

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İZOLE BİR TOPLUMDA ERİTROSİT ASİD FOSFATAZ

GENETİK POLİMORFİZMİ

KİM. MÜH. M. Bahattin SEÇİLMİŞOĞLU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :

Tezin Sözlü Savunma Tarihi :

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ekin Önder

Jüri Üyesi : Prof. Dr. E. Ediş Kaha

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet KARAGÖZEL

Enstitü Müdürü: Doç. Dr. Adnan GALK

Haziran, 1995

TRABZON

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Genetik	3
2.1.1. Dominant Resesif ve Kodominant Genler	3
2.1.2. Çok Alellilik	4
2.1.3. Popülasyon Genetiği	4
2.1.4. Genetik Polimorfizm	8
2.2. Enzimler ve İzozimler	12
2.3. Eritrosit Asid Fosfataz ve İzozimleri	12
2.3.1. Asid Fosfatazlar	12
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Elektroforez	15
3.1.1. Elektroforez Hakkında Genel Bilgiler	15
3.1.2. Elektroforez Türleri	16
3.1.3. Sellüloz Asetat Elektroforezi	16
3.2. Gereçler	19
3.3. Kimyasal Maddeler	19
3.4. Çözeltilerin Hazırlanması	20
3.5. Kan Örneklerinden Hemolizat Hazırlanması	21
3.6. ACP ₁ İzozimlerinin Elektroforetik Ayırımı	21

4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	30
5.1. Metodun Tartışılması	30
5.2. Bulguların Tartışılması	31
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	38
6.1. Sonuçlar	38
6.2. Öneriler	38
7. ÖZET	39
8. SUMMARY	40
9. KAYNAKLAR	41

ÖNSÖZ

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde, Adli Fen Bilimleri araştırmalarında önemli bir yer tutmaya başlayan çeşitli eritrosit enzim polimorfik sistemlerinden biri olan Eritrosit Asid Fosfataz (EAP : ACP₁) enzim sisteminin, izole bir popülasyondaki alel ve fenotip frekanslarının dağılımını incelemeyi amaçlayan ve bu anlamda Türkiye’de ilk olan bu araştırmada, yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm,

K.T.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı’ndan,

Prof. Dr. Sayın Ekin ÖNDER’e, Prof. Dr. Sayın E. Edip Keha’ya, Prof. Dr. Sayın Orhan Değer’e ve diğer akademik sayın personele;

Ayrıca İ.Ü. Adli Bilimler Enstitüsü’nden Prof. Dr. Sayın Sevil ATASOY’a, Dr. Sayın Ersi ABACI’ya ve tüm Enstitü çalışanlarına; teşekkürlerimle...

Haziran 1995

Kim. Müh. M. Bahattin SEÇİLMİŞOĞLU

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adli ve kriminal araştırmalarda, insan kanının bir kimlik belirleme aracı olarak kullanılması, 1940 yılında, Landsteiner'in ABO kan gruplarını keşfinden beri mümkün bulunmaktadır. Ancak, düşük bir ayırıtırma ve dışlama olasılığına sahip olması sebebiyle bu uygulama, sonuca gütürme bakımından çoğu zaman yetersiz kalmaktadır.

Bu sebeple son yıllarda, kan aracılığıyla kimlik belirleme çalışmalarını, ABO kan gruplarına ek olarak ve bunların vereceği sonuçların doğruluk yüzdesini artırıcı, başka sistem analizlerine de dayandırılmaktadır.

Söz konusu bu sistemlerin en güvenilirlerinden ve modern biyokimyasal tekniklerin imkan verdiği en yenilerinden biri de, insan eritrositlerindeki bazı enzimlerin çeşitli genetik varyantlarının (fenotip) belirlenmesi yoluyla, bir kan örneğinin kimliklendirilmesi ve/veya bireyselleştirilmesi (individualizasyon) uygulamasıdır.

Adli rutin çalışmalarda, kimliklendirme amacıyla kıyaslanan iki kan örneğinin uyuşması durumunda, suçlanan kişinin şüphelilik hali devam etmekte ve bu durumda genetik verilerin, nihai kararı vermede ne ölçüde güvenilir olabilecekleri, matematiksel olasılık hesaplarıyla ortaya çıkmaktadır.

İşte bu olasılık hesaplarının yapılabilmesi için ilk ve en önemli şart, ilgili popülasyonun, belirli genetik işaretler açısından fenotip

ve gen frekanslarının, yüksek ve güvenilir bir oranda belirlenmiş olmasıdır (1).

Türk toplumundaki eritrosit izozimlerinin gen frekanslarını belirlemek amacıyla, az sayıda olsa da bazı çalışmalar yapılmıştır. Ancak bu konu, Türk bilim literatürüne henüz girmekte olduğundan, anılan bu çalışmalar, daha ziyade metodun yerleştirilmesi ve bir ön bilgi edinilmesi amacına yönelik olmuştur (1-2-3-4-5). Önümüzdeki yıllarda bu çalışmaların giderek artması ve bu alandaki eksikliğin giderilmesi beklenmektedir.

Öncekilerden farklı olarak, sunulan bu çalışmada, konuya biraz daha farklı bir tarzda yaklaşmak amacıyla kan örnekleri, küçük bir yerleşim biriminde yaşayan ve birbirleriyle akrabalık ilişkisi bulunan kişilerden sağlanmıştır. Böylece dar ve kapalı bir popülasyonda (izole popülasyon), eritrosit asid fosfataz izozimlerinin nasıl bir dağılım gösterdiği ve bu dağılımın, Hardy-Weinberg dengesinden sapma gösterip göstermeyeceği belirlenmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GENETİK

Kromozomlar üzerinde, DNA moleküllerinden oluşan ve özel fonksiyona sahip birimlere **Gen** denir. Aynı lokus üzerindeki her gen, değişik şekillere sahip olabilir ki bunlara **Alel** denir. Alellerin aynı olması durumunda **Homozigot**, farklı olması durumunda ise **Heterozigot** yapı söz konusudur.

Heterozigot kişi, söz konusu gen yeri bakımından iki türlü m-RNA sentezler ve bu sebeple de iki türlü polipeptid, yani iki ayrı genotip oluşturur. Fonksiyonel olarak bir gen, bir spesifik polipeptid zincirinin amino asid sıralamasını tayin eden nükleotidler dizisidir (6).

2.1.1. Dominant Resesif ve Kodominant Genler

Bir mutant gen, kromozom çiftinden yalnız biri üzerinde bulunduğu zaman (heterozigot) fenotipte beliriorsa bu gene **Dominant Gen**, homolog kromozomların her ikisinde de bulunduğu (homozigot) fenotipte beliriorsa buna da **Resesif Gen** denir (6).

Eğer normal genin **A** (dominant), bunun alelinin de **a** (resesif) biçiminde olduğu farzedilirse, hem homozigot (**AA** ve **aa**) hem de heterozigot (**Aa**) kişiler, dış görünüş olarak aynı, fakat kalıtsal olarak farklı olacaklardır. Belirlenen bu karakter özelliğine **Fenotip**, bunu oluşturan kalıtsal yapıya da **Genotip** denir (6).

Heterozigot kişiler bazan, taşıdıkları iki genin de fenotipini gösterebilirler. Mesela AB kan grubunu taşıyan bir kişi, A ve B antijenlerini oluşturan genler için heterozigot olduğu halde, hem A hem de B antijenine sahiptir. Bu şekilde, heterozigot durumdaki iki genin aynı anda kendini göstermesine **Kodominans**, böyle genlere de **Kodominant Gen** denir (6).

2.1.2. Çok Alellilik

Bazan, belirli bir karakteri etkileyen ikiden fazla alel bulunabilir. Bu duruma **Çok Alellilik** denir. Buna en iyi örnek olarak ABO kan grupları ve eritrosit izozimleri verilebilir. Her fert alellerden yalnız ikisine sahiptir.

2.1.3. Popülasyon genetiği

Belli bir alan içinde yaşayan ve hepsi aynı türe ait fakat farklı genetik kombinasyonlar taşıyan fertlerin oluşturduğu topluluğa **Popülasyon** denir. Popülasyondaki kalıtım ve varyasyon olayları, **Popülasyon Genetiği**'nin inceleme alanını oluşturur (7).

Popülasyon Genetiği'nin temelleri, 1908 yılında İngiliz Matematikçi **G. H. Hardy** ve Alman fizikçi **W. Weinberg** tarafından atılmıştır. Bu iki bilim adamı, popülasyon genetiğindeki en önemli değişkenin **gen frekansı** olduğunu öne sürerek **Hardy - Weinberg Kanunu**'nu ortaya koydular (6, 8).

Bu kanuna göre;

- Bir popülasyon için en önemli değişken, gen frekansıdır.
- Popülasyondaki alel genler bir gen havuzu içinde bulunurlar ve bunların biraraya gelmeleri tesadüfidir.
- Gen sıklığını değiştiren belirli etkenler (mutasyon, seleksiyon, genetik kayma vb.) var olmadığı takdirde, toplumda herhangi bir otozomal homozigot gen tarafından oluşturulan karakterin sıklığı, o genin toplumdaki sıklığının karesine eşittir. Heterozigot genler için

ise, bir alel frekansının diğer alel frekansı ile çarpımına eşittir. Bu şartlarda genotiplerin frekansı nesilden nesile değişmez (6).

2.1.3.1. Gen ve Genotip Frekansları Arasındaki İlişki

Bir popülasyonda görülmesi muhtemel genotiplerin sayısının, gen sayısından fazla olması doğaldır. Mesela iki alelli bir lokus için mümkün genotip sayısı 3' dür. Diploid bireyli bir popülasyonda 100 gen yeri için mümkün genotip sayısı 3^{100} olacaktır (6, 8-9-10).

