

**BİYOLOJİK ÖRNEKLERDE P30 MARKERİ'NİN
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÖNTEMLERİ
KULLANARAK KANTİTATİF ANALİZİ**

Vildan VOLKAN
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Eylül – 2003

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonunca kabul edilen 01 10 81 numaralı proje kapsamında
desteklenmiştir.**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Vildan VOLKAN'ın Biyolojik örneklerde p30 markerının moleküler biyoloji yöntemleri kullanarak kantitatif analizi başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi.02.10.2023 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Yrd.Doç.Dr.Melih ZEYTİNOĞLU

Üye (İkinci Danışman) : Prof.Dr.Tülay İREZ

Üye : Doç. Dr.Kubilay UZUNER

Üye : Doç.Dr.Süleyman AYDIN

Üye : Yrd.Doç.Dr.Berrin TÜYLÜ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun

02.10.2023.....tarih ve22/4..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Orhan ÖZER
Fen Bilimleri Enstitüsü
M ü d ü r ü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOLOJİK ÖRNEKLERDE (SEMEN VE VAJİNAL ÖRNEKLERDE) P30 MARKERİ'NİN MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÖNTEMLERİ KULLANARAK KANTİTATİF ANALİZİ

VİLDAN VOLKAN

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd.Doç.Dr. Melih ZEYTİNOĞLU
İkinci Danışman: Prof.Dr. Tülay İREZ
2003, 43 sayfa**

Bu çalışmanın amacı daha önceleri farklı metodlarla (Elisa, cross-over elektroforez, rocket elektroforez vb.) tanımlanan p30'un bu yöntemlerden farklı olarak ELFA yöntemi ile saptanmasıdır. Adli tıpta cinsel saldırı olaylarının saptanması oldukça geniş bir yer tutmaktadır. Bunun için çeşitli testler ile spesifik semen markerları tespit edilmektedir. Vajinal sıvıdaki semeni ölçmek için kullanılan yöntemler asit fosfatazın (AP) enzimatik aktivitesinin biyokimyasal ölçümü ve PSA (Prostat spesifik antijen) veya monoklonal fare anti-semen 5 (MHS-5) antikoları ile seminal sıvı proteinlerinin immunoassay metodu ile saptanmasını kapsamaktadır. Çeşitli özellikteki semen ve vajinal örneklerde semen markerlarından p30'un ELFA ve ELİSA yöntemleri ile tayini yapılmıştır. Semen örneklerinin morfolojilerinin farklı olmasının p30 miktarını etkilemediği anlaşılmıştır. Ayrıca vajinal örneklerde zamana bağlı olarak p30 miktarının azaldığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: P30 (PSA), ELFA, ELİSA, Semen, Vajinal salgı

ABSTRACT**Master of Science Thesis****THE QANTITATIVE ANALYSIS OF P30 MARKER IN BIOLOGICAL
SAMPLES (SEMEN AND VAGINAL SWAB SAMPLES) USING
MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES****VİLDAN VOLKAN****Anadolu University
Graduate of natural and Applied Sciences
Biology Program****Supervisor: Asst. Assc. Prof. Melih ZEYTİNOĞLU
Second Supervisor: Prof. Dr. Tülay İREZ
2003, 43 pages**

The aim of this study is to identify the p30 by ELFA method which is different from Elisa, cross-over electrophoresis, rocket electrophoresis etc. Determining the sexual assault events occupies very huge place in forensic science. Therefore, the specific semen markers are being determined by various tests. The methods, which is used to measure the semen in vaginal swabs, contains the biochemical measurement of enzymatic activity of acid phosphatase and determination of seminal fluid proteins by the immunoassay method with PSA or monoclonal mouse anti-semen 5 (MHS-5) anticores. The p30 as a semen marker determined by ELFA and ELISA methods in various semen and vaginal samples. It is understood that the differences of morphology of the semen samples don't affect the quantity of the p30. Besides, the quantity of p30 in the vaginal samples were observed to be reduced depending on the time.

Keywords: P30 (PSA), ELFA, ELISA, Semen, vaginal fluid.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın başından sonuna kadar her türlü bilgi ve desteği sağlayan değerli danışman hocalarım Sayın Yrd.Doç.Dr. Melih ZEYTİNOĞLU ve Sayın Prof.Dr. Tülay İREZ'e,

Tez çalışmam için gerekli olan malzemeleri sağlayan Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonu Birimine,

Her türlü maddi ve manevi desteği sunan aileme ve ayrıca Canan AYDIN, Erdal BOZKURT ve Mehmet İMANÇER'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. SEMEN SALGILARI.....	3
2.1.1. Semen Hacmi.....	3
2.1.1.1. Seminal sıvının rengi.....	3
2.1.1.2. Görünüm ve koagülasyon.....	3
2.1.1.3. Ejakülatın koagülasyonunu ve likefaksitonunu sağlayan maddeler.....	4
2.1.1.4. Viskozite.....	4
2.1.2. Semen konsantrasyonu.....	4
2.1.2.1. Testis sekresyonları.....	5
2.1.2.2. Epididim sekresyonları.....	5
2.1.2.3. Seminal vezikül sekresyonları.	5
2.1.2.4. Prostat sekresyonları.....	6
2.1.2.5 Bulboüretal ve üretal bez sekresyonları.	6
2.2. SEMEN ANALİZİNDE KULLANILAN PARAMETRELER....	6
2.2.1. Fruktoz.	6
2.2.2. Prostatik asit fosfataz (PAP)	7
2.2.3. Sitrik asit.....	8
2.2.4. Çinko.....	9
2.2.5. Magnezyum.....	10

2.2.6. Kalsiyum.....	10
2.2.7. Askorbik asit.....	11
2.2.8. Siyalik asit.....	11
2.2.9. Laktik dehidrogenaz.....	12
2.2.10. İnhibin-aktivin.....	12
2.2.11. Lipidler.....	13
2.2.12. Kinin.....	13
2.2.13. Poliaminler ve katekolaminler.....	13
2.2.14. Asetilkolin.....	13
2.2.15. Spermin ve spermidin.....	13
2.2.16. Prostaglandinler.....	13
2.2.17. Prolaktin.....	13
2.2.18. Transferrin.....	14
2.2.20. MHS-5 Antijeni ve MHS-5 Antikoru.....	14
2.2.21. Prostat Spesifik Antijen (p30 antijeni, PSA).....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. MATERYAL.....	18
3.1.1. Kullanılan Gereçler.....	18
3.1.2. Örneklerin Hazırlanışı.....	18
3.1.2.1. Semen Örnekleri.....	18
3.1.2.2. Vajinal Örnekler.....	18
3.2. YÖNTEM.....	19
4. BULGULAR.....	22
4.1.1. BULGULARIN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ....	25
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
6. KAYNAKLAR.....	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1: Araştırmaya Katılan Kadınlarda Koitus Sonrası Günlere
Göre P30 Miktarlarının Ortalamaları (Yöntemlere Göre)**

25

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1.	PSA Kit bileşimi	19
3.2.	TPSA stripti	19
4.1.	Semen örneklerinin spermiyogram sonuçları ve p30 miktarları	23
4.2.	Vajinal örneklerde koitus sonrası geçen zaman ve Elfa yöntemiyle ölçülmüş p30 miktarı	24
4.3.	Vajinal örneklerde koitus sonrası geçen zaman ve Elisa yöntemiyle ölçülmüş p30 miktarı	24
4.4.	Hasta Gruplarına Göre P30 Miktarlarının Karşılaştırılması (Tek Yönlü Varyans Analizi)	25
4.5.	Semen Örneklerinde Elfa ve Elisa Yöntemlerinin Ölçümleri Arasındaki İlişki (Korelasyon Testi)	25
4.6.	Semen örneklerinde Elfa ve Elisa Yöntemleriyle Ölçülen P30 Miktarı Ortalamalarının Karşılaştırılması (Bağımlı Gruplarda T Testi)	25
4.7.	Araştırmaya Katılan Kadınlarda Koitus Sonrası Günlere Göre P30 Miktarlarının Elfa ve Elisa Yöntemlerine Göre Ortalama ve Standart Sapmaları (Yöntemlere Göre)	26
4.8.	Kadınlarda Koitus Sonrası Elfa ve Elisa Yöntemlerinin Ölçümleri Arasındaki İlişki (Korelasyon Testi)	26
4.9.	Kadınlarda Koitus Sonrası Elfa ve Elisa Yöntemleriyle Ölçülen P30 Miktarı Ortalamalarının Karşılaştırılması (Bağımlı Gruplarda T Testi)	27

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PAP	: Prostatik asit fosfataz
P30 (PSA)	: Prostat spesifik antijen
GGT	: Gama-glutamil transpeptidaz
LDH	: Laktik dehidrogenaz
ELİSA	: Enzym linked immunosorbent assay
ml	: Mililitre
ATP	: Adenozin tri fosfat
mmol/L	: Litredeki milimol miktarı
cAMP	: Siklik adenozin mono fosfat
mg/dl	: Desilitredeki miligram miktarı
FSH	: Folikül stimulan hormon
MHS-5 antijeni	: Monoklonal fare semen-5 antijeni
mg/ml	: Mililitredeki miligram miktarı
µg/L	: Litredeki mikrogram miktarı
ng/ml	: Mililitredeki nanogram miktarı
ELFA	: Enzym linked fluorescent assay
TPSA	: Total prostat spesifik antijen
AP	: Asit fosfataz

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Adli tıp alanında seksüel saldırı olaylarında bulunan çeşitli semenler ile iddia edilen tecavüzün belirlenebilme girişimleri sperm hücrelerinin mikroskopik kanıtlarına dayanmaktadır [1]. Araştırmacılar herhangi bir tip yüzey (vücut yüzeyi, giysiler, cisimler vb.) üzerindeki bir lekede veya sıvıda seksüel suçların kanıtı olarak kullanılabilir bir biyolojik materyal olan semene ulaşabilirler. Adli analizlerde, en sık ve en önemli problem kişilerin sperm örneklerinin tanısıdır ve DNA'nın araştırılması ile bu engel büyük oranda aşılabilmektedir. Semen lekesinin saklandığı koşullar belirgin olarak semenin biyokimyasal parametrelerinin stabilitesini etkileyebilir [2]. Genel erkek popülasyonunda %8-%10 oranında düşük sperm sayılı veya spermi olmayan erkeklerin bulunduğunu gösteren veriler bildirilmiştir. Benzer olarak vazektomide kullanılan yaygın bir kontrasepsiyon yöntemidir [3]. Azospermi veya vazektomiye bağlı olarak bazı erkeklerin semeninde spermatozoa olmaması ve bu nedenle ejeksiyon ve kanıt materyallerine sıklıkla sperm hücrelerinin yapışmasının olmaması nedeniyle PAP, PSA (p30), GGT, kolin , spermin ve laktat dehidrogenaz gibi semen sıvısı protein marker testleri bildirilmiştir. Kolin, GGT, spermin ve LDH testlerinin herbirinin önemli sakıncaları bulunmaktadır ve genele uygulanamazlar [1].

Semen asit fosfataz (PAP) her ne kadar semen konsantrasyonundan daha düşük konsantrasyonda olsa da diğer dokular ve sekresyonlarda da bulunmaktadır.Prostatik asit fosfatazın kemikte, osteoklastlarda, eritrosit, lökosit ve trombositlerde yüksek aktivitede olduğu bilinmektedir [4]. Ayrıca örnekler 20-25 ° C'nin üzerinde tutulduğu zaman PAP aktivitesinin ortadan kalktığı görülmüştür. Endojen vaginal kaynaklardaki veya birçok bitkisel materyallerdeki asit fosfataz aktivitesi yanlış pozitif sonuç verebilir. Enzim aktivitesi oda sıcaklığında saklandığında azalmaktadır. Bu nedenle küçük miktarlarda semen bulunabildiğinde iç çamaşırlarındaki veya vaginal tamponlardaki kurumuş semen lekelerinin eksatelerinde olduğu gibi asit fosfataz aktivitesi semene tek başına özellik kazandırmayabilir [1].

1983'te Suzuki ve ark. [5] seminal plazmada yüksek çinko olduğunu ve bunun seminal lekelerde kalitatif değerlendirme ile gösterilebileceğini ileri

sürmüşlerdir. Ancak daha sonraları koyu renkli giysilerde bu testin uygulanması sakıncalı görülmüştür [6]. İnsan seminal plazması prostatik orijinli olan yüksek miktarda çinko içermektedir [7]. Prostatik sekresyonlarda bulunan çinko, plazma çinkosuna göre daha düşük moleküler ağırlıklı proteinlere bağlı bulunmaktadır. Çinkonun spermatozoon fonksiyonu, sperm kromatin ve kondansasyon yeteniğini sağladığı, böylece spermatozoa fonksiyonlarında bir regülatör rolü oynadığı bilinmektedir [8]. Semen çinkosunun PAP aktivitesine göre daha stabil olduğu ancak çinko tayinlerinde kontaminasyonların çok önemli yeri olduğu bilinmektedir [6].

1978'de adli incelemelerde kullanılabilecek semen proteinlerinin tanımlanması araştırmasının bir parçası olarak Sensebaugh (California üniversitesi) ortalama moleküler ağırlıklı (yaklaşık olarak jel filtrasyonunda 30 kDa) ve ortalama yüklü ($pI = 6,5 - 8$ arasında) bir semen spesifik glikoprotein izole ve karakterize etmiştir. Ortalama moleküler ağırlığına dayanarak bu proteini p30 olarak adlandırmıştır [9]. Araştırmacılar p30'un uzun süre stabil kalabildiğini ve çeşitli dış etkenlere karşı duyarlı asit fosfataz aktivitesine göre çok daha duyarlı olduğunu ileri sürmüşlerdir [2]. P30 antijeni tecavüz soruşturmalarında semenin saptanması için gerekli olan bir ideal marker'ın birçok özelliğine sahiptir. Semende yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır, male -spesifik olduğu görülmektedir, postkoital azalması düzenli bir pattern izlemektedir, relatif olarak stabildir ve duyarlıdır. Cross-over elektroforez, rocket elektroforez ve Elisa ile araştırma yıllardır semen tanımlanmasında kullanılmaktadır.

