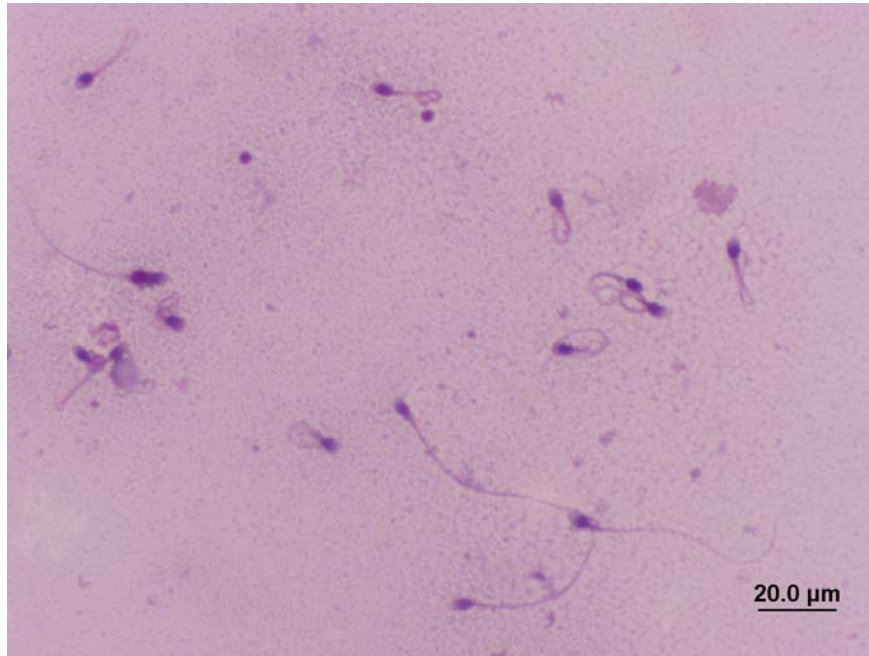
Şekil 4.8. Deniz suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 480.saatte alınan görüntü (vaka 4)



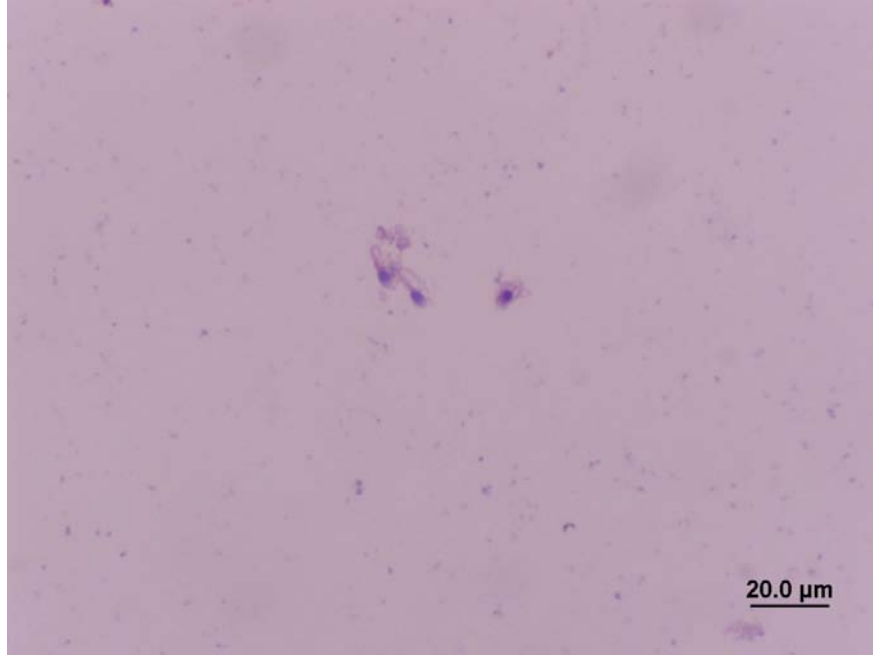
Şekil 4.9. Distile suda %20'lik semen dilüsyonunda 0.saatte alınan görüntü (vaka 4)



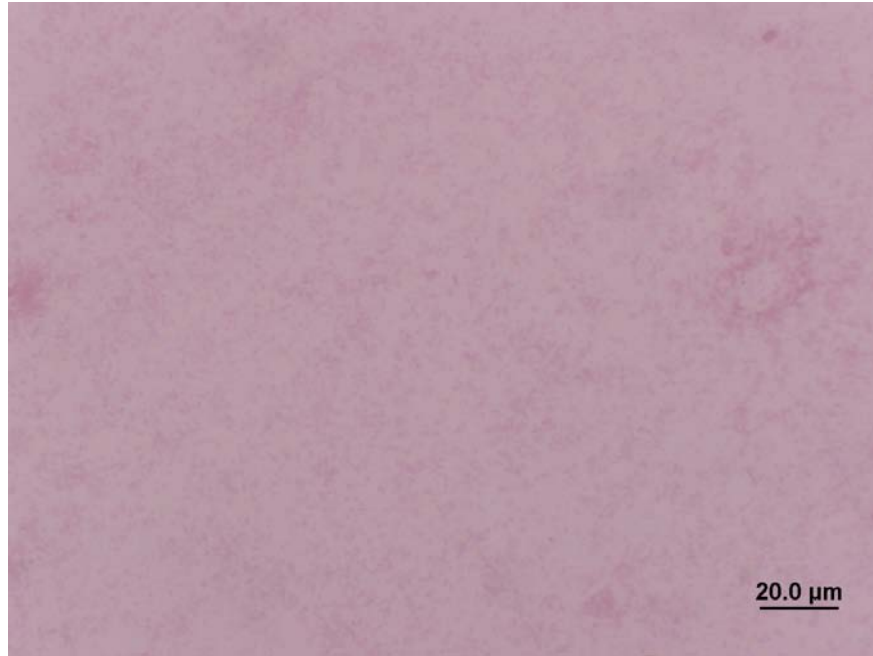
Şekil 4.10. Distile suda %20'lik semen dilüsyonunda 480.saatte alınan görüntü (vaka 4)



Şekil 4.11. Porsuk suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 0.saatte alınan görüntü (vaka 4)



Şekil 4.12. Porsuk suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 240.saatte alınan görüntü (vaka 4)



Şekil 4.13. Porsuk suyunda %20'lik semen dilüsyonunda 480.saatte alınan görüntü (vaka 4)

Yukarıdaki mikroskopik fotoğraflar; sperm incelemeleri sırasında, alınan örneklerin yaymaları yapılarak Hemotoksilen&Eosin boyasıyla boyandıktan sonra çekilmiştir. Vakalar arasında farklılıklar bulunduğundan tüm fotoğraflar aynı vakanın farklı su türlerine ve farklı zamanlarına aittir.

Şekil 4.4.'te, Şekil 4.6.'da, Şekil 4.9.'da ve Şekil 4.12.'de çeşme suyu, deniz suyu, distile su ve porsuk sularına konulan semenin, 0.saatte alınan örneklerinde baş ve kuyruk kısımları belirgin sperm hücreleri görülmektedir. Belirtilen şekillerde izlenen fotoğraflar, dilüsyonun 0.saatte olması itibariyle semen örneğinde bulunan normal sperm görüntüleri ile eş değerdir. H&E bar:20 μm .

Şekil 4.5.'te ve Şekil 4.10.'da, çeşme suyuna ve distile suya konulan semenin, 480.saatte alınan örneklerinde, sperm hücrelerinin kuyruklarının kaybolduğu, sadece baş kısımlarının seçilebildiği görülmektedir. H&E bar:20 μm .

Şekil 4.7.'de, deniz suyuna konulan semenin, 240.saatte alınan örneklerinde, sperm hücrelerinin çoğunun kuyruklarını kaybetmelerine rağmen baş kısımlarının seçilebildiği, bununla beraber kuyruk kısımları da mevcut sperm hücrelerinin de aynı kare içinde seçilebildiği görülmektedir. H&E bar:20 μm .

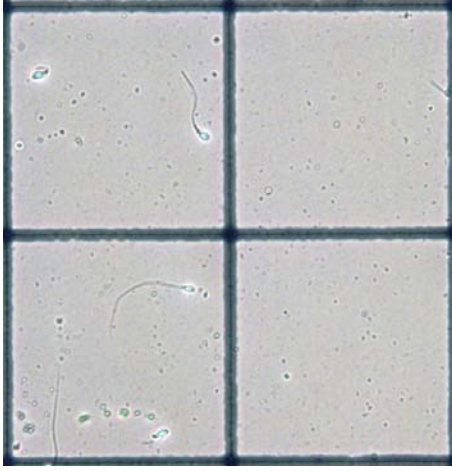
Şekil 4.11.'de, porsuk suyuna konulan semenin, 240.saatte alınan örneklerinde, sperm hücrelerinin kuyruklarının olduğu ancak kuyruk kısımlarının kıvrıldığı ve deforme oldukları görülmüştür. H&E bar:20 μm .

Şekil 4.8.'de ve Şekil 4.13.'te, deniz suyuna ve porsuk suyuna konulan semenin, 480.saatte alınan örneklerinde, sperm hücrelerine dair herhangi bir görüntünün alınamadığı izlenmiştir. Bu görüntüler inceleme sırasında, sperm görülemediği zaman en son yapılan yaymalardır. H&E bar:20 μm .

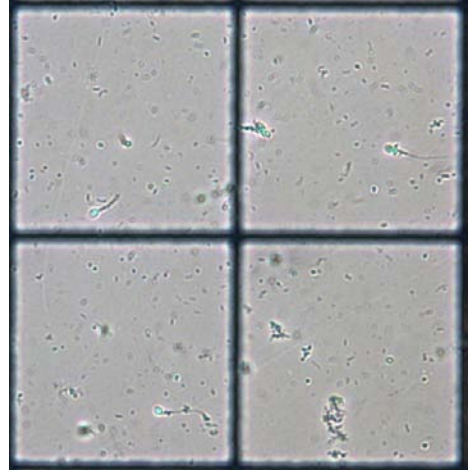
Yukarıdaki şekillerin açıklamalarından da anlaşılacağı üzere, sperm hücrelerinin kuyruklarını kaybettikleri görülmüş ancak hepsinin kuyruğunun kaybetme zamanının aynı olmaması nedeniyle bu süre tespit edilememiştir.

Çalışmalar esnasında yaklaşık 2000 adet dijital mikroskopik görüntü alınmıştır. Aşağıda gösterilen fotoğraflar da sperm sayma kamarasındaki incelemeler esnasında çekilen görüntülerdir. Sperm sayma kamarası 100 eşit kareden oluşmakta ve bir karenin kenarı 100 μm 'dir. Görüntüler x20'lik objektifte değerlendirilmiştir. Fotoğrafların sonunda toplu olarak açıklamaları verilmiştir.