Belli bir otomozal A lokusunu alalım ve bu lokusta A ve a gibi iki alel bulunduğunu farzedelim. Bu durumda mümkün genotipler AA, Aa ve aa olacaktır. N diploid bireyli sonlu bir popülasyonda:

AA genotipli fertlerin sayısı N_{11} ,

Aa genotipli fertlerin sayısı $2N_{12}$,

aa genotipli fertlerin sayısı N_{22}

olacaktır. Burada;

$$N_{11} + 2N_{12} + N_{22} = N$$

olmaktadır (8).

N diploid bireyli bir popülasyonda her bireyin iki gen taşıdığı gözönüne alındığında, popülasyondaki toplam gen sayısı $2N$ olacaktır.

- AA genotipindeki bir fert iki tane A geni,

- Aa genotipindeki bir fert bir tane A, bir tane a geni,

- aa genotipindeki bir fert iki tane a geni taşımaktadır.

Bu durumda popülasyondaki;

A geni sayısı $2N_{11} + 2N_{12}$

a geni sayısı $2N_{22} + 2N_{12}$ olacaktır.

A geninin frekansı p ile, a geninin frekansı q ile gösterildiğinde,

$$(*) \quad p = \frac{2N_{11} + 2N_{12}}{2N}$$

$$(**) \quad q = \frac{2N_{22} + 2N_{12}}{2N}$$

olacaktır. Burada;

$$p + q = 1' \text{ dir (9-10).}$$

Seçilen 100 kişilik bir popülasyondaki fertler, genotiplerine göre aşağıdaki tabloda olduğu gibi gösterilebilir (8).

Tablo 1. 100 Kişilik Bir Popülasyondaki Fertlerin Genotip ve Gen Sayısı

	AA	Aa	aa	Toplam
Fert Sayısı	30	50	20	100
Gen Sayısı (A)	60	50	-	110
Gen Sayısı (a)	-	50	40	90

Bu durumda yukarıdaki örnek için,

$$- \text{ A geninin frekansı, } p = 110/200 = 0.55$$

$$- \text{ a geninin frekansı, } q = 90/200 = 0.45$$

olacaktır.

AA, Aa ve aa genotiplerinin frekansları da sırasıyla **P**, **H** ve **Q** ile gösterilirse, aşağıdaki tabloda verilen bağıntılar elde edilir (8).

TABLO 2. N Bireyli Bir Popülasyondaki Genotiplerin Sayı ve Frekansı

Genotip	Sayı	Frekans
AA	N_{11}	$P = N_{11}/N$
Aa	$2N_{12}$	$H = 2N_{12}/N$
aa	N_{22}	$Q = N_{22}/N$
Toplam	N	1

Gen Frekansları için daha önce verilen (*) ve (**) eşitliklerinde,

N_{11}/N yerine P,

N_{12}/N yerine $1/2 H$,

N_{22}/N yerine Q

değerleri (Tablo 2'den) konursa, gen ve genotip frekansları arasında, aşağıdaki bağıntılar elde edilir (8).

$$p = P + 1/2 H$$

$$q = Q + 1/2 H$$

2.1.3.2. Gen Frekansı ve Hardy-Weinberg Dengesini Değiştirmeye Yönelik Etkenler

Bir popülasyonun gen ve genotip frekanslarının nesilden nesile değişmemesi durumunda, o popülasyon için "Hardy-Weinberg Dengesinde" terimi kullanılır. Ancak aşağıdaki bazı etkenler, bu dengeden sapmalara yol açar (6-7).

(A) Rastgele Olmayan Evlilikler: Mesela resesif bir gen için, homozigot bir fert, diğer bir homozigot fertle birleştiğinde denge, homozigotlar lehine bozulacaktır. Aile içi evlilikler bunun en önemli örneğidir (6-7).

(B) Mutasyon: Mutasyon, genetik bir yapının değişmeyen bir durumdan diğer bir değişmeyen duruma geçmesidir. Çok seyrek olarak görülmekle birlikte, aile ve toplumdaki gen frekanslarını değiştirir.

(C) Seleksiyon: Mutasyonlar tarafından popülasyonun gen havuzuna sokulmak istenen yeni genlerin, dolayısıyla yeni fenotiplerin eliminasyonudur. Doğal veya yapay olabilir. Doğal seleksiyonun taraflı davranması durumu "Selektif Seleksiyon" olarak adlandırılır. Selektif seleksiyon, Hardy-Weinberg Kanunu'ndan beklenen sonuçları değiştirmektedir (6-7).

(D) Genetik Kayma: Kendi içlerinde birleşmeler yapmış küçük ve izole popülasyonlarda, belli bir genin frekansında ortaya çıkan tamamen tesadüfi artış ya da azalışları ifade eder ve bu tür toplumlarda önemlidir (6-7).

(E) Gen Akımı: Göç veya başka ırklardan kişilerle birleşme gibi olaylar sonucu, orijinal popülasyonun gen havuzuna yeni genlerin katılması durumudur ki bu yolla toplumların gen yapıları değişebilmektedir (6-7).

2.1.4. Genetik Polimorfizm

Tek bir gen lokusu tarafından oluşturulan polipeptidler ve bunların varyantları incelendiğinde, aynı lokusa birden fazla alelin yerleşmiş olduğu ve bu alellerin popülasyon içinde, birbirlerinden kesinlikle ayırdedilebilen birden fazla fenotip oluşturarak, varlıklarını beraberce sürdürdükleri görülmektedir. İşte bu duruma **Genetik Polimorfizm** denir. Mesela ABO kan grupları, popülasyon içinde, birbirlerinden kesinlikle ayırdedilebilen dört fenotip (AA, BB, AB ve O) oluştururlar. İnsanda ilk bulunan polimorfizm, 1940'da Landsteiner tarafından ortaya konan bu kan gruplarıdır (6,9-10).

Genetik polimorfizmden söz edebilmesi için bu alellerin, popülasyon içinde % 1-2'den daha yüksek bir frekansta görülmeleri gerekir. Bu bakımdan polimorfizm, toplumda % 1' den daha düşük bir frekansta görülen **nadir genetik varyantlarla** karıştırılmamalıdır (6,9-10).

2.1.4.1. Genetik Polimorfizmin Adli ve Kriminal Uygulamaları

Genetik bir sistemin adli rutin araştırmalarda kullanılabilmesi için, doğumla var olması ve hayat boyu değişmemesi gerekir. Yapılan araştırmalar, yapısal gen lokuslarının 1/3'ünün polimorfizm gösterdiğini ortaya koymuştur (11).

Adli vak'alarda kullanılmak üzere son yıllarda çok sayıda genetik varyant bulunmuş, yenileri için de araştırmalar sürmektedir. Adli vak'alarda kimliklendirme çalışmaları için, bu genetik varyantların en yüksek dışlama imkanı verenlerinin seçilmesi, individualizasyonu kolaylaştırmaktadır. Enzim ve antijenler için tesbit edilen çok sayıda genetik varyant, ilgili popülasyondaki frekanslarının bilinmesi durumunda bir kan örneğinin kimliklendirilmesini mümkün kılar. İncelenen genetik varyant sayısı arttıkça, kişiler arası diskriminasyon imkanı da o ölçüde artar (11).

Mesela babalık (neseb) tayini için ABO, Rh, MNSs, Kell, Duffy, Kidd ve HLA sistemleri birlikte kullanıldığında, zanlıyı dışlama ihtimali % 78.6 olur. Bunlara Haptoglobulin de eklendiğinde % 82.5 gibi oldukça yüksek bir oran ortaya çıkar. Analize eklenen her sistem ile suçsuz bir kişiyi dışlama oranı yükselecektir (11).

Aşağıdaki tabloda, adli vak'alarda genetik işaret olarak sıklıkla kullanılan polimorfik protein ve enzim sistemleri verilmiştir (12).

TABLO 3. Adli Vak'alarda Kullanılan Polimorfik Sistemler

SİSTEMİN ADI	KISALTILMIŞ ADI	ELEKTROFORETİK GÖÇ SÜRESİ (dak)	GÖRÜNÜRLEŞTİRME SÜRESİ (dak)
-Adenozin deaminaz	ADA	25	15
-Adenilat kinaz	AK	45	5-10
-(Alfa) ₁ -Antitripsin	AAT	60	30
-Alkaleen fosfataz	ALP	40	60
-Eritrosit asid fosfataz	ACP ₁ (EAP)	40	8-10
-Esteraz D	EsD	30-60	5-10
-Fosfoglukomutaz	PGM	60	15
-Fosfoglukonat dehidrogenaz	PGD	60	10
-Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	G-6-PD	20	5
-Glioksalaz I	GLO-I	30	20-35
-Glutamik piruvik transaminaz	GPT	60	15-30
-Grup spesifik komponent	GSC	20	30
-Hemoglobin	Hb	15	5
-Laktat dehidrogenaz	LDH	30	10-15
-Peptidaz A	PEP-A	60	10
-Transferrin	Tf	40	30

Aşağıdaki tabloda, 20 farklı genetik sistemin, dört farklı ırk için elde edilen ortalama dışlama olasılıkları (O.D.O) verilmiştir (13).

TABLO 4. 20 Genetik Sistemin 4 Irk için O.D.O Verileri

SİSTEM	BEYAZ	SİYAH	KIZILDERİLİ	ASYA
1. ABO	0.152	0.178	0.130	0.195
2. Rh	0.404	0.475	0.451	0.285
3. MNSs	0.312	0.197	0.314	0.241
4. Kell	0.034	0.123	0.001	0.001
5. Duffy	0.183	0.089	0.185	0.097
6. Kidd	0.187	0.169	0.187	0.187
7. Pp	0.039	0.010	0.043	0.086
8. Hp	0.184	0.186	0.187	0.173
9. Gc	0.163	0.118	0.143	0.187
10. Hb	0.000	0.045	0.002	0.004
11. AK	0.035	0.009	0.013	0.001
12. ADA	0.044	0.017	0.016	0.026
13. EAP	0.243	0.151	0.167	0.137
14. EsD	0.092	0.079	0.109	0.179
15. G-6-PD				
erkek	-	-	-	-
kadın	0.008	0.154	0.146	0.005
16. PGM	0.145	0.128	0.145	0.149
17. 6-PD	0.016	0.041	0.023	0.078
18. GbI	0.185	0.172	0.168	0.665
19. PEP-A	0.000	0.047	0.002	0.000
20. GPT	0.185	0.145	0.182	0.184
TOPLAM O.D.O (20 sist. için)	0.949	0.950	0.950	0.919

Günümüzde adli vak'alarda kullanılabilecek, insan kanına ait 50' den fazla polimorfik sistem mevcuttur.