Bu çalışmada p30 markerının çeşitli bireylerden alınan semen ve vajinal örneklerde ELFA ve ELİSA teknikleri ile saptanması ve bu iki yöntemin karşılaştırılması hedef alınmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SEMEN SALGILARI:

2.1.1.Semen Hacmi:

Normal ejakülat miktarı 2-6 ml (ortalama 3-4 ml) arasında değişmektedir. Semen hacminin ölçümü bazen tek başına genital sistemle ilgili bozukluklar hakkında bilgi verebildiği gibi, ejakülattaki toplam sperm sayısının belirlenmesi açısından da önemlidir.

Eğer volüm 1 ml' den az ise önce materyalin tamamının elde edilip edilmediği araştırılmalıdır. Ejakülatın spermden zengin ilk kısmının kaybolması volüm azlığı yanında sayı ve motilitenin bozuk çıkmasına da neden olabilmektedir.

Semen hacminin yaklaşık % 60-70'i veziküla seminalisten, % 20-25'i prostattan kaynaklanmaktadır.

Semen hacminin azalması **hipospermi**, artması ise **hiperspermi** olarak tanımlanmaktadır [10].

2.1.1.1.Seminal sıvının rengi:

Semenin rengi kendine has mat beyazdır (gri-beyaz-sedefi). Abstinans fazla olduğunda renk sarımsı veya gri-krem renkte olabilmektedir.

Semenin kendine has özel bir de kokusu vardır. Semen kokusunun prostat sekresyonlarından olan sperminin oksidasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir.

Bu kokunun olmayışı prostat fonksiyon bozukluğuna veya prostat enfeksiyonuna bağlı olabilir. Patolojik koşullarda idrar ya da kan da karışabilir [10].

2.1.1.2.Görünüm ve koagülasyon:

Ejakülasyondan hemen sonra semen sıvı halde olup hızla koagulum haline gelir. Bu geçiş farkedilmeyecek kadar çok kısa sürer. Koagülasyonu veziküla seminalis kaynaklı protein kinaz enzimi sağlamaktadır.

Koagülasyon olmayışı ejakülatör duktus tıkanıklığı ve agenezilerine ya da seminal keselerin konjenital yokluğuna bağlı olabilir. Bu durum seminal plazmada fruktozun olmayışı ile kendini belli eder. Semen hemen tamamı koagulum haline geçmekle birlikte çok az bir kısmı sıvı halde kalmış olabilir [10].

2.1.1.3.Ejakülatın koalüasyonunu ve likefaksiyonunu sağlayan maddeler:

Ejakülasyondan hemen sonra sperm pıhtılaşır. Bu olayın tam mekanizması açık değildir. Bu pıhtılaşma kandaki gibi değildir ve büyük olasılıkla prostat ön lobundan salgılanan vezikülazla olmaktadır. Vezikülaz ne trombin ne de fibrinojeni koagüle etmez zaten bunlar seminal plazmada da yoktur. Veziküla seminalisten gelen bazı koagülasyon faktörleri de etkilidir.

Likefaksiyon ejakülasyondan 5-20 dakika sonra görülür. Seminal plazmada likefaksiyonu sağlayan etkenler, prostat kökenli proteolitik enzimlerdir. Bunlar plazminojen aktivatörü (ürokinaz) ve kemotripsine benzer etki yapan seminindir.

2.1.1.4.Viskozite:

Ejakülasyondan 15-20 dakika sonra erimiş haldeki semen örneği hacim için pipetlenirken veya ölçme kabına aktarılırken viskozitesi de değerlendirilir. Viskozite fazla olduğunda semen serbest akışkanlık göstermez. Pipetle kaldırıldığında semenin kopmadan uzaması normal daha fazla uzaması ise viskozite artışını gösterir.

Viskozite artışı prostat enfeksiyonuna ve uygun olmayan kapların kullanılmasına bağlı olabileceği gibi, genital kanallar, prostat ve veziküla seminalis enfeksiyonlarına bağlı olabilir.

Viskozite artışının infertilite sebebi olmadığı, ancak sperm analizinde özellikle konsantrasyon tayininde problemlere yol açabileceği kabul edilmektedir.

2.1.2. Semen Konsantrasyonu:

Semendeki sperm sayısının ve motilitesinin değerlendirilmesi analizin en önemli kısmını oluşturur. Sperm konsantrasyonu, seminal sıvının bir ml'sinde bulunan sperm sayısıdır. Total sperm sayısı ise ejakülattaki toplam sperm sayısı olup, konsantrasyon ile ejakülat hacmi çarpılarak hesaplanır.

Azoospermia : Semende spermatozoa bulunmaması durumudur. Azoospermi, infertilite kliniğine başvuran hastaların % 10-20'sinde görülmekte olup, temel nedenleri testiküler tükenme ve duktus obstrüksiyonlarıdır.

Oligozoospermia : Sperm konsantrasyonunun 20 milyon / ml'den az olmasıdır.

Normozoospermia : Normal ejakülatür. Normal sperm konsantrasyonu 20 milyon/ml ile 350 milyon/ml arasında değişir.

Polizoospermia : 350 milyon/ml'den daha fazla sperm sayısını ifade eder [10].

Necrospermi: Tüm spermatozoonların ölü olmasına denir.

Teratozoospermi: Anormal spermatozoonların çok olmasına teratozoospermi adı verilir.

Testis haricindeki aksesuar bezlerin (seminal vezikül, prostat, bulboüretal ve üretal bezler) sekresyonlarını da içerir. Seminal sıvının büyük bir kısmını oluşturan seminal veziküller, toplam hacmin yaklaşık % 46-80'inden sorumludur. Prostat % 13-33, bulboüretal ve üretal bezler % 2-5, testisler ise % 5'inden sorumludur [11-13].

2.1.2.1 Testis sekresyonları:

Testisin semene katkısı miktar açısından az olmasına karşın, spermatozoonları içermesinden ötürü son derece önemlidir. Rete testis sıvısı androjenler ve androjen bağlayan proteinler yönünden zengindir; ayrıca transferrin ve inhibin de bu sıvı içinde bulunmaktadır [12,14-15].

2.1.2.2. Epididim sekresyonları:

Epididim kanalında, spermatozoon fonksiyonu bakımından önemli olan birçok kimyasal madde semene eklenir. Bu kanaldan semene katılan en önemli maddeler karnitin, inositol, lipidler ve fosfolipidlerdir. Epididim kanalında spermatozoonlar belli ölçüde hareketlilik kazanırlar [13,15].

2.1.2.3.Seminal vezikül sekresyonları:

Seminal vezikül fonksiyonunun yeterliliği, sperm motilitesi için oldukça önemlidir; bu fonksiyondaki azalma ile astenozoospermi arasında kuvvetli bir ilişki olup, ejakulata prolaktin, bikarbonat veya prostaglandinler (PG) gibi maddelerin eklenmesi ile motilitenin arttığı deneysel olarak gösterilmiştir. Seminal vezikül fonksiyonundaki azalma ile paralel seyreden sperm motilitesi üzerindeki negatif etkinin başlıca nedeni, bakteriyel enfeksiyonlardır [11,16].

2.1.2.4.Prostat sekresyonları:

Prostat sekresyonlarında bulunan çok sayıda enzim, semenin pıhtılaşması ile likefaksiyonunuda rol oynar. Prostat sekresyonlarındaki bakteriostatik bir amin olan spermin, spermatozoanın fosfat kristallerini oluşturur. Prostat sıvısında fazla miktarda asit fosfataz, sitrat, kalsiyum ve çinko da bulunur [14].

2.1.2.5.Bulboüretal ve üretral bez sekresyonları:

Bulboüretal bezler proksimal üretraya açılır. Mukoproteinlerden zengin olan salguları, üretranın lubrikasyonunu sağlar. Salgı miktarının az olmasına karşın, bu sekresyonlara özgü antisperm antikörlerin bulunduğu bildirilmiştir ve bu açıdan önemli olabilirler. Üretral bez sekresyonları, bulboüretal bez sekresyonları ile benzer niteliktedir [12,15,17].

2.2. SEMEN ANALİZİNDE KULLANILAN PARAMETRELER:

Semende bulunan protein, amin, karbonhidrat, lipid, ve elektrolitlerin bir kısmı genital kanalın belli bölümleri için özgün olup; seminal plazmadaki biyokimyasal yapıların tetkiki, erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde önem kazanmıştır. Seminal vezikül fonksiyonu açısından fruktoz düzeyi, prostat bezi için asit fosfataz düzeyi, epididim fonksiyonu için ise karnitin düzeyi önemli belirleyicilerdir [12]. Fertilizasyonun gerçekleşmesi için hem spermelerin normal olması hem de uygun semen bileşiminin olması gerekir [13,17]. Semeni oluşturan sekresyonların kaynaklandığı üç temel yapı olan seminal vezikül, prostat ve testis-vas deferens salgılarının semende bulunmasına “eucrasia” denirken; bunlardan herhangi birinin bulunmaması “dyscrasia” olarak adlandırılır [18].

2.2.1. Fruktoz:

Fruktoz ilk olarak 1946 yılında Mann tarafından [19] seminal vezikülün belirleyicisi olarak tanımlanmıştır. Fruktoz analizinde önceleri gaz kromatografisi ve kağıt kromatografisi kullanılırken, son yıllarda spektrofotometrik veya enzimatik yöntemler gibi özgün teknikler kullanılmaya başlanmıştır [16,19-20].

Seminal plazmanın fruktozu spermatozoalar için bir aerob ve anaerob enerji kaynağını oluşturur. İnsan semeninde fruktozun normal düzeyi 120-450 mg/100 ml'dir [21,22]. 120 mg/100 ml altındaki derişim genellikle seminal kesenin inflamasyonunu, androjen yetersizliğini, ejakulatuvar kanalların kısmi tıkanıklığını ya da yetersiz ejakulasyon gibi patolojiyi düşündürür. Seminal

keseenin konjenital yokluğunda ya da ejakulatuvar kanalların tam tıkanıklığında ejakulatta fruktoz bulunmaz [21].

Prostat ve seminal kesenin sekretuvar işlevi belirgin bir şekilde testosteronun işlevi altındadır ve semenin fruktoz miktarı androjen aktivitesinin iyi bir göstergesidir [21,23]. Testisten testosteron salınımının ölçümü yerine fruktoz tayini, ilgili organın salgı işlevini tayin etmede daha kolay olduğu gibi, ayrıca daha geçerli fizyolojik bir ölçümdür. Normospermili, fakat düşük fruktoz derişimli olan infertil hastalar vardır. Bu hastalar, androjen tedavisine duyarlıdır ve böyle tedaviyi takiben gebelikler yayınlanmıştır. Bu hastalara androjen verildiğinde seminal plazmalarındaki fruktoz miktarı belirgin şekilde artmıştır [23]. Cinsel yoksunluğun 6 günden fazla sürmesi halinde fruktoz düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Vas deferens tıkanıklığı olan hastalar ile azospermik olgularda fruktoz düzeyinin anlamlı olarak yükseldiği gözlenmiştir [24]. Semendeki fruktoz düzeyleri androjen kontrolü altında olmasına karşın, depolanma, ejakulasyon sıklığı, kan glukoz düzeyleri, beslenme durumu gibi birçok faktörler seminal plazma fruktoz derişimini etkileyebilmektedir [21].

İnsan sperminde glikolitik enerjinin major ya da tek kaynağını fruktozun oluşturduğu iddiasına karşıt yönde çalışmalar olup glukozun da enerji sağlama da en az fruktoz kadar rolü olduğu iddia edilmektedir [25].

2.2.2. Prostatik asit fosfataz (PAP):

Ejekülat sıvısında yüksek düzeylerde asit fosfataz bulunduğu ve prostat kanserli olguların kemik metastazlarında asit fosfataz düzeylerinin oldukça yüksek bulunduğu bilinmektedir. Asit fosfataz özellikle prostat kanserli olguların tanısı ve tedavilerinin izlenmesinde en çok kullanılan biyokimyasal parametrelerden biri olmuştur [26,27].

Asit fosfataz hemen hemen bütün vücut dokularında izozimleri olan bir enzimdir. İzozimlerinden bir tanesi de PAP'dır. Adından da anlaşılacağı gibi PAP en fazla prostat dokusunda bulunur. Aslında prostat dokusunda üç tane farklı asit fosfataz bulunmakla birlikte, sadece PAP prostata spesifik bir enzim olup diğer asit fosfatazlardan immünolojik olarak farklıdır. Yapılan immünolojik çalışmalar, asit fosfatazın karaciğer, beyin, akciğer, testis, mesane, kalp, dalak, deri ve trombositlerde az miktarda; normal ve malign lökositlerde, normal ve malign

pankreas adacık hücrelerinde, renal tübüler epitelde ve meme kanserli dokularda önemli miktarlarda bulunduğunu göstermiştir [26,28].

PAP, glandüler epitel hücrelerin lizozomal granüllerinde yer alır. Moleküler ağırlığı 100.000 olan ve iki identik alt birimden meydana gelen bir siyaloglikoproteindir. İzoelektrik noktası $pI=4.5-5.5$ arasında bulunduğundan asit fosfataz olarak adlandırılmıştır. PAP, molekül ağırlığı 110.000 olan prekürser olarak sentezlenir [26,29,30].