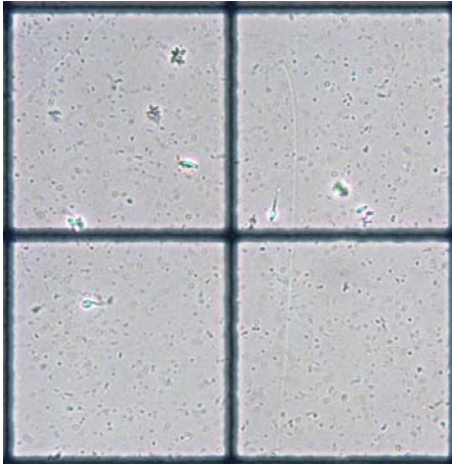
a-0.saat çeşme suyu



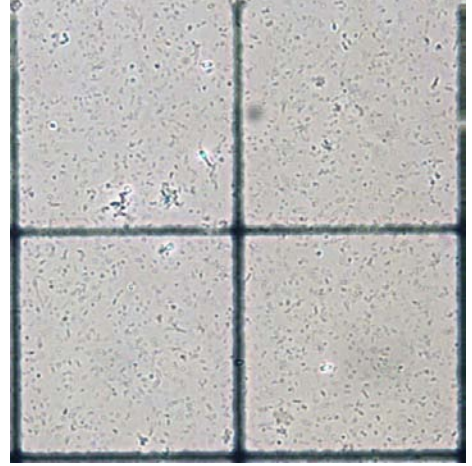
b-240.saat çeşme suyu



c- 600.saat çeşme suyu

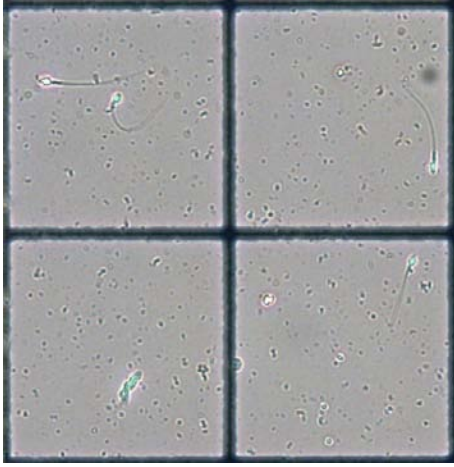


d- 840.saat çeşme suyu

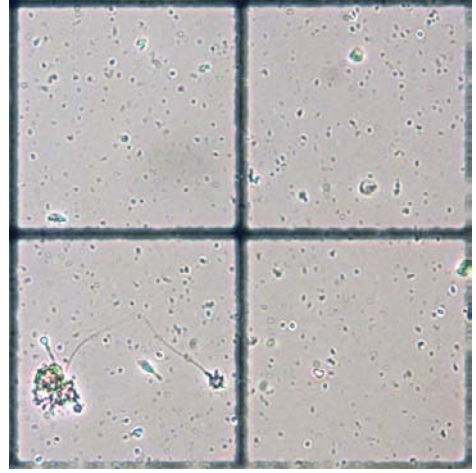


Şekil 4.14. Çeşme suyu örneklerinde ilerleyen saatlere göre sperm görüntüleri

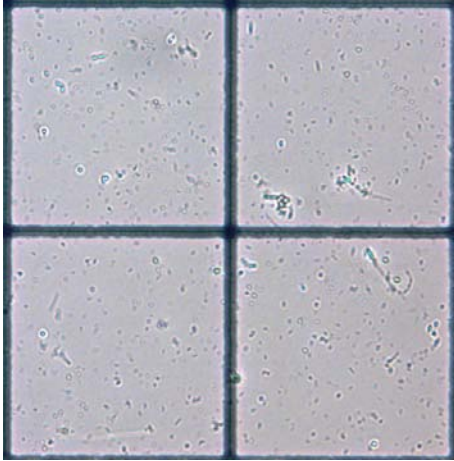
a-0.saat deniz suyu



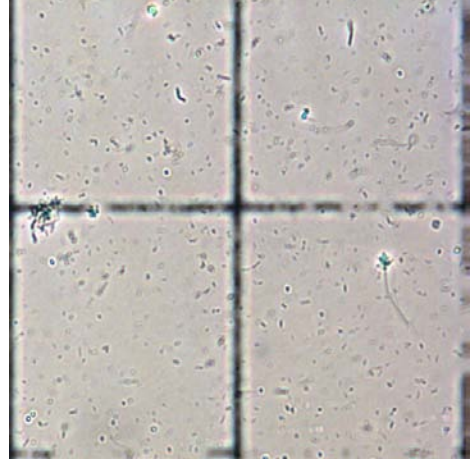
b- 120.saat çeşme suyu



c-240 saat deniz suyu

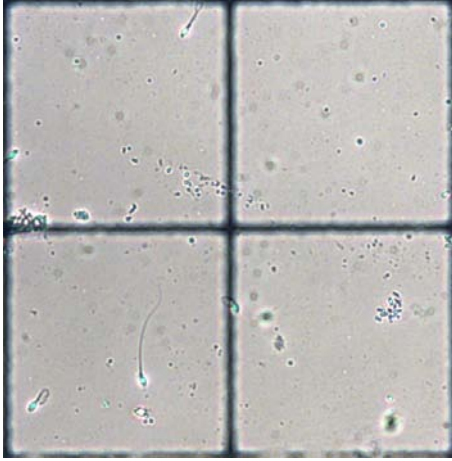


d-480.saat deniz suyu

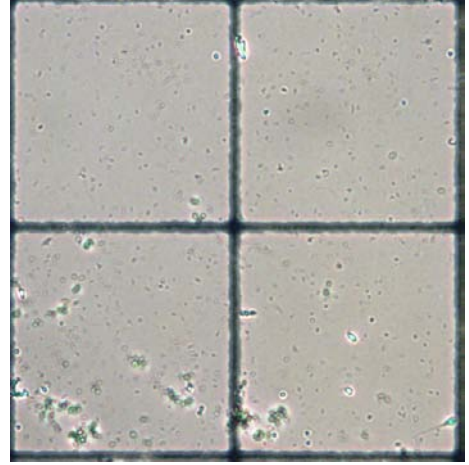


Şekil 4.15. Deniz suyu örneklerinde ilerleyen saatlere göre sperm görüntüleri

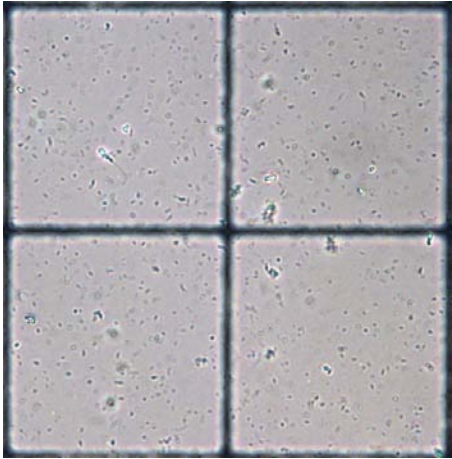
a-0.saat distile su



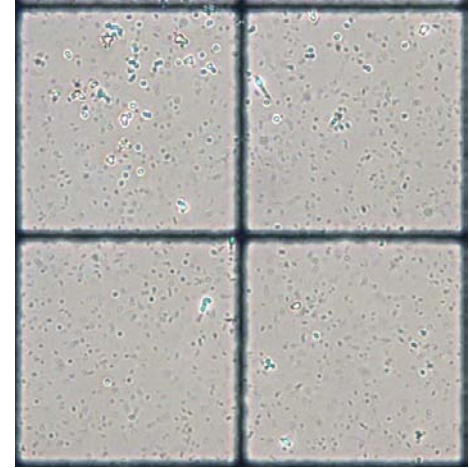
b-240.saat distile su



c-480.saat distile su

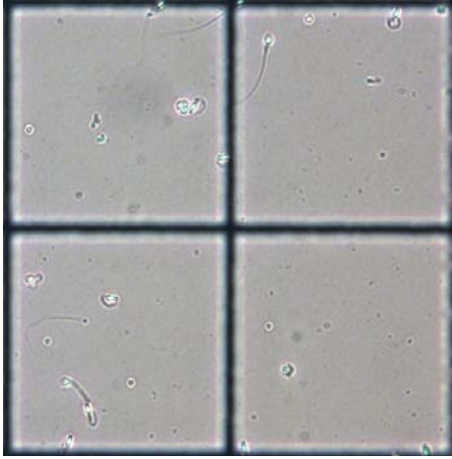