2.2. ENZİMLER VE İZOZİMLER

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları katalizleyen, protein yapısında biyomoleküller olarak tanımlanır. Enzimler, katalizledikleri reaksiyonu yalnızca hızlandırmayıp tümüyle kontrol ederler. Bir diğer özellikleri de, katalizledikleri reaksiyona son derecede spesifik olmalarıdır (14).

Bir canlı türünde aynı kimyasal reaksiyonu katalizleyen, ancak farklı moleküler yapıya sahip enzimlere **İzoenzim** (:İzozim) adı verilir. İzozimler, birbirlerinden farklı maksimum aktivite gösteren ve substrat affiniteleri, Michaelis-Menten (K_M) sabitleri ve düzenleyici özellikleri ile birbirlerinden ayrılan enzimlerdir (14).

Bugün birçok enzimin izozimleri bilinmektedir. Bunların çoğu, farklı polipeptid zincirlerinin değişik kombinasyonlarından ibarettir. İzozimler aynı lokustaki farklı aleller tarafından meydana getirilirler (8).

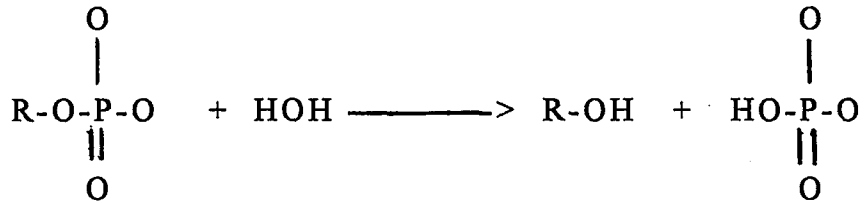
2.3. ERİTROSİT ASİD FOSFATAZ VE İZOZİMLERİ

2.3.1. Asid Fosfatazlar (ACP, EC 3.1.3.2)

Bu adlandırma bir tek enzimi değil, belli bir pH aralığında optimal aktivite gösteren bir grup enzimi ifade eder. Asid fosfatazlar lizozomlarda bulunur (14).

Asid fosfataz aktivitesinin en çok bulunduğu organ ve dokular, karaciğer, dalak, eritrositler, trombositler, kemik iliği ve prostat glandıdır. Asid fosfatazlar dayanıksız enzimlerdir; 37°C ve pH 5'in üzerinde aktivitelerini kaybederler (14).

Asid fosfatazlar, hidrolazlar grubundan enzimlerdir ve moleküldeki eter bağlarına su sokarak hidrolizleyen, ya da monofosfatı, akseptör bir alkole transfer eden ortofosforik monoester fosfohidrolaz ve fosfotransferazlardır.

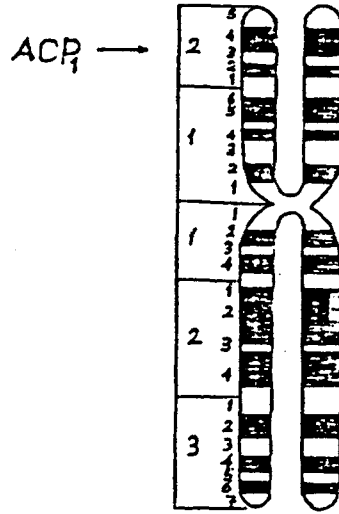


Enzim bu fonksiyonunu iki aşamada gerçekleştirir. Reaksiyonlar sonunda ya bir inorganik fosfat, ya da yeni bir fosfat esteri yapılır (14).

2.3.1.1. Eritrosit Asid Fosfataz (ACP₁ : EAP)

Eritrosit asid fosfataz, pH 5'de aktif olan diğer asid fosfatazlardan farklı olarak, pH 6'da aktiftir ve substrat spesifitesi gösterir. Bundan başka, diğer fosfatazların çoğunun teşhisinde kullanılan α - ve β -naftil fosfatları hidroliz etmemesi ile bunlardan ayrılır. Yine diğer asid fosfatazların tersine, formalin ortamında aktivitesini kaybeder. EAP, bugüne kadar yalnızca eritrositlerde tesbit edilmiştir. EAP'ın bir tek gen tarafından sentezlendiği bilinmektedir (14).

Bu genin, otozomal kromozomlardan 2 nolu kromozomun kısa kolunun 2.5 bandında bulunduğu bildirilmiştir (Şekil 1) (6,15-16-17-18-19).



ŞEKİL 1. EAP'ı Sentezleyen Genin 2 Nolu Kromozomdaki Yeri (16).

Bu enzimi sentezleyen genin, A,B ve C olmak üzere üç alelinin bulunduğu ve bu alellerin de $ACP_1 A$, $ACP_1 B$ ve $ACP_1 C$ homozigot, $ACP_1 AB$, $ACP_1 AC$ ve $ACP_1 BC$ heterozigot olmak üzere toplam altı fenotip oluşturduğu, ilk defa 1963-64 yıllarında Hopkinson tarafından ortaya konmuştur (17).

Yukarıda sözü edilen ve dünya popülasyonunda en sık görülen bu üç alele ek olarak, çeşitli araştırmacıların belirledikleri bazı nadir aleller de aşağıdaki tabloda verilmektedir (17, 20-21-22).

TABLO 5. Eritrosit Asid Fosfatazın Sık ve Nadir Alelleri

ARAŞTIRMACI	BULUNUŞ TARİHİ	ALEL
Hopkinson	1963-1964	$ACP_1 A, B, C$
Gibbett ve Scott	1965	$ACP_1 R$
Karp ve Sutton	1967	$ACP_1 D$
Herbich	1969	$ACP_1 O$
Sorensen	1975	$ACP_1 E$
Tanis ve ark.	1977	$ACP_1 Gua-1$
Yoshihara ve ark.	1980	$ACP_1 Tic-1$
Turowska	1984	$ACP_1 K$
Nelson ve ark.	1984	$ACP_1 G, F$

3. MATERYAL VE METOD

3.1. ELEKTROFOREZ

3.1.1. Elektroferez Hakkında Genel Bilgiler

Elektroferez temel olarak, makromoleküllerin bir elektriksel alana yerleştirildiklerinde, taşıdıkları yüke göre anod veya katoda doğru göç etmek suretiyle birbirlerinden ayrılmaları prensibine dayanır (23).

Bir protein molekülü, kendi izoelektrik noktasından ne kadar uzak bir pH ortamında bulunursa, göç etme hızı o ölçüde artar (23).

3.1.1.1. Elektroferezde Tampon Çözeltisinin Önemi

Tampon çözeltisinin, elektroferez uygulamasında başlıca iki fonksiyonu vardır:

- Elektrik akımını taşımak,
- pH' ı sabit tutmak suretiyle moleküllerin net yükünü kesinleştirmek.

Böylece tampon, elektroforetik göçün yönünü belirler. Tamponun iyonik gücü, molekülün ilerleme hızını ve bandların belirginliğini sağlar. İyon konsantrasyonunun artmasıyla molekülün hareket yeteneği azalır (23).

3.1.1.2. Bandların Görünürleştirilmesi (Vizualizasyon)

Elektroferez işleminden sonra protein bandları, bir indikatör aracılığıyla görünür hale getirilir. Tüm proteinleri boyayabilen indikatörler olduğu gibi, sadece belli bir proteini boyayan

indikatörler de vardır. Özel bir indikatörü bulunmayan proteinler için ise immünolojik teknikler kullanılmaktadır (23).

3.1.2. Elektroforez Türleri

Elektroforez, taşıyıcı (destek) ortamın cinsine göre, çeşitli türlere ayrılmaktadır. Bunlar:

- 1) Kağıt Elektroforezi
- 2) Sellüloz Asetat Elektroforezi
- 3) Nişasta Jel Elektroforezi
- 4) Agar Jel Elektroforezi
- 5) Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)
- 6) Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) olarak adlandırılmaktadırlar (23).

3.1.3. Sellüloz Asetat Elektroforezi

Sellüloz asetat, elektroforez taşıyıcı ortamı olarak ilk defa 1957 yılında Köhn tarafından kullanılmış ve bugüne kadar da uygulamada başarıyla kullanılmaktadır (24).

Sellüloz bir β -D-Glukoz polimeri olup, sadece bitkilerde bulunan bir makromoleküldür.

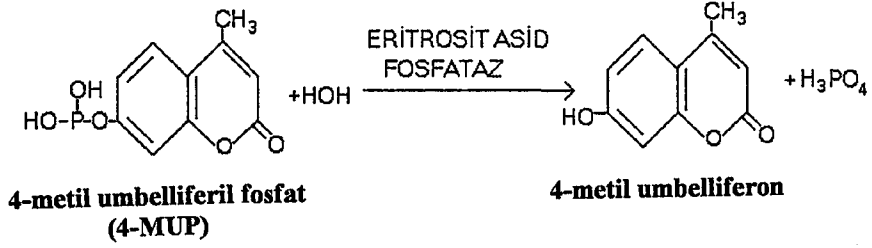
Elektroforezde kullanılan sellüloz asetat membranları genellikle % 80 hava boşluğu ihtiva ederler ve kuru, opak ve dayanıksızdırlar. Ancak tampona konduklarında bu hava boşlukları sıvı ile dolduğundan dayanıklı bir hal alırlar. Bu membranlar homojen bir yapıya da sahiptirler ve serbest OH gruplarının hepsi asetillenmiştir (24).