Prostatik asit fosfataz prostat tarafından salgılandığı için, prostat fonksiyonunun bir göstergesidir. Oldukça stabil bir enzim olduğundan, adli tıpta şüpheli materyalin semen olup olmadığının saptanmasında kullanılır [13,31-32]. Sperm konsantrasyonu ile semendeki asit fosfataz aktivitesi arasında belirli bir ilişki saptanmıştır. Azoospermik hastalarda asit fosfataz aktivitesi maksimum iken, sperm konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Daha sonra, asit fosfatazın sperm motilitesine, vitalitesine ve metabolizmasına etki ettiği anlaşılmıştır [32,33]. Yapılan çalışmaların bir kısmında prostatik asit fosfataz ile fertilité arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu ileri sürmüşler ve puberte ile birlikte semendeki asit fosfataz aktivitesinin hızla arttığını göstermişlerdir [33,34].

2.2.3. Sitrik asit:

İlk kez insan seminal plazmasında gösterilen sitrik asit bir β -hidroksitricarballic asittir [36,37]. Prostat sıvısının major kaynağı sitrattır. Prostat sıvısında 75 mmol/L olarak bulunurken, serumda 0.12 mmol/L olarak bulunur. Bu yaklaşık serumdakinden 615 defa yüksek demektir. Ortalama 3.76 g/L'dir [38]. Seminal plazmanın bir komponenti olarak bilinen sitratın seminal plazmadaki kaynağının prostat olduğu Huggins ve Neal tarafından gösterilmiştir [39]. Sitrata, prostatın ozmotik dengesini devam ettirmede önemlidir. Metal iyonlarının güçlü bir bağlayıcısıdır. Prostat bezinin fonksiyonunu bozan durumlarda seviyesi azalır, bu nedenle prostat bezinin fonksiyonunu ölçmede bir kimyasal indikatör olarak kullanılır [40].

Sitrik asit değerleri ile diğer sperm parametreleri arasında bir ilişki kurulamamış olup memeli semenindeki fonksiyonu kesin olarak bilinmemektedir [35,37,41].

Sitrat ilk defa 1930 yılında seminal plazmanın bir komponenti olarak belirlenmiş ve Huggins tarafından ayrıntılı olarak çalışılmıştır [39]. Prostat sekresyonunun major anyonudur. Yalnız prostat tarafından sekrete edilir. Metal iyonlarını bağlayarak, konsantrasyonlarını regüle eder. Sitrat prostatın ozmotik dengesinin korunmasında önemli bir rol oynar ve prostat sekresyonu için bir marker olarak kabul edilir [42,43].

2.2.4. Çinko:

Bütün canlı organizmalarda bulunan çinko, insanların normal gelişiminde ve seksüel olgunlaşmasında esastır. Membran yapısı ve fonksiyonlarının yürütülmesinde önemli rol oynar. Çinko; karaciğer, böbrek, kemik, retina, kas, pankreas ve prostatta yüksek miktarda bulunur ve yaklaşık yüz kadar enzimin yapısına girmektedir [44]

İnsan semeninin yüksek çinko konsantrasyonuna sahip olduğu ve bu çinkonun prostat orijinli olduğu Mawson ve Fischer tarafından gösterilmiştir. İnsanda prostat en çok çinko ihtiva eden dokudur [45].

Sağlıklı bir insanın seminal plazmasındaki çinko konsantrasyonu kan plazmasındakinin yaklaşık 140 katı kadar, prostat sıvısındaki konsantrasyonu kan plazmasındakinin 300 katı kadardır. Serum çinkosu ortalama $100\mu\text{g}/100\text{ ml}$, seminal plazmada ortalama $140\mu\text{g}/\text{ml}$ 'dir. Çinkonun prostatta birikimi androjenik aktiviteye bağlı bir olaydır. [46].

Çinkonun sperm üzerindeki fonksiyonları çeşitli araştırmacılar tarafından şöyle belirtilmiştir ;

- Sperm membranının bütünlüğünü artırır.
- Sperm motilitesini artırır.
- Sperm kuyruğunun helezoni hareketini artırır.
- Sperm adenil siklazını inhibe ederek, ATP sentezini artırır [47].

İnfertil şahıslarda semen çinko düzeyinin fertil şahıslara göre anlamlı ölçüde düşük olması, bu hastalarda çinko tedavisini de beraberinde getirmiştir. Takihara ve ark. semen çinko düzeyi düşük infertil hastalara çinko sülfat tedavisi uygulanmış ve iyi sonuçlar alındığını bildirmiştir [48].

Carreras'ın bir çalışmasında % motilite ile seminal plazma çinko değerleri arasında anlamlı bir negatif ilişki saptanmış olup; normal sperm fonksiyonu için

çinkonun gerekli olduğu, ancak aşırı yüksek seminal çinko düzeylerinin astenozoospermiye yol açabileceği bildirilmiştir [49]. Bu sonucu, infertil erkek olgularda uygulanan çinko tedavisinden sonra anlamlı olarak artan seminal çinko düzeyine eşlik eden ilerleyici motil sperm oranındaki artış da desteklemektedir [50].

2.2.5. Magnezyum:

Vücuttaki total magnezyumun yaklaşık yarısı kemikte kalsiyum ve fosforla kompleks yapmış halde, geri kalanı yumuşak dokularda bulunur. Normalde serum magnezyum seviyesi 1.85-2.20 mg/100 ml arasındadır [51].

Erkek genital sistemindeki diğer bezler, benzer magnezyum konsantrasyonlarına sahip olmalarına rağmen, insan prostat bezi ve seminal veziküller magnezyumca zengindir. Ejakulatlardan elde edilen çeşitli fraksiyonların analizleri ve asit fosfataz aktivitesine paralel olarak yapılan deneylerle semendeki magnezyumun da prostat orijinli olduğu anlaşılmıştır. Spermlerdeki ortalama magnezyum konsantrasyonu $3.7 \mu\text{g}/10^8$ sperm olarak bulunmuştur [52].

Fertilizasyonda enerji kaynağı olarak rol oynayan ATP'nin bu görevini yapabilmesi, magnezyum ile kompleksler teşkil etmesine bağlıdır [53].

2.2.6. Kalsiyum:

Kalsiyum hücre fonksiyonu için çok önemlidir. Bazı vücut sıvılarında fazla miktarda bulunur. İnsan sütünde ortalama 10 mmol/L iken, insan seminal plazmasında kalsiyum konsantrasyonu kan serum kalsiyumundan 3 ila 4 kat fazladır. Semen hem sıvı hem de sellüler bir kompartman olduğu için bu, özellikle ilginçtir. Semen kalsiyumu başlıca prostat kaynaklıdır, biraz da seminal keseden orijin alır. Seminal plazma kalsiyumunun, sitrat ile kompleksler yaptığı bilinmektedir [54].

Spermtazoalar ortamdaki kalsiyum konsantrasyonlarının değişiminden çok etkilenirler. Ortam iyonize kalsiyum ilavesinin sperm motilitesini başlattığı gözlenmiştir. Epididimal spermatozoaya kalsiyum ilavesi iyi, proressive bir motiliteye neden olur. Motiliteye etkisi yanında, kalsiyum birçok türün akrozom reaksiyonuna da iştirak eder [55].

2.2.7. Askorbik asit:

1932 yılında izole edilen askorbik asit moleküler ağırlığı 176.1 g olan bir ketolaktondur. Suda eriyen bir vitamin olan askorbik asit çoğu memelilerde sentez edildiği halde insanlarda bir enzim eksikliğinden dolayı sentez edilemez [56,57].

Semendeki miktarı yaklaşık 13 mg/dl olan askorbik asitin kan plazmasından son derece yüksek oluşu nedeniyle seminal plazmadaki biyolojik rolü ve önemine işaret edilmiştir [56]. Askorbik asit seminal plazmaya seminal veziküller tarafından verilir [58,59]. Askorbik asit glikolizisde rol oynayan cAMP konsantrasyonunu düşürür. CAMP'ye hangi mekanizma ile etki ettiği bilinmemekle beraber adenil siklaz enzimini inhibe edebileceği belirtilmiştir [60-61].

Biyolojik olarak,aktif redükte edici bir ajan olan askorbik asitin seminal plazmadaki nonspesifik sperm aglutinasyonunu tersine çevirerek insanda fertilitiyi düzelttiği gösterilmiştir [62].

Videla ve ark. [59] seminal askorbik asit düzeyleri arasında normospermik, oligospermik ve azospermik gruplar arasında fark bulamamıştır. Bazı araştırmacılar ise askorbik asit düzeyinin fertil grupta infertil gruba göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir [63,64]. Buna karşılık yapılan bir başka çalışmada en yüksek askorbik asit düzeylerini normospermik grupta saptamış olup bu ortalama azospermik grup ortalamasının 6 katından fazla bulunmuştur [65].

2.2.8. Sialik asit:

Nöraminik asitin ikinci karbonuna asetil grubu bağlanması ile meydana gelen yapı, N-Asetil Nöraminik asit (NANA) olarak adlandırılır. Ketozların önemli bir sınıfını teşkil eden sialik asitler 9 karbon atomu ihtiva eden nöraminik asidin asetillenmiş türevleridir. İnsan seminal plazmasında bulunan sialik asit N-asetil nöraminik asittir. Prostat ve seminal veziküllerden salgılanan bu asidin seminal plazma değeri değişmekle beraber yaklaşık 124 mg/dl'dir. İlk defa Odin tarafından domuz semenindeki sialik asidin varlığına dikkat çekilmiştir.

Çeşitli araştırmacılar, sialik asidin fertilizasyon olayında fizyolojik bir rol oynadığına dikkat çekmişlerdir. Bu asidin epididimisteki sperm matürasyonunda, iyonik dengenin sağlanmasında, spermatozoa ve epididim arasındaki antijenik

ilişkide, akrozom stabilizasyonunda, spermatozoanın yapısal bütünlüğünün sağlanmasında rolü vardır [65].

2.2.9. Laktik dehidrogenaz (LDH)

LDH, 150000 molekül ağırlıklı, dört polipeptit zinciri ihtiva eden regülatör bir enzimdir. LDH, glukozun laktata metabolik dönüşündeki son kademeyi kataliz etmektedir. Bu anaerobik şartlarda gerçekleşmektedir [66].

LDH'nın insan seminal plazmasındaki mevcudiyeti ilk olarak 1958 yılında Mac leod ve Wroblewski tarafından gösterilmiştir. 1963 yılında hem Blanko ve Zinkham hem de Goldberg, insan semeninde LDH-x olarak adlandırılan ek bir izenzimi tanımlamışlardır.

Semendeki LDH-x aktivitesi spermatogenezisin bütünlüğünü yansıtmaktadır. Her birey için ejakulattaki sperm sayısı ile LDH-x aktivitesi arasında iyi bir korelasyon olduğu bulunmuştur [67].

2.2.10 İnhibin-aktivin:

İnhibin ve aktivin yapısal benzerlikleri olan ve hipofiz bezine etki ederek FSH sekresyonunu etkileyebilen dimerik gonadal proteinlerdir.

İnhibin overde granüloza ve teka hücrelerinde, testiste Sertoli hücrelerinden salgılanan polipeptit yapıda bir hormondur. İnhibin selektif olarak FSH sekresyonunu inhibe eder. İnhibin B erkekte ve kadında(foliküler fazda) fonksiyoneldir. İnhibin A ise erkekte görülmez.

İnhibin yetişkin testisinde esas olarak Sertoli hücrelerinde daha az olarak da Leydig hücrelerinden salgılanır.

Aktivin ise FSH sekresyonunu simüle eder.

İnhibin ve aktivin moleküllerinin FSH üzerine olan etkileri yanısıra, gonadlara parokrin ve otokrin etkileri de vardır [68].

2.2.11. Lipidler:

Spermin ovumu fertilize edebilmesi için kadın genital sisteminde bir süre kalabilmesi ve bu yeteneği kazanabilmesi gerekir. Buna ' kapasitasyon' denir. Seminal plazmadaki lipidler ile spermin içinde bulunan lipidler arasındaki denge bozulursa kapasitasyon gerçekleşmez, yaşam süresi kısalmır.

2.2.12. Kinin:

Kallikrein ve kinin sisteminin sperm motilitesine etkisi Schille tarafından bulunmuştur. Kinin sperm hareketliliğini, fruktoz yapımını, oksijen yapımı ve kullanımını artırır ve yaşam süresini uzatır.

2.2.13. Poliaminler ve katekolaminler:

Sperm hareketinde etkili, protein özelliğinde yeni bulunan bir madde olan "FORWARD MOTILITY FACTOR" sperm ileri hareketini sağlar. Bu faktörün katekolamin içerdiği tahmin edilmektedir.

2.2.14. Asetilkolin:

Asetilkolin sperm membran sisteminde Ca^{++} iyonuna karşı geçirgenliği artırır. Bu yolla sperm akrozom reaksiyonu uyarır, motilite artırılır.

2.2.15. Spermin ve spermidin:

Prostat kökenli poliaminlerdir. Enzimatik olarak okside olduklarında yüksek bakterisit etki yaparlar. Ayrıca DNA molekülüne girip büyüme faktörü rolü oynadıkları sanılmaktadır.

2.2.16. Prostaglandinler:

Kaynağı veziküla seminalistir. Tip ve yoğunluğa bağlı olarak vazokonstriksiyon ya da vazodilatasyon yaparlar. A, B, E, F tipleri vardır. Prostaglandinler çok etkili ajanlar olup ereksiyon, ejakülasyon, sperm motilite ve taşınmasıyla testiküler ve penil kontraksiyonlarda rol alırlar.