d-720.saat distile su

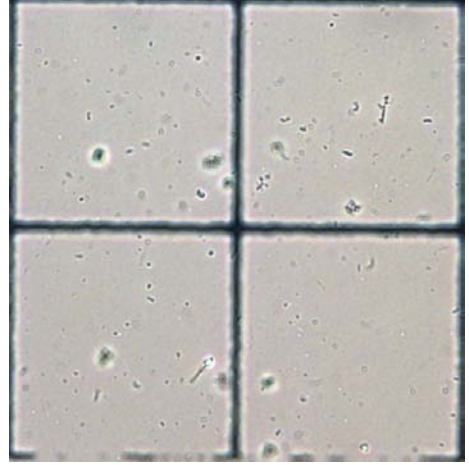


Şekil 4.16. Distile su örneklerinde ilerleyen saatlere göre sperm görüntüleri

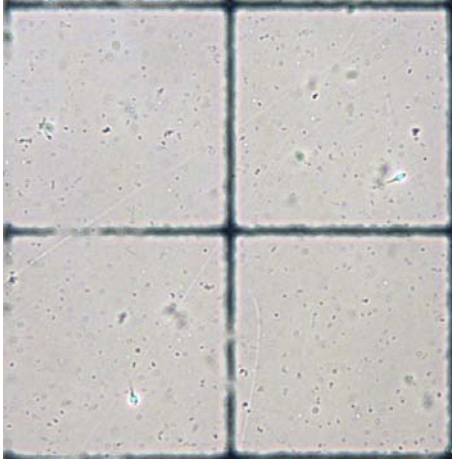
a-0.saat porsuk suyu



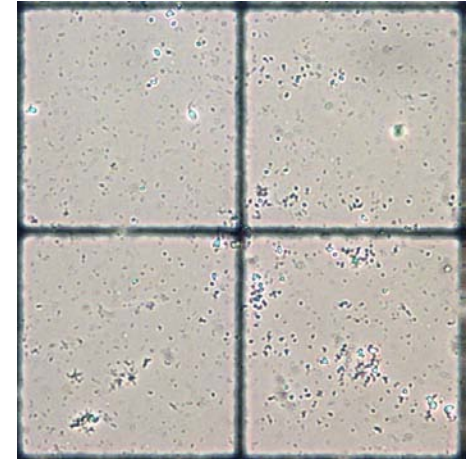
b-120.saat porsuk suyu



c-360.saat porsuk suyu

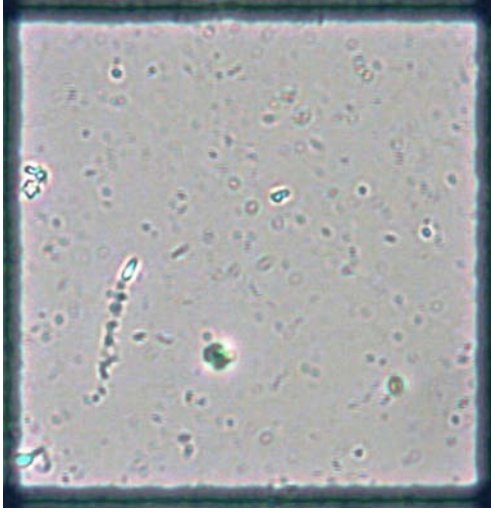


d-480.saat porsuk suyu

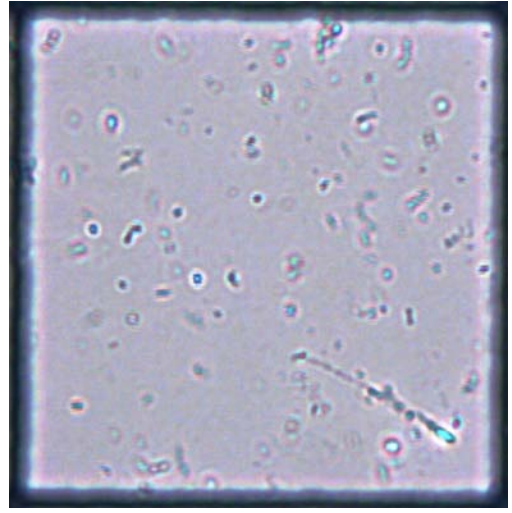


Şekil 4.17. Porsuk suyu örneklerinde ilerleyen saatlere göre sperm görüntüleri

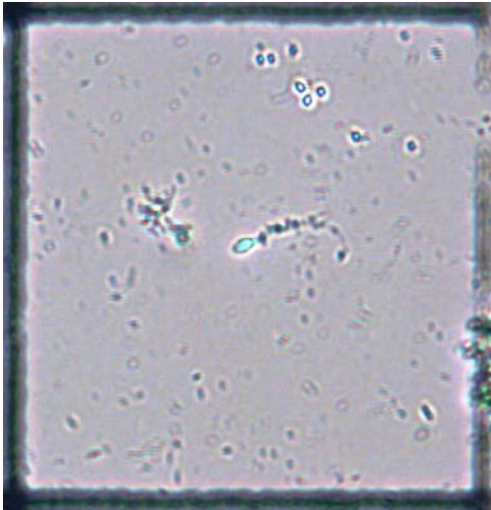
a-360.saat çeşme suyu



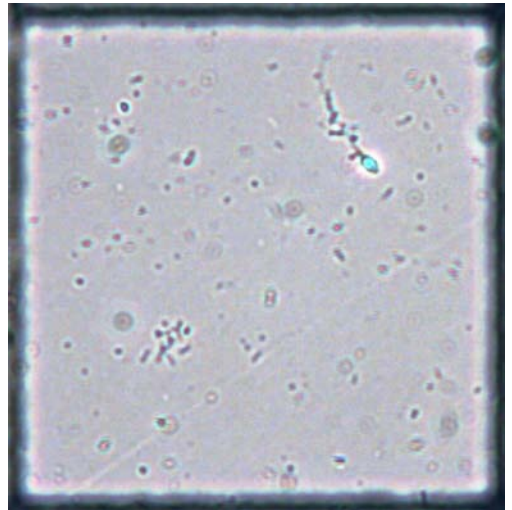
b-144.saat deniz suyu



c-336.saat distile su

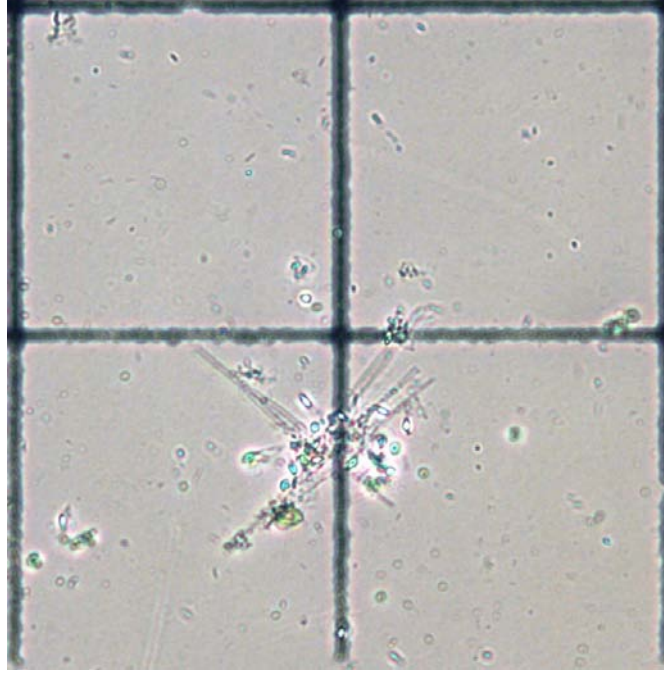


d-240.saat porsuk suyu

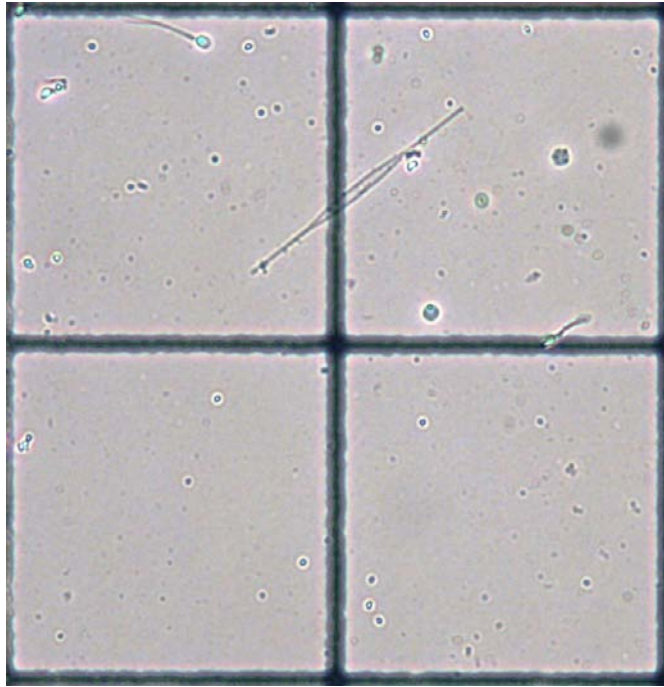


Şekil 4.18. Farklı su türlerinde ve farklı zamanlarda, sperm hücresi etrafında toplanan mikroorganizmalar