3.1.3.1. Eritrosit Asid Fosfatazın Sellüloz Asetat

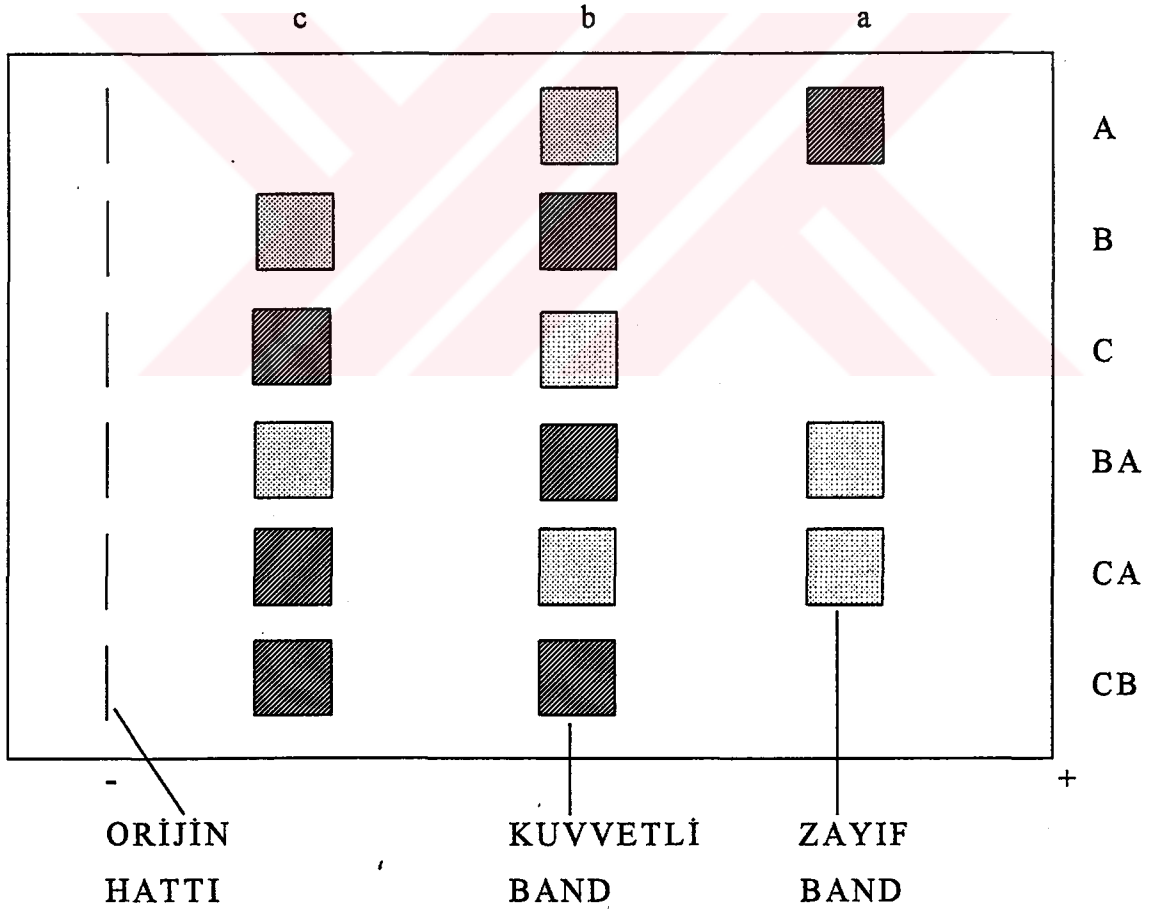
Elektroforezi

Elektroforez işleminden sonra, bandların görünürleştirilmesi için uygulanan işlemde ACP₁ fenotipleri, aşağıdaki reaksiyon

mekanizmasıyla reaksiyon karışımındaki 4-metil umbelliferil fosfattan (4-MUP), bir fosfat grubu ayırır ve UV-366 nm ışık altında floresans veren 4-metil umbelliferon oluşur (12).



Şekil 2' de, UV-366 nm ışık altında görünür hale getirilmiş olan izozim bandlarının elektroferez membranı üzerindeki konumları şematik olarak gösterilmiştir (12).



ŞEKİL 2. ACP₁ Fenotiplerinin Şematik Görünümü

Buna göre,

AA Fenotipi : a hattında kuvvetli bir band,
b hattında zayıf bir band,

BB Fenotipi : b hattında kuvvetli bir band,
c hattında zayıf bir band,

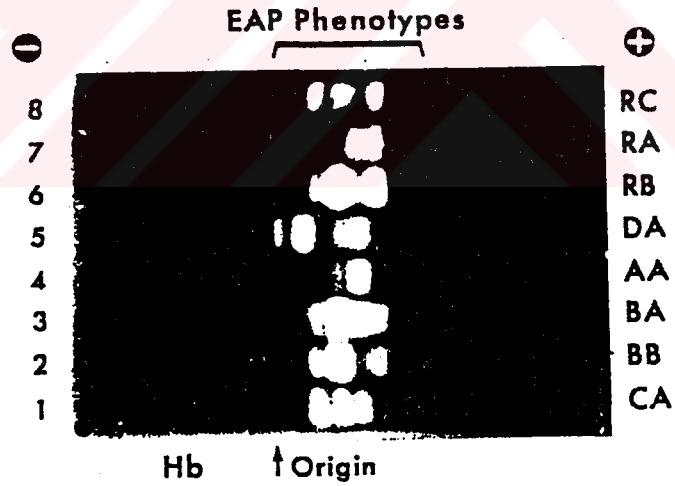
CC Fenotipi : b hattında zayıf bir band,
c hattında kuvvetli bir band,

AB Fenotipi : a hattında zayıf bir band,
b hattında kuvvetli bir band,
c hattında zayıf bir band,

AC Fenotipi : a hattında zayıf bir band,
b hattında daha zayıf bir band,
c hattında kuvvetli bir band.

BC Fenotipi : b ve c hattında aynı derecede kuvvetli iki band

olarak belirlemektedir (12).



RESİM 1: Bazı ACP₁ Fenotiplerinin UV-366 nm Işık Altındaki Görünümleri (12).

Bu çalışmada, Trabzon ili Merkez Yeşilova köyünde oturan, aynı soyadını taşıyan ve aileye sonradan katılmamış 55 kişiden elde edilen kan örnekleri kullanıldı.

Enzimin çalışılmasında B. W. Grunbaum Metodu uygulandı ve elektroforez sistemi olarak da yine Grunbaum tarafından geliştirilen Sartorius Sartophor sistemi kullanıldı (12).

3.2. Gereçler

KULLANILAN GEREÇ	TİPİ
- Derin Dondurucu	Profilo
- Elektrikli Balon-joje Isıtıcısı	Elektromag
- Elektroforez Tankı	Sartorius Sartophor
- Elekt. Analitik terazi (0.1 mg has.)	Shimadzu Libror AEU 210
- Etüv	Elektromag 5040 BC
- Güç Kaynağı	Sartophor SM 16641 type
- Kurutma Kağıdı	Sartophor SM 15905
- Otomatik Mikropipet	Oxford Microsets
- Örnek Taşıyıcısı	Sartophor
- Örnek Uygulayıcısı (aplikatör)	Sartophor
- pH metre	Consort C- 424
- Santrifüj	Hettich EBA III D 72 5000 U/min
- Sellüloz Asetat Membranları	Sartorius SM 11200-70x145 BBN
- UV Işın Kaynağı	Desaga Gmbh D.6900 type 131100

3.3. Kimyasal Maddeler

KİMYASAL MADDE ADI	FİRMA ADI- KATOLOG NO
- Gliserol	Merck 4094
- 4-metil umbelliferil fosfat (MUP)	Sigma
- Noble Agar	Difco Laboratories 0142-01
- Sitrik asid monohidrat	Merck 244

- Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat	Merck 6346
- Sodyum hidroksid	Merck 6498
- tri-sodyum sitrat dihidrat	Merck 6430
- tri-Sodyum sitrat 5.5 hidrat	Merck 6431

3.4. Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. % 3.8 Sodyum Sitrat Çözeltisi

Hemolizatların hazırlanmasında antikoagülan olarak kullanılmak üzere 3.80 g sodyum sitrat.5.5 hidrat tartılarak distile suda çözüldü, 100 mL'ye tamamlandı.

3.4.2. Tank Tamponu

Fosfat-Sitrat, pH = 5.9

0.024 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0.015 M $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

3.312 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ile 4.4115 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, birlikte distile suda çözümlenerek pH' ı kontrol edildi ve 1 L' ye tamamlandı.

3.4.3. Membran Tamponu

Tank tamponundan, 1/5 oranında seyreltilerek hazırlandı.

3.4.4. Görünürleştirme Reaksiyon Tamponu

0.05 M sitrik asid tamponu, pH = 5.0

10.507 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ distile suda çözümlenerek 10 M sodyum hidroksid ile pH' ı 5.0' e ayarlandı ve litreye tamamlandı.

3.4.5. 10 M NaOH Çözeltisi:

40.0 g NaOH, distile suda çözümlenerek 100mL'ye tamamlandı.