2.2.17. Prolaktin:

Hipofiz ön lobunda ve Pars distaliste yapılan ve salınan Prolaktin, ekstra hipofizer kaynaklardan da izole edilmiştir. Prostatta ve seminal plazmada prolaktin sentezi yapıldığı araştırmalarla gösterilmiştir. Bu hormon 198 aminoasitten oluşan bir polipeptit zincirinden ibarettir.

Bartke prolaktinin spermatogenezde ve testisin androjenik fonksiyonlarında rol oynadığını göstermiştir. Segal ve arkadaşları 127 kısır erkekte yaptıkları bir araştırmada prolaktin seviyelerinin kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğunu göstermişlerdir [69].

2.2.18. Transferrin:

Transferrin (TRF;siderofilin) demir transportu için gerekli temel bir plazma proteinidir. Transferrin tek polipeptit zincirli bir glikoproteindir. Demir,

bakır, çinko, kobalt ve kalsiyum gibi birçok katyonu reversibl olarak bağlar. Transferrin yarılanma ömrü 4 gündür.

Transferrin karaciğerde, bir miktar lenfositlerde ve son yıllarda yapılan birçok çalışmada tespit edildiği gibi az miktarda da Sertoli hücreleri tarafından testislerde sentez edilir.

İnsan semeninde spermatozoanın yaşaması ve fonksiyonları için uygun ortamın sağlanması bakımından önemli birçok protein komponenti bulunur.

Transferrinin germ hücrelerinin gelişmesi ve diferansiasyonundaki önemi demirin germ hücrelerine transportuyla ilgilidir. Çünkü demir germ hücrelerindeki DNA sentezinin ve daha birçok biyokimyasal reaksiyonun başarılması için gereklidir [70].

2.2.19. MHS-5 Antijeni ve MHS-5 Antikoru:

MHS-5 antijeni ve MHS-5 antikoru yeni bir semen probu ve semen markeri olarak düşünülmüştür. Çünkü MHS-5 epitopu tüm test edilen donörlerde (vazektomili erkekleri de kapsayacak şekilde) semen içinde korunmaktadır; insan biyolojik sıvıları veya evcil hayvanların semenleri ile hiçbir çapraz reaksiyon gözlemlenmemiştir. 0,75 ng kadar düşük seminal sıvı proteinleri mevcudiyetinde bile pozitif identifikasyon veren sensitif, ucuz ELİSA yöntemi geliştirilmiştir. Ayrıca antijen, vaginal sıvılarda maskelenmemekte ve elimine edilmemektedir. Ve 4 saat vücut ısısında inkübe edilmiş vaginal sıvı ve semen karışımında saptanmaktadır. Ejaküle edilen sekresyonların major sağlayıcısı olan vesikula seminalis bu antijenlerin kaynaklandığı yerdir. Antijenik epitop ısıya dayanıklıdır ve birkaç ay önce toplanmış adli olaylarda da saptanmaktadır [1].

2.2.20. Prostat Spesifik Antijen (P30 antijeni, PSA)

P30 antijeninin, prostat epitelial hücreleri tarafından salgılanan proteolitik aktiviteye sahip bir glikoprotein olduğu belirtilmektedir [71,72].

Ultrastrüktürel lokalizasyon çalışmaları sonucu p30 antijeninin, prostatta küboidal asini hücrelerinin, granüllü endoplazmik retikulumunda sentezlendiği, sitoplazmik vezikül ve vakuollerle, lizozomlarda depolandığı ve asiner hücrelerin apikal hücre membranına taşındığı, burada ekzositozla salıverildiği gösterilmiştir [71,73,74].

PSA ilk kez 1971 yılında seminal plazmada Hara ve arkadaşları tarafından saptandı. γ seminoprotein adı verildi [75]. İki yıl sonra Li ve Beling de aynı proteini izole ederek bu proteine E₁ antijeni adını verdiler [76]. Bu protein düşük moleküler ağırlıklı olup (yaklaşık 31.000 D) ve agar elektroforezinde β mobilitesi göstermektedir. 1978 yılında Sensabaugh ilk kez doğru olarak bu semene spesifik proteinin elektroforez ile özelliklerini belirledi. Molekül ağırlığının 30.000 D ve izoelektrik noktasının 6,5-8 olduğunu saptayarak molekül ağırlığından dolayı p30 adı verildi [77]. 1979 yılında Wang ve arkadaşları prostat dokusundan bir antijen izole ettiler ve prostat dokusuna spesifik olduğunu gösterdiler [78]. Bu çalışma PSA'nın PAP'tan ayrı bir antijen olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Prostat dokusuna özgü olmasından dolayı PSA denmiştir. Daha sonra Wang ve arkadaşları seminal plazmada bulunan PSA'nın prostat dokusundan izole edilen PSA ile immünojenik ve biyokimyasal olarak benzer olduğunu gösterdi [79]. Son olarak Papsidero ve arkadaşları insan serumundan identifiye ettikleri PSA'nın prostatik dokudan elde edilenle aynı özellikte olduğunu saptadılar [78].

Bugünkü verilerimize göre γ - seminoprotein, protein-E, prostat spesifik antijen(PSA) ve p30 antijeni aynı proteolitik aktiviteye sahip bir glikoproteindir [71,73].

P30 antijeninin molekül ağırlığının 30.000-34.000 Dalton olduğu, %93'ü peptid ve %8'i karbonhidrat (%4.84 heksoz, %2.87 heksozamin, %0.25 sialik asit) olan tek polipeptitli bir glikoprotein olduğu bildirilmekte ve ayrıca 5 izomerinin bulunduğu gösterilmiştir [80,81].

P30 antijeninin nötral bir serin proteaz olduğu, kallikreine benzediği ve semen likefaksiyonunda seminal vesikül proteinlerinin (fibronektin, seminogelin I-II) parçalanmasından sorumlu olduğu belirtilmektedir P30 antijeninin primer yapısı ile ilgili tartışmalar sürmektedir [80,82].

P30 antijeninin aminoasit dizilimi ile ilgili çalışmalar hala sürmektedir. P30 antijeninin 19. kromozom üzerinde olduğu ve aynı bölgenin y-renin, epidermal büyüme faktörü ve sinir büyüme faktörü genini taşıdığı belirtilmektedir [83-85].

P30 antijeninin; oda sıcaklığında 24-48 saat (maksimum 4 gün), 4°C de 14 gün, -20 °C de dondurulduğunda 6 aydan 12 yıla kadar stabil kaldığı

bildirilmiştir [71]. Kamenev ve arkadaşları [86], p30 antijeninin kuru leke ve yayma olarak oda ısısında 10 yıl saklanabileceğini söylemektedirler. Poyntz [87], p30 antijeninin yayma kurutulduktan sonra yıllarca bozulmadan saklanabileceğini belirtmektedir.

Graves[88], vaginal örneklerde p30 antijeninin koitustan 27 saat sonrasına kadar saptanabildiğini, asit fosfataz için bu sürenin 14 saat olduğunu belirtmektedir. Kamenev [89] ise bu süreyi maksimum 47 saat olarak belirlemiştir.

Cinsel ilişkiden sonra seminal sıvı proteinlerinin (p30 gibi), hücresel elemanlardan (sperm gibi) daha hızlı bir şekilde denatüre olduğu ve alınan sürüntülerdeki protein miktarının ılık ve nemli şartlarda hızla denatüre olduğu çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir [87,89,90].

Yapılan çalışmalarda p30 antijeninin kan, tükürük, ter, nazal sekresyon, idrar, feçes ve menstrual kanda saptanamadığı belirtilmektedir [89].

P30 antijeninin vücut sıvılarındaki konsantrasyonu bireysel farklılıklar göstermekle birlikte, seminal sıvıda 0.5-2 mg/ml, serumda 0.90±ng/ml, idrarda 260 ng/ml seviyesinde bulunmaktadır [82,83,88].

Serumda yarılanma ömrü 2-3 gün olan p30 antijeninin, radikal prostatektomiden 2-6 hafta sonra, serumda tayininin yapılmadığı belirtilmektedir [71,91]. Çeşitli kaynaklardaki farklı p30 antijen değerlerinin p30 antijen ölçümünde kullanılan yöntemle, etnik kökene ve prostat volümüne bağlı olduğu belirtilmektedir [92].

Goldfard ve arkadaşları [93,94], 42 çocuk otopsisinin prostat dokusunda yaptıkları çalışmalarda p30 antijen konsantrasyonunun; doğumda yüksek olduğunu, 6. ayda tayin edilemeyecek kadar azaldığını, 10 yaş civarında yeniden yükselmeye başladığını ve puberte sonuna kadar seviyesinin yükseldiğini, böylece serum testosteron seviyesiyle direkt korelasyon gösterdiğini saptamışlardır.

Önceleri p30 antijeninin prostata spesifik bir belirleyici olduğu, başka hiçbir dokunun bu antijeni içermediği düşünülmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda p30 antijeninin prostata spesifik olmadığı, prostat dışında üretra, pararüretal bezler, mesane ve anal kanal gibi embriyolojik dönemde kloakadan

gelişen dokularda da immünoperoksidaz boyama ile gösterebildiği saptanmıştır [95,96].

Seminal sıvıda 0.5-2 mg/ml seviyelerinde bulunan p30 antijeninin, seminal plazmadaki total proteinlerin %10'unu oluşturduğu saptanmıştır [82,83].

İndirek immunofluorescence yöntemle semende spermatozoanın postakrozomal, boyun ve kuyruk bölgelerinde p30 antijeni gösterilmiştir [97].

P30, son yıllarda PAP ile birlikte prostat kanserinin tanısı ve tedavisinin izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaya başlanmıştır. Prostat kanserli olgularla yapılan çalışmalar, P30'un PAP'dan daha iyi sonuçlar verdiğini göstermektedir [98].

Bazı araştırmacılar idrarda bulunan ürokinazın P30'a yakın özellikler taşıdığını öne sürmüşlerdir. P30 ve ürokinazın aminoasit sıralanmaları incelenerek, birbirlerinden farklı oldukları ortaya konmuştur. Prostat dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunan çinko da P30'u inhibe eder. Prostat kanserli dokularda çinko düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Bu durumda, prostat kanserli dokularda P30 aktivitesinde artış beklenebilir. Kanserli prostat dokusunda P30 aktivitesinin yüksek oluşu, kanser tanısı ve mekanizması açısından değerli bilgiler verebilir. Bazı araştırmacılar; çinko düzeyinin azalması sonucu P30 aktivitesindeki artışın, kanserli prostat dokusunda görülen değişimlere yol açabileceğini ileri sürmektedirler [98].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL:

İstanbul üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın hastalıkları ve Doğum Kliniği ve Tüp Bebek Bölümü Androloji laboratuvarına başvuran hastalardan alınan 52 semen örneği ve 5 hastadan alınan vajinal sıvı ve 5 tane serum fizyolojik olmak üzere toplam 62 materyalle çalışmamız yapıldı.

Çalışmada toplanan semen materyalleri taze olarak çalışıldı. Ancak vajinal örnekler çalışma saatine 2-8 °C’de saklandı.

3.1.1. Kullanılan Gereçler:

Otomatik pipet
Santrifüj
Derin dondurucu
Eppendorf tüpler
Mikropipet uçları
Spor
Steril vaginal swab
Steril tüpler
Serum fizyolojik
ELFA cihazı (Biomrieux-MİNİVİDAS)
PSA kiti

3.1.2. Örneklerin Hazırlanışı:

3.1.2.1. Semen Örnekleri:

Semen örnekleri hastalardan alındıktan sonra önce spermiyogram testleri yapılarak semen örneklerinin morfolojileri ve içerdiği sperm miktarları ve çeşitleri belirlenmiştir. Çalışmaya alınmadan önce semen numuneleri 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant kısımları çalışmaya alınmıştır.

3.1.2.2. Vajinal Örnekler:

Vajinal salgılar hastalardan vajinal swab olarak adlandırılan steril pamuklu çubuklarla alınmıştır. Daha sonra içinde standart 1 cc serum fizyolojik bulunan steril tüplere alınmıştır. Swab üzerindeki sekresyonun serum fizyolojik içinde karışması sağlanır.

3.2. YÖNTEM:

3.2.1. Elfa yöntemi:

Çizelge 3.1. PSA kit bileşimi

TPSA Stripti	Kullanıma hazır
TPSA SPR	Kullanıma hazır SPR in iç yüzeyi monoclonal mouse anti-PSA immunoglobini ile kaplanmıştır.
TPSA Solusyonu	Kullanıma hazır Dana serumu + 0,9 g/l sodyum azide

SPR:

SPR (solid phase receptacle:katı faz kaplama) üretim sırasında monoclonal anti-PSA antiadileri (mouse) ile kaplanmıştır.

