

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ADLI TIP ANABİLİM DALI

86743

ÇUKUROVA YÖRESİNDE HAPTOGLOBİN GEN  
FREKANSLARININ SAPTANMASI

Bio. HÜSNİYE DAĞ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç.Dr. BEHNAN ALPER

Bu tez Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBE 97 YL.6 proje  
numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 86743

ADANA - 1999

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

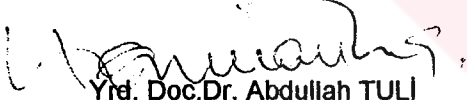
**Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Adli Seroloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Çukurova Yöresinde Haptoglobin Gen Frekanslarının Saptanması" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

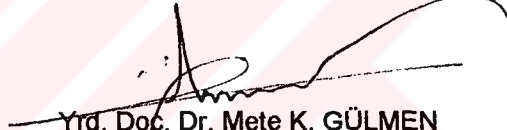
Tez Savunma Tarihi: 25/01/1999



Doç. Dr. Behnan ALPER  
Ç.Ü. Tıp Fakültesi  
Adli Tıp ABD Başkanı  
Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Abdullah TULI  
Ç.Ü. Tıp Fakültesi  
Biyokimya ABD Öğretim Üyesi  
Üye



Yrd. Doç. Dr. Mete K. GÜLMEN  
Ç.Ü. Tıp Fakültesi  
Adli Tıp ABD Öğretim Üyesi  
Üye

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 21.1.99 tarih ve 2/21-9. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Kadri ÖZCAN  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Adli Bilimler son yıllarda teknolojinin gelişmesine paralel olarak yeni alanlar üzerinde çalışmalarını yoğunlaştırmıştır. Adli Seroloji bilim dalı özellikle biyolojik artık ve lekelerin kimliklendirilmesi konusunda elindeki teknik altyapıyı kullanarak, rutin uygulamalar içinde yerini almıştır. Bu bilim dalının ülkemizde de geliştirilmesi ve Hukuk sistemine sağlıklı ve objektif veriler sunması amaçlanmaktadır.

Bu amaç doğrultusunda Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Adli Seroloji Yüksek Lisans Programı açılarak, bu bilim dalına hizmet verebilecek eğitilmiş elemanların yetiştirilmesi hedeflenmiştir. Bu program içerisinde eğitimimi sürdürdüğüm dönemde yol gösterici ve değerli katkılarından dolayı Prof.Dr.Serpil Salaçin'e gönülden teşekkür ederim.

Eğitim ve tez dönemi içerisinde gösterdikleri ilgi ve destekleri için tüm Adli Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine ve çalışanlarına,

Yüksek lisans eğitim dönemi yanında, tez projesinin oluşumu ve sonuçlandırılması aşamasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Ç.Ü.Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Başkanı Doç.Dr.Behnan Alper'e,

Bu tezin laboratuvar çalışması süresince yardımlarını gördüğüm çalışma arkadaşlarım Bio.Lale Dönbak ve Bio.Ayşe Altun'a,

SBE 97.YL.6 no'lu proje olarak bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki maddi katkıları nedeniyle Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Bio.Hüsniye Dağ

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay .....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe .....	3
2.2. Haptoglobin molekülünün yapısı .....	4
2.3. Haptoglobin Fenotipleri .....	6
2.4. Haptoglobinin Özellikleri .....	10
2.4.1. Klinik Uygulamalarda Haptoglobin Seviyesinin Değerlendirilmesi .....	13
2.4.2. Haptoglobin Seviyesini Etkileyen Faktörler .....	13
2.5. Adli Tıpta Haptoglobinin Önemi .....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	16
3.1. Kan Örnekleri .....	18
3.2. DeneYlerde Kullanılan Malzemeler .....	18
3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	18
3.2.2. Kullanılan Araç ve Gereçler .....	18
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	20
3.3.1. Tampon Solüsyonlarının Hazırlanması .....	20
3.3.2. Boya Solüsyonunun Hazırlanması .....	21
3.4. Çalışma Örneklerinin Hazırlanması .....	21
3.4.1. Serumların Hazırlanması .....	21
3.4.2. Hemoglobin Solüsyonunun Hazırlanması .....	21
3.4.3. Örneklerin Hazırlanması .....	21
3.5. Jelin Hazırlanması .....	21
3.6. Örneklerin Jele Aplikasyonu .....	22
3.7. Elektroforez Koşulları .....	22
3.8. Elektroforezin Yapılışı .....	22
4. BULGULAR .....	24
4.1. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	27
5. TARTIŞMA .....	29
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	33
7. KAYNAKLAR .....	34
ÖZGEÇMİŞ	

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Hp 1-1 tipinin şematik görünümü	8
<b>Şekil 2.</b> Hp 2-1 tipinin şematik görünümü	9
<b>Şekil 3.</b> Hp 2-2 tipinin şematik görünümü	10
<b>Şekil 4.</b> Hemoglobin ve Hp-Hb kompleksinin böbrekten geçişi	11
<b>Şekil 5.</b> Plak düzeneği ve keskinin görünümü	19
<b>Şekil 6.</b> Elektroforez cihazı ve güç kaynağının görünümü	20
<b>Şekil 7.</b> Haptoglobın bantlarının görünümü	26



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Hp $\alpha^1$ zincirinin aminoasit sekansı .....	5
Çizelge 2. Yaygın Hp fenotipleri ve subtipleri .....	7
Çizelge 3. 100 kişide nişasta jel elektroforezi ile saptanan Hp fenotipleri.....	25
Çizelge 4. 100 kişide saptanan Hp fenotip dağılımı.....	27
Çizelge 5. Çeşitli popülasyonlara ait Hp gen frekansları.....	31
Çizelge 6. 100 kişide saptanan haptoglobin fenotip ve gen frekans dağılımı .....	33



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha$	Alfa
aa	Aminoasit
$\beta$	Beta
DNA	Deoksiribonükleikasit
Hb	Hemoglobin
HLA	Human Leucocyte Antigens (İnsan Lökosit Antijenleri)
Hp	Haptoglobin
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium (Hardy-Weinberg Eşitliği)
İEF	İzoelektrik Fokuslama
MA	Moleküler Ağırlık



## ÖZET

### Çukurova Yöresinde Haptoglobin Gen Frekanslarının Saptanması

Adli Seroloji, biyolojik kökenli doku ve sıvılar ile bunlara ait leke ve artıkların tanımlanmasında ve kimliklendirilmesinde uygulama alanı bulmuştur. Günümüzde bu amaçlarla eritrosit antijenleri, eritrositlerin ve serumun genetik kontrollü polimorfik enzim ve proteinleri, lökosit antijenleri (HLA) ve DNA analizleri kullanılmaktadır.

Bir serum glikoproteini olan haptoglobin  $\alpha$  ve  $\beta$  polipeptid zincirinden oluşan tetramerik bir proteindir.  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerinin genetik kontrolü 16. kromozomda (16q22) lokalize olmuştur. Karaciğerde sentez edilmekte ve plazmadaki serbest hemoglobini bağlamaktadır. Popülasyonda genetik kontrollü, Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2 olarak saptanan üç fenotipi saptanmıştır. Haptoglobin akut faz proteinlerindedir. Bu nedenle serumdaki seviyesi malignitelerde, enfeksiyonlar ve travmalarda artış göstermektedir. Haptoglobin polimorfizm göstermesi, fenotiplerinin kolaylıkla ayırt edilebilmesi ve kan lekelerinde çok stabil olması nedeniyle adli bilimlerde önemli olan bir markırdır. Adli amaçlı analizlerde, paternite testlerinde ve popülasyon çalışmalarında oldukça sık kullanılmaktadır.

Bu çalışmada Çukurova Yöresinde yaşayan 100 sağlıklı vericiden alınan kan örneklerinde Hp fenotiplerini saptamak amacıyla nişasta jel elektroforezi kullanıldı. Elde edilen sonuçlar ile Hp gen frekansları hesaplanmıştır.

Çalışmamızda haptoglobin fenotipleri 11 kişide Hp1-1, 36 kişide Hp2-1, 53 kişide Hp2-2 olarak saptandı. Gen frekansları ise Hp\*1: 0.29, Hp\*2: 0.71 olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar Hardy-Weinberg Eşitliği ile uyumlu bulunmuştur.

**Anahtar Sözcükler: Adli Seroloji, Haptoglobin, Nişasta Jel Elektroforezi.**



## ABSTRACT

### Gene frequencies of Haptoglobin in the Çukurova Region

Forensic Serology is the scientific field aimed at the identification and individualization of biological fluids and tissues and the stains. In the present, erythrocyte antigens, the genetic controlled polymorphic enzymes and human leucocyte antigens (HLA) and DNA analyses are used for these purposes.

Human Hp is a plasma glycoprotein composed of two types of polypeptide chains,  $\alpha$  and  $\beta$ , that are covalently associated by disulfide bonds. The genes controlling the  $\alpha$  and  $\beta$  chains are located on chromosome 16q22. It is synthesized in the liver and it bounds the free hemoglobin in the plasma.

In the human populations there are three genetic Hp phenotypes: Hp 1-1, Hp2-1, Hp 2-2. Hp belongs to the acute phase glycoproteins, thus its serum level is markedly increased in malignancy, infections and trauma. Hp is important in forensic sciences while it shows polymorphism, its phenotypes are easily distinguished and it is stable on blood stains for a prolonged period of time. So Hp is extensively used in forensic analyses, paternity tests and population studies.

The distribution of the Hp phenotypes has been investigated on 100 healthy blood donors living in the Çukurova Region, by the starch gel electrophoresis. The Hp phenotypes were found as follows; Hp1-1 in 11, Hp2-1 in 36 and Hp2-2 in 53 of the samples. The gene frequencies were calculated as;  $Hp^*1= 0.29$  and  $Hp^*2= 0.71$ . The results shows in accordance with the Hardy Weinberg Equilibrium.

**Key Words: Forensic Serology, Haptoglobin, Starch Gel Electrophoresis.**

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli Seroloji özellikle paternite araştırmaları ve bilinmeyen kişilere ait kan ve diğer vücut sıvıları ile lekelerinin, biyolojik dokuların kimliklendirilmesiyle uğraşan bir bilim dalıdır. Bu amaçlarla günümüzde, ilk basamakta eritrositlerdeki kan grubu antijenleri serolojik olarak gösterilmekte, ikinci basamakta polimorfik eritrosit enzimleri ve serum proteinleri elektroforetik olarak tiplendirilmektedir. Daha sonraki aşamalarda ise lökosit antijenleri ve DNA düzeyindeki analizler rutin çalışmalarda kullanılmaktadır.<sup>1,2</sup>

Beşyüzden fazla antijenik sistem bilinmesine rağmen rutin uygulamalarda ancak birkaç tanesi (ABO, MN, Rh, vb) kullanılmaktadır. Bu antijenik sistemlere ek olarak birçok polimorfik protein sistemlerinden de yararlanılmaktadır. Adli Serolojide kimliklendirme ve paternite tayini amacı ile sıklıkla kullanılan eritrosit enzimleri; Eritrosit Asit Fosfataz (EAP), Adenozin Deaminaz (ADA), Adenilat Kinaz (AK), Fosfoglukomutaz (PGM), Esteraz D (EsD), Glioksalaz (GLO), serum proteinleri ise; Haptoglobin (Hp), Transferrin (Tf),  $\alpha$ -1-antitripsin ( $\alpha$ 1-AT), Gama Marker (Gm), Kappa Marker (Km) ve Grup Spesifik Komponentleridir (Gc).<sup>3,4</sup>

Bir serum glikoproteini olan Haptoglobin (Hp) dolaşımdaki hemoglobine bağlanarak çok stabil bir kompleks oluşturduğu için Grekçe tutmak, kavramak anlamına gelen haptain kelimesinden türetilerek isimlendirilmiştir. Haptoglobin karaciğerde sentezlenir ve retiküloendotelyal sistem tarafından dolaşıma taşınarak hemoglobin ile kompleks oluşturur. Fizyolojik fonksiyonu tam olarak anlaşılamamakla birlikte, normal eritrosit yıkımı ve hemoliz esnasında demir kaybını sınırlamakta ve plazmadaki serbest oksihemoglobini bağlamaktadır. Büyük oranda idrarla dışarı atılmaktadır. İnsanlarda haptoglobinin genetik kontrollü 3 fenotipi saptanmıştır, Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2. Fenotiplerinin gösterilme kolaylığı, lekelerde dayanıklılığı ve ayırt etme oranının yüksekliği nedeniyle Adli Serolojide paternite araştırmaları ve kimliklendirmede haptoglobin 40 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır.<sup>5-13</sup>

Polimorfik serum proteinleri ve eritrosit enzimleri çeşitli elektroforetik yöntemlerle incelenebilmektedir. Elektroforez dünyada adli amaçlı araştırmalarda oldukça sık başvuru alan yöntemlerdendir. Adli incelemelerde kullanılan elektroforetik sistemlerden bazıları, selüloz asetat, nişasta, agaroz ve poliakrilamid jel elektroforezidir.