3.5. Kan Örneklerinden Hemolizat Hazırlanması

- Numaralandırılmış santrifüj tüplerinin her birine 0.4 mL % 3.8 sodyum sitrat çözeltisi kondu
- Her bir tübe kan örneklerinden 1.6 mL alınarak ağızları parafilmle kapatıldı ve karışmalarını sağlamak üzere birkaç kez alt üst edildi.
- Örnek tüpleri 2500 rpm'de 5 dak. süreyle santrifüjlendi.
- Plazma kısımları bir pipetle dikkatlice çekilerek ayrıldı ve atıldı.
- Kalan eritrosit kısımları, distile su ile 1/2.5 oranında seyreltilerek hemolizat elde edildi. Bu hemolizatlar 2 kez dondurulup çözüldükten sonra -20°C' de analiz tarihine kadar muhafaza edildi.

3.6. ACP, İzozimlerinin Elektroforetik Ayırımı

3.6.1. Elektroforez İşlemi

Soğutucudan çıkarılan tank tampon çözeltisi bekletilerek oda sıcaklığına getirildi. Tank içine taşıyıcı ve elektrodları yerleştirildi.

Tankın her iki bölmesine işaretli seviyeye kadar tampon çözelti kondu ve tank her iki tarafından hafifçe kaldırılarak, çözeltinin her iki bölmeye de eşit olarak yayılması sağlandı. İşaretli seviyenin yukarısına sıçramış olan sıvı damlacıkları kurutma kağıdıyla dikkatlice alındı.

Üzerinde 1'den 10'a kadar numaralandırılmış haznecikleri olan örnek taşıyıcısının bu hazneciklerine kan örneklerinin numara sırasına göre ilk 10 adedinden 20'şer μ L kondu.

Tank tamponundan 1/5 oranında seyreltilerek daha önceden hazırlanmış olan membran tamponundan, 100 mL kadar alınarak yayvan bir kap içerisine kondu.

Sellüloz asetat membranı el değdirilmeden bir pens yardımıyla alındı ve bir ucundan başlayarak membran tamponu içerisine dikkatlice daldırıldı. Bu işlem yüzey ıslatma tarzında ve hava kabarcıkları oluşmamasına dikkat edilerek yapıldı. Yüzey tümüyle ıslanınca bir pens yardımıyla membran çözelti içine batırıldı. (Bu işlem sırasında, üzerlerinde beyaz lekeler oluşan membranlar kullanılmayarak atıldı).

Yine pensler yardımıyla çözelti içinden çıkarılan membran, iki adet kurutma kağıdı arasına konarak yüzeyindeki fazla sıvı alındı.

Kurutulan membran her iki tarafındaki birer sıra deliklerinden, örnek köprüsü üzerindeki dişlilere geçirilerek köprü üzerine tesbit edildi ve örnek köprüsü tank üzerindeki yerine oturtuldu. Membran uçları pens yardımıyla tank tamponu içine daldırıldı ve tankın alt kapağı dikkatlice kapatıldı.

Özel hazneciklerine daha önceden kan örneklerinin (hemolizat) bulunduğu örnek taşıyıcısı üzerine örnek uygulayıcısı (aplikatör) yerleştirildi ve bir defada 10 adet numune alındı (İstenirse tek tek de alınabilir).

Aplikatör, örnek taşıyıcısı üzerinden alınarak tank kapağı üzerindeki (katod tarafında) 3 nolu pozisyonda yerine oturtularak, kan örneklerinin hepsi birden membran üzerine uygulandı.

Tankın üst kapağı kapatılarak altındaki ayar vidaları ve üzerindeki su terazisi yardımıyla tam yatay konumda olması sağlandı.

Akım kaynağı 250 V(DC) ve 60 dakikalık süreye set edilerek, fişi tank üzerindeki prize takıldı; 250 V ve 1-3 mA' lik bir doğru akım 60 dakika süreyle uygulanmak üzere butona basılarak

elektroforetik göç başlatıldı. Eritrosit asid fosfataz izozimleri anoda doğru göç etmeye başladılar.

3.6.2. Reaksiyon Jelinin Hazırlanması

Elektroforez işleminin devam ettiği sırada, izozim bandlarının görünürleştirilmesinde kullanılacak olan reaksiyon jeli hazırlandı. Bunun için aşağıdaki işlem sırası takibedildi:

a) 10 mg 4-metil umbelliferil fosfat (MUP), 4.5 mL gliserol içerisinde bir bagetle karıştırılarak mümkün olduğunca çözüldü.

b) Bu çözelti üzerine 15 mL reaksiyon tamponu azar azar eklenerek iyi bir karışma sağlandı.

c) 250 mg agar, 10 mL reaksiyon tamponu içinde çözülerek kaynatıldı.

d) Agar çözeltisi 50°C' a soğutularak, bunun üzerine (b)' deki çözelti eklendi ve elde edilen bu jel, hiç zaman kaybedilmeden 5 adet petri kutusuna, yaklaşık eşit miktarlarda, homojen bir şekilde ve hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek döküldü ve petri kutularının kapakları kapatıldı.

e) Hemen kullanılmayacak olan jel plakaları (petri kutuları), alüminyum folyolara sarılarak (ışık almaması için) buzdolabına kondu.

3.6.3. İnkübasyon ve Değerlendirme

60 dakikalık elektroforez süresi sonunda tanktan çıkarılan membran bir pens yardımıyla, daha önceden hazırlanmış olan petri kutusundaki reaksiyon jeli üzerine üst yüzeyi gelecek şekilde (arada hava boşluğu kalmayacak tarzda) yapıştırıldı.

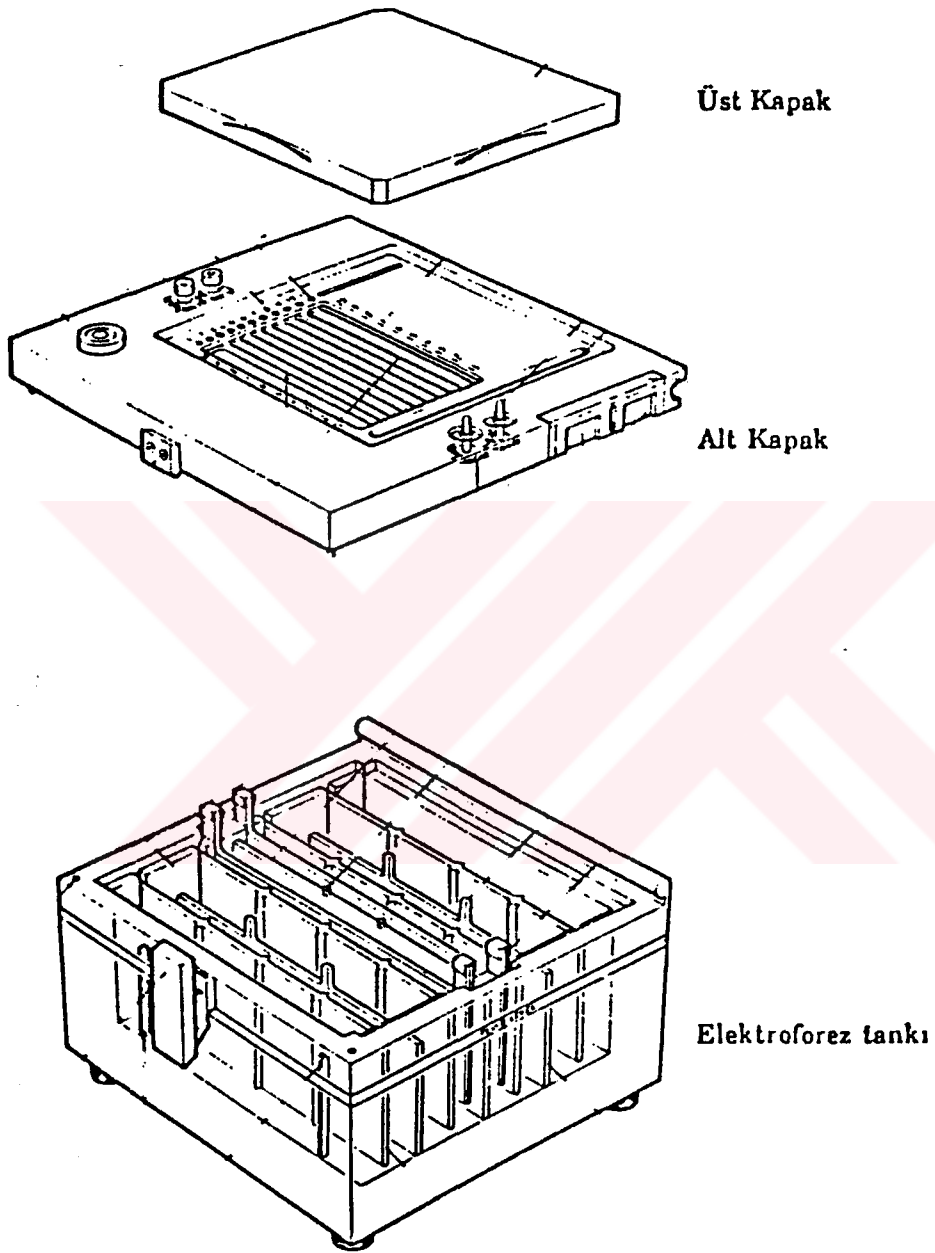
Petri kutusunun kapağı kapatılarak 37°C' deki etüvde 10 dak. süreyle inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası etüvden çıkarılan membran üzerindeki izozim bandları UV-366 nm ışık altında görülebilir hale geldi ve