Çizelge 3.2.TPSA Stripti:

Kuyucuklar	Reagent
1	Örnek kuyucuğu
2-3-4-9	Boş kuyucuklar
5	Konjugat: monoclonal anti-PSA immunoglobulinleri (mouse) ile etiketli alkalın fosfataz + 0,9 g/l sodyum azide (400 µl)
6-7	Yıkama solusyonu : Tris (0,05 mol/l, pH : 7,4) + NaCl (0,4 mol/l) + tween (0,05%) + 0,9 g/l sodyum azide (600µl)
8	Solusyon : Tris (0,1 mol/l) + NaCl (0,1 mol/l) + dana serumu (5%) + 0,9 g/l sodyum azide (400µl)
10	Substratlı küvet : 4 metil – umbelliferyl fosfat (0,6 mmol/l) + dietanol amin (DEA) 0,62 mol/l veya 6,6%, pH : 9,2 + 1 g/l sodyum azide (300µl)

Ölçüm Prensibi:

Ölçüm prensibi iki adımlı enzim immunoassay sandviç metodudur. Son aşamada floresan madde ile okuma yapılır (ELFA: Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Reaksiyon SPR olarak adlandırılan kapsülde gerçekleşir. Numune SPR içine aktarılır (200µl) ve bu kapsülde reaktif ile reaksiyona girer. Örnekler SPR içinde birçok kere çevrilir. Bu operasyon örnekte var olan PSA'yı SPR'ın iç çeperinde yapışmış olan antiadibi ile birleştirmeye olanak sağlar. Numune içindeki

bağlanmamış antijenler yıkama yolu ile uzaklaştırılır. Alkalın-fosfataz işaretli antikor (PSA'ya spesifik) SPR içindeki Antigen-Antikor bileşiği ile reaksiyona girerek sandviç kompleksi oluşturur. Final tespit basamağı sırasında substrat (4-metil umbellifery fosfat) SPR içine çekilir. Konjugat enzim bu substratın floresan ürüne (4- metil umbelliferon) hidrolize olmasını katalizler. Bu madde 450 nm'de ölçülür. Işımanın şiddeti numunedeki PSA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Okuma sonucunda cihazın hafızasındaki kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak PSA'nın ng/ml cinsinden sonucu bulunur.

Elfa cihazının alt okuma sınırı 0,070 üst okuma sınırı ise 100 ng/ml'dir.

3.2.2. Elisa yöntemi:

PSA kit bileşimi:

- 96 kuyucuklu tavşan anti-PSA ile kaplanmış mikropate
- Zero Buffer, 7 ml
- 0, 2, 4, 15, 60 ve 120 ng/ml oranlarında PSA içeren standart solüsyon
- Enzim konjugat solüsyonu, 12 ml
- TMB solüsyonu, 11 ml
- Durdurucu solüsyon (1N HCl), 11 ml

Elisa yönteminde reaksiyon, mikropate kuyucuklarında gerçekleşir. Bu kuyucuklar tavşan anti-PSA antibodyleri ile kaplıdır. Antibody-enzim konjugat solüsyonunda monoklonal anti-PSA antibodyleri ile konjuge edilmiş attan elde edilmiş peroksidaz (HRPO: horseradish peroxidase) bulunur. Numuneler ilk aşamada oda sıcaklığında 60 dakika immobilize tavşan antibodyleri ile reaksiyona bırakılır. Kuyucuklar bağlanmamış antijenleri uzaklaştırmak amacıyla yıkanır. Daha sonra 60 dakika tekrar monoklonal anti PSA- HRPO konjugatı ile immobilize antijenin bağlanmasını sağlamak üzere beklenir. Bu aşamada PSA molekülleri ile enzimle bağlanmış antibodyler arasında sandviç oluşturulması amaçlanır. Kuyucuklar tekrar bağlanmamış etiketli antibodyleri uzaklaştırmak amacıyla su ile yıkanır. Daha sonra TMB solüsyonu eklenir ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakılır. Bu inkübasyon sonucunda mavi renk oluşur. Mavi renk oluşumunun ardından durdurucu solüsyon eklenmesi ile renk sarıya

dönüşür. PSA konsantrasyonu direk olarak numunedeki rengin keskinliği ile orantılıdır. Absorbans 450 nm de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Yöntem Prosedürü:

- 1- Her kuyucuğa 50 µl standart, numune ve kontroller konuldu.
- 2- 50 µl Zero Buffer eklendi.
- 3- 30 saniye kadar karıştırıldı.
- 4- Oda sıcaklığında (18-25 °C) 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 5- Kuyucuklar 5 kere distile su ile yıkandı.
- 6- Her kuyucuğa 100 µl Enzim Konjugat solüsyonu eklendi. Ve 5 saniye kadar karıştırıldı.
- 7- Oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 8- Kuyucuklar 5 kere distile su ile yıkandı.
- 9- 100 µl TMB solüsyonu eklendi. 5 dakika karıştırıldı.
- 10- Oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 11- 100 µl durdurucu solüsyon her kuyucuğa eklenerek reaksiyon durduruldu.
- 12- 30 saniye kadar karıştırıldı. Bu aşamada mavi rengin tamamen sarı renge dönüşmesi çok önemlidir.
- 13- 450 nm de okuma yapıldı

4. BULGULAR

Bu çalışmada normospermi, oligospermi, astenoteratospermi ve azospermi özelliklerini taşıyan semen örnekleri ile koitus sonrası zaman aralıkları farklı vajinal örneklerde ELFA ve ELİSA teknikleri ile p30'un analizi yapılmıştır.

Semen örneklerinin morfolojisi ile ELFA ve ELİSA yöntemleri ile saptanan p30 (PSA) miktarları çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Post-koital vaginal salgılarda ELFA ve ELİSA yöntemleri ile saptanan p30 miktarları ve koitus sonrası geçen zaman çizelge 4.2. ve çizelge 4.3.'de yer almaktadır.

Post-koital vaginal örneklerin zamana bağlı değişimi şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Bu eğriye göre zamana bağlı olarak total p30 değeri azalmaktadır.

Yapılan değerlendirme sonucunda 13 normospermik hastanın ELFA yöntemine göre ortalama p30 değeri 58,79 ng/ml olarak bulunmuştur. 13 oligospermik olgunun ortalama p30 değeri 60,29 ng/ml; 13 tane olan astenoteratospermik olguların ortalaması 58,62 ng/ml ve 13 azospermi vakasının ortalama değeri de 57,25 ng/ml olarak saptanmıştır. Tüm semen örneklerinde ortalama p30 değeri 58,74 ng/ml'dir.

ELİSA yöntemine göre 13 normospermik hastanın ortalama p30 değeri 32,33 ng/ml, 13 oligospermik olgunun ortalama p30 değeri 37,62 ng/ml; 13 tane olan astenoteratospermik olguların ortalaması 35,73 ng/ml ve 13 azospermi vakasının ortalama değeri de 34,19 ng/ml olarak saptanmıştır. Tüm semen örneklerinde ortalama p30 değeri 34,97 ng/ml'dir.

Koitus sonrası 1 gün geçen 5 vajinal örnekte ELFA yöntemi ile saptanan ortalama p30 değeri 37,05 ng/ml, 3 gün geçen örneklerde 17,04 ng/ml, 5 gün geçen örneklerde 4,18 ng/ml, 7 gün geçen örneklerde 1,22 ng/ml, 10 gün geçen örneklerde 0,22 ng/ml, 15 gün geçen örneklerde 0,09 ng/ml olarak saptanmıştır.

Aynı hastalarda ELİSA yöntemi ile yapılan çalışmalar sonucunda koitus sonrası 1 gün geçen 5 vajinal örnekte ortalama p30 değeri 21,39 ng/ml, 3 gün geçen örneklerde 10,57 ng/ml, 5 gün geçen örneklerde 1,90 ng/ml, 7 gün geçen örneklerde 0,34 ng/ml'dir. Ancak 10 günlük ve 15 günlük vajinal örneklerde p30 antijeninin ortalama miktarı 0,00 ng/ml'dir.

Bunların dışında non-koital 5 adet vaginal salgı örneğinde ELFA yöntemi ile yapılan çalışmaların tümünde p30 değeri <0,07 olarak bulunmuştur. Ayrıca serum fizyolojikle yapılan çalışmada da p30 değeri <0,07 olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Semen örneklerinin spermiyogram sonuçları ve p30 miktarları

Hasta no :	Spermiyogram sonucu	Elfa Yöntemiyle Saptanan P30 Değeri (ng/ml)	Elisa Yöntemiyle Saptanan P30 Değeri (ng/ml)
1	Normospermi	55,70	22,50
2	Normospermi	73,20	41,70
3	Normospermi	65,78	39,23
4	Normospermi	30,93	10,51
5	Normospermi	43,10	20,90
6	Normospermi	>100	65,10
7	Normospermi	71,25	43,19
8	Normospermi	89,49	50,13
9	Normospermi	48,84	22,77
10	Normospermi	56,95	32,10
11	Normospermi	28,72	13,20
12	Normospermi	45,23	25,70
13	Normospermi	55,12	33,29
14	Oligospermi	>100	72,00
15	Oligospermi	45,37	27,16
16	Oligospermi	72,29	49,37
17	Oligospermi	78,80	53,19
18	Oligospermi	41,12	18,30
19	Oligospermi	29,07	16,13
20	Oligospermi	39,50	27,17
21	Oligospermi	63,25	38,92
22	Oligospermi	>100	67,79
23	Oligospermi	72,11	40,57
24	Oligospermi	52,79	29,27
25	Oligospermi	62,35	36,75
26	Oligospermi	27,13	12,51
27	Astenoteratospermi	45,71	27,32
28	Astenoteratospermi	72,37	43,54
29	Astenoteratospermi	>100	62,39
30	Astenoteratospermi	23,78	12,92
31	Astenoteratospermi	54,22	29,43
32	Astenoteratospermi	37,10	19,26
33	Astenoteratospermi	75,59	41,17
34	Astenoteratospermi	>100	71,56
35	Astenoteratospermi	42,16	24,67
36	Astenoteratospermi	33,23	20,22
37	Astenoteratospermi	51,85	30,52
38	Astenoteratospermi	82,17	52,31
39	Astenoteratospermi	43,95	29,19
40	Azospermi	>100	69,97
41	Azospermi	57,26	30,19
42	Azospermi	>100	71,27
43	Azospermi	23,79	10,96
44	Azospermi	74,12	39,54

45	Azospermi	45,55	23,33
46	Azospermi	39,92	21,39
47	Azospermi	53,25	32,46
48	Azospermi	29,42	17,52
49	Azospermi	67,13	37,43
50	Azospermi	49,92	27,57
51	Azospermi	47,61	29,79
52	Azospermi	56,92	33,19

Çizelge 4.2. Vajinal örneklerde koitus sonrası geçen zaman ve Elfa yöntemiyle ölçülmüş p30 miktarı

Hasta no:	1. gün	3. gün	5. gün	7. gün	10. gün	15. gün
1	56,97	20,23	7,92	0,88	0,41	0,12
2	43,27	17,52	4,23	1,38	0,13	<0.070
3	34,41	19,43	3,16	1,62	0,19	<0.070
4	21,15	17,75	3,29	0,49	0,23	<0.070
5	29,45	10,29	2,31	1,76	0,75	0,16

Çizelge 4.3. Vajinal örneklerde koitus sonrası geçen zaman ve Elisa yöntemiyle ölçülmüş p30 miktarı

Hasta no:	1. gün	3. gün	5. gün	7. gün	10. gün	15. gün
1	31,25	14,96	3,57	0	0	0
2	26,30	10,27	1,92	0,63	0	0
3	19,56	9,19	1,10	0,51	0	0
4	12,65	7,23	1,72	0	0	0
5	17,23	6,24	1,23	0,59	0	0

4.1.1.BULGULARIN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRMESİ:

Çizelge 4.4. Hasta Gruplarına Göre P30 Miktarlarının Karşılaştırılması (Tek Yönlü Varyans Analizi)

Yöntem	Gruplar	Hasta sayısı	Ortalama	Standart Sapma	F	P
Elfa testi	Normospermi	13	58,79	20,99	0,037	0,990
	Oligospermi	13	60,29	24,05		
	Astenoteratospermi	13	58,62	24,99		
	Azospermi	13	57,25	23,35		
	Toplam	52	58,74	22,73		
Elisa testi	Normospermi	13	32,33	15,41	0,216	0,885
	Oligospermi	13	37,62	18,79		
	Astenoteratospermi	13	35,73	17,54		
	Azospermi	13	34,19	17,95		
	Toplam	52	34,97	17,06		

Araştırmaya katılan Normospermi, Oligospermi, Astenoteratospermi ve Azospermili grupların ölçülen P30 miktarları arasında her iki yönetime göre de istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Çizelge 4.5. Semen Örneklerinde Elfa ve Elisa Yöntemlerinin Ölçümleri Arasındaki İlişki (Korelasyon Testi)

	Elfa Testi P30 Miktarı Ölçümü Sonuçları
Elisa Testi P30 Miktarı Ölçüm Sonuçları	$r=0,975$ $p=0,001$ $N=52$

Araştırma grubuna dahil olan denekler üzerinde yapılan çalışma sonucunda elisa ve elfa yöntemleriyle ölçülen P30 miktarları arasında istatistiksel olarak pozitif yönde ileri derecede anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0,01$).