a-120.saat porsuk suyu

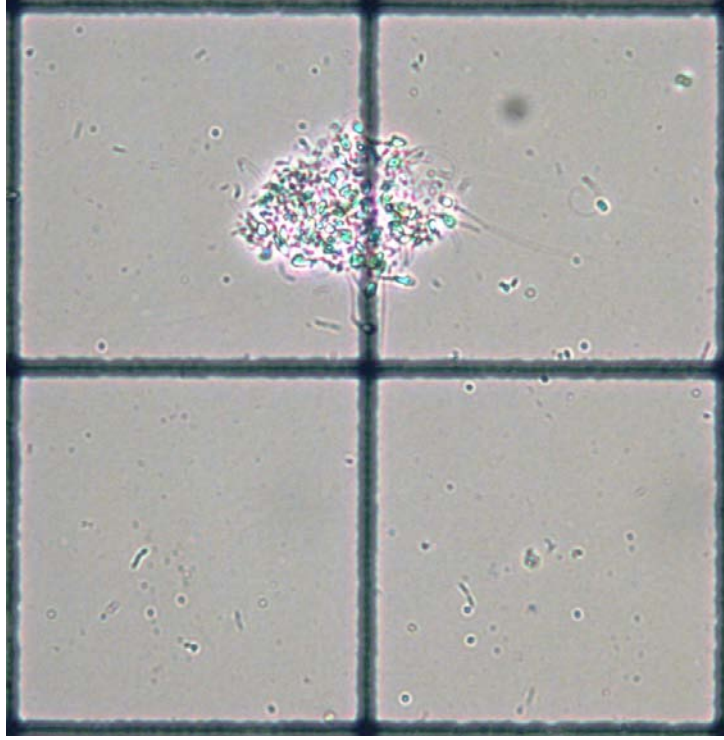


b-72.saat porsuk suyu

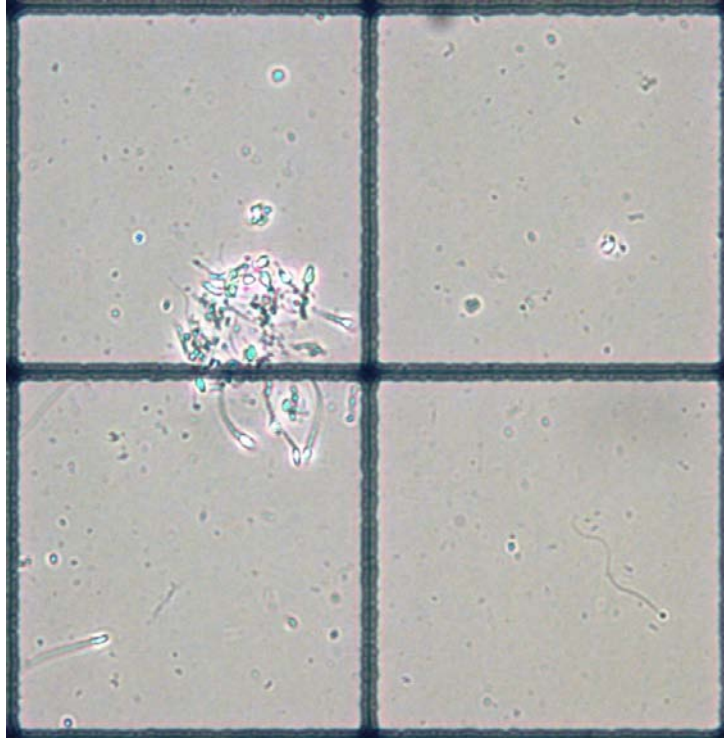


Şekil 4.19. Porsuk suyu örneklerinde sperm hücresi ile izlenen diatomlar

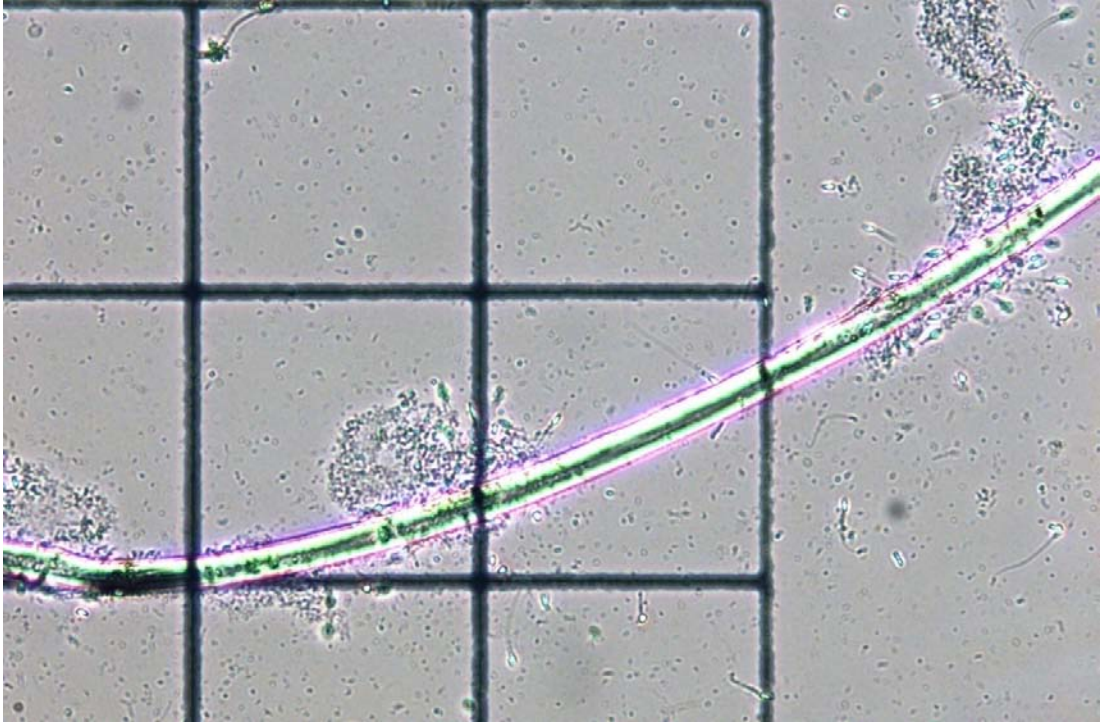
a-192. saat distile su



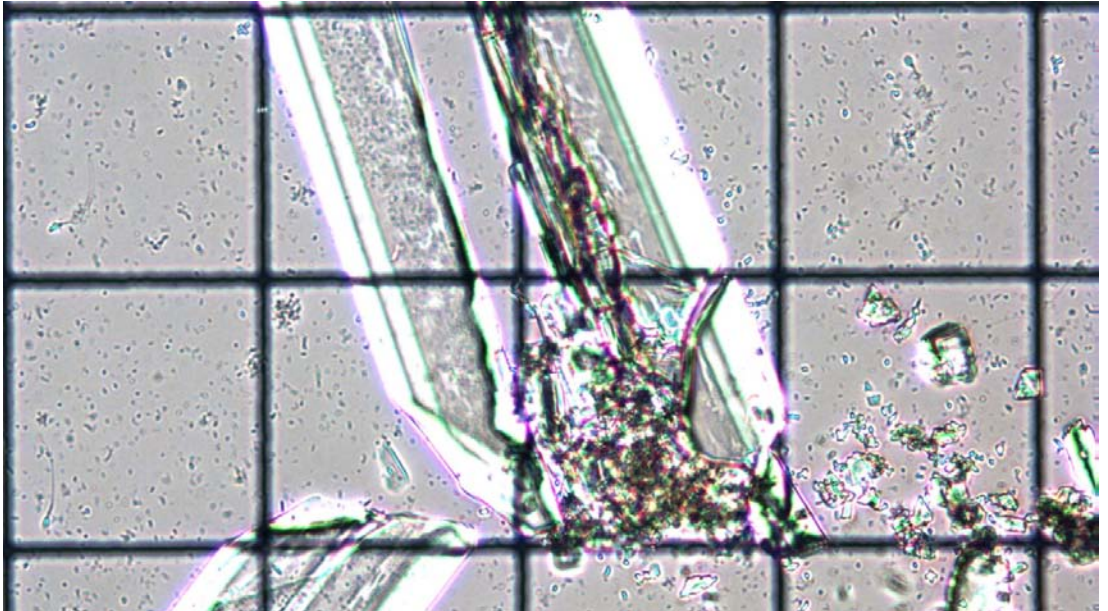
b-144. saat çeşme suyu



Şekil 4.20. Kendi etrafında toplanarak topluluk oluşturan sperm hücreleri

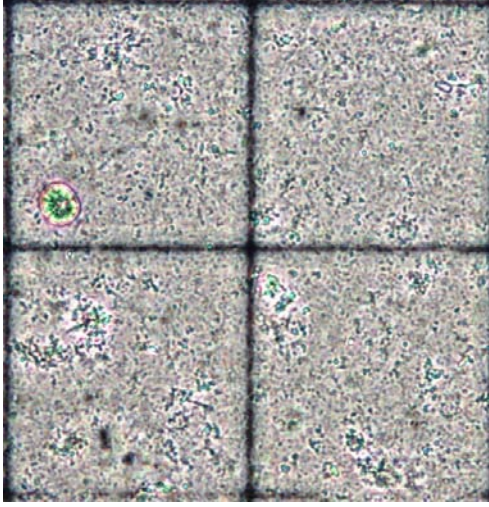


Şekil 4.21. Çeşme suyu örneğine düşen bir kıl segmenti üzerine toplanan sperm hücreleri (240.saat)

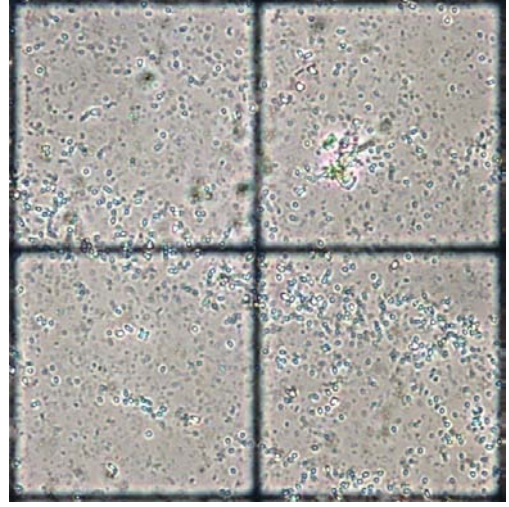


Şekil 4.22. Deniz suyu örneğinde kristalize yapılar ve sperm hücreleri(240.saat)

a-çeşme suyu

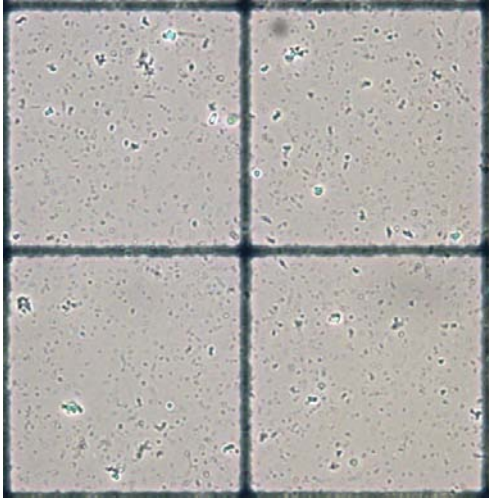


b-distile su

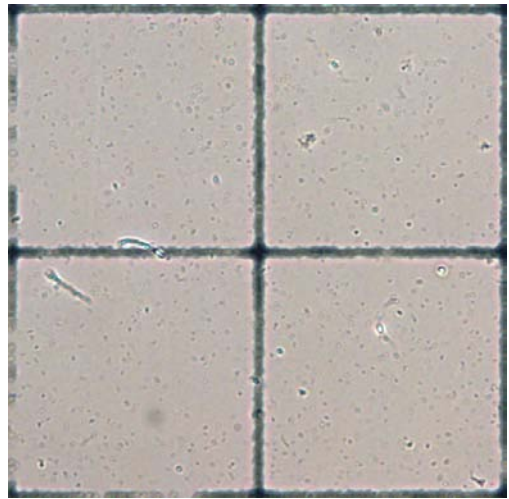


Şekil 4.23. Çeşme ve distile sulardan manuel çalkalama kullanılmadan 720.saatte tüpün alt kısmındaki çöken tortudan alınan örnekler

a-çeşme suyu



b-distile su



Şekil 4.24. Çeşme ve distile sulardan manuel çalkalama yapılarak 720.saatte alınan örnekler

Şekil 4.14., Şekil 4.15., Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.'de yer alan a'da çeşme suyu, b'de deniz suyu, c'de distile su ve d'de porsuk sularındaki 0.saatten ilerleyen saatlere doğru alınmış görüntüler izlenmektedir. Fotoğraflar, H&E boyası ile boyanan yaymalarla benzerlik göstermektedirler. H&E ile boyalı preparatlar dikkatlice incelenecek olursa daha temiz bir zeminde olduğu, ancak sperm sayma kamarasındaki örneklerdeki incelemelerde daha kirli bir zemin teşkil ettiği, bunun nedeninin de boyama prosedürlerinde kullanılan alkol ve diğer solüsyonlardan kaynaklandığı düşünülmüştür. H&E ile boyalı preparatlardaki sperm hücrelerinin kafa kısımları kolayca ayırt edilebilirken direk incelemedeki sperm hücrelerinin kafa kısımları ayırt edilememiştir.

Şekil 4.18.'de ise farklı zamanlarda tüm su örneklerine gelen mikroorganizmaların, sperm hücrelerine tutunmuş halde oldukları izlenmektedir. Mikroorganizmalar, sperm hücresinin bilhassa kuyruk kısımlarına yapışarak tutundukları bölgeleri kısa zamanda dejenere ettikleri izlenmiş ancak fotoğraf karesine yalnızca tutunduklarına dair resimler girmiştir.

Şekil 4.19.'da izlenen porsuk suyuna ait örneklerde iğ şeklindeki diatomlar görülmektedir. Aynı şekilde izlenen diatomlara, genelde porsuk suyu örneğinde rastlanmıştır. Bu diatomların tanınması ile örneğin cesedin porsuk suyundan çıkarılmış olabileceği ihtimali de Adli Tıp açısından değerli bir bulgudur.

Şekil 4.20.'de sperm hücrelerinin topluluklar oluşturdukları görülmektedir. İncelenen örneklerde spermlerin topluluk oluşturmaları, daha çok çeşme suyu ve distile sularda olmaktadır. Çeşme suyu ve distile suyun, deniz ve porsuk sularına göre daha temiz olduğu ve sperm hücrelerinin daha rahat hareket etmeleri göz önüne alınırsa bu topluluk mekanizmasının hücre yüzeylerindeki elektrostatik yüklerle meydana gelmiş olabileceği düşünülmüştür.

Şekil 4.21.'de kaza ile çeşme suyu örneğine düşen bir kıl segmentinin olduğu ve sperm hücrelerinin örnekler içindeki kıl, çöp vs. gibi materyallerin etrafında toplandıkları izlenmiştir.

Şekil 4.22.'de 240.saate ait deniz suyu örneğinde kristalize yapılar ve sperm hücreleri görülmektedir.

Şekil 4.23.'de çeşme ve distile sulardan manuel çalkalama kullanılmadan 720.saatte tüpün alt kısmındaki çöken tortudan alınan örneklerin fotoğrafları yer

almıştır. Normal inceleme, tortudan değil tortunun manuel çalkalama ile homojenizasyonundan sonra yapılmıştır. Şekil 4.24.'de manuel çalkalama sonrası dağılan, daha homojen ve temiz bir görüntü izlenmektedir.

Şekillerle de anlaşılacağı üzere; direk yaymalarda, mikroorganizmalar ve motiliteleri, çöp, kristal vs. gibi doğal ortama dair yapılar daha net izlenirken, boyama yapıldığında ise izlenemedikleri ya da daha az sıklıkla izlendikleri saptanmıştır.

PSA İncelemelerine Ait Bulgular

Prostat spesifik antijen(PSA) aktivasyonu, yapılan çalışmalar bölümünde değinilen kitlerle tespit edilmiştir. Bir vakadan alınan semen örneği; çeşme suyu, deniz suyu, distile su ve porsuk sularında 1/10000, 1/100000 ve 1/500000 şeklinde üç farklı dilüsyona uğratılmış, bu örneklerden PSA aktivasyonu izlenemeyen zamana kadar günlük periyotlarla takip edilmiştir.

1/10.000'lik ejakulat dilüsyonunda, eldeki verilen normal dağılım göstermemesi üzerine Kruskal-Wallis analizi yapılmıştır. Buna göre tablo 4.5.'te ortalama PSA aktivasyonu bitiş süreleri izlenmektedir.