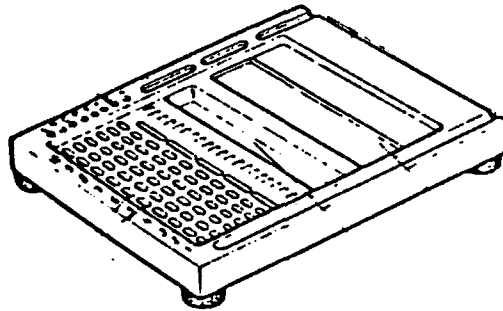
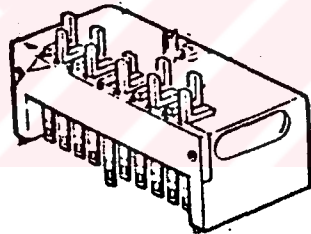
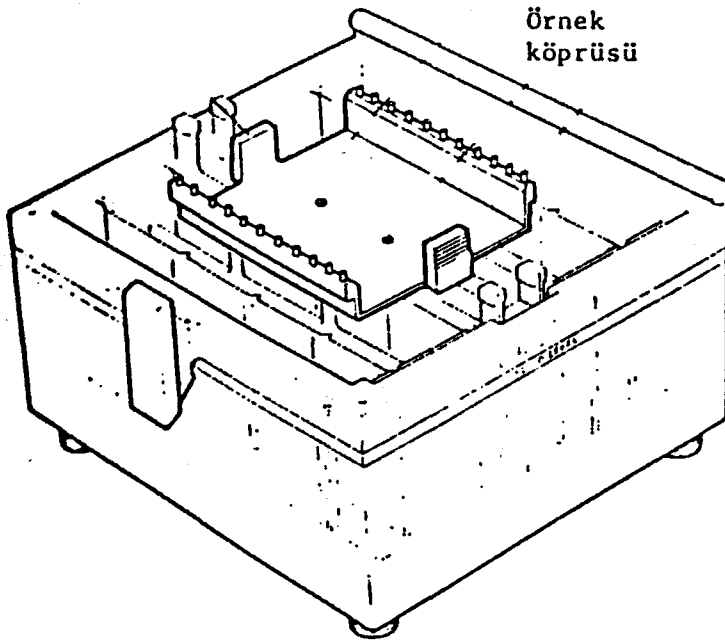
değerlendirildi. İzozim bandlarının görünür hale gelmesi, inkübasyon sırasında ve Bölüm 3.1.3.1.' deki reaksiyonla olmaktadır.

Agfa Orto Copex 25 film kullanılarak UV-366 mm ışık altında elektroforegramların fotoğrafları çekildi (Resim 2).

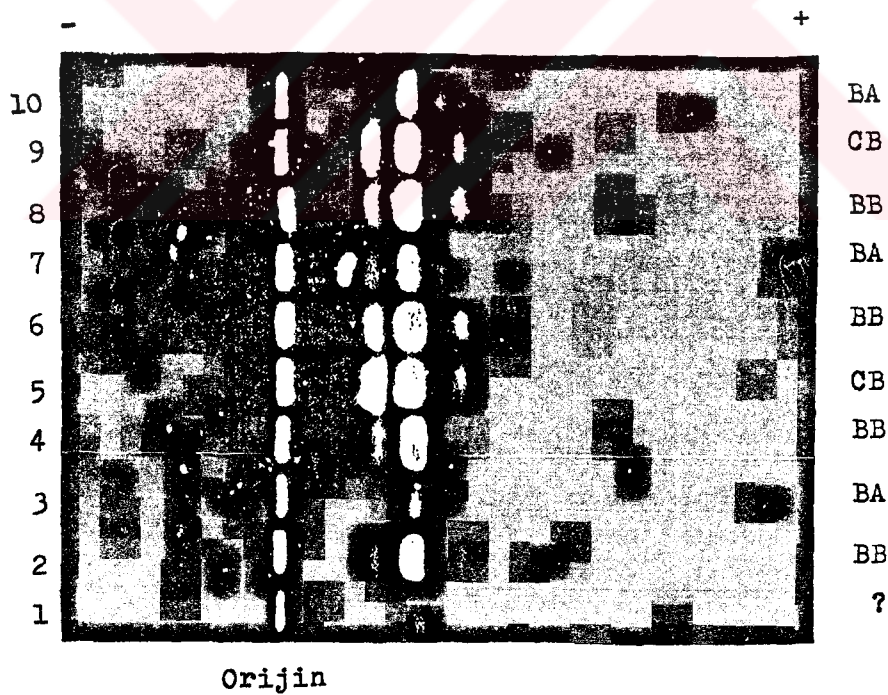
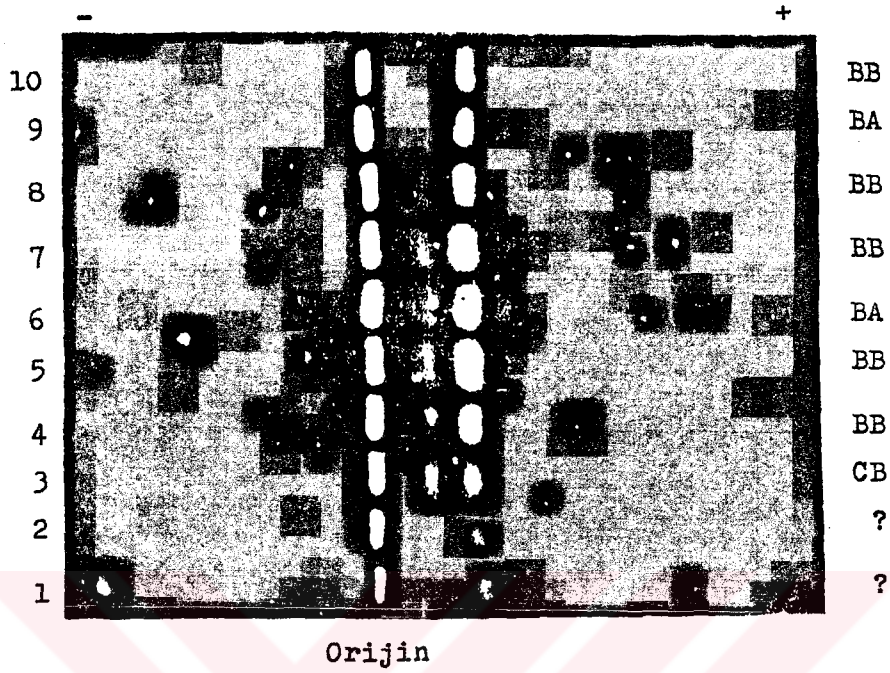




ŞEKİL 3. Çalışmamızda Kullanılan Sartophor Modeli Elektroforez Tankı ve Parçalarının Şematik Görünümü (12).



ŞEKİL 4. Örnek Köprüsünün Tank Üzerindeki Konumu, Örnek Uygulayıcısının (aplikatör) ve Taşıyıcının Şematik Görünümleri (12).



RESİM 2. Çalışmamızdan Eritrosit Asid Fosfataz Fenotiplerine
Ait Elektroforegramlar

4. BULGULAR

Eritrosit Asid Fosfataz fenotipleri bakımından incelenen 55 kişinin kan örneklerinden;

- 1 kişi homozigot A,
- 28 kişi homozigot B,
- 8 kişi heterozigot AB,
- 1 kişi heterozigot AC,
- 17 kişi heterozigot BC olarak tesbit edildi.
- Homozigot C fenotipi tespit edilmedi.

Bu durumda kan örnekleri incelenen 55 kişinin toplam 110 geninden;

- 11 tanesi A geni,
- 81 tanesi B geni,
- 18 tanesi ise C genidir.

Buna göre, her bir genin frekansı;

$$\text{A geninin frekansı; } p_A = \frac{2x(1) + 8 + 1}{2x(55)} = \frac{11}{110} = 0.100$$

$$\text{B geninin frekansı; } p_B = \frac{2x(28) + 8 + 17}{2x(55)} = \frac{81}{110} = 0.736$$

$$\text{C geninin frekansı; } p_C = \frac{1 + 17}{2x(55)} = \frac{18}{110} = 0.164$$

olmaktadır. Hardy-Weinberg Kuralı'na uygun "Beklenen (Teorik) Fenotip Frekansları" ise;

$$\text{AA fenotipi için ... } p_A^2 = (0.100)^2 = 0.010$$

$$\text{BB fenotipi için ... } p_B^2 = (0.736)^2 = 0.542$$

$$\text{CC fenotipi için ... } p_C^2 = (0.164)^2 = 0.027$$

$$\text{AB fenotipi için ... } 2x(p_A x p_B) = 2x(0.100x0.736) = 0.147$$

$$\text{AC fenotipi için ... } 2x(p_A x p_C) = 2x(0.100x0.164) = 0.033$$

$$\text{BC fenotipi için ... } 2x(p_B x p_C) = 2x(0.736x0.164) = 0.241$$

olarak bulundu.

Aşağıdaki tabloda, incelenen 55 kan örneğinin fenotip sayıları ve dağılım yüzdeleri verilmektedir.

TABLO 6. Çalışmamızda ACP₁ Fenotiplerinin Sayı ve Dağılım Yüzdeleri

	FENOTİPLER						TOPLAM
	AA	AB	AC	BC	BB	CC	
N	1	8	1	17	28	-	55
%	1.82	14.54	1.82	30.91	50.91	0.00	100

Aşağıdaki tabloda her bir fenotipin beklenen ve gözlenen değerleri ile gen frekansları yer almaktadır.

TABLO 7. ACP₁ Fenotiplerinin Gözlenen - Beklenen Değerleri ve Gen Frekansları

DENEK SAYISI		FENOTİP SAYILARI						GEN FREKANSLARI		
		AA	AB	AC	BC	BB	CC	A	B	C
55	gözl.	1	8	1	17	28	-	0.100	0.736	0.164
	bekl	0.55	8.08	1.81	13.25	29.81	1.48	±0.028	±0.042	±0.035

5. TARTIŞMA

5.1. METODUN TARTIŞILMASI

Proteinler ve enzimler gibi kompleks makromoleküllerin birbirlerinden ve diğer moleküllerden ayrılmasında, molekül büyüklüğüne, çözünme farklılığına, özel bağlayıcı moleküllerin varlığına ve elektriksel yük ayırımına dayanan birçok farklı ayırma yöntemleri bulunmaktadır (23).