Bu çalışmada Çukurova yöresinde yaşayan 100 kişilik bir popülyasyonda Hp fenotiplerinin nişasta jel elektroforezi ile incelenmesi, yöntemin laboratuvar koşullarımızda sağlıklı sonuçlar alınacak şekilde adaptasyonu ve eldeki verilere göre Hp\*1 ve Hp\*2 gen frekanslarının hesaplanarak, diğer çalışma sonuçları ile karşılaştırılması, yöremize ait ilk veri tabanının oluşturulması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Haptoglobin, 1940'da Polonevski and Jayle tarafından bir  $\alpha^2$  -glikoprotein olarak karakterize edildiğinden beri hemoglobin ile oluşturduğu stabil yapının biokimyasal önemi konusunda geniş araştırmalar yapılmıştır. İnsanlarda Hp'nin kalıtsal olan varyasyonları ilk defa Smithies tarafından (1955) tanımlanarak Hp'nin 3 fenotipi; Hp1-1, Hp2-1 ve Hp2-2 nişasta jel elektroforezinde gösterilmiştir. Buna paralel olarak haptoglobin lokusu Hp, oluşumundan sorumlu genlerde Hp\*1 ve Hp\*2 olarak adlandırılmıştır. 1962'de Smithies et al., iki Hp\*1 alleli arasında bir nonhomolog crossingover sonucu oluşan intragenik duplikasyon nedeniyle Hp\*2 allelinin düzenlendiğini rapor etmiştir. Yine aynı yıl Smithies et al., Hp $\alpha$  subünitinin Hp<sup>1F</sup>, Hp<sup>1S</sup> ve Hp<sup>2</sup> olarak düzenlenen üç alleli olduğunu saptamışlar ve elektroforetik olarak hızlı yürüyen polipeptid  $\alpha$ 1f (Hp1F), yavaş yürüyen ise  $\alpha$ 1s (Hp1S) olarak adlandırılmıştır. <sup>14-17</sup>

Robson et al., 1969'da pedigree analiziyle 16. kromozomda, Hecht et al. 16.kromozomun uzun kolunda Hp  $\alpha$  zinciri lokalizasyonunu göstermişlerdir. Yang et al. 1972'de yaptıkları çalışmalarla degradasyona rağmen Hp'nin asit sıvısında, oda ısısında hemen veya kullanılabilecek kadar -20°C' de saklama ile gösterilebildiği belirtilmiştir. 1973'de Pastewka et al. poliakrilamid jel elektroforezi ile Hp subtiplerini tanımlamışlardır. <sup>18-22</sup>

Kurosky et al. 1980'de insan haptoglobininde aminoasit sekansı yapmışlardır. Teige et al. immünoblotlama ve izoelektrik fokuslama ile  $\alpha$  polimorfizmini göstermişlerdir. 1981'de Greer et al. Hp  $\beta$  zincirinin haptoglobin-hemoglobin kompleksinde önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir. 1983 yılında Yang et al.  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerini inceleyerek Hp\*1'de 5, Hp\*2'de 7 ekson düzenlendiğini rapor etmişlerdir. Maeda 1991'de Hp varyantlarından Hp2-1 modifiye tip ile Hp2-1 fenotipi arasındaki farklılıkları göstermiştir. <sup>9,23-26</sup>

Günümüzde Hp\*1 geninin 2 alleli ve Hp\*2 geninin 3 alleli ile elektroforetik olarak incelenebilen Hp fenotip sayısı 15'e ulaşmıştır.

## 2.2. Haptoglobin Molekülünün Yapısı

Haptoglobin molekülü disülfid bağıyla bağlı 2 $\alpha$  ve 2 $\beta$  zincirinden oluşmuştur.  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirleri translasyon sonrası  $\alpha\beta$  dimeri oluşturmak için bir prekürsör gibi sentezlenirler. Daha sonra iki dimer, iki sistein ile kovalent bağlanarak bitişik  $\alpha$  zincirine tetramerik molekül ( $\beta\alpha\alpha\beta$ ) vermek için bağlanmaktadır. Haptoglobin sentezi 16. kromozomun (16q22) polimorfik bir bölgesi tarafından kontrol edilmektedir.<sup>19,27-33</sup>

Haptoglobin molekülünün  $\alpha$  ve  $\beta$  olarak iki tip polipeptid zinciri içerdiği, haptoglobin polimorfizminin nokta mutasyonlar sonucu  $\alpha$  zincir varyasyonları nedeniyle oluştuğu belirtilmektedir. Hp  $\alpha$  zincirinin molekül ağırlığı 9500 olarak saptanmıştır. Hp  $\alpha$  zincirinin elektroforetik hareketliliğe göre Hp  $\alpha^{1F}$  (hızlı), Hp  $\alpha^{1S}$  (yavaş) ve  $\alpha^2$  olarak düzenlenen üç alleli saptanmıştır.  $\alpha^{1F}$  ve  $\alpha^{1S}$  peptidlerinin 53. pozisyondaki Lys/Glu aminoasitlerinin yer değiştirmesi ile farklılaştığı bildirilmektedir.  $\alpha^{1F}$ 'de Lys,  $\alpha^{1S}$ 'de Glu aminoasitleri vardır (Çizelge 1). Hp  $\alpha^2$  allelinin Hp $^{1F}$  ve Hp $^{1S}$  allelleri arasındaki eşit olmayan crossing over sonucu oluştuğu ve  $\alpha^1$  zincirinin iki katı uzunluğunda olduğu belirtilmektedir. Hp $\alpha^2$  allelinin Hp $^{2FF}$ , Hp $^{2FS}$  ve Hp $^{2SS}$  olarak düzenlenen üç tipi olduğu saptanmıştır. Nokta mutasyonunun bütün  $\alpha$  peptidlerinde etkili olduğu kabul edilmektedir.<sup>21,22,28,34-41</sup>

Hp  $\beta$  zinciri, moleküler ağırlığı 36000 dalton olan ve 4 asparagin rezidüsünden (Asn<sup>23</sup>, Asn<sup>46</sup>, Asn<sup>50</sup>, Asn<sup>80</sup>) oluşan bir polipeptiddir. Polimorfik özellikte değildir, bütün Hp tiplerinde aynı yapıyı gösterir.  $\beta$  polipeptidi 280 aminoasit rezidüldür. Yapılan çalışmalarla Hp  $\beta$  zincirinin kimotripsinojen ailesinden serin proteaz ile kimyasal benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca

Hp  $\beta$  zincirinin haptoglobinin hemoglobine bağlanmasında önemli fonksiyonu olduğu belirtilmiştir. <sup>7,21,22,25,32,37,42-47</sup>

**Çizelge 1.** Haptoglobin  $\alpha^1$  zincirinin aminoasit sekansı <sup>48</sup>

Haptoglobin $\alpha^1$ 83 rezidülü $\alpha^1$ f= 54. Pozisyonda Lys		
$\alpha^1$ s= 54. Pozisyonda Glu		
1	10	20
NH -Val -Asn -Asp -Ser -Gly -Asn -Asp -Val -Thr -Asp -He -Ala -Asp -Asp -Gly -Gln -Pro -Pro -Pro -Lys-		
	30	40
-Cys -He -Ala -His -Gly -Tyr - Val -Glu -His - Ser -Val -Arg -Tyr -Gln -Cys -Lys -Asn -Tyr -Tyr - Lys -		
	50	60
- Leu -Arg -Thr -Gln - Gly -Asp -Gly -Val -Tyr -Thr -Leu -Asn -Asn -Glu -Lys -Gln -Trp -He -Asn -Lys-		
	70	80
- Ala -Val -Gly -Asp -Lys -Leu -Pro -Glu -Cys -Glu -Ala -Val -Gly -Lys -Pro -Lys -Asn -Pro -Ala -Asn -		
	83	
- Pro - Val - Glu - COOH		

Hp genetik varyantları, Hp\*1 ve Hp\*2 olarak tanımlanan iki otozomal allellik gen tarafından kontrol edilmektedir. Hp insan genetiğinde nokta mutasyonu ve eşit olmayan crossing over için bir model oluşturmaktadır.  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirleri aynı genler tarafından kodlanmaktadır. Hp\*1'de 5 ekson, Hp\*2'de 7 ekson düzenlenmiştir. <sup>20,37,43,49,50</sup>

Hp\*1 geni 329 aminoasit içeren bir polipeptiddir. 83 aminoasit içeren kısa fragman  $\alpha^1$  olarak, 245 aminoasitlik uzun fragman ise  $\beta$  peptidi olarak gösterilmektedir. <sup>27,51</sup>

Hp\*2 geni 3. ve 4. eksonun çiftlenmesi sonucunda 7. eksonda düzenlenir. Hp\*2'nin başlangıçtaki gen üretimi 388 aminoasit içeren bir polipeptid zinciri şeklindedir. Hp\*1 geninin üretimi esnasında 143 tanesi ayrılır. Sonuçtaki

fraksiyonlar  $\beta$ 'da olduğu gibi,  $\alpha_2$  ( 142 a.a ) olarak gösterilmektedir.  $\beta$  zinciri aynıdır, fakat  $\alpha_2$  iki tane  $\alpha_1$  halinde bulunur.<sup>27,51</sup>

Bunlara ek olarak birkaç nadir  $\alpha$  varyantları da gözlenmiştir. Bunlar  $\alpha^2$  zincirinin miktarının azalmasıyla belirlenen Modifiye ve  $\alpha^1$  zincirinin miktarının azalmasıyla belirlenen Carlsberg varyantlarıdır. Hp2-1 Modifiye fenotipik varyantı zencilerde yaygın olarak görülmektedir. Bu modifiye tipde, Hp\*2 geninin nadir bir alleli olan Hp\*2M'in, Hp\*2 gen ürününün az üretilmesinden sorumlu olduğu belirtilmektedir.<sup>39,52,53</sup>

Johnson varyantı (Hp3\*) gibi diğer bir nadir allelin, Hp2'den orijin aldığı ve eşit olmayan crossing over sonucu meydana geldiği, Hp $\alpha$ 1 zincirinin yaklaşık 3 katı bir moleküler ağırlığa sahip olduğu belirtilmektedir.<sup>50,51</sup>

Birkaç allotipik  $\beta$  zincir varyantı da rapor edilmiştir. Bunlardan Marburg ve Bellevue varyantları uzun süredir bilinmektedir.<sup>39</sup>

Son yıllarda DNA analizleriyle haptoglobin ilişkili gen (Haptoglobin related gene-HPR) olarak adlandırılan ikinci bir haptoglobin geninin varlığı gösterilmiştir. HPR ile normal haptoglobin arasında bazı farklılıklar gözlenmiştir. Normal Hp  $\beta$  zincirinin 80.sekansında Asn<sup>80</sup>-Tyr-Ser<sup>82</sup> iken HPR  $\beta$  zincirinde bu sekans Asn<sup>80</sup>-Tyr-His<sup>82</sup> olmuştur. Bir başka fark da HPR gen sekansı ile  $\beta$  zincirinin 157. pozisyonunda ekstra sisteinden dolayı multimerik özellik gösterdiği saptanmıştır. HPR henüz protein üretiminde tayin edilememiş olmasına rağmen, erişkin karaciğerinde transkripsiyonun çok düşük bir seviyesinde gösterilmiştir.<sup>29,54-58</sup>

