

Sodyum Dodesil Sülfat ve Proteinaz K'nın Kullanılması İle Vajinal Sıvılardan Spermatozoanın İzalasyonu

Dr. Yasemin Feride POLAT (1), Dr. Hakan POLAT (2)

ÖZET

Cinsel suçlarda en sık olarak yapılan inceleme vajinal sıvılardan elde edilen ekstrelerde spermatozoidlerin tespiti. Sodyum dodesil sülfatla proteinaz K kullanarak, spermatozoidlerin dışındaki tüm hücre elemanlarını sindirmek mümkündür. Bu yöntem spermatozoidlerin izolasyonunda hızlı ve etkin bir yoldur. Normal metod başarısız kaldığında bu yöntemi kullanarak 8 ekstrede daha spermatozoidler tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Proteinaz K, spermatozoa, vajinal sıvı.

SUMMARY

The Isolation of Spermatozoa From Sexual Assault Swabs With Using Proteinase K and Sodium Dodecyl Sulphate

The most common examination in sexual offences is the identification of spermatozoa in aqueous extracts from swabs. Using proteinase K with sodium dodecyl sulphate, it is possible to digest all the cellular material apart from the spermatozoa, resulting in a quick and effective method of their isolation. Spermatozoa were detected in 8 extracts using this treatment when the normal method had failed to reveal all but one of them.

Key Words: Proteinase K, spermatozoa, vaginal swab.

GİRİŞ

Biyolojik materyalin incelenmesi ve değerlendirilmesi adli olayların aydınlatılmasında en önemli konudur. Yakın zamanda DNA teknolojisindeki gelişmeler sayesinde adli kovuşturmalar kapsamında elde edilen sperm örneğinden DNA'nın izole edilmesi ve failin genetik profilinin belirlenmesi olayın aydınlatılmasında önemli katkılar sağlamıştır. Özellikle cinsel saldırı olaylarında mağdurdan elde edilen saldırganın ait biyolojik materyal saldırının gerçekleşmiş olduğuna ve saldırganın ya da saldırganların kimliklerinin belirlenmesinde değerli bir kanıttır. Ülkemizde cinsel suçlar giderek artış göstermektedir. Bunların büyük bir çoğunluğu da ırza geçme vakalarıdır. Semen yönünden vajinal sıvıların incelenmesinde hücresel elemanlar arasından spermatozoid-

lerin tespiti rutin olarak yapılan bir iş olup, spermatozoidler az sayıda bulunduğu zaman alıcı olabilir.

Günümüzde vajinal sıvılar 1 ml. su içinde ekstre edilir ve 2-3 damla ekstre lam-lamel preparatının hazırlanması ve boyanmasından sonra mikroskopik olarak incelenir. Semen vajinal sıvı ile karışık olduğunda bu vücut sıvılarındaki çok sayıda hücrenin bulunması ile az sayıda spermatozoidlerin saptanması güçleşir. Spermatozoidlerin lokalizasyonu seçici olarak parçalanma suretiyle epitel hücrelerinin ortadan kaldırılması ile daha kolay ve hızlı bir biçimde yapılır (1).

Epitel hücrelerinin parçalanmasında kullanılan eritici karışımın ana elemanlarını sodyum dodesil sülfat (SDS) ve proteinaz (K) keratini hidroliz etme aktivitesi nedeniyle bu ismi almıştır (2, 3). Proteinaz K Tritirachium album mantarının hiflerinden elde edilir. SDS ise anyonik bir deterjan olup bir proteinin hidrofobik bölgelerine bağlanarak polipeptit zincirlerinin açılmasına yani proteinin denature olmasına yol açar. Proteinaz K denature olmuş proteinlere karşı kuvvetli bir proteolitik aktivite göstererek büyük polipeptit zincirlerini daha küçük moleküllere parçalar. Bu küçük moleküller özellikle molekülün

*İ.U. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı (1) Uzmanı,
İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi
(2) Uzmanı.*

ayrılma noktasındaki karboksil kısmındaki aromatik veya hidrofobik amino asit kalıntıları yönünden spesifikler (2). SDS ve Proteinaz K'nın kimyasal yapıları değişmeksizin uyumlu bir şekilde bir arada bulunması bu iki maddenin tercih edilen eritici bir karışım şeklinde başarılı olarak beraberce kullanılmasına olanak verir. Bu yöntemle disülfid bağlarından zengin olan spermatozoidler değişmeden kalırlar (2, 4).

Cinsel birleşme sonrası vajinal sıvılarda spermatozoidler az sayıda bulunduğu zaman gözden kaçma olasılığı çoğalır ve az sayıda bulunduğundan tespiti uzun zaman alır.

DNA yöntemine göre, daha ucuz, kolay ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle karmaşık olmayan vakalarda proteinaz K'nın kullanılmasıyla spermatozoidlerin lokalizasyonu, seçici olarak parçalanma sureti ile epitel hücrelerinin ortadan kaldırılması ile daha kolay ve hızlı bir biçimde yapılmasını amaçladık.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada 1996-1998 tarihleri arasında İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Doğum ve Hastalıkları Anabilim Dalında Gönüllü vericilerden alınan vajinal sıvı örnekleri incelendi. Cinsel birleşmeden sonraki 7 güne kadar çeşitli araklarla alınan 50 vericiye ait vajinal sıvılar alındı. İki ayrı işleme tutuldu, biri kontrol olarak kullanıldı, diğesinde ise proteinaz K yöntemi kullanıldı.