Özellikle enzim izozimleri gibi benzer yapılara sahip biyomoleküllerin ayırımında, kesin ve hassas bir ayırım gerektirmesi bakımından, elektriksel yük ayırımına dayanan elektroforezin tartışılmaz bir yeri ve üstünlüğü vardır.

Elektroforez, nisbeten yeni bir metod olmasına rağmen, özellikle hassasiyet ve çabuk sonuç alma gerektiren araştırmalar ve bazı klinik rutin çalışmalarda, tercih edilen ve yaygın olarak kullanılan bir metoddur (23).

Çalışmamızda metod olarak seçilmiş bulunan Sellüloz Asetat Elektroforezi, diğer elektroforez türlerine göre birçok avantajları sebebiyle daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu metodun başlıca üstünlükleri;

- Elektroforez süresinin kısa olması
- Çok az miktarda numunelerle çalışılabilmesi,
- Porlarının daha küçük olması sebebiyle protein adsorbsiyonunun daha az olması ve böylece daha keskin bandlar elde edilebilmesi,

- Kolayca berraklaşması,
- Işığın geçirme özelliği sebebiyle, hızlı dansitometrik ölçüme imkan vermesi olarak sayılabilir.

Buna karşılık pahalı oluşu ve üretici firmaya göre değişmesi de başlıca dezavantajlarıdır. (12,23).

Ayrıca, genetik polimorfik sistemlerin araştırılmasında bugüne kadar en başarılı ve yaygın olarak kullanılan tek metod olan ve bizim de kullandığımız Grunbaum Metodu da, sellüloz asetat elektroforezine dayalı olarak geliştirilmiştir (12). Bu alanda şimdiye kadar yapılmış araştırmaların ve oluşan literatürün de hemen tümüyle bu elektroforez türüne dayanıyor olması, bizim de bu metodu seçmemizde önemli bir etken olmuştur.

5.2. BULGULARIN TARTIŞILMASI

ACP₁' in A, B ve C alelleri arasında, dünya genelinde en yüksek gen frekansına sahip olan B aleli olup, Orta Amerika yerlileri (0.8899) ve Güney Afrika yerlilerinde (0.8038) daha sık görülmekte, Asya toplumlarında ise (0.6659-0.7894) nisbeten daha düşük bir değere inmektedir. En az görüldüğü toplumlar ise Avrupa popülasyonlarıdır (0.5380-0.6994). Türk ve Kıbrıs-Türk popülasyonlarındaki frekansının (sırasıyla 0.6807-0.700* ve 0.6798) Asya-Avrupa değerleri arasında olması dikkat çekicidir. Çalışmamızda elde edilen B geni frekansı, tüm dünyada olduğu gibi, denek popülasyonumuzdaki en yüksek frekans olmaktadır (0.736). Bu değer, Avrupa ve Amerika beyaz ırkı değerlerinden oldukça yüksek, daha çok Asya popülasyonlarınıninkine yakındır ve Türkiye geneli ile de oldukça uyumludur (4, 17, 25-26-27-28-29-30).

* Türkiye popülasyonu için yapılan iki ayrı çalışmanın sonuçlarıdır.

ACP₁A aleli bütün dünyada, gen frekansının yüksekliği bakımından ikinci sıradaki aleldir. Bu alel en çok Amerika beyazları (0.3938) ile Avrupalılarda (0.2300-0.3723) görülmekte, Asya toplumlarında (0.2103-0.3029) ise nisbeten daha düşük bir değerde bulunmaktadır. Türk ve Kıbrıs-Türk popülasyonlarının A geni frekansları (sırasıyla 0.2920-0.270 * ve 0.2810) da yine Avrupa ve Asya popülasyonlarının sınırları içindedir. Denek popülasyonumuzun A geni frekansı ise (0.100) bütün dünya ve bu arada Türkiye geneli değerlerinden oldukça düşüktür. Ayrıca bu değer, bütün dünyadaki sıralamanın tersine, popülasyonumuzdaki en düşük gen frekansı olmaktadır (4, 17, 25-26-27-28-29-30).

ACP₁B ve A alelleri ırklar bakımından karşılaştırıldığında, B alelinin siyah ırkta, beyaz ırka oranla daha sık görülmesine karşılık, A aleli beyaz ırkta, siyah ırka göre daha yüksek bir gen frekansına sahiptir (17, 25-26-27-28-29-30).

ACP₁C aleli, bütün dünyada en az sıklıkta görülen aleldir. Bu alel, Güney Afrika yerlilerinde ve Uzak-Doğu (sarı) ırkında hiç görülmemektedir. C alelinin en yüksek frekansları, Amerika beyazları (0.0596) ile Avrupalılarda (0.0356-0.0963) görülmektedir. Bu alelin frekansı bakımından da Türk ve Kıbrıs-Türk toplumlari (sırasıyla 0.0273-0.030 * ve 0.0392), Avrupalılarla bazı Batı Asya toplumlari arasında bir değere sahiptir. C alel frekansı bakımından denek popülasyonumuz (0.164), gerek Türkiye ve gerekse bütün dünya popülasyonlarından oldukça yüksek bir frekansa sahiptir. Ayrıca yine bütün dünya ve Türkiye genelinin tersine, denek popülasyonumuzun C geni frekansı, yükseklik bakımından ikinci sıradadır (4, 17, 25-26-27-28-29-30).

Dünya genelinde hiç görülmeyen ve nadir genetik varyant olarak düşünülen ACP₁R alelinin, Kuzey ve Güney Amerika ve ayrıca Güney Afrika siyahlarında, polimorfik sistem oluşturabilecek

oranlarda görülmesi, bu alelin siyah ırka özgü olduğunu düşündürmektedir.

ACP₁Tic-1 alelinin, sadece Hindistan'daki Ticuna kabilesindeki ilkel bir popülasyonda sık görülen bir alel olduğu ve 0.110 frekansta bulunduğu, Yoshihara ve Mohrenweisser (1980) tarafından bildirilmektedir (20).

ACP₁O alelinin, ilk defa Herbich (1969) tarafından Avusturya'da bir ailede tesbitinden sonra, Polonya'da yapılan çalışmalarda Turowska (1977) tarafından adli bir vak'ada belirlendiği ve daha sonra da Koziol-Bruszezwska (1978), Turowska-Bogusz (1978) ve Dobosz (1983) tarafından 50 ailede tesbit edildiği bilinmektedir (21).

ACP₁E, F, G ve K gibi nadir aleller de bulunmaktadır ve bunların dışında nadir alellerin de zamanla bulunması mümkündür (20,22).

Bulgularımızda A ve C gen frekanslarının, Türkiye genelinden bir ölçüde farklı çıkması, denek popülasyonumuzun izole bir toplum olması ile açıklanabilirse de, ülkemizin heterojen bir genetik yapıya sahip olması ve Türkiye geneli için henüz sadece bir çalışmanın yapılmış olması, bu yargıya varmada ihtiyatlı olmayı gerektirmektedir.

Ayrıca ülkemizdeki başka izole gruplarda benzer bir çalışmanın yapılmamış olması ve denek popülasyonumuzun birkaç nesil önceki durumlarının da iyi bilinmiyor olması, diğer eksikliklerimizdir.

Benzer bir karşılaştırma, Tablo 8' deki Hindistan'a ait genel değerlerle, tablo 9'daki Hindistan'da bazı kabilelere ait bulgular arasında yapıldığında, bu izole grupların A ve C gen frekanslarının,

Hindistan geneline göre daha düşük, buna karşılık B geni frekanslarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Hint toplumu gibi heterojen bir toplum ile bu toplum içinde yaşayan, ancak son derecede izole gruplar arasındaki bu fark, beklenen bir sonuç izlenimini vermektedir (31).

Bir başka dikkat çekici husus da, dünyada sadece bazı Orta ve Kuzey Avrupa toplumlarında düşük frekanslarda rastlanan CC fenotipinin, Türkiye genelinde olduğu gibi, denek popülasyonumuzda da hiç görülmemiş olmasıdır.



TABLO 8. Çeşitli Dünya Popülasyonlarında ACP₁ İzozimlerinin Fenotip Dağılımı ve Gen Frekansları (17, 25-26-27-28-29-30).

POPÜLASYON	DENEK SAYISI	A(%)	BA(%)	B(%)	CA(%)	CB(%)	C(%)	GEN FREKANSLARI				
								A	B	C	R	
AVRUPA												
-İngiltere	1010	11.98	44.55	34.26	3.27	5.94	0.00	.3589	.5950	.0460	-	
-Çekoslovakya	300	12.00	37.00	38.33	3.33	9.33	0.00	.3217	.6150	.0633	-	
-Danimarka	679	13.40	39.76	35.64	3.98	7.07	0.00	.3527	.5906	.0552	-	
-Fransa	824	9.71	41.26	39.81	3.40	5.83	0.00	.3204	.6335	.0461	-	
-Almanya	3324	11.70	41.28	35.23	4.06	7.58	0.15	.3437	.5966	.0597	-	
Freiburg	1800	11.1	39.3	36.8	4.4	8.3	0.1	.3295	.6060	.0645	-	
Köln	500	10.2	42.2	35.8	3.4	8.2	0.2	.3300	.6100	.0600	-	
-İrlanda	295	11.86	32.20	48.81	1.69	5.42	0.00	.2881	.6763	.0356	-	
-İtalya	800	7.13	28.63	50.38	3.13	10.63	0.13	.2300	.7000	.0700	-	
-İtalya	504	6.91	36.77	48.91	1.99	5.27	0.14	.2629	.6994	.0377	-	
-Polonya	1064	13.82	29.04	38.16	7.14	11.56	0.28	.3191	.5846	.0963	-	
-İsviçre	1365	10.77	44.25	35.60	3.00	6.01	0.37	.3440	.6073	.0487	-	
-İsveç	517	15.28	39.65	31.33	4.26	9.28	0.19	.3723	.5580	.0696	-	
-Türkiye	274	8.39	39.78	46.35	1.82	3.65	0.00	.2920	.6807	.0273	-	
-Kıbrıs Türklere	242	7.44	38.43	46.28	2.89	4.96	0.00	.2810	.6798	.0392	-	