### **2.3. Haptoglobin Fenotipleri**

Haptoglobinin Hp1-1, Hp2-1 ve Hp2-2 olarak bilinen 3 polimorfik formu mevcuttur. Genetik olarak belirlenen bu üç fenotip, elektroforezde farklı olarak gözlenmektedir. Hp1-1 elektroforezde tek bir bant olarak göç ederken, Hp2-1 ve Hp2-2 çok daha kompleks bant dağılımları göstermektedir. Hp\*1 ve Hp\*2 olarak adlandırılan iki genin bu üç fenotipi yönettiği kabul edilmektedir. Burada Hp1-1

ve Hp2-2 homozigot, Hp2-1 heterozigot fenotiplerdir (Çizelge 2). Hp'nin polimorfik formları arasında anlamlı bir fonksiyonel farklılık saptanmamıştır.<sup>10,25,33,59-62</sup>

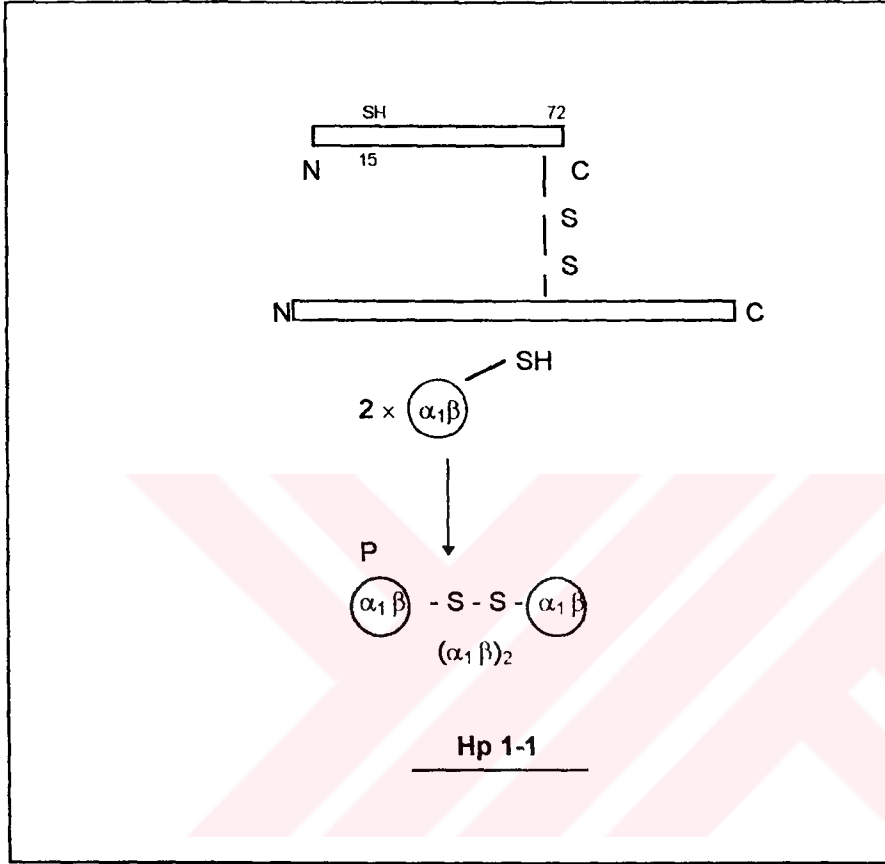
Çizelge 2. Yaygın Hp Fenotipleri ve Subtipleri<sup>34</sup>

<u>Hp Fenotipleri</u>	<u>Hp Subtipleri</u>
Hp1-1	1S-1S
	1S-1F
	1F-1S
Hp2-1	1S-2SS
	1S-2FF
	1S-2FS
	1F-2SS
	1F-2FS
	1F-2FF
Hp2-2	2FF- 2FS
	2FF-2FF
	2FF-2SS
	2FS-2FS
	2FS-2SS
	2SS-2SS

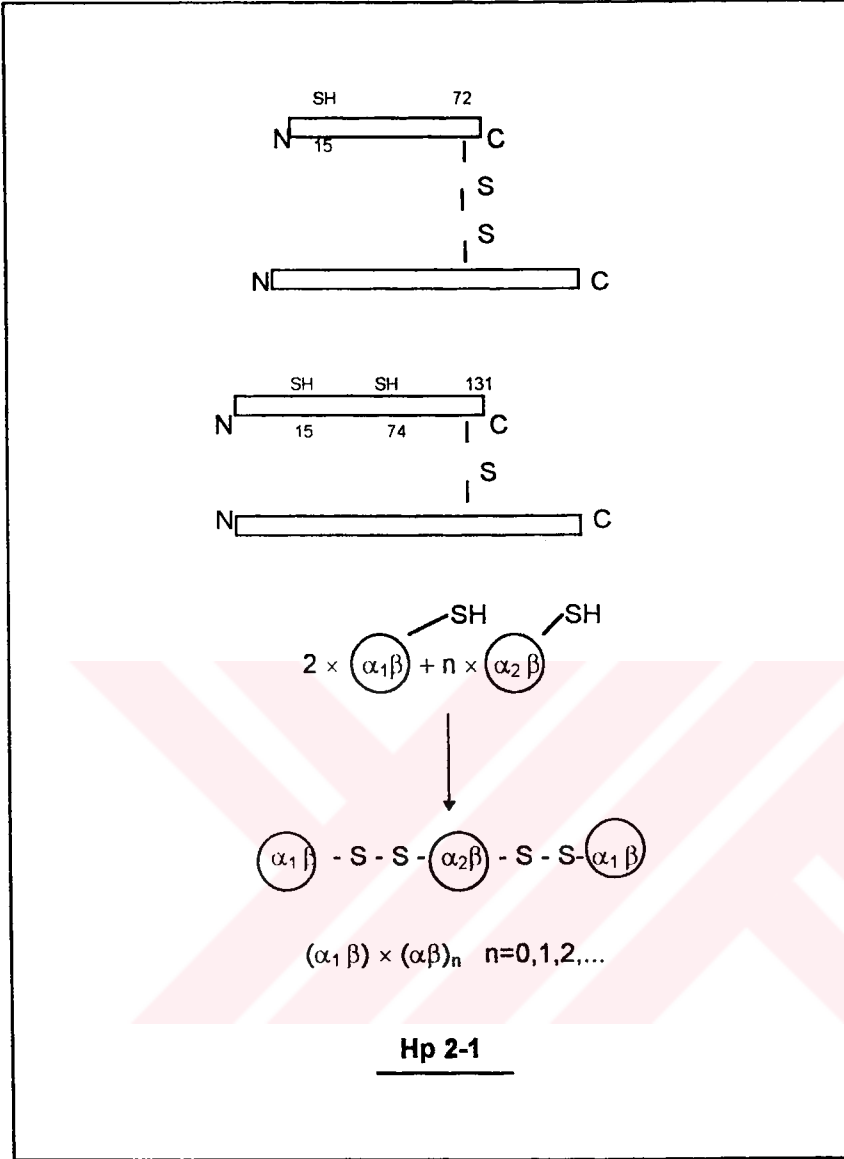
Hp 1-1 tipinin moleküler ağırlığı (MA) 90.000 daltonudur. Genotipi ( $Hp\alpha^1$   $Hp\alpha^1$ ) dir. İki  $\alpha^1$  ve  $\beta$  zinciri disülfid bağıyla bağlanarak tetramerik bir yapı ( $\alpha^1\beta$ )<sub>2</sub> meydana getirir (Şekil 1). Molekül, merkezde küçük bir topuz ile ince flaventlerle bağlı sferikal iki ana gruptan oluşmuştur. Molekülün şekli haltere benzetilmektedir.<sup>25,28</sup>



Tip 2-1'in MA 160.000 daltondur. Yapısı  $(\alpha^1\beta)_2(\alpha^2\beta)_n$  ( $n=0,1,2,\dots$ ) olarak gösterilmektedir (Şekil 2). Tip 2-2'nin MA ise 400.000'dir. Yapısı ise  $(\alpha^2\beta)_n$  ( $n=3,4,5,\dots$ ) olarak gösterilmektedir (Şekil 3).<sup>25,63-65</sup>

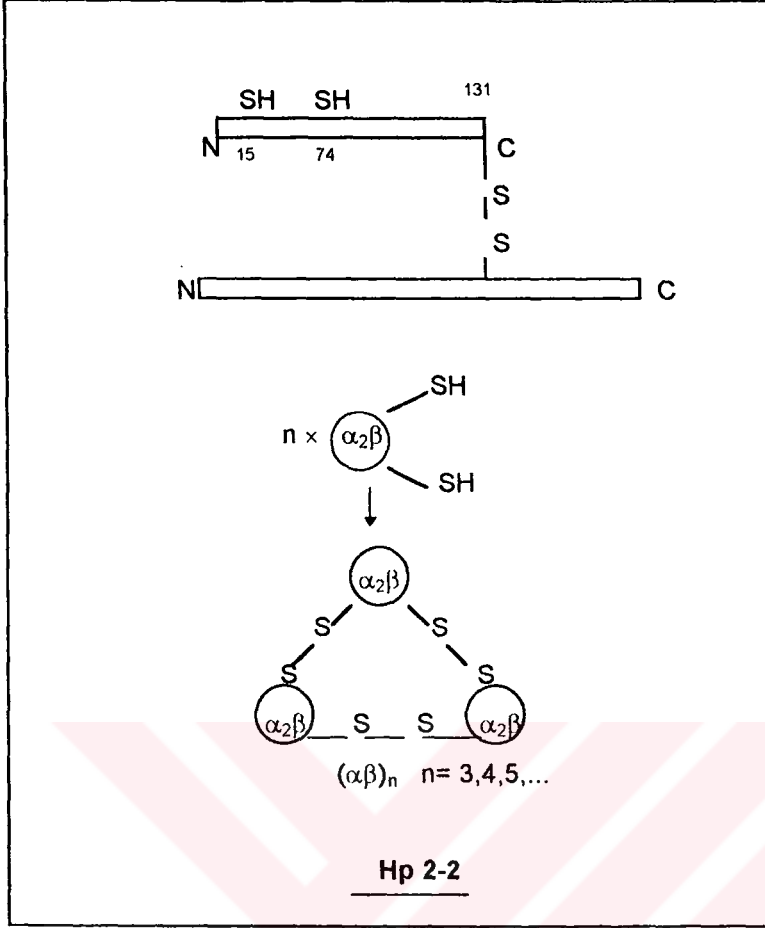


Şekil 1. Hp1-1 tipinin şematik görünümü.<sup>27</sup>



**Şekil 2.** Hb 2-1 tipinin şematik görünümü.<sup>27</sup>

Dördüncü bir grup olarak 0-0'ın da varlığı bilinmektedir. Bununla birlikte ahaptoglobineminin sickle-cell anemide de hızlı hemolizden dolayı izlendiği bildirilmektedir.<sup>5,49</sup>



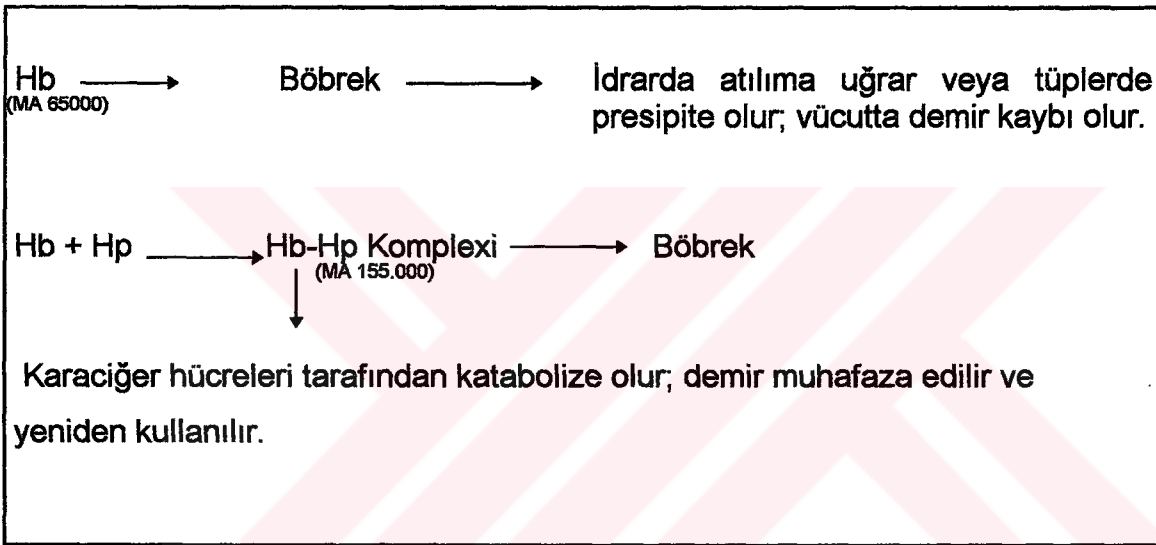
Şekil 3. Hp2-2 tipinin şematik görünümü.<sup>27</sup>