Çizelge 4.6. Semen örneklerinde Elfa ve Elisa Yöntemleriyle Ölçülen P30 Miktarı Ortalamalarının Karşılaştırılması (Bağımlı Gruplarda T Testi)

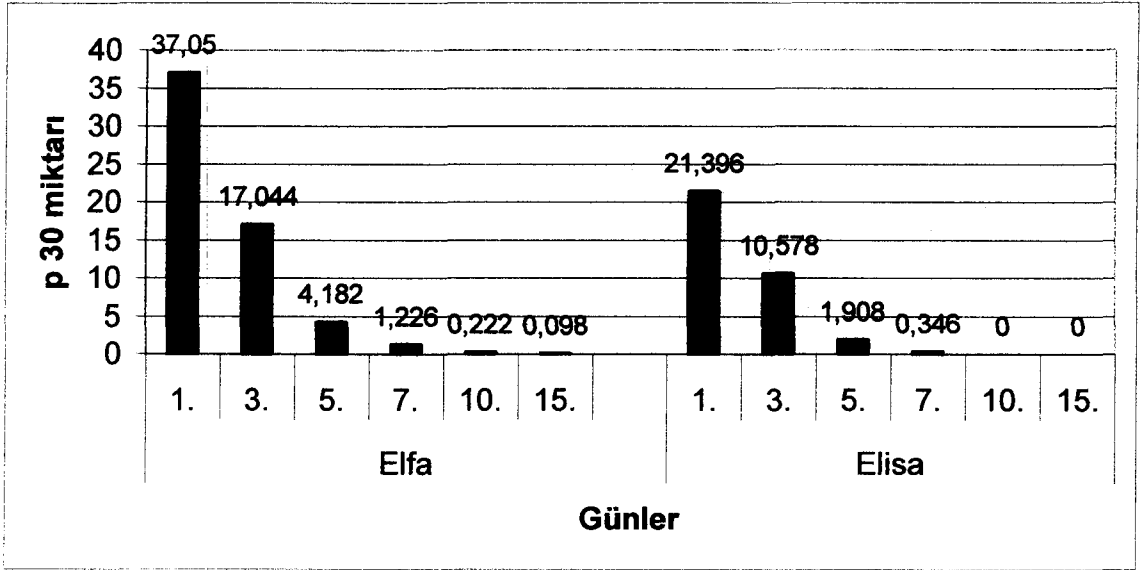
	Hasta sayısı	Ortalama	Standart Sapma	T	P
Elfa Testi	52	58,74	22,72	23,96	0,001
Elisa Testi	52	34,97	17,06		

Araştırma grubuna dahil olan denekler üzerinde yapılan çalışma sonucunda elisa ve elfa yöntemleriyle ölçülen P30 miktarları ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0,01$).

Çizelge 4.7. Araştırmaya Katılan Kadınlarda Koitus Sonrası Günlere Göre P30 Miktarlarının Elfa ve Elisa Yöntemlerine Göre Ortalama ve Standart Sapmaları (Yöntemlere Göre)

Yöntem	Gün	Hasta sayısı	Ortalama	Standart Sapma
Elfa	1.gün	5	37,05	13,72
	3.	5	17,04	3,94
	5.	5	4,18	2,19
	7.	5	1,22	0,53
	10.	5	0,22	0,11
	15.	5	0,09	0,04
Elisa	1.gün	5	21,39	7,39
	3.	5	10,57	3,26
	5.	5	1,90	0,98
	7.	5	0,34	0,31
	10.	5	0,00	0,00
	15.	5	0,00	0,00

Şekil 4.1: Araştırmaya Katılan Kadınlarda Koitus Sonrası Günlere Göre P30 Miktarlarının Ortalamaları (Yöntemlere Göre)



Çizelge 4.8. Kadınlarda Koitus Sonrası Elfa ve Elisa Yöntemlerinin Ölçümleri Arasındaki İlişki (Korelasyon Testi)

	Elfa Testi P30 Miktarı Ölçümü Sonuçları
Elisa Testi P30 Miktarı Ölçüm Sonuçları	$r=0,994$ $p=0,001$ $N=30$

Araştırma grubuna dahil olan denekler üzerinde yapılan çalışma sonucunda elisa ve elfa yöntemleriyle ölçülen P30 miktarları arasında istatistiksel olarak pozitif yönde ileri derecede anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p<0,01$).

Çizelge 4.9. Kadınlarda Koitus Sonrası Elfa ve Elisa Yöntemleriyle Ölçülen P30 Miktarı Ortalamalarının Karşılaştırılması (Bağımlı Gruplarda T Testi)

	Hasta sayısı	Ortalama	Standart Sapma	t	p
Elfa Testi	30	9,97	14,69	3,76	0,001
Elisa Testi	30	5,70	8,62		

Araştırma grubuna dahil olan denekler üzerinde yapılan çalışma sonucunda elisa ve elfa yöntemleriyle ölçülen P30 miktarları ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0,01$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ:

P30 antijeni [99] tecavüz vakalarında semen tayininde ideal bir marker olma özelliğine sahiptir. Semende yüksek konsantrasyonlarda bulunmakta olduğu bilinmektedir.

P30 post-coital vajinal örneklerde zamana bağlı olarak düzenli bir azalma göstermektedir ve Elisa metodu ile çok spesifik ve sensitivitesi yüksek bir ölçüm yapılmaktadır [100].

Çalışmada kullanılan ELİSA yöntemi ile vajinal swablarda koitus süresinden 1 gün geçmiş olan 5 örnekte ortalama P30 miktarı 21,39 ng/ml olarak saptanmıştır. Yine aynı örneklerde 3 gün sonra yapılan çalışmada ortalama P30 miktarı 10,57 ng/ml, 5 gün sonra yapılan çalışmada p30 ortalama değeri 1,90 ng/ml, 7 gün sonra yapılan deneylerde 0,034 ng/ml, 10 gün ve 15 gün sonra yapılan çalışmalarda ise bu değer 0 ng/ml olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada kullanılan ELFA yöntemi ile vajinal swablarda koitus süresinden 1 gün geçmiş olan 5 örnekte ortalama P30 miktarı 37,05 ng/ml olarak saptanmıştır. Yine aynı örneklerde 3 gün sonra yapılan çalışmada ortalama P30 miktarı 17,04ng/ml, 5 gün sonra yapılan çalışmada p30 ortalama değeri 4,18 ng/ml, 7 gün sonra yapılan deneylerde 1,22 ng/ml, 10 gün sonra yapılan çalışmada ortalama p30 değeri 0,22 ng/ml ve 15 gün sonra yapılan çalışmada ise bu değer 0,09 ng/ml olarak bulunmuştur. Bu durumda koitus sonrası geçen zaman arttıkça P30 miktarının azaldığı düşünülebilir.

Ayrıca Elfa yönteminde koitustan 10 ve 15 gün geçtikten sonra yapılan çalışmalarda p30 ölçümü yapılmışken, Elisa yönteminde 10 ve 15 günlük tüm numunelerde p30 antijeninin ölçümü 0 ng/ml olarak saptanmıştır.

Elfa yöntemi ile çalışılan non-koital 5 vaginal örneğin tümünde saptanan P30 miktarı <0,070 ng/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca serum fizyolojik ile kontrol amaçlı yaptığımız çalışmada bulunan P30 miktarı da <0,070 ng/ml'dir. Bu durumda bu değerlerin altında saptanan değerlerin P30 içeriği açısından anlamsız değerler olduğu düşünülebilir. Elisa yöntemi ile çalışılan non-koital 5 vaginal örneğin tümünde de P30 miktarı 0 ng/ml olarak bulunmuştur. Bu iki çalışma da

kadınlarda p30 antijeninin ancak koitus gerçekleştiği durumlarda ölçülebileceğini göstermektedir.

Stubbings ve arkadaşları (1985) yaptıkları çalışmada [96] seksüel saldırı vakalarında semen ve post-coital vaginal salgılarda GGT, p30, asit fosfataz tayinleri yapmışlardır. Bu çalışmalarda p30 tayinleri cross-over elektroforez tekniği ile 1/100'den 1/3000' kadar seyreltmelerde pozitif sonuçlar elde edebilmişlerdir.

P30'un cross-over ile yapılan analizinde 5 yıllık 22 °C'de saklanmış semen lekelerinde tanımlandığı ve hem 4 °C, hem de 37 °C'de saklanmış 10 haftalık lekelerde de saptandığı vurgulanmıştır. P30 identifikasyonunun ne 48 saatlik 37 °C'de ter, tükürük, idrar gibi vücut sıvıları ile in vitro inkübasyonundan ne de 8 günlük 37 °C'deki inkübasyondan etkilenmediği ortaya konmuştur [1,101,102].

Araştırmacılar P30'un Elisa ile tayinini yapmışlar, normal semen örneklerinde 1/10000 dilüsyonlarda tayin yapabilmişlerdir [90]. Bir vaginal post-coital swab örneğinde 3 gün sonra 1/500 seyreltmede p30 tayini yapabilmişlerdir. Araştırmacılar Elisa metodunun, p30 tayini için elektroforezden 100 kez daha sensitif olduğunu yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir [90]. Kamenev ve arkadaşları 1985'te yaptıkları bir çalışmada [100] sandwich enzim immunoassay testini p30 için uygulamışlar ve p30'un 1/1.000.000 dilüsyonda bile tayin edilebilirliğini göstermişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada Elisa yönteminin adli tıp vakalarında semenin kime ait olduğunun tanımlanması için oldukça spesifik, sensitif ve etkili bir metod olduğu saptanmıştır. Elisa ile yapılan araştırmaların çok çeşitli avantajlar sunmakta olduğu belirtilmiştir. Elisa'nın standart immunoelktroforetik metotlardan daha sensitif ve sperm araştırmalarında laboratuvarın harcamaları dikkate alındığında daha avantajlı olduğu bildirilmiştir. 1 ng/ml'den daha az P30'da bile testin sensitif olduğu saptanmıştır. P30 negatif fakat asit fosfataz pozitif örneklerin sperm açısından araştırılmasının gerekli olduğu belirtilmiştir .

Yapılan başka bir çalışmaya göre vaginal sıvıda semenin tanımlanması tecavüz mağdurunun iddia ettiği cinsel ilişkinin dökümantasyonunu sağlayabilir. Vazektomili ve normal erkeklerden alınan semen yüksek seviyelerde p30

içermektedir (1 ml seminal plazma başına 1,55 mg) ve erkeklerin idrarı ise düşük p30 içermektedir (ml başına 260 ng). Ayrıca vaginal sıvı ve idrar gibi kadınlardan alınan vücut sıvılarında bu antijen saptanmamıştır ve bu durum p30'un bir male-spesifik antijen olduğunu düşündürmektedir. P30 koitustan sonra ortalama 27 saat süresince vaginal sıvıda saptanabilir ve PAP ise 14 saat sonraya kadar saptanabilmektedir. Tecavüz soruşturmalarında semen saptanmasının p30 ile ölçülmesi PAP için enzim ölçümüne göre daha sensitif olduğu sonucuna varılmıştır [99].

Massibay ve arkadaşları [103] seminal lekelerde indirekt thin immunoassay (ince tabaka immunoassay) metodu ile p30 tayini yapmışlar, 20 hastada 50 ng'a kadar limiti olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda kullandığımız ELFA yöntemi ile 52 erkek hastanın 6 tanesinin semeninde 100 ng üstüne kadar p30 limiti saptanmıştır.

Elisa yöntemi ile yaptığımız çalışmada 52 semen örneğinin ortalama P30 değeri 34,97 ng/ml'dir. Bunlardan azospermik vakalarda ortalama P30 değeri 34,19 ng/ml olarak bulunmuştur. Oligozoospermik vakalarda bu değer 37,62 ng/ml, astenoteratospermik olgularda 35,73 ng/ml ve normospermik vakalarda ise 32,33 ng/ml'dir.

Elfa yöntemi ile yaptığımız çalışmada ise 52 semen örneğinin ortalama P30 değeri 58,74 ng/ml'dir. Bunlardan azospermik vakalarda ortalama P30 değeri 57,25 ng/ml olarak bulunmuştur. Oligozoospermik vakalarda bu değer 60,29 ng/ml, astenoteratospermik olgularda 58,62 ng/ml ve normospermik vakalarda ise 58,79 ng/ml'dir. Bu durumda azospermik bireylerin semeninde de P30 saptanması bu yöntemle adli amaçlı olgularda semenin varlığının saptanmasının mümkün olabileceğini göstermektedir.

ELFA va ELİSA yöntemleri ile yaptığımız p30 tayinleri sonucunda her iki yöntem açısından tüm semen grupları içerisinde (normosperi, oligospermi, azospermi, astenoteratospermi) p30 miktarları açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p < 0,05$). Bu da ELİSA yönteminde olduğu gibi ELFA yönteminde de azospermili bireylerde p30 tayininin yapılabildiğinin göstergesidir. Semen örnekleri üzerinde yapılan değerlendirme sonucunda ELİSA ve ELFA yöntemleri ile ölçülen p30 miktarları arasında istatistiksel olarak pozitif yönde

ileri derecede anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p < 0,01$). Ayrıca yine semen örneklerinde ELFA ve ELİSA yöntemleri ile ölçülen p30 miktarı ortalamalarının karşılaştırılması yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p < 0,01$). ELFA yöntemi ile yapılan çalışmalardaki ortalama p30 değerinin aynı örneklerde ELİSA yöntemiyle saptanan ortalama değerlerden yüksek olması ve p değerinin $< 0,01$ olarak belirlenmesi ELFA yöntemi ile yapılan p30 ölçümlerinin ELİSA yönteminden daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Vajinal salgılarda koitus sonrası ELİSA ve ELFA yöntemleri ile yapılan p30 ölçümleri sonucunda yapılan değerlendirmede iki yöntemle ölçülen p30 miktarları arasında istatistiksel olarak pozitif yönde ileri derecede anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p < 0,01$). Ayrıca bu iki yöntemle ile ölçülen p30 miktarı ortalamalarının karşılaştırılması yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p < 0,01$).

P30 membran testlerinin üreticileri bu çalışmanın verilerini kullanarak 4 ng/ml kadar düşük P30 seviyelerinin bile saptanabileceğini vurgulamaktadırlar. Böylece 1,3 milyonda bir dilue edilen seminal sıvı saptanabilir. Yapılan çalışmada 1:50.000 ile 1:1.000.000 arasında dilue edilen seminal sıvıda her 3 membran testi de P30'u saptamak için yeterli olduğu ve Elisa'ya dayalı ölçüm yöntemleri ile aynı sensitiviteyi sunmakta olduğu bildirilmiştir [104]. İdrar örneklerinde P30 saptanması küçük miktarlardaki prostat sıvısı veya prostatit gibi inflamatuvar süreç veya bening prostat hiperplazisi sonucu olabilir.