Tablo 4.5. 1/10.000 ejakulat dilüsyonun çeşitli sularda PSA aktivitesinin ortadan kaybolduğu ortalama sürelerin(saat) dağılımı

Su türü	N	Median(saat)	%25	%75
Çeşme suyu	30	888,00	768,00	1032,00
Deniz suyu	30	156,00	96,00	192,00
Distile su	30	444,00	360,00	840,00
Porsuk suyu	30	120,00	96,00	168,00

(P= <0,001)

Tablo 4.6.'da yine 1/10.000'lik ejakulat dilüsyonundaki su çeşitlerinin Tukey test yöntemiyle birbirleri ile karşılaştırmaları gösterilmiştir. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre 1/10.000'lik dilüsyonlarda PSA aktivasyonunun bitiş sürelerine göre çeşme suyu ile distile su arasında ve deniz suyu ile porsuk suyu arasında fark olmadığı, çeşme suyu ile deniz ve porsuk suları arasında ve distile su ile deniz ve porsuk suları arasında fark olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.6. 1/10.000 ejakulat dilüsyondaki farklı su çeşitlerinin PSA aktivitesi açısından birbirleri ile karşılaştırmaları

Karşılaştırılan su türleri	Diff. of ranks	q	P <0,05
Çeşme vs Porsuk	2191,00	11,50	Evet
Çeşme vs Deniz	1953,00	10,25	Evet
Çeşme vs Distile	550,00	2,87	Hayır
Distile vs Porsuk	1641,00	8,61	Evet
Distile vs Deniz	1403,00	7,36	Evet
Deniz vs Porsuk	238,00	1,24	Hayır

1/100.000'lik ejakulat dilüsyonunda eldeki verilen normal dağılım göstermemesi üzerine Kruskal-Wallis analizi yapılmıştır. Buna göre Tablo 4.7.'de ortalama PSA aktivasyonu bitiş süreleri izlenmektedir.

Tablo 4.7. 1/100.000 ejakulat dilüsyonun çeşitli sulara PSA aktivitesinin ortadan kaybolduğu ortalama sürelerin(saat) dağılımı

Su türü	N	Median(saat)	%25	%75
Çeşme suyu	30	120,00	96,00	144,00
Deniz suyu	30	72,00	48,00	72,00
Distile su	30	96,00	72,00	120,00
Porsuk suyu	30	72,00	48,00	96,00

(P= <0,001)

Tablo 4.8.'de yine 1/100.000'lik ejakulat dilüsyonundaki su çeşitlerinin Tukey test yöntemiyle bir birleri ile karşılaştırmaları gösterilmiştir. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre 1/100.000'lik dilüsyonlarda PSA aktivasyonunun bitiş sürelerine göre çeşme suyu ile distile su arasında, distile su ile porsuk suyu arasında ve deniz suyu ile porsuk suyu arasında fark olmadığı, çeşme suyu ile deniz ve porsuk suları arasında ve distile su ile deniz suyu arasında fark olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.8. 1/100.000 ejakulat dilüsyondaki farklı su çeşitlerinin PSA aktivitesi açısından birbirleri ile karşılaştırmaları

Karşılaştırılan su türleri	Diff. of ranks	q	P <0,05
Çeşme vs Deniz	1127,00	5,91	Evet
Çeşme vs Porsuk	1060,50	5,56	Evet
Çeşme vs Distile	368,50	1,93	Hayır
Distile vs Deniz	758,50	3,98	Evet
Distile vs Porsuk	692,00	3,63	Hayır
Porsuk vs Deniz	66,50	0,34	Hayır

1/500.000'lik ejakulat dilüsyonunda eldeki verilen normal dağılım göstermemesi üzerine Kruskal-Wallis analizi yapılmıştır. Buna göre tablo 4.9.'da ortalama PSA aktivasyonu bitiş süreleri izlenmektedir.

Tablo 4.9. 1/500.000 ejakulat dilüsyonun çeşitli sularda PSA aktivitesinin ortadan kaybolduğu ortalama sürelerin(saat) dağılımı

Su türü	N	Median(saat)	%25	%75
Çeşme suyu	30	24,00	24,00	48,00
Deniz suyu	30	24,00	24,00	24,00
Distile su	30	24,00	24,00	48,00
Porsuk suyu	30	24,00	0,00	24,00

(P= <0,012)

Tablo 4.10.'da yine 1/500.000'lik ejakulat dilüsyonundaki su çeşitlerinin Tukey test yöntemiyle bir birleri ile karşılaştırmaları gösterilmiştir. Bu karşılaştırma sonuçlarına göre 1/500.000'lik dilüsyonlarda PSA aktivasyonu bitiş sürelerine göre çeşme suyu ile deniz suyu arasında ve distile su ile porsuk suyu arasında fark olmadığı, çeşme suyu ile porsuk suyu arasında fark olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.10. 1/500.000 ejakulat dilüsyondaki farklı su çeşitlerinin PSA aktivitesi açısından birbirleri ile karşılaştırmaları

Karşılaştırılan su türleri	Diff. of ranks	q	P <0,05
Çeşme vs Porsuk	746,50	3,91	Evet
Çeşme vs Deniz	611,50	3,21	Hayır
Çeşme vs Distile	392,00	2,05	Test yapılamadı
Distile vs Porsuk	354,50	1,86	Hayır
Distile vs Deniz	219,50	1,15	Test yapılamadı
Deniz vs Porsuk	135,00	0,70	Test yapılamadı

Aşağıda belirtilen tabloda ise tüm dilüsyonlarda, farklı sularda tespit edilen PSA aktivasyonun 30 vakada minimum ve maksimum süreleri gösterilmiştir. Buna göre; farklı suların 1/500.000 lik dilüe örneklerinde 0. saatlerde negatif olarak saptanan vakaları olduğu, tüm vakaların farklı dilüsyonlarında da çeşme ve distile sulardaki maksimum sürelerin, deniz ve porsuk sularındaki maksimum sürelerden oldukça fazla olduğu izlenmektedir.

Tablo 4.11. Farklı dilüsyonlardaki PSA aktivasyonunun, farklı su türlerindeki minimum ve maksimum bitiş süreleri(saat)

Dilüsyon oranları	Çeşme suyu		Deniz suyu		Distile su		Porsuk suyu	
	Min.	Maks	Min.	Maks	Min.	Maks.	Min.	Maks.
1/10 ⁴	528	1296	48	240	360	1104	48	264
1/10 ⁵	24	624	24	120	24	576	24	120
1/5x10 ⁵	0	120	0	48	0	120	0	48

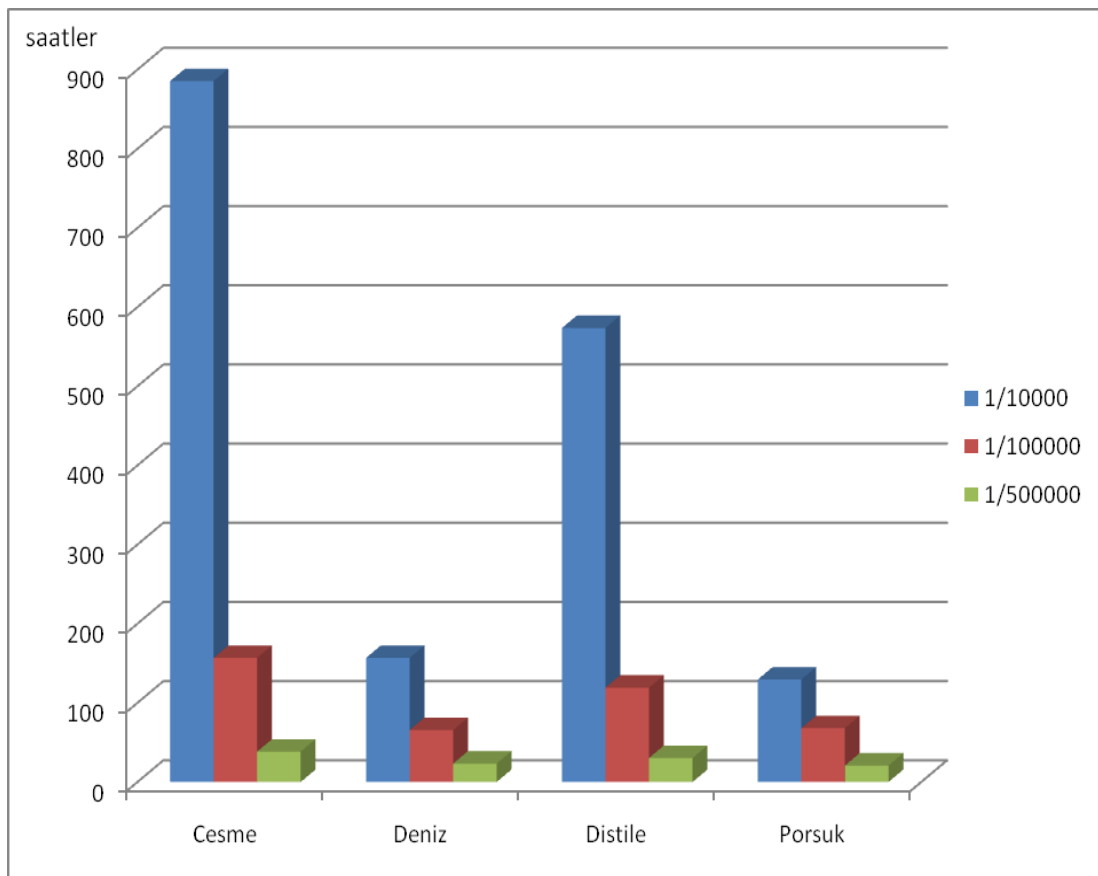
Yukarıdaki tabloda da görüldüğü üzere, 1/500.000 dilüe örneklerde 0.saatte PSA aktivasyonu göstermeyen vakalar olmuştur. Çeşme suyu örneklerinde 30 vakadan 2 vaka, deniz suyu örneklerinde 30 vakadan 5 vaka, distile su örneklerinde 30 vakadan 6 vaka, porsuk suyu örneklerinde 30 vakadan 7 vaka olmak üzere 120 adet 1/500.000 dilüe örnekte toplam 20 örnekte 0.saatte PSA negatif olarak tespit edilmiştir. Çeşitli sularda, 120 vakada 0.saatte PSA tespit edilebilirliği %66.66 olarak bulunmuştur.

Tüm ejakulat dilüsyonlarının çeşitli sularda PSA aktivitesinin ortadan kaybolduğu ortalama sürelerin(saat) dağılımlarını gösteren çizelge; Tablo 4.12.'de sunulmuş olup bu tabloya ait grafik de şekil 4.25.'te gösterilmiştir.

Tablo 4.12. Farklı su türlerinde ve farklı dilüsyonlardaki PSA aktivasyonunun ortalama bitiş süreleri(saat)

Dilüsyon oranları	Çeşme suyu	Deniz suyu	Distile su	Porsuk suyu
1/10.000	885,53	156,80	573,60	129,60
1/100.000	156,80	65,60	119,20	68,00
1/500.000	38,40	23,20	30,40	20,80

Çeşme suyunda 1/10.000'lik dilüe semen örneğinde, 1296 saate(54.günün sonu) kadar pozitif saptanan bir vaka olmuş, 30 vakanın ortalaması 885,53 saat (36.gün) olarak tespit edilmiştir. Deniz suyunda 1/10.000'lik dilüe semen örneğinde, 240 saate(10.günün sonu) kadar pozitif saptanan bir vaka olmuş, 30 vakanın ortalaması 156,80 saat (6.gün) olarak tespit edilmiştir. Porsuk suyunda 1/10.000'lik dilüe semen örneğinde, 264 saate(11.günün sonu) kadar pozitif saptanan bir vaka olmuş, 30 vakanın ortalaması 129,60 saat (5.gün) olarak tespit edilmiştir. Distile suda ise 1/10.000'lik dilüe semen örneğinde, 1104 saate(46.günün sonu) kadar pozitif saptanan bir vaka olmuş, 30 vakanın ortalaması 573,60 saat (23.gün) olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.25. Farklı su türlerinde ve farklı dilüsyonlardaki PSA aktivasyonunun ortalama bitiş süreleri

5. TARTIŞMA

Sperm Tespiti İle İlgili Tartışma

Proje-tezin sperm tespiti ile yapılan deneyleri, mililitrede 50 milyon sperm hücresi olacak şekilde standardize edilmiş ve çeşitli su türleriyle %20'lik dilüsyona uğratılmış örneklerin 24 saatlik periyotlarla mikroskopik incelemeleri şeklinde idi. Semen materyalini fruktoz ile zenginleştirilmiş bir besiyeri olarak düşündüğümüzde, dilüe edilen örneklerin bulunduğu deney tüplerinin ağızları açık bırakılarak etraftan gelen mikroorganizmalarla kontaminasyon olması beklenmiştir. Deniz ve porsuk suları içinde zaten var olan mikroorganizmaların ise bu besiyerinde daha hızlı üreyip etraftaki besini (semen ve sperm hücresi) tüketmeleri neticesinde bulguların daha erken kaybolduğu görülmüştür.