#### 2.4. Haptoglobinin Özellikleri

Haptogloblin, karaciğerde parankimal hücrelerde sentezlenerek retiküloendotelyal sistem tarafından dolaşıma taşınıp hemoglobin ile birleşmektedir. Ekskresyonu böbrekler yoluyla olmaktadır. Plazmada normal seviyesi erişkinde 300mg/100ml'dir. Serum Hp konsantrasyonunun çocuklarda düşük düzeylerde olduğu bilinmektedir. Hp seviyesinin yenidoğanda düşük oranda olduğu, ancak dördüncü aydan itibaren yükseldiği belirtilmektedir.<sup>5,59,66,67-75</sup>

Hp hemoglobin ile nonkovalent bağla sıkı bir kompleks oluşturacak şekilde bağlanmaktadır. Hemoglobinin moleküler ağırlığı yaklaşık 65.000

civarındadır. Buna karşın Hp'nin (Hp1-1) en basit polimorfik formunun moleküler ağırlığı 90.000 civarındadır. Böylece Hp-Hb kompleksinin moleküler ağırlığı 155.000'i geçmektedir. Serbest Hb böbrek glomerüllerinden geçerek tubuluslara ulaşabilir ve burada presipite olma eğilimi gösterir (Hp'nin Hb'ini bağlama kapasitesinin tümü ile ortadan kalktığı ağır bir kan uyuşmazlığından sonra meydana gelebildiği gibi). Buna karşın Hp-Hb kompleksi glomerüllerden geçemeyecek kadar büyüktür. Böylece bu kompleks böbreklerden serbest hemoglobin kaybını engellemektedir.<sup>24,33,64,70,76</sup>



Şekil 4. Hemoglobin ve Hp-Hb kompleksinin böbreklerden geçişinin şematik görünümü.<sup>76</sup>

Haptoglobinin, serbest hemoglobinden başka karboksihemoglobin, oksihemoglobin, methemoglobin, fetal hemoglobin, indirgenmiş hemoglobini bağlayabildiği gösterilmiştir. Bunun yanında Hp'nin deoksijene Hb, Miyoglobulin ve değişik Hb varyantlarından, örneğin Hb H ve Hb Barts'ı bağlayamadığı açıklanmıştır. Haptoglobin seviyesi hemoglobinin renal eşik değeri ile tayin edilmektedir. Hp'nin bağlama kapasitesi artarsa idrarda serbest hemoglobin görülmektedir. Haptoglobin seviyesi hemoglobin bağlama kapasitesi ile ifade edilmektedir; 100ml plazmada Hp tarafından bağlanan hemoglobin miktarıdır.

Hp seviyesi fenotiplere göre değişkenlik göstermektedir. Hp2-2 seviyesi diğer gruplara göre önemli derecede düşüklük göstermektedir.<sup>5,77,78</sup>

Klinik amaçlı kullanılan düzeylerden normal alt limitin 25mg/100ml, üst limitin ise 300mg/100ml olduğu belirtilmektedir. Normal değerlerin bu geniş aralıktaki düzeyleri, hasta olmayan kişilerde dikkate değer ölçüde kişisel özellikleri verebilmektedir. Erkeklerde fazla androjen üretiminden dolayı kadınlara göre önemli ölçüde yüksektir. Hp yenidoğanların %90'ında bulunmaz, bu nedenle Hp tayini 6 aylık bebeklik dönemine kadar çok fazla önem taşımamaktadır.<sup>5</sup>

Haptoglobin seviyesi; Hp-Hb kompleksinin peroksidaz aktivitesi ile, elektroforez, immünodiffüzyon, Hb ve Hp-Hb kompleksinin farklı asit denatürasyonları gibi yöntemlerle ölçülebilir. Hp seviyesi idrarda, serebrospinal sıvıda, amniotik sıvıda, göbek bağı kanında ve tükürükte ölçülebilir. Hp konsantrasyonu biyolojik sıvılarda Hp-ELISA yöntemi ile tayin edilebilmektedir. Hp dağılımı sıvının orjinine ve fizyopatolojik durumuna bağlıdır. Neonatal Hp, normal erişkin Hp ile immünolojik benzerlik göstermektedir.<sup>77</sup>

Peroksidaz yöntemi, serumda Hp-Hb kompleksinin varlığını göstermede yetersizdir. İmmünodiffüzyon yönteminde ise üç farklı Hp tipinin farklı moleküler ağırlıkta olması ve bundan dolayı diffüzyon katsayısının farklılığı gibi bazı problemler çıkmaktadır. Elektroforetik teknikler peroksidaz yöntemi ile karşılaştırıldığında teknik olarak basitlik, iyi sonuç, yüksek hassasiyet, düşük hata gibi avantajları olduğu gözlenmiştir. Haptoglobin elektroforezi Hp-Hb kompleksi ve serbest hemoglobinin farklı elektrik yüklerden dolayı farklı kutuplara göçü prensibi ile yapılmaktadır. Kağıt, nişasta jel, agar jel, selüloz asetat ve akrilamid jel Hp elektroforezi için kullanılabilir.<sup>5</sup>

#### **2.4.1. Klinik uygulamalarda haptoglobin seviyesinin değerlendirilmesi**

Klinik uygulamalarda tanı amaçlı olarak transfüzyonların hemolitik reaksiyonlarının tayininde (methemalbumin bandlarının görülmesi ile), hemolitik anemiler için rutin tarama testlerinde, konjenital bilirubin metabolizması bozukluklarında, hemolitik anemi tanısında, kalıtsal haptoglobin yıkımı ve hepatit tanısında Hp seviye ölçümü kullanılmaktadır.<sup>5</sup>

#### **2.4.2. Haptoglobin seviyesini etkileyen faktörler**

Haptoglobin akut faz proteinlerindedir. Bu nedenle serumdaki seviyesi malign neoplastik hastalıklar, enfeksiyonlar, travma, stres, sıtma, doku nekrozu, amyloidosis, panhipopituitarizm, akut miyokardiyal infarkt, steroid uygulamaları, yanıklar, cerrahi girişim, kollagen hastalıkları, böbrek hastalıkları, skorbit, bilier obstrüksiyonlar gibi patolojik durumlarda yükselmektedir. Serum Hp düzeyi hemolitik anemilerde, siroz gibi hepatik hastalıklarda, astımda, neonatal serumda ve intravasküler hemoliz esnasında azalmaktadır. Ayrıca androjen, glukokortikoid, parathormon, papain, elastaz ve hyaluronidaz gibi enzim ve hormon uygulamalarından sonra Hp seviyesinde artma gözlemlendiği bildirilmiştir. Bununla birlikte popülasyonda çok küçük bir oranda da ailesel ahaptoglobinemi görülmektedir.<sup>5,18,56,77,79-88</sup>

#### **2.5. Adli Tıpta Haptoglobinin Önemi**

Serum haptoglobin miktar ve tip tayini klinik tanıda gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Haptoglobin miktarının ölçülmesi çeşitli hastalıkların tanımlanmasında değerli olup, tip tayini de popülasyon çalışmalarında, antropolojik ve genetik tetkikler yönünden değerlendirilmektedir. Hp  $\alpha$  subtiplerinin belirlenmesi ile dağılımlarının ve allel frekanslarının hesaplanmasının, adli bilimlerde paternite olgularında ve kimliklendirmede kullanışlı bir parametre olduğu kabul edilmektedir. Genetik polimorfizm

göstermesi, fenotiplerinin kolayca ayırt edilebilmesi ve kan lekelerinde çok stabil olması nedeniyle adli bilimlerde tercih edilen bir serum proteindir.<sup>6,88-93</sup>

Smithies'in Hp tiplerini göstermesinden sonra tüm dünyada haptoglobine olan ilgi artmıştır. Özellikle antropolojik ve genetik testler yönünden Hp önem kazanmıştır. Hp, Adli Bilimlerde ilk olarak kullanılan serum proteinlerinden biridir. Haptoglobin polimorfizmi 40 yıldan fazla bir süredir paternite araştırmalarında kullanılmaktadır.<sup>51</sup>

Haptoglobin polimorfizmi kullanılarak değerlendirilen paternite testlerinde, babalığı reddetme oranının %33 olduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarla HLA doku tiplendirmesi ile beraber, ABO ve haptoglobin tiplendirmesi babalığı reddetme oranını %95'lerin üzerine çıkarmaktadır. Paternite testlerinde bütün genetik belirteçler (ana kan grupları ve subgrupları, polimorfik eritrosit antijenleri ve serum proteinleri, HLA) kullanıldığında ise bu oran %99'a ulaşmaktadır.<sup>27,36,94</sup>

Poliakrilamid jel elektroforezi, immünoelektroforez, nişasta jel elektroforezi gibi yöntemlerle kan lekelerinde Hp tiplendirmesi yapılabilmektedir. Tiplendirme Hp-Hb kompleksinin peroksidaz aktivitesinin çeşitli boyalar yardımıyla gösterilmesi esasına dayanmaktadır.<sup>95</sup>

Serum örnekleri için kullanılan yöntemler kan lekeleri için çok sınırlı uygulanabilmektedir. Bu yöntemlerle çalışılırken fazla hemoglobin uzaklaştırılmalı, leke taze olmalı, üç günden eski olmamalıdır. Serumdan elde edilen paternler lekedeki kan kuruduğu zaman kaybolmaktadır. Bu nedenle lekeli materyalde tayin için immüno-elektroforetik metodlar geliştirilmiştir.<sup>63,96</sup>

Eski kan lekelerinde haptoglobin fenotiplerinin gösterilmesi enzim immünoassay ve western blotlama teknikleriyle yapılabilmektedir. Western blotlama tekniği, jelden nitroselüloz membrana Hp bantlarının transferi ile gerçekleştirilmektedir. Enzim immünoassay ise ekstrakte örnekten Hp bantlarının identifiye edilmesi yöntemine dayanmaktadır. İmmünoassay yöntemi ile oda sıcaklığında saklanan 15 aylık kan lekelerinde, -20° C'de saklanan 22 aylık kan lekelerinde Hp fenotiplerinin gösterilebileceği belirtilmektedir. Western

blotlama ve enzim immünoassay yöntemi ile yağ dokularında Hp tiplendirilmesi yapılabildiği bildirilmiştir. Enzim immünoassay yöntemi ile -22°C'de saklanan 6 aylık idrar örneklerinden, oda ısısında saklanan 4 haftalık idrar örneklerinden Hp tiplendirmesi yapılabileceği bildirilmiştir. İmmüno blotlama yöntemi ile 0.001µl tam kandan, 0.015 mm<sup>2</sup> kan lekesinden Hp fenotiplendirmesi yapılabileceği belirtilmektedir. DNA analizleri ile 15-18 aylık kan lekelerinde Hp genotiplerinin ayırdedilebildiği, çeşitli dokularda Hp genotipinin incelenebildiği ve çok düşük Hp düzeyi olduğu bildirilen göbek bağı kanında da tiplendirilebildiği bildirilmiştir.<sup>10,43,92,97</sup>

Ayrıca kan lekelerinde ve postmortem dokularda çeşitli restrüksiyon enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen Southern hibridizasyonu ile Hp tiplendirmesi yapılabildiği belirtilmektedir.<sup>10</sup>





### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Çukurova yöresinde yaşayan, rastgele seçilmiş, sağlıklı ve aralarında akrabalık bağı olmayan 100 gönüllü vericiden kan örnekleri alındı. Hp fenotiplerini belirlemek amacı ile nişasta jel elektroforezi ile tiplendirme yapıldı. Bu çalışmanın projesi ve gönüllü kan vericileri için hazırlanan rıza ve bilgilendirme formları, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kuruluna sunularak onay alındı. Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonundan SBE 97.YL.6 no'lu proje ile parasal destek alındı.