P30 membran testlerinin Elisa ile aynı sensitiviteyi sunduğunun bilinmesinden beri birçok laboratuvar için uygulanabilir bir alternatif oluşturmaktadır [104].

Bizim çalışmamızda kullanılan ELFA tekniğinin de Elisa yöntemine alternatif olabileceği düşünülmüştür. Öncelikle Elfa yöntemi Elisa yönteminden daha kısa zamanda sonuç vermektedir. ELFA yöntemi ile 1 saat gibi bir zamanda p30 için ölçüm yapılırken ELİSA için bu zaman yaklaşık 3,5 saattir. ELFA yönteminde okuma aşamasında floresan madde ile ölçüm yapıldığı için güvenilirlik sınırı artar. Ayrıca kullanılan ELFA cihazının tekrar edilebilirlik düzeyi ve optik okuyucunun güvenilirliği yüksektir. ELFA tekniğinin daha pahalı ancak doğruluk bakımından ELİSA'dan daha üstün olduğu düşünülmektedir.

Bunların dışında ELİSA yönteminde teknisyenden kaynaklanabilecek pipetleme hataları ELFA yönteminden daha fazla gerçekleşebilmektedir.

Serumun tersine, seminal plazmadaki P30 değerleri etkilenmemektedir. Çünkü P30, immunohistokimyasal olarak sadece prostatla değil aynı zamanda periüretal bezlerde de saptanabilmektedir. Seminal plazmadaki pH değerleri sitrat tarafından ayarlanırken, pH ve P30 negatif bir korelasyon göstermektedir. Ayrıca diğer semen parametrelerinin hiçbiri (hacim, dansite, canlılık, lökosit, maturasyon oranı, morfoljik kriterler, fruktoz, karnitin, elastaz) seminal plazmadaki P30'u etkilememektedir. P30 tanı ve prostat kanserli hastaları izlemede en önemli tümör markerıdır. Serumda P30'un artışı malign olmayan prostat değişiklikleri kadar prostat kanserinin de bir sonucu olabilir [105]. P30'un proteolitik etkileri dakikalar içinde koagüle ejakulatı sıvılaştırmaktadır fakat Dube ve arkadaşları vizköz semen örneklerinde P30'un azalmadığını saptamışlardır [106]. Yapılan bir başka çalışmada ise semen P30 konsantrasyonunun serum P30 konsantrasyonunun yaklaşık 10^6 katı olduğu belirtilmiştir [107].

Bizim kullandığımız P30 (PSA) antibody'si de aynı zamanda serum örneklerinde P30'un saptanmasına olanak sağlamaktadır. Yani hem semen örneklerinde ve vaginal örneklerde P30'un adli amaçlı saptanmasına hem de P30'un ölçümü yapılarak prostat kanseri tanısının yapılabilmesine olanak sağlamaktadır.

Yaptığımız çalışma sonucunda post-coital vaginal örneklerde p30'un koitus sonrası 2 hafta geçmiş olan vajinal örnekler ve non-koital vajinal örneklerle göre daha yüksek okuma değerleri verdiği görülmüştür. Buna göre adli amaçlı p30 tayininde ELFA yönteminin kullanımının uygun olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca ELFA yöntemiyle yapılan ölçümlerde azospermili ve oligospermili örneklerde de p30'un okuma değerlerinin sırasıyla 57,25 ve 60,29 ng/ml oranında saptanması yine adli amaçlı çalışmalarda ELFA yönteminin kullanımının uygun olabileceğini düşündürmektedir.

Daha sonra yapılabilecek çalışmalarda ELFA yöntemi ile p30'un çeşitli semen örnekleri ve vajinal örneklerdeki referans değerlerinin saptanması ile adli olgularda p30'un tayini için spesifik bir yöntem haline getirilebileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. HERR, J.C., SUMMERS, T.A., MCGEE, R.S., SUTHERLAND, W.M., SIGMAN, M. ve EVANS, R.J., *Characterization of a Monoclonal Antibody to a Conserved Epitope on Human Seminal Vesicle-Specific Peptides: A Novel Probe / Marker System for Semen Identification*, *Biology of Reproduction*; **35**, 773-784, (1986).
2. VERDEJO, A.J., OSUNA, E., OLIVARES, E.G. ve LUNA, A., *Study of the Enzymatic of GGT, LDH, PAP and PSA in Semen Stains, Application to Age Calculation*, *Forensic Science International*; **68**, (1994).
3. STEINMAN, G., *Rapid spot Tests for Identifying Suspected Semen Specimens*, *Forensic Science International*; **72**, 191-197, (1995).
4. HOOFT, P. ve VOORDE, H., VANDE , *Evaluation Modified Zinc Test and the Acid Phosphatase Test as Preliminary Screening Methods in Sexual Assault Case Material*, *Forensic Science International*; **53**, 135-141, (1992).
5. SUZUKI, O., ASANO, M., KIDO, A., ve OYA, M., *Zinc Test as a New Tool for Identification of Semen Stains*, *Forensic Science International*; **22**, 231-235, (1983).
6. HOOFT, P. ve VOORDE, H., VANDE, *The Zinc Tests as an Alternative for Acid Phosphatase Spot Tests in the Primary Identification of Seminal Traces*, *Forensic Science International*; **47**, 269-275, (1990).
7. MAWSON, C., ve FISCHER, M., I., *Zinc Carbonic Anhydrase in Human Semen*, *Biochemistry*; **55**, 696-699, (1953).
8. ARVER, S., ve ELIASSEN, R., *Zinc and Zinc Ligands in Human Seminal Plasma* , *Acta Physiol Scand*; **115**, 217-224, (1982)

9. GRAVES, H.B., SENSABAUGH, G.F. ve BLAKE, E.T. *Postcoital Detection of a Male-Specific Semen Protein*, The New England Journal of Medicine; **312**(6): 338-343, (1985).
10. SEZEN, Ş., *Semen Analizlerinden Bazı Parametrelerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, (1998).
11. GONZALES, G.F., GARCIA-HJARLES, M.A. ve GUTIERREZ, R., *The Secretory Activity of the Seminal Vesicles and Its Relation Ship to Sperm Motility*, International Journal of Andrology; **12**: 286-294, (1989).
12. JEQUIER, A.M. ve CRICH, J.P., *Semen Analysis*, Blackwell Scientific Publication USA; 1-145, (1986).
13. ÖZGÜNEN, T., *Semen Analizi Labaratuvar El Kitabı* , Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.B.D. Adana, (1993).
14. ALEXANDER, N.J., *Male Evaluation and Semen Analysis in Gynecology and Obstetrics (Ansbacher R.)* Saunders, Michigan; 460-482, (1983).
15. SETCHHELL, B.B., *Infertility Pathophysiology of Spermatogenesis and Sperm Transport in Textbook of Genito-Uriner Surgery Investigation and Treatment of Male Infertility*, Churchill Livingstone Edinburgh, London; 1120-1168, (1985).
16. COOPER, T.G., WEIDNER ve W., NIESCHALG, *The Influence of Inflammation of the Human Male Genital Tract on Secration of the Seminal Fructose and Citric Acid*, International Journal of Andrology; **13**: 336-339, (1990).
17. AMELER, R.D. ve DUBIN, L., *Semen Analysis- Male Infertility*, W. B. Saunders Company, England; 1-159, (1977).
18. GONZALES, G.F., *Functional Structure and Ultrastructure of Seminal Vesicles*, Archieves of Andrology; **22**: 1-13, (1989).
19. JUNGREIS, E., NECHAMA, M., PAZ, G. ve HOMONNAI, T., *A Simple Spot Test for the Detection of Fructose Deficiency in Semen*, International Journal of Andrology; **12**: 195-198, (1989).

20. DREDEN, P.V., RICHARD, P. ve GONZALES, J., *Fructose and Proteins in Human Semen*, *Andrology*; **21**: 576-579, (1989).
21. WALSH, P.C., GITTES, R.F., PERLMUTLER, A.D. ve STAMEY T.A., *Campbell's Urology, 5 th Ed.*, W. B. Saunders Company Philadelphia, 256-257, 259, 260, 652, (1986).
22. İMRAN, A.H. ve TURAN, O., *Klinik Tanı Laboratuvarı*, Sermet Matbaası, İstanbul , 3. bs. ; 561, (1985).
23. ELIASSON, R., *Biochemical Analysis of Human Semen in the Study of the Physiology and Pathophysiology of the Male Accessory Genital Glands*, *Fertility and Sterility*; **19**, 344-350, (1968).
24. GONZALES, G.F., GARAC-HJARLES, M. ve NAPUR, R., *Corrected Seminal Fructose Levels: Index of Secretory Activity of Seminal Vesicles*, *Archives of Andrology*; **21**: 135-142, (1989).
25. PETERSON, R.N. ve FRENCH, M., *Factors affecting fructose utilization and Lactic Acid Formation by Human Semen. The Role of Glucose and Pyruvic Acid*, *Fertility and Sterility*; **22**(10): 639, 644, (1971).
26. HELLER, J.E., *Prostatic Acid Phosphatase: Its current clinical Status*, *The Journal of Urology*; **137**: 1091-1103, (1987).
27. PONTES, J.E., *Biological Markers in Prostate Cancer*, *The Journal of Urology*; **130**, 1037-1047, (1983).
28. WARHOL, M.J. ve LONGTINE, J.A., *The Ultrastructural Localization of Prostate Specific Antigen and Prostatic Acid Phosphatase in Hyperplastic and Neoplastic human Prostates*, *The Journal of Urology*; **134**: 607-613, (1985).
29. BOYER, P.D., *The Enzymes Volume IV, Hydrolysis*. Academic Press, New York –London,: 455-498, (1971).
30. WAHEED, A. ve VAN ETTEN, R.L., *Biosynthesis and Processing of Prostatic and Lysosomal Acid Phosphatases in a Prostate Carcinoma Cell Line PC-3 S F 12*, *Cancer Research*; **46**: 4796-4803, (1986).
31. ANDO, S., CARPINO, A., BUFFONE, M., MAGGIOLINI, M. ve GIACCHETLO, C., *Prostatic Acid Phosphatase and Zinc Levels in the*

- Seminal Plasma of Varicoceles*, International Journal of Fertility; **35**: 249-254, (1990).
32. CROTTAZ, B., REY, F., SENN, A., GERMOND, M., REYMOND, M.J. ve GOMEZ, F., *FSH Bioactivity in Idiopathic Normogonadotropic Oligoasthenozoospermia*, Fertility and Sterility; **57**: 1034-1045, (1992).
 33. HOOFT, P.J. ve VANDE VOORDE, H.P., *The Zinc Test as an Alternative for Acid Phosphatase Spot Test is in the Primary Identification of Seminal Traces*, Forensic Science International.; **47**: 269-275, (1990).
 34. LAHRAY, A. ve BHATTACHARYYA, A.K., *Phosphate , Zinc Calcium, Citric Acid and Acid Phosphatase in Human Ejaculates as Related to Coagulation Iliquefaction*, Archieves of Andrology; **19**: 275-283, (1987).
 35. KANYO, A. ve SAS, M., *Citric Acid Contents in the Ejaculate, Significans of Its Determination in Andrological Diagnostics*, İnt. Urol. Nephrol, 7(1): 83-87, (1975).
 36. HUGGINS, C., SCOTT, W.W. ve HEHEN J.H., *Chemical Composition of Human Semen and of the Secretions of the prostate and of the Secretions of the Prostate and Seminal Vesicles*, Am J. Physiol; **136**: 467-473, (1942).
 37. MANN, T. ve LUTWAK-MANN, C.,(EDS), *Male Reproductive function and Semen*, The Lavenham Press Ltd. , Essex; 24, 305-318, (1981).
 38. DONALD, S.C., *The Biochemistry and Physiology of the Prostate and Seminal Vesicles*, Campbell's Urology; W.B. Saunders Company, (1986).
 39. HUGGINS, C. ve NEAL, W., *Coagulation and Liquefaction of Semen. Proteolytic Enzymes and Citrate in Prostatic Fluid*, J. Exp. Med.; **76**: 527,(1942).
 40. COOPER, J.F. ve FARID, J., *The Role of Citric Acid in the Physiology of the Prostate*, J. Surg., Res. **3**: 112-121, (1963).

41. ACKERMAN, D.R., *Variation Due to Freezing in the Citric Acid Content of Human Semen*, Fertility and Sterility; **22**: 58-60, (1971).
42. COFFEY, D.S., *The Biochemistry and Physiology of the Prostate and Seminal vesicles*, Campbell's Urology, Saunders Co. Philadelphia ; **1**: 253-290, (1986).
43. HOMONNAI , Z.T., MATZKIN, H. ve FAINMAN, N., *The Cation Composition of the Seminal Plasma and Prostatic Fluid and Its Correlation to Semen Quality*, Fertility and Sterility ; **29**: 5, (1978).
44. GORDON, E.F. ve PASSAL, D.B., *Medical Progress Zinc Metabolism. Basic Clinical and Behavioral Aspects*, J. Pediatr., **99**: 341-349, (1981).
45. MAWSON, C.A. ve FISCHER, M.I., *Zinc in Aspermic Human Semen*, Nature, **177**: 190, (1956).
46. HARTOMA, T.R. ve NETTER, A., *Zinc, Plasma Androgens and Male Sterility*, Lancet, **İ**: 1125-1126, (1977).
47. LEAKE, A. ve CHRISHOLM, G.D., *Subcellular distribution of Zinc in the Benign and Malignant Human Prostate: Evidence for a Direct Zinc Androgen Interaction*, Acta. Endoc., **105**: 281-288, (1984).
48. TAKIHARA, H., COSENTINO, J.M. ve COCKETT, T.K., *Effect of Low-Dose Androgen and Zinc sulfate on Sperm Motility and Seminal Zinc Levels in Infertile Men*, Urology, **12**(2), 160-164, (1983).
49. CARRERAS, A. ve MENDOZA, C., *Zinc Levels in Seminal Plasma of Fertile and Infertile Men*, Andrologia, **22**: 279-283, (1990).
50. TIKKIWIAL, M., AJMERG, R.L. ve MARTHUR, N.K., *Effect of Zinc Administration on Seminal Zinc and Fertility of Oligozoospermic Males*, Indian J. Physiol. Pharmacol, **31**: 30-34, (1987).
51. STEGMAYR, B. ve HELLMAN, B., *Calcium, Magnesium and Zinc Contents in Organelles of Prostatic Origin in Human Seminal Plasma*, Scand. J. Urol. Nephrol., **16**(3):199-203, (1982).
52. PAPADIMAS, J., BONTIS, J. ve IKKOS, D., *Seminal Plasma Zinc and Magnesium in Infertile Men*, Arch. Androl., **10**: 261-268, (1983).
53. LEHNINGER, A.L., *Principles of Biochemistry*, Worth Publ., New York, 209-270, (1982).