Bulgular ise sperm hücrelerinin, porsuk ve deniz sularında, çeşme ve distile sulara göre daha erken ortamdaki kaybolmaları şeklindeydi. Porsuk ve deniz sularındaki sperm konsantrasyonları ile çeşme ve distile sulardaki sperm konsantrasyonları karşılaştırıldığında, 168.saatte anlamlı bir farklılık ortaya çıkmış, bu saatten sonra porsuk ve deniz sularındaki sperm konsantrasyonları çeşme ve distile sulardaki sperm konsantrasyonlarından daha hızlı bir azalışla tespit edilemeyecek duruma gelmiştir. Buna göre; 30 vakanın sperm incelenmesinin çeşme suyunda 408.saatten başlayıp 1128.saate kadar geçen zaman diliminde sonlandığı, deniz suyunda 288.saatten başlayıp 888.saate kadar geçen zaman diliminde sonlandığı, distile suda 384.saatten başlayıp 1008.saate kadar geçen zaman diliminde sonlandığı, porsuk suyunda ise 384.saatten başlayıp 792.saate kadar geçen zaman diliminde sonlandığı görülmüştür (Bakınız Tablo 4.4. ve Şekil 4.2.). 30 vakanın içerisinde, deniz suyunda 888.saate, porsuk suyunda ise 792.saate kadar sperm hücresinin görülebildiği uzun süren örnekler olabileceği gibi çeşme suyunda 408.saatte, distile suda da 384.saatte sperm hücresinin görülemediği kısa sürede tamamlanan örnekler karşımıza çıkmıştır. Deniz ve porsuk sularındaki uzun süre sperm hücresinin görülebildiği durumlar ele alınacak olursa; öncelikle beşer litrelik depo deniz ve porsuk suyu içindeki mikroorganizmaların homojen dağılmadığını düşünürsek her ne kadar manuel çalkalama yöntemi kullansak da bahsi geçen örnek vakalara suyla beraber daha az ya da daha çok mikroorganizmanın girmesi muhtemeldir. Yani tüplere sperm hücrelerini standardize ettiğimiz gibi sulardaki

mikroorganizmaları standardize etme şansımız olmamaktadır. Bir nehir suyunun her bir metreküpyü ya da bir deniz suyunun her bir noktası eşit olarak mikroorganizma içermez. Çeşme ve distile sularda erken tamamlanan vakalardaki örneklerde ise yine ortamdaki gelen kontaminasyonun ne kadar olduğu bilinmezken ana sebep olarak sperm kalitesindeki düşüklüğün sebep olabileceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarda; sıcaklık faktörü(29), sperm hücresinin apoptozunu sağlayan mekanizmaların bozukluğu(30) gibi daha birçok faktörün sperm kalitesine etki ettiği gösterilmiştir. Yine motilite azlığında hareket edemeyen sperm hücrelerine mikroorganizmaların daha çabuk geldiği düşünülmüştür. Yapılan mikroskopik incelemelerde, sperm hücrelerinin kuyruk kısımlarına mikroorganizmaların yapışıp, önce kuyruk kısmını ortadan kaldırdıkları daha sonra baş kısmını da parçaladıkları görülmüştür. (Bakınız Şekil 4.18. a, b, c, d)

Cinsel saldırı mağdurlarından alınan swap örneklerinin incelemelerinde; spermatozoonun vajinada; bazı yazarlar tarafından 72 saate kadar(6), bazı yazarlar tarafından 120 saate kadar(8), servikte 179 saate kadar, anüste 46 saate kadar, rektumda 65 saate kadar(8), oral kavitede ise ağız çalkalama ve dişleri fırçalama yapılmaksızın 6 saate kadar kalabildiği bildirilmiştir(6,8). Willott ve ark., sperm tespitinin ölü bir insanın vajinasında 1-2 hafta boyunca tespit edilebileceğinden bahsetmişler, nedenini ise ölü insandaki vajinal sekresyonun inaktivasyonuna bağlamışlardır. Culhane ve ark.(31) ise, 3 sene boyunca gebe kadınların kontrolleri esnasında vajinal örneklerde çalışarak gestasyonda vajinal sekresyonların, semen ve içeriğindeki PSA, sperm gibi materyalleri daha kısa sürede parçaladıklarını belirtmişlerdir.

Birçok araştırmacı, kendi bölgelerindeki cinsel suçları incelemiş, fakat muayene esnasında alınan örneklerde çoğu vakada sperm tespit edilememiştir. Grossin C. ve ark.(32), 418 cinsel suç vakasını ilk 72 saatte değerlendirmişler, %30.3'ünde sperm tespitini elde etmişlerdir, yine Riggs N. ve ark.(33), 1076 cinsel suç vakasını değerlendirmişler, vakaların %13'ünde sperm tespit edilirken %48'sinde ise semenin pozitif olduğunu göstermişlerdir. Oliveira Aded NL. ve ark.(34), 44 çocuğun cinsel suç taramasında 3(%6.82) vakada sperm hücresine rastlamışlardır. Jänisch S. ve ark.(35) da inceledikleri cinsel suçlarda olay tarihinden sonra 3 gün içinde aldıkları vajinal örneklerde 81 (%38) vakada, anal örneklerde ise 24 saat

içinde 7 (%18.9) vakada sperm hücresi tespit edebilmişlerdir. Özdemir H.(36) semende PSA ve sperm saptanması konulu uzmanlık tezinde; kadın doğum kliniğine başvuran, post-koitus süresi 4,5 saat ile 7 gün olan, gönüllü 32 kadından vajinal swap almış, 32 vakadan 11 vakada H&E ve Berg özel boyası ile sperm saptamış, sperm görebildiği en uzun süreyi ise post-koital 33.saatte tespit etmiştir, Ingemann-Hansen O. ve ark.(39) da 72 saat içinde incelenen ve swapları alınan vakaların mikroskobik olarak %30'unda sperm tespit etmişler, mikroskobik olarak sperm tespit edilemeyen vakaların %19'unda ise genetik laboratuvarlarında sperm hücreleri tespit edilmiştir.

Şu ana kadar vajinada tespit edilebilen süre olan 1-2 haftaya göre, projede çıkan sonuçlar (çeşme suyunda 1128 saat, deniz suyunda 888 saat, distile suda 1008 saat, porsuk suyunda ise 792 saat) oldukça uzundur. Ancak bu sulardaki spermin ortadan kayboluşunda vajinal sekresyon, vajinal hücre ve makrofajlar rol almamış, sular içinde bulunan ve havadan kontaminasyon yoluyla gelen mikroorganizmalar rol almıştır.

Cesedin, koitus sonrasında denize veya Porsuk gibi nehir sularına atılma senaryosu düşünüldüğünde, ölen şahısların vajinal sekresyonlarının olmadığını, vajinaya pasif olarak ancak vajina hacmi kadar sıvı geçişi olabileceğini hesaba katarsak bulduğumuz sonuçlardan daha kısa sürelerin ortaya çıkma ihtimalleri fazladır. Deneyler, in vitro ortamda yapılmış olup in vivo ortamla farklı sonuçlar alınabileceği akılda tutulmalıdır. Bununla birlikte ölümlü olgularda ve sudan çıkarılan cesetlerde cinsel suç şüphesi varsa, yaşayan olgulardaki gibi 3.-5. günden sonra sperm görülemeyeceği düşünülmemeli, aradan geçen zaman uzun da olsa gerekli örnekler alınıp incelemeye devam edilmelidir. Yine bununla ilgili olarak, sıcak havalarda ve sıcak mevsimlerde ceset üzerindeki post mortem değişimler hızlanacağı için örnek almada hızlı davranmamız gerektiği de önemlidir.

Allard J.E. ve ark.(37) semenli swap ve çamaşır örneklerinden dilüsyonla sperm ve PSA çalışmışlar, kuyruklu sperm hücresini en yüksek 1/1000'lik dilüsyonda tespit etmişler, direk yayma metoduyla daha az sensitif bulunan spermlerin, swap ekstrasyon metodlarıyla görülmelerinin daha fazla sensitif olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Aynı zamanda PSA dilüsyonlarında da 1/10.000'de negatif sonuç çıktığı ancak ekstrasyonla az çok saptanabildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada zaman faktörü kullanılmamış, ekstrasyonun önemi vurgulanmıştır. Bizim

çalışmalarımızda ise ekstrasyon kullanılmamış, zaman faktörü kullanılmıştır. Çalışmalarımızda, sperm hücrelerinin en son görülme zamanları ile PSA'nın en son tespit edilebildiği zamanlardan sonra ekstrasyona gidilmiş olsaydı yukarıdaki çalışma(37) sonuçları doğrultusunda pozitif sonuç alma zamanları daha da uzayabilirdi.

Engelbertz F. ve ark.(38), post-ejakülasyon idrarlarını 10 erkekte zamana bağlı olarak ele almışlar, ejakülasyondan yarım saat sonra alınan idrarlarında zamana bağlı olarak sperm hücresi aramışlardır. Maksimum 11. saate kadar izlenen sperm hücresi görülmesinin ortalama saatini 4,5-5 saat olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışma da bir bakıma sperm dilüsyonunu göstermektedir. 5 saate kadar post-ejakülasyon idrarlarında sperm hücresine rastlamanın adli tıbbi değeri olsa da pratik uygulamalarda sanık-şüpheliye kısa sürede ulaşmak mümkün olmadığı gibi bu yöntemle suçun aydınlatılabilmesi de güçtür. Ancak diğer bulgular, destekleyici bir rol oynayabilir.

Yukarıda ele alınan literatür örnekleri topluca değerlendirildiğinde; sperm hücresinin vajinal örneklerde tespit edilebilmesinin zamana bağlı güçleştiği, semenin tespitine yönelik ek incelemeler yapılması gerektiği anlaşılmaktadır. Bizim yaptığımız çalışma sonucunda; farklı sularda dilüe edilen semen örneklerinin uzun bir süreçte değerlendirildiği ve oldukça uzun sürelerde sperm tespit edildiği yönünde olup bu çalışmanın aynısı ya da benzeri literatür örneklerinde rastlanmamıştır.

PSA Tespiti İle İlgili Tartışma

Semen içerisinde yer alan bir glikoprotein olan Prostat Spesifik Antijen(PSA), 1980'li yılların ortalarında cinsel suç vakalarında sperm hücresinin görülmeyen olgularda ek kanıt olarak karşımıza çıkmıştır. Cinsel suç saldırganı erkeğin sperm konsantrasyonunun az olduğu (oligospermik-azoospermik) ya da vazoktemize olgularda olduğu gibi hiç olmadığı durumlarda mikroskopik ve genetik olarak sperm hücresinin görülmesinde zorluk çekildiğinden, vajina-serviks içinde bulunmayan PSA'nın tespiti ile cinsel suç mağdurlarından kanıt elde edilmektedir.