Form 1'de Rıza ve Bilgilendirme Formu görülmektedir.



## Form 1. Vericileri bilgilendirme ve rıza formu.

### Bilgilendirme Formu

Bu çalışmanın amacı; yöremizde genetik kontrollü polimorfik serum proteinlerinden biri olan Haptoglobin gen frekanslarını ortaya koymaktır.

Gönüllü olarak katılacak kişilerden 5cc venöz kan alınarak plazmada haptoglobin fenotipleri belirlenecektir. Bu çalışmada elde edilecek bilgiler ile Çukurova Bölgesinde haptoglobin gen frekansları saptanacaktır. Elde edilen sonuçlar Adli Tıp Anabilim Dalı'na yapılacak çalışmalarda "Kişilerin adı,soyadı veya onları tanıtıcı , herhangi bir işaret belirtilmeden" veri olarak kullanılabilir. Sonuçlar çalışmaya katılan kişilere, istedikleri takdirde yazılı olarak bildirilecektir.

Kan alma işlemi öncesi, bu çalışmaya gönüllü olarak katılmak istediğinize dair rıza formunu imzalamanız gerekmektedir.

### Rıza Formu

Aşağıda imzası bulunan ben, Haptoglobin gen frekanslarının saptanması çalışması hakkında tam olarak bilgi aldım.

Gönüllü olarak kol damarımdan vereceğim 5cc kanda yapılacak çalışma sonuçlarının; adım, soyadım veya beni tanıttığım herhangi bir işaret belirtilmeden yayınlanabileceği ve istediğim takdirde kendim ile ilgili sonuçları öğrenebileceğim bildirildi.

Bu bilgileri aldıktan sonra, bu çalışmaya gönüllü olarak katıldığımı beyan ederim.

Gönüllünün Adı ve Soyadı:

Tarih:

Yaşı:

İmza:

Bilgi için:

Ç.Ü.T.F. Adli Tıp ABD

Tlf: 3386060/ 3429

### 3.1. Kan örnekleri

Gönüllü vericilerden alınan 100 kan örneği çalışıldı. Steril enjektörlerle 5cc venöz kan alınarak steril sitratlı cam tüplerin içine aktarılıp, her örneğe bir protokol numarası verildi.

### 3.2. Deneyleerde kullanılan malzemeler

#### 3.2.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Nişasta: Hidrolize patates nişastası. Sigma, S-5651.

Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): %35'lik, Merck, 8600.

Asetik Asit: %100 Glasiyel, Merck, 100056.

Borik Asit (H<sub>3</sub>Bo<sub>3</sub>): Minimum %99.5'luk. Sigma, B0252.

Sodyum Hidroksit (NaOH): Merck, 6462.

Benzidin (p,p'- diaminobiphenyl): Sigma, B-3503.

#### 3.2.2. Kullanılan araç ve gereçler

Tüpler: 1cm x 10cm boyutlarında, plastik kapaklı, steril cam tüpler kullanıldı.

Mikropipet: 200µl'lik (Gilson P200) volümü ayarlanabilir mikropipetler kullanıldı.

Pipet uçları: 200µl hacimde pipet uçları kullanıldı.

Santrifüj: Dakikada maksimum 5500 devir hızına ulaşan, 12 tüpe uygun başlıklı, zaman ve hız ayar göstergesi bulunan santrifüj kullanıldı. (Hettich Universal 30F)

Filtre Kağıtları: Whattman No:3 filtre kağıtları 1cm x 0.3cm boyutlarında kesilerek bir kutu içinde saklandılar.

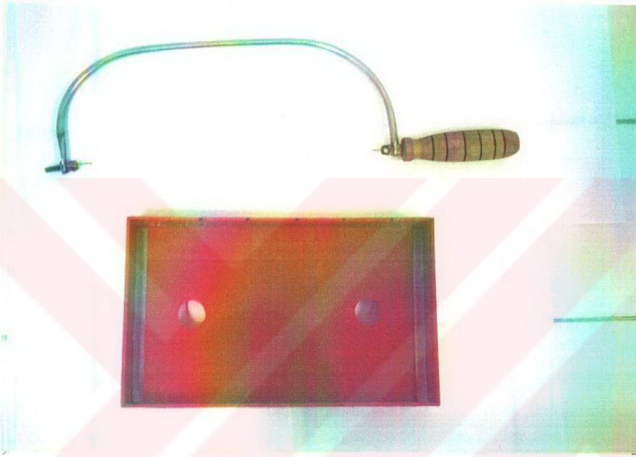
Cam Plaklar: Cam plaklar 3 mm kalınlığında ve 19cm x 12.5cm boyutlarında kestirilerek hazırlatıldı.

Plak Düzeneği: Pleksiglastan, 21.5 cm x 12.7 cm boyutlarında, her iki dış kenardan içeriye 1cm boşluk bırakılarak yaptırılan plak (Şekil 5), üzerinde jel dökülmesi için konulan cam plağı kolay çıkarabilmek amacıyla 1cm çapında 2

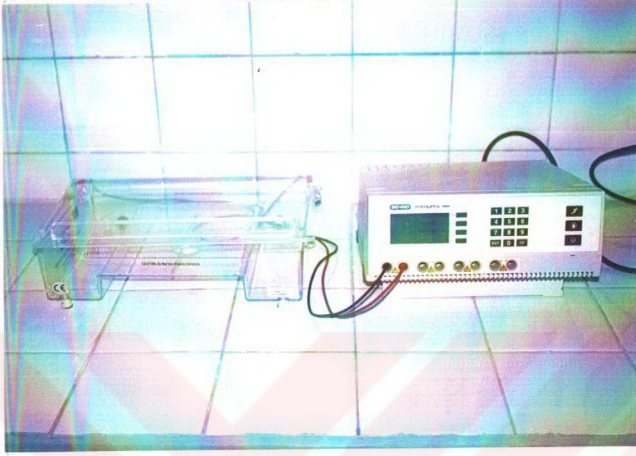
delik açtırıldı. Ayrıca plağın kenarında kalan boşluğu kapatarak jelin dökülmesini önlemek ve elektrik iletimini sağlamak amacıyla 1cm x 3.5 cm boyutlarında süngerler hazırlandı. Bu süngerler plağın kenarındaki boşluklara sıkıştırıldı.

Elektroforez Cihazı: Maxicell EC360M (Şekil 6)

Güç Kaynağı: Bio-Rad, Power PAC 3000. (Şekil 6)



Şekil 5. Plak düzeneği ve keskinin görünümü.



Şekil 6. Elektroferez cihazı ve güç kaynağının görünümü.

### 3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

#### 3.3.1. Tampon Solüsyonlarının Hazırlanması

Jel Tamponu: ( pH-11)

0.93 gr Borik asit ( $H_3Bo_3$ )

0.67 gr Sodyum Hidroksit (NaOH)

kariştirilerek distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Elektroferez Tamponu: ( pH-9.5)

9.3 gr Borik asit ( $H_3Bo_3$ )

1.2 gr Sodyum Hidroksit (NaOH)

kariştirilerek distile su ile 1 litreye tamamlandı.

karıştırılarak distile su ile 1 litreye tamamlandı.

### **3.3.2. Boya Solüsyonunun Hazırlanması**

Spatül ucuyla alınan benzidin 10 ml asetik asitte ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) çözdürüldü. Üzerine %35'lik hidrojen Peroksit'ten ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 5 damla ilave edildi.

### **3.4. Çalışma Örneklerinin Hazırlanması**

#### **3.4.1. Serumların Hazırlanması**

Gönüllü 100 sağlıklı vericiden 5'er cc venöz kan örneği sitratlı tüplerin içine alındı. Kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum kısmının ayrılması sağlandı. Serum bir enjektör yardımıyla alınarak başka tüplere aktarıldı. Örnek serumlar deneyler yapılana kadar  $+4^\circ\text{C}$ 'de korundu.

#### **3.4.2. Hemoglobin Solüsyonunun Hazırlanması**

A, B, AB ve O kan gruplarına sahip kişilerden sitratlı tüplere 2'er cc kan alındı. Her bir tüpün içine 2 cc serum fizyolojik ilave edilip karıştırılarak 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 8 kez tekrar edilerek eritrositler yıkandı. Daha sonra tüm gruplar 1:1:1:1 oranında başka bir tüpe alınarak karıştırıldı. Bu karışıma 1:4 oranında distile su ilave edilerek kapaklı bir tüp içinde  $-20^\circ\text{C}$ 'de dondurularak saklandı.

#### **3.4.3. Örneklerin Hazırlanması**

Üç damla serum + bir damla hemoglobin solüsyonu steril bir tüp içinde karıştırıldı.

### **3.5. Jelin Hazırlanması**

150 ml jel tamponu 150 ml distile su ile karıştırıldı. Bu karışımdan bir erlen içine 100 ml konulup, üzerine 32 gr hidrolize nişasta karıştırılarak eritildi. Kalan 200 ml bir erlen içinde kaynatıldı. Kaynamaya başlayınca üzerine nişasta

çözeltisi ilave edilerek 5-6 dakika süre ile karıştırıldı. Pişen jel, düz bir zemin üzerine hazırlanan plağın içine yerleştirilen cam plağın üzerine döküldü. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletip soğuttuktan sonra buzdolabına (+4° C) konularak 20-30 dakika daha bekletildi.

### 3.6. Örneklerin Jele Aplikasyonu

Nişasta jeli buzdolabından çıkartıldıktan sonra plak üzerinde 3.5 cm aralıklarla 5 ayrı aplikasyon noktası işaretlendi. Jel üzerine 1.7 cm aralıklarla bistüri yardımıyla dikey oluklar açıldı. Oluklar açılırken jele yapışmasını önlemek amacıyla bistüri distile su ile ıslatıldı. Örnekler filtre kağıtlarına emdirilerek, bu filtre kağıtları jel üzerinde açılan noktaların içine bir pens yardımıyla yerleştirildi.

### 3.7. Elektroforez Koşulları

Akım : 40 mA

Gerilim: 120 V

Güç : 5 W

Isı : +4° C

Süre : 2,5 saat

### 3.8. Elektroforezin Yapılışı

Elektroforez tankının kenarındaki boşluklara elektroforez tamponu konuldu. Plak düzeneği tank köprüsünün üzerine düzgün bir şekilde yerleştirilerek kapağı kapatıldı. Elektroforez cihazı buzdolabına konuldu. Güç kaynağı buzdolabı yakınına yerleştirilerek 120V, 40mA ve 5W olarak ayarlandı. Elektroforez cihazı çalıştırdıktan 30 dakika sonra jel üzerine yerleştirilen filtre kağıtları çıkartıldı. 2 saat daha elektroforez işlemine devam edildi. Haptoglobulin bantlarının katottan anoda doğru yürüdüğü görüldü. İki saatin sonunda elektroforez cihazı kapatıldı. Plak düzeneği elektroforez cihazından çıkarılarak, üzerinde jel bulunan cam plak düz bir zemin üzerine yerleştirildi. Jel bir keski yardımıyla enine, elektroforez yürüme yönüne paralel olarak kesildi. Üstte kalan



jel parçası da başka bir cam plak üzerine alındı. Asetik asit + benzidin + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karışımı boya pamuklu bir çubuk yardımı ile her iki jel üzerinde bantlar oluşana kadar sürüldü. Bantlar oluştuktan sonra sonuçlar kaydedilerek fotoğrafları çekildi.