Çalışmada kullanılmak üzere Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) [Pro K, Tritirachium album type XI (Sigma, Poole UK)]'den elde edilen 1 mg proteaz (proteinaz K'yı), %2'lik SDS solüsyonunun her 100 ul'sine ilave etmek suretiyle hazırlandı. %2 SDS, 1.21 gr/1 Tris (0.1 M), 3.72 gr/1 EDTA disodyum 0.001 M ve 5.84 gr/1 sodyum klorid (0.01 M)'den oluşan bir ekstraksiyon tamponu içerisinde hazırlanarak son pH 8.2 olarak ayarlandı. SDS / Pro K solüsyonu -20°C'de 100 ul'lik bölümler halinde dondurularak çalışma gününe kadar saklandı.

Proteinaz K Yöntemi

- 1- Tüm vajinal sıvılar 1 ml distile su içerisinde 10.000 devirde 2 dakika süre ile santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
- 2- Pellete (sediment) 100 ul SDS/Pro K solüsyonu ilave edilip, oda sıcaklığında (25°C) 5 dakika beklemeye bırakıldı.
- 3- Daha sonra karışım 1 ml distile suda yıkandı ve 2 dakika santrifüj edildi.
- 4- Bu yıkama işlemi tekrar edildi.

5- Sediment (her zaman pellet şeklinde görülmez) yaklaşık olarak 20 ul distile suda süspansiyonu yapıldı.

6- Bu 20 ul'nin tamamı bir mikroskop lamı üzerinde dağıtıldı ve kurutuldu (sıcak bir madeni levha üzerinde). Bunsen alevinde ısıyla fiksasyondan sonra,

7- Lamalar Hematoksilin ile 5 dakika boyandı, çeşme suyunda çalkalandı.

8- Eozin ile 30 sn karşıt boyamaya tabi tutuldu. Distile suda yıkandıktan sonra, katı kısımlar sıcak bir madeni levha üzerinde kurutuldu ve neutral XAM'le bir lamelle kapatıldı.

SDS/Pro K karışımı kullanılarak her olguda kaydedilen spermatozoidlerin sayısı, orjinal 1 ml vajinal sıvı ekstresinden alınan 1 damlalık kontrol örneği ile karşılaştırıldı, boyanarak kapatıldı.

BULGULAR

İncelenen 50 vajinal sıvı arasından rutin yöntemle (kontrol) hazırlanmış olan 28 lam spermatozoidlerin varlığı yönünden pozitif olarak saptandı.

Kontrol preparatında spermatozoidler görülmez iken SDS/Pro K ile işlemten sonra aynı 28 vajinal sıvının yanısıra 8 tanesinde spermatozoidleri ihtiva ettiği belirlendi. Bu 8'in 3 tanesi cinsel birleşmeden sonraki 3 gün içerisinde alındı, geri kalan 5 tanesi ise cinsel birleşmeyi izleyen 4. 5. 6. ile 7. günleri arasında alındı (Tablo 1)

Gün	Kontrol ve SDS/ProK Pozitif	Kontrol ve SDS/ProK Negatif	Kontrol Negatif SDS/ProK Pozitif	Total
<1	5	-	-	5
2	16	-	2	18
3	4	3	1	8
4	3	2	1	6
5	-	6	2	8
6	-	2	1	3
7	-	1	1	2
Total	28	14	8	50

Tablo 1. 50 vajinal sıvı olgusunda spermatozoidlerin saptanması.

TARTIŞMA

SDS/Pro K ile işleme tabii tutulan ekstrelerin tümünde lamaların incelenmesi kontrol grubuna nazaran daha az zaman aldı. Lam zeminindeki materyalin azlığı nedeniyle mikroskopta küçük büyültme kullanılarak ilk araştırmayı yapmakta mümkün oldu. Bu yüzden görüş alanı da arttı. SDS/Pro K kullanımı sadece spermatozoidlerin tespitini kolaylaştırıp, hızlandırmaz, aynı zamanda yine araştırma alanı 1 veya 2 damla ile sınırlı iken tüm vajinal sıvı örneğinin öncelenmesine olanak sağlar. Vajinal sıvıda birkaç tane spermatozoid bulunduğu bunların gözden kaçırılması olanağı daha azdır. Vajinal sıvılarla ilgili bir başka bir sorunda *Candida Albicans*'a bağlı enfeksiyonun varlığı olabilir. Maya hücreleri büyüklük bakımından spermatozoidlere yakındır. Maya hücreleri SDS Pro K ile sindirilmesine rağmen sadece eozin boyasını alırlar, hematoksilen ile boyanmazlar, halbuki spermatozoidler her ikisi ile de boyanırlar.

Sonuç olarak, SDS/Pro K ile ön muamele böyle örneklerde spermatozoidlerin araştırılması güçlüğü azaltır. Irza geçme vakalarında birden fazla suçlu bulunduğu zamanlar hariç, DNA yöntemine göre kolay, hızlı, ucuz ve etkin bir izalasyon yöntemi oluşturması açısından adli olayların aydınlatılmasında yardımcı bir metot olarak katkıda bulunacağı inancındayız.

KAYNAKLAR

- 1- **Gill P, Jeffreys AJ and Werrett DJ.** Forensic applications of DNA fingerprints. *Nature* 1985; 318: 577-579.
- 2- **Morihara K and T Suzuki H.** Specificity of proteinase K from *Tritirachium album* Limber for synthetic peptides. *Agricultural and Biological Chemistry* 1975; 39: 1489-1492.
- 3- **Calvin HI and Bedford JM.** Formulation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *Journal of Reproductive Fertility* 1971; 13: 65-75.
- 4- **Chapman RL, Brown NM and Keating SM.** The isolation of spermatozoa from sexual assault swabs using proteinase K. *Journal of the Forensic Science Society* 1989; 29: 207-212.