54. ARVER, S. ve SJOBERG, H.E., *Calcium fractions in Seminal plasma and Functional Properties of Human Spermatozoa*, Acta. Physiol. Scand., **116**: 159-165, (1982).
55. BABCOCK, D.F. ve HUTCHINSON, T., *Calcium Redistribution in Individual Cells Correlated with Ionophore Action on Motility*, International Journal of Andrology, **3**: 130-142, (1982).
56. DAWSON, E.B., HARRIS W.A. ve POWELL, L.C., *Relationship Between Ascorbic Acid and male fertility*, World Rev Nutr. Diet. **62**:1-26, (1990).
57. KAPLAN, L.A. ve PESCE, A.J., *Clinical Chemistry*, The CV Mosby Company, St. Louis, 573-669, (1984).
58. EDGAR, J.A., *Dehydroascorbic Acid and Cell Division*, Nature; **227**: 24-24, (1970).
59. VIDELA, E., BLANCO, A.M. ve GALLI, M.E., ET AL : *Human Seminal Biochemistry, Fructose, Ascorbic Acid, Citric Acid, Acid Phosphatase and Their Relationship with Sperm Count*, Andrologia; **13**(3): 212-214, (1981).
60. BAYSAL, A., *Askorbik Asit ve Chediak-Higashi Sendromu*, Beslenme ve Diyet Dergisi **6**(1): 154, (1977).
61. HOSKINS, D., *Adenin Nucleotid Mediation of Fructolysis and Motility in Bovine Epididymal Spermatozoa*, J. Biol Chem **248**: 1135-1140, (1973).
62. HARRIS, W.A., HARDEN, T.E. ve DAWSON, E.B., *Apparent Effect of Ascorbic Acid Medication on Semen Mental Levels, Fertility and Sterility*, **32**: 455-459, (1979).
63. KOETS, P. ve MICHELSON, L., *Relation Between Ascorbic Acid Content and Quality of Human Semen, Fertility and Sterility*, **7**(1), : 15-17, (1956).
64. VAISHWANAR, P.S. ve DESHKAR, B.V., *Ascorbic Acid Content and Quality of human Semen*, Am J. Obstet Gynecol., **95**: 1080-1082, (1966).

65. ÇARPINOĞLU, MEHMET, *Sperm Motilitesinde Rol Oynayan Faktörlerden Spermatozoa Üçlü ATPaz Aktivitesine Semende Bulunan Askorbik Asit, Sialik Asit ve Sitrik Asidin Etkileri*, Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniv. Tıp Fak. Üroloji A.B.D., (1992).
66. POLAT, ÖZKAN, *Bening Prostat Hiperplazisi, Prostat Kanseri, Prostatit Vakalarında; Serum ve Prostatik Sekretle Laktik Dehidrogenaz ve Prostatik Asit Fosfataz enzimlerinin seviyeleri*, Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniv., Tıp Fak. Üroloji A.B.D. , (1991).
67. KİRİŞÇİ, L., *Semende Fruktoz Derişimi ve LDH, Alfa-Amilaz ve Pepsinojen Aktiviteleri ile İnfertilite Arasındaki İlişkinin Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniv. Tıp Fak. Biyokimya A.B.D., (1989).
68. ÖZKAN, K. U., *Testis Torsiyomunda Karşı Taraf Testis Hasarının İnhibin B ile Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniv. Tıp Fak. Çocuk Cerrahisi A.B.D., (2000).
69. BALOĞLU, A., *Erkek İnfertilitesinde Prolaktinin Sperm Dansitesi ve Motilitesi Üzerine Etkisi*, Uzmanlık Tezi, Ege üniv. Tıp Fak. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D., (1985).
70. TÜRKMEN, B., *İnfertil ve Fertil Erkeklerde Sperm Sayısı ve Seminal Plazma Transferrin Düzeylerinin Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı, Şişli Etfal Hastanesi, (1992).
71. ARMBRUSTER, D.A., *Prostate Specific Antigen: Biochemistry, Analytical Method and Clinical Application*, Clinical Chemistry; **39**(2): 181-195, (1993).
72. LİLJA, H., *Significance of Different Molecular Forms of Serum PSA*, Urol. Clin., North Am.; **20**(4): 681-686, (1993).
73. BILHARTZ, D.L., TINDALL D.J. ve OESTERLING, J.E., *Prostate-Specific Antigen and Prostatic Acid Phosphatase: Biomolecular and Physiologic Characteristics*, Urology; **38**: 95-102, (1991).
74. TURKES, A., NOTT, J.P. ve GRIFFITHS, K., *Prostate Specific Antigen: Problems in Analysis*, Eur J Cancer, **27**(5): 650-652, (1991).

75. HARA, M., KAYANAGI, Y., INOVE, T. ve FUKUYAMA, T., *Some Physico-Chemical Characteristics of "Semino Protein", and Antigenic Component Specific for Human Seminal Plasma*, Japan Journal of Legal Medicine , **25**; 322-324, (1971).
76. LI, T.S., ve SHULMAN, S., *Immunoelectrophoretic Analysis of Human Seminal Plasma Fractions by Various Methods*, Journal of Fertility; **16**: 87-100, (1971).
77. SENSABAUGH, G.F., *Isolation and Characterization of a Semen Specific Protein From Human Seminal Plasma : A Potential New Marker for Semen Identification*, Journal of Forensic Sciences; **23**: 106-115, (1978).
78. PAPSIDERO, L.D., WANG, M.C., VALENZUELA , L.A., MURPHY, G.P. ve CHU, T.M., *A Prostate Antigen in Sera of Prostatic Cancer Patients*, Cancer Res.; **40**: 24248, (1980).
79. WANG, M.C., VALENZUELA, L.A., MURPHY, G.P. ve CHU, T.M., *A Simplified Purification Procedure for Human Prostate Antigen*, Oncology; **39**: 1-5, (1982).
80. BRAWER, M.K., *Prostate Specific Antigen*, Acta Oncologica; **30**(2): 161-168, (1991).
81. SENSABAUGH, G.F. ve BLAKE, E.T., *Seminal Plasma Protein p30: Simplified Purification And Evidence For Identity With Prostate Specific Antigen*, The Journal of Urology; **144**: 1523-1526, (1990).
82. LILJA, H., *Structure, Function and Regulation of the Enzym Activity of Prostate Specific Antigen*, The Journal of Urology; **11**: 188-191, (1993).
83. HARA, M. ve KIMURA, H., *Two Prostate Specific Antigens , Gama-Seminoprotein and B-Microseminoprotein* , J. Lab. Clin. Med.; **113**(5): 541-548, (1989).
84. SCHALLER, J., AKIYAMA, K., TSUDA , I., HARA, M., MARTI, T. ve RICKLI, E.E., *Isolation, Characterization and Amino-Acid Sequence of Gama-Seminoprotein, A Glycoprotein From Human Seminal Plasma*, Eur J Biochem; **170**: 111-120, (1987).

85. LUNDWALL, A. ve LILJA, H., *Molecular Cloning of Human Prostate Specific Antigen cDNA*, Eur Biochem Soc.; **214**(2): 317-322, (1987).
86. KAMENEV, L., LECLERCG, M. ve GENARD C.H., *Detection of p30 Antigen in Sexual Assault Case Material*, Journal of Forensic Science Society; **30**(4): 193-200, (1990).
87. POYNTZ, F.M. ve MARTIN, P.D. *Comparison of p30 and Acid Phosphatase Levels in Post-Coital Vaginal Swabs From Donor and Casework Studies*, Forensic Science International; **24**: 17-25, (1984).
88. GRAVES, H.B., SENSABAUGH, G.F. ve BLAKE, E.T. *Postcoital Detection of a Male-Specific Semen Protein*, The New England Journal of Medicine, **312**(6): 338-343, (1985).
89. KAMENEV, L., LECLERCG, M. ve GERARD, C.F., *An Enzym Immunoassay for Prostate-Specific p30 Antigen Detection in the Postcoital Vaginal Tract*, Journal of Forensic Science Society; **29**(4): 233-241, (1989).
90. STUBBINGS, N.A. ve NEWALL, P.J., *An Evaluation of Gama Glutamyl Transpeptidase (GGT) and p30 Determinations for the Identification of Semen on Postcoital Vaginal Swabs*, Journal of Forensic Sciences; **30**(3): 604-614, (1985).
91. YANG, M., *Endogenous Antibody to Prostate-Specific Antigen in Women*, Clinical Chemistry; **34**(3): 647-648, (1988).
92. SENSABAUGH, G.H. *Isolation and Characterization of a Semen-Specific Protein From Human Seminal Plasma: A Potential New Marker for Semen Identification*, Journal of Forensic Sciences; **23**: 106-115, (1978).
93. GLODFARD, D.A., STEIN, B.S., SHAMZADEH, M. ve PETERSON, R.O., *Age-Related Changes in Tissue Levels of Prostatic Acid Phosphatase and Prostate Specific Antigen*, Journal of Urology; **136**: 1266-1269, (1986).
94. OESTERLING, J.E., JACOBSEN, S.T., CHUTE, C.G., GUESS, H.A., GİRMAN, C.J., PANSER, L.A. ve LIEBER, M.M., *Serum Prostate-*

- Specific Antigen in a Community-Based Population of Healty Men.* JAM; **270**(7): 860-864, (1993).
95. KAMOSHIDA, S. ve TSUTSUMI, Y., *Extraprostatic Localization of Prostate Localization of Prostatic Acid Phosphatase and Prostate Specific Antigen: Distribution in Cloacogenic Glandular Epithelium and Sex- Dependent Expression in Human Anal Gland.*, Human Pathology; **21**(11): 108-111, (1990).
96. POLLEN, J.J. ve DREILINGER, A., *Immunohisto-Chemical Identification of Prostatic Acid Phosphatase and Prostate Specific Antigen in Female Periurethral Glands*, Urology; **23**(3): 303-304, (1984).
97. HERR, J.C. ve WOODWARD, M.P. *An Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA) for Human Semen Identification Based on a Biontynylated Monoclonal Antibody to a Seminal Vesicle-Specific Antigen*, Journal of Forensic Sciences; **32**(2): 346-356, (1987).
98. GIDON, Y., *Prostat Kanseri Tanısında, Serum Prostatik Asit Fosfataz (PAP) ve Prostat Spesifik Antigen(PSA) Düzeyleri Yanı sıra Yeni Bir Parametre: Siyalik Asit; Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (1991).*
99. HOWARD,C.B., GRAVES,M.D., SENSABAUGH,G.F. ve BLAKE,E.T., *Postcoital Detection of a Male-Specific Semen Protein*, The New England Journal of Medicine; **312**: 338-343, (1985).
100. KAMENEV,L.,LECLERCO,M. ve GERARD,C.F., *An Enzym Immunoassay for Prostate-Specific P30 Antigen Deteciion in the Postcoital Vaginal Tract*, Journal of Forensic Science Society; **29**: 233-241, (1989).
101. HOOFT,P., VOORDE,H. Van De ve DIJK,V., *A More Sensitive Modification of the Zinc Test for Seminal Traces Suitable for Stable Test Paper Strips*, Forensic Science International; **53**: 131-133, (1992).
102. MAWSON,C. ve FISCHER,M.I., *Zinc Carbonate anhydrose in Human Semen*, Biochemistry; **55**: 696-699, (1953).

103. MASIBAY,A.S ve LAPPAS,N.T., *The detection of protein p30 in Seminal Stains by Means of Thin-Layer Immunoassay*, Journal of Forensic Sciences: **29**(4), 1173-1177, (1984).
104. HOCHMEISTER,M.N., BUDOWLE,B., RUDIN,O., GEHRIG,U.B., THALI,M. ve DIRNHOFER,R., *Evaluation of Prostate-Specific Antigen (PSA) Membran Test Assays for the Forensic Identification of Seminal Fluid*; Journal of Forensic Sciences; **44**: 1057-1060, (1999).
105. SCHIFERSTEIN,G., *Prostate-Spesific Antigen (PSA) In Human Seminal Plasma*; Archieves of Andrology; **42**: 193-197 , (1999).
106. DUBE ,J.Y, GAUDREAULT,D. ve TREBLAY,R.R., *The concentration of immunoreactive prostate spesific antigen is not decreased in viscous semen samples*, Andrologia; **21**:136-139
107. LYNNE,C.M., ABALLA,T.C.,WANG,T.J., RITTENHOUSE,H.G., FERRELL,S.M. ve BRACKETT,N.L., *Serum and Semen Prostate Specific Antigen Concentrations are Different In Young Spinal Cord Injured Men Compared to Normal Controls*, The Journal of Urology; **162**: 89-91, (1999).