Çalışmamızda, PSA'nın farklı tür sularında ve farklı dilüsyon oranlarında zamana bağlı olarak değişimleri incelenmiştir. PSA aktivasyonunun bitiş sürelerinin ortalamaları 1/10.000'lik dilüe semende ele alındığında; çeşme suyu (885,53 saat) ve distile suda (573,60 saat) , deniz suyu (156,80 saat) ve porsuk suyuna (129,60 saat) göre daha fazla sürede pozitiflik gösterdiği, 1/100.000'lik ve 1/500.000'lik dilüe örneklerde ise tüm suların daha kısa sürelerde PSA negatifliğine geçtikleri görülmüştür. (Bakınız tablo: 4.2.7-8) Çeşme suyunda 1/10.000'lik dilüe semen örneğinde, 1296 saate (54.günün sonu) kadar pozitif saptanan bir vaka olmuş, 30 vakanın ortalaması 885,53 saat (36.gün) olarak tespit edilmiştir. Distile suda ise 1/10.000'lik dilüe semen örneğinde, 1104 saate (46.günün sonu) kadar pozitif saptanan bir vaka olmuş, 30 vakanın ortalaması 573,60 saat (23.gün) olarak tespit edilmiştir. Buna benzer kriterler ile yapılan bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Sürelerin ise oldukça uzun olmaları bize adli tıpta cinsel saldırıya uğrayan mağdurdan alınan örneklerde sperm hücresi görülmesi bile PSA incelemesi yapılmasının gerekliliğini bir kez daha göstermiştir. Aynı şekilde mağdurun cinsel suç sonrasında, muayeneye başvurmadan çeşme suyu ile yapacağı duş sonrasında dahi PSA tespitinin yapılabileceği kanısına varılmıştır. Ancak cinsel suç sonrası, deniz suyuna ya da porsuk suyuna atılan kişilerin cesetlerinde PSA incelemeleri için daha kısa bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızın in vitro ortamda olmasından dolayı gerçek vakalarda PSA pozitifliği saptanabilecek süre açısından kesin bir zaman söylenemese de, 1/10.000'lik dilüe örneklerde deniz ve nehir suyunda 10.-11. güne kadar PSA pozitifliği saptanabildiği göz önüne alındığında ölüm/olayın üzerinden geçen süre uzun da olsa PSA incelemesinin yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

PSA'nın adli tıpta keşfinden sonra o zamana kadar aynı görevi gören semende asit fosfataz(ACP) aranması ile karşılaştırmalı bulgular sunulmuştur. Graves HC. ve ark.'nın 1985 yılında yaptıkları çalışmada(20), cinsel suç mağdurlarının vajinal örneklerinde 47 saate kadar PSA'nın görülebildiği vakalar olmasına rağmen ortalama 27 saat olarak PSA'nın tespit edilebildiğini ortaya çıkarmışlar, PSA'nın asit fosfataz testine üstünlüğünü göstermişlerdir. Evers ve ark.(40), da 786 cinsel suç vakasından alınan örneklerde ACP'ın negatif olarak saptandığı ancak mikroskopik olarak sperm hücrelerinin tespit edilebildiği %3'lük bir oran bulmuşlardır. Kamanev L. ve ark.(41) da PSA'nın ACP'ye göre daha olumlu sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir. Culhane ve ark.(31) ise 3 sene boyunca gebe kadınların kontrolleri esnasında vajinal örneklerde PSA, Gram boyama ve direk yaymada sperm tespiti ve ACP ile karşılaştırmalı çalışma yapmışlar, post-koital 48.saatte PSA tespit edilebilirliğini, sperm tespitinden ve ACP'den daha yüksek bulmuşlardır. Celebioglu A. ve ark.'nca, cinsel suçlarda alınan swap ve şüpheli olarak alınan üzerinde semen lekesi olabilecek 80 materyalin %85'inde PSA saptanmış ve genetik laboratuvarında erkek DNA'sı olduğu onaylanmıştır(44).

Tayland'da 2006 yılında meydana gelen bir cinsel suç olgusu, o ülkede PSA testi ile aydınlatılan ilk olgu olma özelliğine sahip olmuştur(42).

Zisman A. ve ark.(43) erkek bireylerde ejakülasyon öncesi ve sonrası kanda PSA'yı ölçmüşler, ejakülasyon sonrası serum PSA'da ortalama olarak %54 oranında artış olduğunu saptamışlardır. Bu araştırma sonuçları, Engelbertz F. ve ark.'nın(38), post-ejakülasyon idrarda sperm hücresi saptamaya yönelik çalışmalarıyla birlikte değerlendirildiğinde, ejakülasyon sonrası erkeklerde bazı değişikliklerin ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Bu değişiklikler kişinin kısa süre içinde bir cinsel aktivasyon gerçekleştirdiğine işaret etmekle birlikte adli tıbbi uygulamaya katkısının oldukça sınırlı olacağı aşikardır.

Lunetta P. ve ark.(45), cinsel saldırı öyküleri bilinmeyen 2-136 günlük, 39 erkek ve 10 kadın cesedinden aldıkları rektal swaplarda PSA incelemişler, kadınlarda PSA negatif saptanırken, erkeklerde %64 pozitif saptandığı, taze ve çürümüş cesetlerde fark çıkmadığı, alınan örneklerin DNA incelemelerinde de yabancı bir DNA'ya rastlanılmadığı, sonuç olarak çürümüş cesetlerdeki PSA'nın prostat otolizinden rektuma sızdığı, taze cesetlerde de anal mukozada PSA'nın

bulunmasından dolayı kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu araştırma erkek cesetler üzerindeki PSA'nın tek başına faydalı bir bulgu olamayacağını göstermektedir.

Çalışmamızın zaman faktörüne benzer bir çalışmayı Khaldi N. ve ark.(46), sitoloji, ACP ve PSA'yı azospermik ve oligospermik bireylerden aldıkları semen örnekleri üzerinde 24 saatlik periyotlarla 72 saate kadar denemişler, 72 saatte tüm olgularda PSA pozitifliği ile en ideal testin PSA olduğunu belirtmişlerdir. Macaluso M. ve ark.(47) da kondom kullanılarak gerçekleştirilen ejakülasyon sonrası kadınların vajinalarından alınan örneklerde 1, 24 ve 48. saatlerde PSA incelemişler, kondomdan sızan meninin 48 saate kadar tespit edilebildiğini göstermişlerdir. Çalışma sonuçları, cinsel suç öyküsünde şüphelinin kondom kullandığı bilgisi edinilse bile yine de vajinadan örnekler alınıp sperm ve PSA incelemesi yapılması gerektiğini destekler niteliktedir.

Seminal sıvıyı dilüe ederek yapılan PSA çalışmaları; Yokoto M. ve ark.(27) tarafından semenin 1/100.000 lik dilüe örneklerinde PSA tespit edilebildiği ancak 1/1.000.000 lik örneklerde tespit edilemediği, yine Sato I. ve ark.(26) tarafından 1/200.000 lik örneklerde PSA tespit edilebildiği ancak 1/300.000 lik örneklerde tespit edilemediği, Seyalioglu İ. ve ark.(49) tarafından yapılan incelemelerde ise 1/600.000 lik dilüe örneklerde PSA'nın tespit edilebildiği, 1/1200000 lik dilüe örneklerde dahi PSA'nın zayıf da olsa pozitif sonuç verdiği şeklindedir.

Yukarıda anlatılan literatür örnekleri değerlendirildiğinde; PSA'nın semen tespitinde oldukça önemli bir yeri olduğunu görmekteyiz. Yapılan PSA tespiti çalışmalarında, dilüsyon için distile su kullanımı, gönüllü erkeklerden semen temini yada direk cinsel suç mağdurundan alınan örnekler kullanılmış olup yine de Sato I. ve ark.(26), Yokoto M. ve ark.(27) ve Seyalioglu İ. ve ark.(49) tarafından yapılan çalışmalardan çıkan sonuçlar ile bizim bulduğumuz sonuçlar uyumluluk göstermektedir. Ancak zaman faktörü ve farklı sulardaki dilüsyon örnekleri, bizim yaptığımız çalışma dışında ele alınmamıştır. Yaptığımız çalışmada aynı kişinin %20'lik dilüsyondaki semen örneğinde en son sperm saptanan zaman ile farklı tüplerde ve değişik dilüsyonlarda PSA'nın saptanabildiği süreler bilinmektedir. Ancak dilüsyon oranları farklı olduğundan bire bir karşılaştırma yapılamamıştır. Bununla birlikte, örneğin çeşme suyundan yapılan örneklerde 840.saatte sperm görülemeyen 18 olgunun 9'unda 1/10.000'lik dilüsyonda PSA pozitifliği

saptanmıştır. Bu fark, değişik su türlerinde ve daha uzun zaman diliminde de karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

1/10000, 1/100000 ve 1/500000'lik dilüe örneklerde ekstraksiyon işlemi yapılmaksızın PSA testi uygulanmıştır. Bu yöntemde dahi 1/500000'lik dilüe örneklerde 0.saatte %66,66 oranında PSA pozitifliği saptanmıştır. Dilüe örneklerin PSA aktivasyonu tamamlandıktan sonra da ekstrasyonla süpernatantı alınarak incelemeye devam edilebilirdi. Ancak deneylerin çok uzun zaman dilimine yayılacağı düşüncesiyle santrifüjle ekstraksiyon oluşturma planlanmamıştır.

%20'lik semen dilüsyonlarında da sperm hücrelerinin tespit edilememesi zamanından sonra PSA testi yapıp aynı örnekte ne zamana kadar PSA'nın pozitifliğinin süreceği araştırılabilirdi ancak toplam örneğin 2,5 ml. olması ve örneklerin yaklaşık 1 ay boyunca incelenmesi, bu arada kullanılan sıvı materyalde oluşan buharlaşma da dikkate alınarak aynı örnek üzerinde ek olarak PSA incelemesine gidilmemiştir. Aynı kişinin %20'lik dilüsyondaki semen örneğinde en son sperm saptanan zaman ile farklı tüplerde ve değişik dilüsyonlarda PSA'nın saptanabildiği süreler bilinmektedir. Ancak dilüsyon oranları farklı olduğundan bire bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Sperm hücrelerine yapışan ve onlarla hareket eden mikroorganizmalar nedeniyle sperm motilitesi de değerlendirilememiştir. Yine de çeşme suyunda 120.saatte hareketli sperm hücresi görülmesi dikkatimizi çekmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Cinsel suçlarda kanıt arama tarihçesinde, önce sperm hücresinin aranması, sperm hücresinin olamayacağı durumlarda asit fosfataz testleri ve arkasından semeninin tespiti için prostat spesifik antijen aranması kronolojik olarak yer almıştır. Sırada ise yine semen içinde mevcut bir protein olan semenogelin vardır. Kanıt için en değerli yöntem genetik araştırmadır. Ancak hem pahalı hem de her merkezde bulunmaması bu yöntemin pratikte kullanımını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle kanıt toplarken tek bir yöntem tercih edilmemeli, birden fazla yöntemler(sitoloji, boyama teknikleri, PSA vs.) kullanılmalıdır. Özdemir H.(36), Seyalioglu İ. ve ark.(49) ve Eşiyok B. ve ark(50) da, yaptıkları çalışmalarda birden fazla yöntemin kullanılmasına işaret etmişlerdir.