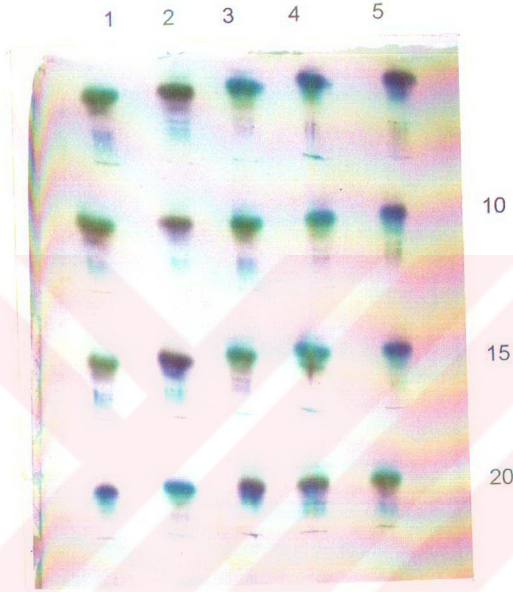
#### 4. BULGULAR

100 kişiden alınan kan örneklerinde nişasta jel elektroforezi ile saptanan haptoglobın fenotipleri Çizelge 3'de gsterilmiştir.

Çizelge 3. 100 kişide nişasta jel elektroforezi ile saptanan Hp fenotipleri.

Prot. No	Fenotip	Prot. No	Fenotip
98/1	Hp 2-2	98/51	Hp 2-2
98/2	Hp 2-1	98/52	Hp 2-2
98/3	Hp 2-2	98/53	Hp 2-1
98/4	Hp 2-1	98/54	Hp 1-1
98/5	Hp 2-2	98/55	Hp 2-2
98/6	Hp 2-1	98/56	Hp 2-2
98/7	Hp 2-2	98/57	Hp 2-2
98/8	Hp 2-2	98/58	Hp 2-1
98/9	Hp 2-2	98/59	Hp 2-2
98/10	Hp 2-2	98/60	Hp 2-1
98/11	Hp 2-1	98/61	Hp 2-1
98/12	Hp 1-1	98/62	Hp 1-1
98/13	Hp 2-2	98/63	Hp 2-1
98/14	Hp 2-1	98/64	Hp 2-2
98/15	Hp 2-2	98/65	Hp 2-2
98/16	Hp 1-1	98/66	Hp 2-2
98/17	Hp 2-2	98/67	Hp 2-2
98/18	Hp 2-2	98/68	Hp 2-2
98/19	Hp 2-2	98/69	Hp 2-2
98/20	Hp 2-2	98/70	Hp 2-1
98/21	Hp 2-1	98/71	Hp 2-2
98/22	Hp 2-1	98/72	Hp 2-2
98/23	Hp 2-2	98/73	Hp 2-2
98/24	Hp 1-1	98/74	Hp 2-1
98/25	Hp 2-2	98/75	Hp 2-1
98/26	Hp 2-2	98/76	Hp 2-1
98/27	Hp 1-1	98/77	Hp 2-2
98/28	Hp 2-1	98/78	Hp 2-1
98/29	Hp 1-1	98/79	Hp 2-2
98/30	Hp 2-2	98/80	Hp 2-2
98/31	Hp 1-1	98/81	Hp 2-2
98/32	Hp 2-2	98/82	Hp 2-1
98/33	Hp 2-1	98/83	Hp 1-1
98/34	Hp 2-2	98/84	Hp 2-2
98/35	Hp 2-2	98/85	Hp 2-1
98/36	Hp 2-1	98/86	Hp 2-2
98/37	Hp 2-1	98/87	Hp 1-1
98/38	Hp 2-1	98/88	Hp 2-1
98/39	Hp 2-1	98/89	Hp 2-2
98/40	Hp 2-1	98/90	Hp 2-2
98/41	Hp 2-2	98/91	Hp 2-1
98/42	Hp 2-2	98/92	Hp 2-1
98/43	Hp 2-1	98/93	Hp 2-2
98/44	Hp 2-1	98/94	Hp 2-2
98/45	Hp 2-1	98/95	Hp 2-2
98/46	Hp 1-1	98/96	Hp 2-2
98/47	Hp 2-1	98/97	Hp 2-2
98/48	Hp 2-2	98/98	Hp 2-1
98/49	Hp 2-2	98/99	Hp 2-1
98/50	Hp 2-1	98/100	Hp 2-2

100 kan örneğinde nişasta jel elektroforezi ile haptoglobin tiplendirilmesi yapıldı. Şekil 7'de haptoglobin bantları görülmektedir.



Şekil 7. Haptoglobin bantlarının görünümü. 14 ve 18.sıra Hp1-1; 2,3,9,10,13,16,19. Sıralar Hp2-1; 1,4,5,6,7,8,11,12,15,17,20. Sıralar Hp2-2 bantlarını göstermektedir.

Çizelge 4'de 100 kişide saptanan haptoglobin fenotip dağılımı gösterilmiştir.

**Çizelge 4.** 100 kişide saptanan Hp fenotip dağılımı.

Haptogloblin Tipleri	Kişi Sayısı
Hp 1-1	11
Hp 2-1	36
Hp 2-2	53
<b>Toplam</b>	<b>100</b>

#### 4.1. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler<sup>3</sup>

Hp1-1= 11 kişi

Hp2-1= 36 kişi

Hp2-2= 53 kişi

Toplam 100 kişi

$$p(1) = \frac{(11 \times 2) + 36}{200} = 0.29$$

$$q(2) = \frac{(53 \times 2) + 36}{200} = 0.71$$

<u>Genotip</u>	<u>Fenotip</u>	<u>Beklenen sıklık</u>	<u>Gözlenen sıklık</u>
1-1	1	$(0.29)^2 = 0.0841 \times 100 = 8.41$	11
2-1	2-1	$2 \times (0.29) \times (0.71) = 0.4118 \times 100 = 41.18$	36
2-2	2	$(0.71)^2 = 0.5041 \times 100 = 50.41$	53

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$(0.29)^2 + 2(0.29 \times 0.71) + (0.71)^2 = 1$$

$$\chi^2 = \frac{(\text{Gözlenen-Beklenen sıklık})^2}{\text{Beklenen sıklık}}$$

$$\chi^2 = \frac{(11- 8.41)^2}{8.41} + \frac{(36- 41.18)^2}{41.18} + \frac{(53-50.4)^2}{50.4}$$

$$\chi^2 = 0.7976 + 0.652 + 0.134$$

$$\chi^2 = 1.58$$

Serbestlik Derecesi (Degrees of Freedom (df))= 1

$\chi^2$  tablosunda 1 df'de 0.05'teki değer 3.841



## 5. TARTIŞMA

Bazı genetik belirleyici sistemler polimorfik özellikler gösterirler, bunların gözlenebilir formları fenotip olarak adlandırılmaktadır. Fenotiplerin identifikasyonu adli bilimlerde, delil olarak kullanılan biyolojik sıvıların veya suç işlenen alanda ve kişiler arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde önemlidir. Bu işaretleyicilerin analizi bilinen örnekler ve bilinmeyen kaynaklar arasında karşılaştırma yapılmasını sağlar.

Bu amaçlarla günümüzde eritrositlerdeki kan grubu antijenleri, eritrositlerin ve serumun genetik kontrollü polimorfik enzim ve proteinleri, lökosit antijenleri ve DNA analizleri rutin çalışmalarda kullanılmaktadır. Paternite çalışmalarında, leke ve doku artıklarının kimliklendirilmesinde sonuçların hata payı ve olasılık yüzdelerini hesaplamak için bu amaçla kullanılan parametrelerin o toplumda görülme sıklığının popülasyon çalışmaları ile ortaya konmuş olması gerektiği belirtilmiştir.<sup>3</sup>

Adli inceleme laboratuvarlarının bir çoğunda uygulama üç adımlıdır:

- Uygun izleri bulma ve identifikasyon
- Bu izlerin karakterizasyonu
- Kontrol örnekleri ile karşılaştırma yaparak kaynak orjinini bulma.

Bazen olayın faili ile mağduruna ait kan ve diğer vücut sıvıları birbirlerine bulaşmaktadır ve lekelerin karakterizasyonu kanıt açısından önemlidir. Birkaç haftalık veya birkaç aylık kuru lekeler çoğunlukla diğer vücut sıvıları ile veya pas, çamur gibi başka materyallerle karıştırılabilmektedirler. Bu nedenle elektroforetik teknikler vücut sıvıları analizinde önemli bir rol oynamaktadır.

Haptoglobin tiplendirmesi birçok laboratuvarında, genetiksel aile çalışmalarında, adli amaçlı analizlerde ve paternite araştırmalarında rutin olarak kullanılmaktadır. Haptoglobin tiplendirmesinde kullanılan yöntemler Hp zincirlerindeki izoelektrik farklılıkların tiplendirilmelerinde kullanılamamaktadır. Bu yöntemlerle sadece Hp $\alpha$  zinciri değil, Hp $\beta$  zinciri de boyanmaktadır. Smithies

et al. 1962'de Hpa1S, Hpa1F, Hpa2SS, Hpa2FS ve Hpa2FF subtiplerini tanımlamışlardır. 1981'de Olaisen et al. izoelektrik fokuslama (İEF) ile Hp subtiplerini ve Hp zincirini karakterize ederek izoelektrik noktalarını ve moleküler ağırlıklarını rapor etmişlerdir. Shindo tavşanlarda spesifik anti Hpa zinciri kullanarak çalışma yapmış, İEF'den sonra immunoblotlama metodunu kullanmıştır. Araştırmacılar Japon popülasyonunda Hpa subtipleri ve allel frekanslarını bu yöntemle saptayarak rapor etmişlerdir.<sup>6,26</sup>

Mastana and Fisher İngiltere'de yaptıkları bir çalışmada paternite tayininde şüpheli babayı reddetme oranını konvansiyonel nişasta jel elektroforezi ile %18, İEF ile %28-36 olarak belirtmişlerdir.<sup>35</sup>

Nişasta jel elektroforezi yıllarca Hp fenotiplendirmesi için tek ortam olarak kullanılmıştır. Günümüzde ise poliakrilamid jel, selüloz asetat, akrilamid gibi elektroforez ortamları kullanılmaktadır. Bu elektroforezlerde Hp bantlarını görüntülemek için bir çok boya kullanıldığı belirtilmektedir. Bu boyalar; diaminobenzidin, benzidin, benzidin DiHCl, tetrametilbenzidin, floresin asetat, 2',7'-diklorofloresin asetat, o-tolidin ve o-dianizidindir.<sup>98</sup>

Bizim çalışmamızda nişasta jel elektroforezi yaparken, jel kıvamının ayarlanması sırasında ve elektroforez esnasında elektrik iletimi ile ilgili sorunlar yaşadık. Nişasta miktarlarında ve ateşte bırakma sürelerinde değişiklikler yapılarak jel kıvamı ayarlandı. Ayrıca elektroforez esnasında plak düzeneğinin kenarına yerleştirilen süngerler yardımıyla akım ile ilgili sorunlar çözülmeye çalışıldı. Bu deneyler esnasında nişasta jel elektroforezinin deneyim ve fazla zaman (3 saat) gerektirmesi gibi dezavantajlarının olduğu görüldü. Ayrıca nişasta jel elektroforezi taze serum örnekleri ile çalışmayı gerektirmektedir. Fakat bu yöntem az miktarda serum örneği ile sonuç alınabilmesi, jelde oluşan bantların fotoğraflanabilmesi ve diğer yöntemlere göre daha ekonomik olması yönüyle değerlendirildiğinde, rutin tarama testlerinde tercih edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Çizelge 5'de çeşitli popülasyonlarda çalışılmış olan Hp fenotiplerine ait gen frekansları karşılaştırılmıştır. Bu çizelgede de görüldüğü gibi Hp\*1 gen frekansı en düşük 0.1770 ile Hindistan popülasyonunda, en yüksek 0.5515 ile Amerikalı zencilerde gözlenmiştir. Hp\*2 ise en düşük değer 0.4484 ile Amerikalı zencilerde, en yüksek ise 0.8230 ile Hindistan popülasyonunda gözlenmektedir.<sup>99-102</sup>

Çizelge 5 . Çeşitli popülasyonlara ait Hp gen frekansları.<sup>99-102</sup>

Popülasyon	Hp*1	Hp*2
Amerika (Beyazlar)	0.3851	0.6149
Amerika (Zenciler)	0.5515	0.4484
Hindistan	0.1770	0.8230
İspanya	0.3801	0.6199
Japonya	0.2605	0.7394
Kuzey Almanya	0.3506	0.6494
Macaristan	0.349	0.651
Mısır	0.2123	0.7876
Türkiye	0.265	0.735
Yunanistan	0.3395	0.6604

Türk popülasyonunda Hp tiplerinin dağılımı ile ilgili ilk çalışma Erdem ve ark tarafından yapılmış, fakat bu çalışmada Hardy-Weinberg Eşitliği (HWE) ile uyumsuzluk bulunmuştur. Erdem ve Aksoy tarafından 1975 yılında tekrarlanan çalışmada Hp\*1 gen frekansı 0.265, Hp\*2 gen frekansı ise 0.735 olarak saptanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmalarında 200 kişilik bir popülasyonda akrilamid jel elektroforezi ile Hp tiplendirmesi yapmışlardır.<sup>99</sup>



Çukurova yöresine ait haptoglobin gen frekanslarını saptamak ve Ç.Ü. Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adli Seroloji Laboratuvarında yapılacak rutin uygulamalarda kullanmak için istatistiksel bir bilgi elde etmek amacıyla yapılan bu çalışmada, Hp\*1 gen frekansı 0.29, Hp\*2 gen frekansı ise 0.71 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları çizelge 5'teki diğer popülasyonlara ait sonuçlarla karşılaştırdığımızda ise Asyalılara yakın sonuçların ortaya çıktığı görülmektedir.