5237 sayılı Yeni Türk Ceza Kanunu'nun(51), cinsel suçlarla ilişkili olarak 102/2 ve 103/2. maddelerinde yer alan “cinsel dokunulmazlığa karşı suçlarda; fiilin vücuda organ veya sair cisim sokulması” şeklindeki suçun nitelikli halinin ortaya çıkarılabilmesi için muayenede inspeksiyon dışında, laboratuvar bulguları da değerlendirilmelidir. Vajinal, anal ve oral swapların alınması, bu swaplarda semene dair biz izin olup olmadığının araştırılması en temel laboratuvar incelemelerindedir. Ancak Türkiye'nin periferindeki il ve ilçelerde yapılan pratik uygulama, çoğu zaman inspeksiyon ve alınan swapların direk yayma yapılarak boya yapılmaksızın incelenmesi şeklinde olmaktadır. Bilinmelidir ki azoospermi yada vazektomili erkek bireylerin, düz yada boyanmış preparatlarında sperm hücresini görmek oldukça güç bir durum oluşturmakta hatta hiç sperm hücresine rastlanılamamaktadır. Muayeneye getirilen şahsın da kendisine tecavüzde bulunan şahsın sperm konsantrasyonunu bilmesini bekleyemeyiz. Ayrıca “hasta yoktur hastalık vardır” deyiminden hareketle her vakanın öyküsü benzer görülse de birbirlerinden farklıdır. Kimi mağdur cinsel suçtan sonra hemen muayene gelmekte, kimisi duş alıp temizlenerek gelmekte, kimisi ise olaydan uzun bir süre sonra gelmektedir.

Bu gibi olaylarda sperm hücresini görmek esas bulgu da olsa asıl önemli olan semenin varlığıdır. Delil elde etme aşamasında; PSA kitlerinin kullanımının yaygınlaştırılması, birden fazla yöntemin (sitoloji, boyama, PSA kiti vs.) kullanılması ve sonuçların uzman adli bilimciler tarafından değerlendirilmesi gerektiği bir kez daha ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Pakurar A.S., Bigbee J.W., Digital Histology An Interactive CD Atlas with Review Text. A John Wiley & Sons, INC. Publication, United States of America, 2004; 183-86
2. <http://hypertextbook.com/facts/2000/EugeneKogan.shtml> (son erişim tarihi: 17.05.2010)
3. De Jonge C.J., Barratt C.L.R., The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Cambridge University Press, UK, 2006; 3-7
4. Cooper T., Noonan E., Eckardstein S., Auger J., Baker G., Behre H., Haugen T.B., Kruger T., Wang C., Mbizvo M.T., Vogelsong K., World Health Organization reference values for human semen characteristics, Human Reproduction Update. 2010;16(3):231–245
5. Kuehnel W., Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy. Printed in Germany by Appl,Wemding. 2003; 376-77.
6. Lerner K.L., Lerner B.W., World of Forensic Science. Printed in the United States of America, 2006; 575-76, 672
7. Di Maio DJ, Di Maio VJ. Forensic Pathology, CRC Press 2nd Edition, Florida, 2001; 456-58
8. Willott GM and Allard JE, Spermatozoa — their persistence after sexual intercourse. Forens Sci Int 1982; 19:135-154.
9. Brawer M.K., Prostate Specific Antigene. Marcel Dekker Inc. USA, 2001; 5
10. Rao A.R., Motiwala H.G., Karim O.M.A., The discovery of prostate-specific antigen. BJU Int 2007; 101: 5-1 0
11. Hernandez J, Thompson IM. Prostatespecific antigen. a review of the validation of the most commonly used cancer biomarker. Cancer 2004; 101 : 894–904
12. Heaney J. A., Allen M.A., Keane T., Duffy M.J., Prostate-specific antigen superior serum marker for prostatic carcinoma. Irish Journal of Medical Science 1987;156(5): 138-141

13. Amling C.L., Prostate-specific antigen and detection of prostate cancer: What have we learned and what should we recommend for screening? *Current Treatment Options in Oncology* 2006;7(5): 337-345
14. Lim Y.A., Park A.J., Kim Y.S., The Diagnostic Usefulness of Prostate-Specific Antigen and Prostate Acid Phosphatase in Prostatic Cancer. *Korean J. Clin. Pathol.* 1993;13(4): 529-535
15. Beebe-Dimmer J.L., Faerber G.J., Morgenstern H., Werny D., Wojno K., Halstead-Nussloch, B., Cooney K.A., Body Composition and Serum Prostate Specific Antigen: A Review and Findings from the Flint Men's Health Study. *Urology.* 2008; 71(4): 554–560
16. Saraiya M., Kottiri B.J., Leadbetter S., Blackman D., Thompson T., Matthew T. McKenna M.T., Stallings F.L., Total and Percent Free Prostate-Specific Antigen Levels among U.S. Men, 2001-2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(9): 2178-2182
17. Nadji M, Tabei SZ, Castro A et al. Prostatic-specific antigen: an immunohistologic marker for prostatic neoplasms. *Cancer* 1981; 48: 1229–32
18. Schumann GB, Badawy S, Peglow A, Henry JB., Prostatic acid phosphatase. Current assessment in vaginal fluid of alleged rape victims. *Am J Clin Pathol.* 1976; 66(6):944-52.
19. Poyntz FM, Martin PD., Comparison of p30 and acid phosphatase levels in post-coital vaginal swabs from donor and casework studies. *Forensic Sci Int.* 1984;24(1):17-25.
20. Graves HC, Sensabaugh GF, Blake ET., Postcoital detection of a male-specific semen protein. Application to the investigation of rape. *N Engl J Med.* 1985;312(6):338-43.
21. Sensabaugh GF. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *J Forensic Sci* 1978; 23: 106–15

22. Sensabaugh GF, Blake ET. Seminal plasma protein p30: simplified purification and evidence for identity with prostate specific antigen. *J Urol.* 1990;144(6):1523-6.
23. 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.
24. Maher J, Vintiner S, Elliot D, Melia L. Evaluation of the BioSign PSA membrane test for the identification of semen stains in forensic casework. *N Z Med J.* 2002;115(1147):48-9.
25. Levine B, Titus JM, Moore K, Fowler D. Use of prostate specific antigen in the identification of semen in postmortem cases. *Am J Forensic Med Pathol.* 2004;25(4):288-90
26. Sato I, Sagi M, Ishiwari A, Nishijima H, Ito E, Mukai T. Use of the "SMITEST" PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine. *Forensic Sci Int.* 2002; 127 (1-2) 71-74
27. Yokota M, Mitani T, Tsujita H, Kobayashi T, Higuchi T, Akane A, Nasu M. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test for forensic examination of semen. *Leg Med (Tokyo).* 2001, 3(3): 171–176
28. Simich JP, Morris SL, Klick RL, Rittenhouse-Diakun K. Validation of the use of a commercially available kit for the identification of prostate specific antigen (PSA) in semen stains. *J Forensic Sci.* 1999;44(6):1229-31.
29. Gallup G.G., Finn M.M., Sammis B., On the Origin of Descended Scrotal Testicles: The Activation Hypothesis. *Evolutionary Psychology* 2009;7(4):517-526
30. Ok E., Öz Z.S., Sperm hücrelerinde apoptoz. <http://www.androloji.org.tr/images/File/30.Say%C4%B1%20Pdf/I2.pdf> (son erişim tarihi:17.05.2010)
31. Culhane JF, Nyirjesy P, McCollum K, Casabellata G, Di Santolo M, Cauci S, Evaluation of Semen Detection in Vaginal Secretions: Comparison of Four Methods. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2008;60:274–281

32. Grossin C., Sibille I., Lorin de la Grandmaison G., Banasr A., Brion F., Durigon M., Analysis of 418 cases of sexual assault. *Forensic Sci Int.*, 2003; 131, 125-130
33. Riggs N., Houry D., Long G., Markovchick V., Feldhaus KM., Analysis of 1076 cases of sexual assault. *Ann. Emerg Med.* 2000; 35(4):358-62.
34. Oliveira Aded NL., Oliveira SF., Silva Dalcin BLG, Moraes TM., Cavalcanti MT, Children and adolescents victimized by sexual abuse in the city of Rio de Janeiro: An appraisal of cases. *Journal of Forensic and Legal Medicine.* 2007;14:216–220
35. Jänisch S., Meyer H., Germerott T., Albrecht UV., Schulz Y., Debertin AS., Analysis of clinical forensic examination reports on sexual assault. *Int J Legal Med.* 2010;124:227–235
36. Özdemir H., Seminal Sıvı ve Artıklarında p30 antijeni ve Spermatozoa Saptanmasına Yönelik Yöntem Çalışmaları, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üni. Tıp Fak. Adli Tıp AD. 1996.
37. Allard JE., Baird A., Davidson G., Jones S., Lewis J., McKenna L., Weston C., Scrimger D., Teppett G., A comparison of methods used in the UK and Ireland for the extraction and detection of semen on swabs and cloth samples. *Science and Justice.* 2007;47:160–167
38. Engelbertz F., Korda JB., Engelmann U., Rothschild M., Banaschak S., Longevity of spermatozoa in the post-ejaculatory urine of fertile men. *Forensic Science International.* 2010;194:15–19
39. Ingemann-Hansen O., Brink O., Sabroe S., Sørensen V., Charles AV., Legal aspects of sexual violence—Does forensic evidence make a difference?. *Forensic Science International.* 2008;180:98–104
40. Evers H., Heidorn F., Gruber C., Lasczkowski G., Riße M., Dettmeyer R., Verhoff M.A., Investigative strategy for the forensic detection of sperm traces. *Forensic Sci Med Pathol.* 2009;5:182–188
41. Kamenev L., Leclercq M., Detection of p30 antigen in sexual assault case material. *Journal of the Forensic Science Society.* 1990;30(4): 193-200

42. Talhith J., Chirachariyavej T., Peonim V., Atamasirikul K., Teerakamchai S., An Autopsy Report Case of Rape Victim by the Application of PSA Test Kit as a New Innovation for Sexual Assault Investigation in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2007; 90(2):348-51
43. Zisman A, Soffer Y, Siegel YI, Paz A, Lindner A. Postejaculation serum prostate-specific antigen level. *Eur Urol.* 1997;32(1):54-7
44. Celebioglu A., Katırcı N., Altunbas S., Akdemir B., Kaydırak B., Cinsel saldırı olaylarında seminal sıvıda Prostat Spesifik Antijen(PSA) varlığının değerlendirilmesi. *Adli Bilimler Dergisi* 2006;5(4):23-26
45. Lunetta P., Sippel H., Positive prostate-specific antigen (PSA) reaction in post-mortem rectal swabs: A cautionary note. *Journal of Forensic and Legal Medicine.* 2009;16:397–399
46. 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
47. Macaluso M., Lawson L., Akers R., Valappil T., Hammond K., Blackwell R., Hortin G., Prostate-Specific Antigen in Vaginal Fluid As a Biologic Marker of Condom Failure. *Contraception* 1999;59:195–201
48. Seyalioğlu İ, Çetin G. Semen Tespitinde Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması. 6. Anadolu Adli Bilimler Kongresi, 6-9 Eylül 2007, Manisa, Sözel ve Poster Bildirileri Kitabı, s: 23
49. Seyalioğlu İ, Eraslan B.Ş., Üzün İ., Çetin G. Otopsilerde alınan vajinal va anal sürüntü sonuçlarının değerlendirilmesi. *Adli Tıp Dergisi.* 2008; 22(2):21-31.
50. Eşiyok B, Yorulmaz C, Günay Balcı Y. Cinsel Saldırılarda Postkoital İnterval. *Adli Tıp Dergisi.* 2001; 15(2):84-92.
51. 5237 sayılı yeni Türk Ceza Kanunu, Legal Yayıncılık 2005