Birçok popülasyonda fenotipleri ve subtipleri saptanan haptoglobine olan ilgi, polimorfik özelliği, lekelerde stabil kalması, fenotiplerinin kolaylıkla gösterilmesi nedeniyle artmaktadır. Yapılan bütün bu çalışmalar paternite araştırmalarında, adli amaçlı kimliklendirmede ve popülasyon çalışmalarında oldukça sık kullanıldığı belirtilen haptoglobinin önemli bir genetik belirteç olduğunu göstermiştir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1- Bu çalışmada Çukurova yöresinde haptoglobin gen frekanslarını saptamak amacıyla nişasta jel elektroforezi ile haptoglobin tiplendirmesi yapılmıştır.

2- 100 kişiden alınan kan örnekleri ile yapılan bu çalışmada 11 kişide Hp1-1, 36 kişide Hp2-1, 53 kişide Hp2-2 fenotipleri saptanmıştır.

3- Çalışmada elde edilen veriler ile HWE kullanılarak gen frekansları hesaplanmıştır (Çizelge 6). Gen frekansları  $Hp^*1= 0.29$ ,  $Hp^*2= 0.71$  olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar HWE ile uyumlu bulunmuştur.

Çizelge 6. 100 kişide saptanan haptoglobin fenotip ve gen frekans dağılımı.

	Gözlenen	Beklenen	Gen Frekansı
Hp1-1	11	8.41	$Hp^*1= 0.29$
Hp2-1	36	41.18	$Hp^*2= 0.71$
Hp2-2	53	50.41	$\chi^2= 1.58$

4- İstatistiksel olarak anlamlı bulunan bu sonuçlar Ç.Ü.Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Seroloji laboratuvarında kimliklendirme ve paternite tayini için kullanılmak üzere veri tabanı oluşturacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Salaçin S, Kellece L, Altun A, Çölkesen Z, Alper B.** Adli amaçlarla kan ve semen lekelerinin identifikasyon ve kimliklendirilmesinde kullanılan yöntemler. *Arşiv*, 1994; 3 (25):25-31.
2. **Roy R, Schmidt K, Gaensslen RE.** Distributions of genetic markers in a Nebraska Population. *JFSCA*, 1990; 35(5): 1207-1210.
3. **Sensabaugh GF.** Biochemical markers of individuality. In: Saferstein R. *Forensic Science Handbook*. New Jersey: Simon and Schuster Company, 1982: 338-415.
4. **Hagins AM, Shaler RC, Mortimer CE, Stuver WC, Neilson DM.** Population frequencies of forensically important genetic markers: phosphoglucomutase, erythrocyte acid phosphatase and haptoglobin. *JFSCA*, 1978; 23(3): 563-569.
5. **Louderback AL, Shanbrom E.** Haptoglobin electrophoresis, *JAMA* ,1968; 206 (2): 362-363.
6. **Shindo S.** Haptoglobin subtyping with anti-haptoglobin  $\alpha$  chain antibodies: *Electrophoresis*, 1990; 11(6): 483-488.
7. **Arcoleo JP, Greçzkrer J.** Hemoglobin binding site and it's relationship to the serine protease-like active site of haptoglobin. *J Biol Chem*, 1982; 257(17): 10063-10068.
8. **Hamaguchi H, Isomoto A, Miyake Y, Nakajima H.** Some spectral properties of the human hemoglobin- haptoglobin complex. *Biochemistry*, 1971; 10(10): 1741-1745.
9. **Maeda N.** DNA polymorphisms in the controlling region of the human haptoglobin genes: A molecular explanation for the haptoglobin 2-1 modified phenotype. *Am J Hum Genet*, 1991; 49: 158-166.
10. **Yokoi T, Sagisaka K:** Haptoglobin phenotyping of human blood stains using a specific DNA probe. *Forensic Sci Int*, 1990; 45: 39-46.
11. **Yang HJ, Przyblska M.** The microheterogeneity of human haptoglobin and it's complex with hemoglobin. *Can J Biochem*; 1973; 51: 597-605.
12. **Jamshid J, Liang JC.** The hemoglobin-haptoglobin bond. I. dissociation of the complex and recovery of the native haptoglobin in an affinity chromatography system. *J Lab Clin Med*, 1973; 82(6): 991-1002.
13. **Waks M, Beychok S.** Induced conformational states in human apohemoglobin on binding of haptoglobin1-1. *Biochemistry*, 1974; 13(1): 15-22.
14. **Smithies O, Connel GE, Dixon GH.** Chromosomal rearrangements and the evolution of haptoglobin genes. *Nature*, 1962; 196: 232-236.
15. **Smithies O, Walker NF.** Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature*, 1955; 4496: 1265-1266.
16. **Smithies O.** Variations in human serum  $\beta$ -globulins. *Nature*, 1957; 180: 1482- 1483.

17. **Smithies O, Walker NF.** Notation for serum-protein groups and the genes controlling their inheritance. *Nature*, 1956; 178: 694- 695.
18. **Marchand A, Galen RS, Lente FV.** The predictive value of serum haptoglobin in hemolytic disease. *JAMA*, 1980; 243 (19): 1909-1911.
19. **Hecht F, Tolby B, Magenis RE, Kimberling WJ, Wyandt H, Lovrien EW.** Chromosomal localization of the heterochromatic region 16qh (.76) linked to  $\alpha$ -haptoglobin in man. *Nature*, 1971; 233: 480.
20. **Mcgill JR, Yang F, Baldwin WD, Brune JL, Barnett DR, Bowman B, Moore CM.** Localization of the haptoglobin  $\alpha$  and  $\beta$  genes (HPA and HPB) to human chromosome 16q22 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1984; 38: 155-157.
21. **Pastewka JV, Reed RA, Ness AT, Peacock AC.** An improved haptoglobin subtyping procedure using polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 1973; 51: 152-162
22. **Barnett DR, Lee TH, Bowman BH.** Amino-acid sequence of the carboxyl terminal octapeptide of human haptoglobin  $\beta$  chain. *Nature*, 1970; 225: 938-939.
23. **Yang F, Brune JL, Baldwin WD, Barnett DR, Bowman BH.** Identification and characterization of human haptoglobin cDNA. *Proc Natl Acad Sci*, 1983; 80: 5875-5879
24. **Greer J, Liao WDL, Brown WE.** Haptoglobin-hemoglobin complex. *J Biol Chem*, 1981; 256(16): 8771-8774.
25. **Kurosky A, Barnett DR, Lee TH, Touchstone B, Hay RE, Amott MS, Bowman BH, Fitch WM.** Covalent structure of human haptoglobin: a serine protease homolog. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; 77(6): 3388-3392.
26. **Teige B, Olaisen B, Pedersen L.** Subtyping of haptoglobin-presentation of a new method. *Hum Genet*, 1985; 70:163-167.
27. **Patzelt D, Geserick G, Schröder H:** The genetic haptoglobin polymorphism: Relevance of paternity assesment. *Electrophoresis*, 1988; 9: 393-397.
28. **Wejman JC, Hovsephian D, Wall JS, Hainfeld JF and Greer J.** Structure of haptoglobin and the haptoglobin-hemoglobin complex by electron microscopy. *J Mol Biol*, 1984; 174: 319-341.
29. **Fawcett HAC, Al-Havi Z and Brzoski H.** Identification of products of the haptoglobin related gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990; 1048: 187-193.
30. **Maeda N, Yang, Barnett DR, Bowman BH, Smithies O.** Duplication within the haptoglobin Hp<sup>2</sup> gene. *Nature*, 1984;309: 131-135.
31. **Crowe RR, Noyes R, Samuelson S, Wesner R, Wilson R.** Close linkage between panic disorder and  $\alpha$ -haptoglobin excluded in 10 families. *Arch Gen Psychiatry*, 1990; 47: 377-380.

32. **Kurosky A, Hay RE, Kim HH, Touchstone B, Rasco MA, Bowman BH.** Characterization of the cyanogen bromide fragments of the  $\beta$  chain of human haptoglobin. *Biochemistry*, 1976; 15(24): 5326-5336.
33. **Lustbader JW, Arcolego JP, Birken S, Greer J.** Hemoglobin binding site on haptoglobin probed by selective proteolysis. *J Biol Chem*, 1983; 258(2): 1227-1234.
34. **Nance WE, Smithies O.** New haptoglobin alleles: A prediction confirmed. *Nature*, 1963; 198: 869-870.
35. **Mastana SS, Fisher P.** Haptoglobin subtypes in the East Midlands (United Kingdom). *Int J Legal Med*, 1994; 107( 1): 52-54.
36. **Thymann M, Svensmark O, Masumba G, Brokso H, Skisby LB.** Haptoglobin subtypedetermination by isoelectric focusing in agarose gel: Application to paternity testing and presentation of a new  $\alpha_2$  variant. *Electrophoresis*, 1990; 11: 61-65.
37. **Straten A, Herzog A, Cabezon T, Bollen A.** Characterization of human haptoglobin cDNAs coding for  $\alpha^{2FS} \beta$  and  $\alpha^{1S} \beta$  variants. *FEBS LETTERS*. 1984; 168(1): 103-107.
38. **Brune JI, Yang F, Barnett DR, Bowman BH.** Evolution of haptoglobin : comparison of complementary DNA encoding  $Hp\alpha^{1S}$  and  $Hp\alpha^{2FS}$  . *Nucleic Acids Research*, 1984; 12 (11): 4531-4538.
39. **Teige B, Olaisen B, Teisberg P.** Haptoglobin subtypes in Norway and a review of Hp subtypes in various populations. *Hum Hered*, 1992; 42: 93-106.
40. **Constans J, Richard P, Viau M.** Relationship between Hp1S and Hp2 gene frequencies among human populations. *Hum Hered*, 1978; 28: 328-334.
41. **Wagner L, Gessi A, Parzer SB, Base W, Waldhausl W, Pasternack MS.** Haptoglobin phenotyping by newly developed monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1996; 156: 1989-1996.
42. **Kane M, Yamamoto Y, Fukumaga T, Tatsumo Y.** Phenotyping of EAP and EsD by high field strength IEF on cellulose acetate membrane. *Electrophoresis*, 1990; 11: 318-321.
43. **Cox KJ, Thomas AS.** The application of immuno-blotting to the phenotyping of haptoglobin. *JFSCA*, 1992; 37(6): 1652-1655.
44. **Valette I, Waks M, Wejman JC, Arcolego JP, Greer J.** Haptoglobin heavy and light chains. *J Biol Chem*, 1981; 256(2): 672-679.
45. **Chow V, Murray RK, Dixon JD, Kurosky A.** Biosynthesis of rabbit haptoglobin: Chemical evidence for a single chain precursor. *Febs Letters*, 1983; 153(2): 275-279.
46. **Haugen TH, Hanley JM, Heath EC.** Haptoglobin. *J Biol Chem*, 1981; 256: 1055-1057.
47. **Kurosky A.** Evolution of haptoglobin and the serine proteases. *Proteases*, 1980; 28: 99-102.

48. **Black JA, Dixon GH.** Amino-acid sequence of alpha chains of human haptoglobins. *Nature*, 1968; 218: 736-741.
49. **Grunbaum BW.** Phenotyping of haptoglobin on gradient acrylamide gel slabs using the Beckman microzone system. *J Forensic Sci Soc*, 1975; 15: 229-234.
50. **Oliviero S, Demarchi M, Carbonara AO, Bernini LF, Bensi G, Raugei G.** Molecular evidence of triplication in the haptoglobin Johnson variant gene. *Hum Genet*, 1985; 71: 49-52.
51. **Teige B, Olaisen B, Pederse L, Teisberg P.** Forensic aspects of haptoglobin: electrophoretic patterns of haptoglobin allotype products and an evaluation of typing procedure. *Electrophoresis*, 1988; 9: 384-392.
52. **Giblett ER, Brooks LE.** Haptoglobin types. *Nature*, 1963; 1997: 576-577.
53. **Grant DJ, Maeda N.** A base substitution in the promoter associated with the human haptoglobin 2-1 modified phenotype decreases transcriptional activity and responsiveness to interleukin-6 in human hepatoma cells. *Am J Human Genet*, 1993; 52: 974-980.
54. **McEvoy SM and Maeda N.** Complex events in the evolution of the haptoglobin gene cluster in primates. *J Biol Chem*, 1988; 263(30): 15740-15747.
55. **Maeda N.** Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin -related gene pair. *J Biol Chem*, 1985; 260: 6698-6709.
56. **Thompson S, Cantwell BMJ, Cornell C, Turner GA.** Abnormally-fucosylated haptoglobin: a cancer marker for tumour burden but not gross liver metastasis. *Br J Cancer*, 1991; 64: 386-390.
57. **Kuhajda FP, Piantadosi S, Pasternack GR.** Haptoglobin-related protein (Hpr) epitopes in breast cancer as a predictor of recurrence of the disease. *N Engl J Med*, 1989; 321(10): 636- 641.
58. **Kuhajda FP, Katumuluwa AI, Pasternack GR.** Expression of haptoglobin-related protein and its potential role as a tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 1188- 1192.
59. **Raugei G, Bensi G, Colantuoni V, Romano V, Santoro C, Constanzo F, Cortese R.** Sequence of human haptoglobin cDNA. Evidence that the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits are coded by the same mRNA. *Nucleic Acids Res*, 1983; 11(17): 5811- 5819.
60. **Oh SK, Very DL, Ettinger R, Walker J, Giampaolo C, Bernardo J.** Monoclonal antibody to SER immune suppressor detects polymeric forms of haptoglobin. *Hybridoma*, 1989; 8(4): 449-466.
61. **Ojala K, Weber TH.** An improved haptoglobin phenotyping procedure using immunofixation after starch gel electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*, 1984; 137: 233-237.

62. **Malchy B, Dugas H, Ofosu F, Smith ICP.** A spin label study of hemoglobin-haptoglobin complexes. *Biochemistry*, 1972; 11(9): 1669-1672.
63. **Culliford BJ.** *The Examination and Typing of Bloodstains in the Crime Laboratory.* U.S. Government Printing Office, Washington DC, 1971; 211-228.
64. **McCormick DJ, Atassi MZ.** Hemoglobin binding with haptoglobin: Delineation of the haptoglobin binding site on the  $\alpha$ -chain of human hemoglobin. *J Prot Chem*, 1990; 9 (6): 735-742.
65. **Katnik I, Steuden I, Pupek M, Wiedkocha A, Dobryczycka W.** Monoclonal antibodies against human haptoglobin. *Hybridoma*, 1989; 8(5): 551-560.
66. **Berkarda B, Müftüoğlu AÜ, Ulutin ON.** *Kan Hastalıkları.* AR Basım Yayın, İstanbul, 1983; 69-70.
67. **Hansson LO, Kjellman NIM, Ludvigsson J, Lundh B.** Haptoglobin concentrations in children aged 9-10 years and its correlation to indirect parameters of erythrocyte turnover. *Scand J Clin Lab Invest.* 1983; 43: 367-370.
68. **Peters JH, Alper CA.** Haptoglobin synthesis. II. Cellular localization studies. *J Clin Invest*, 1966; 49: 314-320.
69. **Makinen MW, Kon H.** Circular dichroism and electron paramagnetic resonance of the haptoglobin-hemoglobin complex. *Biochemistry*, 1971; 10(1): 43-52.
70. **Cerda S, Oh SK.** Methods to quantitate human haptoglobin by complexation with hemoglobin. *J Immun Methods*, 1990; 134: 51-59.
71. **Higa Y, Oshiro S, Kino K, Tsunoo H, Nakajima H.** Catabolism of globin-haptoglobin in liver cells after intravenous administration of hemoglobin-haptoglobin to rats. *J Biol Chem*, 1981; 36(23): 12322-12328.
72. **Hwang PK, Greer J.** Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin-haptoglobin complex. *J Biol Chem*, 1980; 253: 3038-3041.
73. **Kino K, Tsunoo H, Higa Y, Takami M, Hamaguhi H, Nakajima H.** Hemoglobin-haptoglobin receptor in rat liver plasma membrane. *J Biol Chem*, 1980; 225(20): 9616-9620.
74. **Hauge M, Heiken A, Höglund C.** Studies on the haptoglobin system II. The development and distribution of Hp groups in children. *Hum Hered*, 1970; 20: 557-565.
75. **Cohen-Dix P, Noble RW, Reichlin M.** Comparative binding studies of the hemoglobin-haptoglobin and the hemoglobin-antihemoglobin reactions. *Biochemistry*, 1973; 12( 19): 3744-3751.
76. **Menteş G, Ersöz B.** *Harper'in Biyokimyası.* Banış Kitabevi. 1993; İstanbul. 768-770.
77. **Katnik I, Dobryczycka W.** Enzyme immunoassay to measure low Levels of haptoglobin in biological fluids. *J Immunoassay*, 1990; 11 (4): 503-517.



78. **Özsoylu Ş, Işık K.** Haemoglobin H disease in a Turkish family. *Scand J Haemat*, 1973; 10:54-58.
79. **Buchanan GR, Holtkamp CA, Johnson A.** Reduced serum haptoglobin values in hemophiliacs receiving monoclonally purified factor VIII concentrates: *Am J Haematology*, 1990; 33: 234-237.
80. **Elg S, Lee RB, Stones C.** Evaluation of serum haptoglobin levels in patients with adnexal masses. *Military Med*, 1989;154 (5):234-236.
81. **Shim BS.** Increase in serum haptoglobin stimulated by prostaglandins. *Nature*, 1976; 259: 326-327.
82. **Neale EJ, Wong WSF, Arumanayagam M, Chang MZA.** The clinical significance of the serum haptoglobin concentration in patients with invasive cervical carcinoma. *August N Z J Obstet Gynaecol*, 1989; 29(3-1): 197-199.
83. **Maes M, Delanghe J, Scharpe S, Meltzer HY, Cosyns P, Suy E, Bosmans E.** Haptoglobin phenotypes and gene frequencies in unipolar major depression. *Am J Psychiatry*, 1994; 151(1): 112-116.
84. **Oh SK, Very DL, Walker J, Raam S, Ju ST.** An analogy between fetal haptoglobin and a potent immunosuppressant in cancer. *Cancer Research*, 1987; 47: 5120-5126.
85. **Elg S, Carson LF, Fowler JM, Twiggs LB, Moradi MM, Ramakrishnan S.** Ascites levels of haptoglobin in patients with ovarian cancer. *Cancer*, 1993; 71(12): 3938-3941.
86. **Hauge SN.** Haemolysis after mitral valve replacement with the Björk-Shiley and the Lillehei-kaster disc valve prothesis. *Br Heart J*, 1976; 38: 977-980.
87. **Fröhlander N, Stjernberg N.** Association between haptoglobin groups and hereditary predisposition for bronchial asthma. *Hum Hered*, 1989; 39: 7-11.
88. **Fröhlander N, Johnson O.** Haptoglobin groups in acute myocardial infarction. *Hum Hered*, 1989; 39: 345-350.
89. **Roy R.** Haptoglobin typing from fatty tissues after extraction with non-ionic detergents. *Forensic Sci Int*. 1991; 49: 95-102.
90. **Budowle B, Chow GH.** Discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis for typing haptoglobin in bloodstains. *JFSCA*, 1985; 30(3): 893-897.
91. **Quarino L, Samples M, San Pietro D, Shaler R, Orta A, Jack D.** Haptoglobin typing of bloodstains using horizontal discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis. *Science and Justice*, 1995; 35(3): 213-216.
92. **Roy R.** Detection of haptoglobin from concentrated urine samples by enzyme immunoassay. *JFSCA*, 1991; 36(5): 1580-1585.
93. **Stolorow MD, Wraxall GD.** An efficient method to eliminate streaking in the electrophoretic analysis of haptoglobin in bloodstains. *JFSCA*, 1979; 24: 856-863.



94. **Terasaki PI, Bernoco D, Gjertson D, Mickey MR, Perdue S.** Ninety-five percent probability of paternity with HLA, ABO and haptoglobin. *Forensic Sci Int*, 1978; 12: 227-232.
95. **Felix RT, Boenisch T, Giese RW.** Haptoglobin phenotyping of bloodstains by nongradient polyacrylamide electrophoresis. *JFSCA*, 1977; 22(3): 580-585.
96. **Culliford BJ, Wraxall BGD.** Haptoglobin types in dried bloodstains. *Nature*, 1966; 5051: 872-873.
97. **Roy R, Roy IC.** Haptoglobin phenotyping from older bloodstains by enzyme immunoassay and haptoglobin phenotypes within a Nebraska Caucasian population. *JFSCA*, 1991; 36(2): 571-575.
98. **Brauner P, Marbach A.** Haptoglobin phenotyping of bloodstains by horizontal electrophoresis on a compact polyacrylamide gradient gel. *Forensic Sci Int*, 1989; 41: 11-16.
99. **Erdem S, Aksoy M.** A note on the distribution of haptoglobin types in Turkey. *Hum Hered*, 1975; 25: 18-19.
100. **Seth S, Berndt H.** Distribution of enzyme groups and serum proteins in a North German Population. *Humangenetik*, 1973; 20: 147-150.
101. **Hever Ö.** Haptoglobin subtypes in Hungary. *Hum Hered*, 1976; 26: 324-326.
102. **Moral P, Panadero AM.** Haptoglobin subtypes in Barcelona (Spain). *Hum Hered*, 1983; 33: 192-194.

## ÖZGEÇMİŞ

Hüsniye Dağ 1970 Yılında Mersinde doğmuştur. İlk ve Orta öğrenimine 1976-1981 yılları arasında Mersin İlkokulu, 1981-1984 yılları arasında Mersin Ortaokulunda devam etmiştir. 1984-1988 yılları arasında Ç.Ü. Tıp Fakültesi Sağlık Koleji'nden mezun olmuş ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesinde hemşire olarak göreve başlamıştır. 1990-1994 yılları arasında Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde okuyarak Biyolog olarak mezun olmuştur.

1994-1995 Bahar döneminde Ç.Ü.Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nın açmış olduğu Adli Seroloji Yüksek Lisans Programına başlamıştır. Yüksek Lisans eğitimi esnasında Temmuz 1998'de Ç.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın açmış olduğu "Moleküler Genetikte Kullanılan Biyokimyasal Yöntemler Lisansüstü II. Yaz Okulu'na Katılmıştır. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nın Nisan 1998'de düzenlediği III. Adli Bilimler Kongresine katılmıştır. 1997-1999 arasında "Çukurova Yöresinde Haptoglobin Gen Frekanslarının Saptanması" başlıklı Yüksek Lisans tezini hazırlamıştır. Halen Ç. Ü. Tıp Fak. Balcalı Hastanesi Medikal Onkoloji Kliniğinde hemşire olarak görev yapmaktadır.