POPÜLASYON	DENEK SAYISI	A(%)	BA(%)	B(%)	CA(%)	CB(%)	C(%)	GEN FREKANSLARI				
								A	B	C	R	
ASYA												
- Hindistan	1859	8.82	39.27	51.32	0.27	0.32	0.00	.2859	.7111	.0030	-	
-Japonya	3414	4.72	32.63	62.62	0.00	0.00	0.00	.2103	.7894	.0000	-	
-Kore	115	10.43	25.22	64.35	0.00	0.00	0.00	.2304	.7696	.0000	-	
-Malezya-Çin	620	5.81	32.74	61.45	0.00	0.00	0.00	.2218	.7782	.0000	-	
-İran	449	13.59	30.51	49.57	2.90	3.34	0.00	.3029	.6659	.0312	-	
AMERİKA												
-Beyazalar	193	17.10	39.38	31.61	5.18	6.74	0.00	.3938	.5466	.0596	-	
-Siyahlar	746	5.09	28.69	61.26	0.54	2.68	0.00	.1991	.7756	.0167	.0074	
		RA:.4 RB:.9 RC:.13 BD:.2 ACP ₁ D .0013										
-Dom.-Car.-İndias	99	2.02	18.18	79.80	0.00	0.00	0.00	.1111	.8899	.0000		
-K.Karolina(Beyaz)	418	11.72	34.44	40.43	4.78	8.61	0.00	.3130	.6200	.0670		
-K.Karolina(Siyah)	366	4.37	28.96	60.10	0.54	1.09	0.00	.1970	.7690	.0110	.0230	
		RA: 1.09 RB:3.55 RC:0.00 R:0.27										
AFRİKA												
-G.Afrika-Bantu	1333	2.10	21.31	65.19				.1343	.8038		.0619	
		RA:1.35 RB:9.08 R:0.98										

TABLO 9. Hindistan'da Bazı İzole Popülasyonlarda ACP₁ Fenotip Dağılımı ve Gen Frekansları (31)

İZOLE GRUPLAR	DENEK SAYISI	FENOTİP DAĞILIMI (%)				GEN FREKANSLARI		
		AA	AB	BB	BC	A	B	C
BRAHMINS								
Niyogi	212	5.18	35.38	59.43	-	0.229	0.771	-
Madwa	243	5.76	32.10	62.13	-	0.218	0.782	-
Dravida	183	5.46	39.89	54.10	0.54	0.254	0.743	0.003
Vadahalai	178	5.62	33.15	60.67	0.56	0.222	0.775	0.003
Tengalai	217	5.53	36.41	58.06	-	0.237	0.763	-
Vaidiki								
-Eluru	93	6.45	25.81	66.66	1.07	0.194	0.801	0.005
-Amalapuram	134	4.48	32.09	63.43	-	0.205	0.795	-
-Manthini	135	2.96	27.41	69.63	-	0.167	0.833	-
VYSYA	327	6.73	34.56	58.71	-	0.240	0.760	-
MALA	109	3.67	33.94	62.38	-	0.206	0.794	-
MADİGA	100	3.00	38.00	59.00	-	0.220	0.780	-

TABLO 10. Türkiye'de ACP₁ İzozimlerinin Fenotip Dağılımı ve Gen Frekansları (4)

DENEK SAYISI	FENOTİP DAĞILIMI (%)						GEN FREKANSLARI		
	AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C
göz.	7.00	39.00	1.00	48.00	5.00	0.00			
100							0.270	0.700	0.030
bek.	7.29	37.80	1.62	49.00	4.20	0.09			

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

1. Gözlenen fenotip frekanslarının teorik frekanslarla uyumunu belirlemek amacıyla χ^2 testi uygulandı (32). Hardy-Weinberg dengesinden anlamlı bir sapma görülmedi ($p < 0.05$).

2. A ve C gen frekansları, Türkiye genelinden farklı bulundu ($p > 0.05$).

3. B geni frekansı bakımından Türkiye geneliyle anlamlı bir fark gözlenmedi ($p < 0.05$).

4. Türkiye genelinde olduğu gibi deneklerimizde de CC fenotipi tesbit edilmedi.

6.2. Öneriler

1. Bu araştırmanın, diğer adli genetik polimorfik enzim sistemleri de dahil edilerek, ülkemizin başka yörelerindeki izole gruplar üzerinde de yapılması yararlı olacaktır.

2. Rutin analiz sonuçlarının sağlıklı değerlendirilebilmesi açısından, adli genetik işaret olarak kullanılan tüm polimorfik sistemlerin, iller ve coğrafi bölgeler bazında araştırılarak, Türkiye'nin bir gen haritasının çıkarılması yerinde olacaktır.

7. ÖZET

Adli Fen Bilimleri uygulamalarında genetik işaret olarak kullanılan ACP_1 polimorfizminin, izole bir popülasyondaki dağılımı araştırıldı.

Bir köyde yaşayan ve aralarında akrabalık bulunan 55 kişinin kan örnekleri incelendi.

Kan örneklerinden hemolizatlar hazırlandı.

Örnekler sellüloz asetat elektroforeziyle fenotiplerine ayrıldı.

Fenotipler UV-366 nm ışık altında incelendi ve değerlendirildi.

Her bir alelin frekansı gen sayımı ile hesaplandı.

Gen frekansları, $ACP_1A = 0.100 \pm 0.028$, $ACP_1B = 0.736 \pm 0.042$, $ACP_1C = 0.164 \pm 0.035$ bulundu. Gözlenen değerler Hardy-Weinberg dengesine uygun bulundu ($\chi^2 = 1.4804$, $SD = 2$, $\alpha=0.05$).

8. SUMMARY

The distribution of the ACP₁ polymorphism that has been used in the Forensic Science applications, was researched in an isolated population.

The blood samples of 55 related individuals who have been lived in a village were examined.

Hemolysates were prepared with samples.

Samples were phenotyped by cellulose acetate electrophoresis.

The phenotypes were examined and classified under the UV-366 nm light.

Gene frequencies were calculated by gene counting.

The following gene frequencies were observed: ACP₁A = 0.100 ± 0.028, ACP₁B = 0.736 ± 0.042, ACP₁C = 0.164 ± 0.035. Observed values were confirmed with Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 1.4804$, DF = 2, $\alpha=0.05$).

9. KAYNAKLAR

1. Abacı, E.: Türk popülasyonunda Adenilat Kinaz Enzim Sistemi gen frekanslarının dağılımı. Yüksek lisans tezi, İst. Üni. Sağlık Bilimleri Enst., İstanbul 1989.
2. Abacı, E., Atasoy, S.: Türk toplumunda Glioksalaz I enzim sisteminin gen frekansları. I. Ulusal Prenatal Teşhis ve Anadolu'nun Genetik Yapısı sempozyumu tebliğ özetleri, Eskişehir 1989.
3. Atasoy, S., Öztürk, M., Abacı, E., Cenani, A., Kıymetli, Ü.: Türkiye'de alyuvar Esteraz D polimorfizmi, Adli Tıp Derg., 6:57-60, 1990.
4. Ateş, G.: Türk popülasyonunda Eritrosit Asid Fosfataz İzozimlerinin gen frekansı. Yüksek lisans tezi, İst. Üni. Adli Tıp Enst., İstanbul 1989.
5. Türkoğlu, M.: Türk popülasyonunda Adenilat Kinaz izozimlerinin gen frekansları. Master tezi, İst. Üni. Adli Tıp Enst., İstanbul 1990.
6. Başaran, N.: Tıbbi Genetik. Bilim Teknik Yayınevi, Eskişehir 1986, s. 95-107, 301-302.
7. Günalp, A., Ayter, Ş., Lüleci, G., Kart, A., Sakızlı, N.: Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı. Meteksan Matbaacılık A.Ş., Ankara 1989, s. 146-151.
8. Tayşi, K., Kasy, B.: Tıbbi Genetik. Hacettepe Üni. yayınları, Ankara 1975, s.344-345, 392-393.
9. Şaylı, B.S., Demir, İ.: Genetik. Ayyıldız Matbaacılık A.Ş., Ankara 1981, s. 163.
10. Goodenough, U., Levine, R.L.: Genetics. Harvard Üni., M. and A. Thompson Litho. U.K. 1976, pp.435-438.
11. Gaensslen, R.E., Bell, S.G., Lee, H.C.: Distributions of genetic markers in United States populations: I blood group and secretor systems. J. Forensic Sci., 32, 4: 1016-1058.

12. Grunbaum, B.W.: Handbook of forensic individualization of human blood and bloodstains. Sartorius GmbH. Göttingen, West Germany 1981.
13. Grunbaum, B.W.: Selvin, S., Myhre, B.A., Poce, N.: Distribution of gene frequencies and discrimination probabilities for 22 human blood genetic systems in four racial groups. J. Forensic Sci., 25, 2: 428-444.
14. Aras, K., Erşen, G.: Tıbbi biyokimya teorik ve klinik enzimoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara 1987.
15. Golden, V.L., Sensabaugh, G.F.: Phenotypic variation in the Phosphotransferase activity of human red-cell Acid Phosphatase (ACP₁). Hum. Genet., 72: 340-343.
16. Bergsma, D.: Human gene mapping. II. Rotterdam Conference Vol: XI, No:3, Rotterdam 1974, pp.7-8.
17. Hopkinson, D.A., Spencer, N., Harris, H.: Red-cell Acid Phosphatase variations: A new human polymorphism. Nature, 199, London 1963, pp 969-971
18. Povey, S., Swallow, D.M., Bobrow, M., Craig, I., Heyningen, V.V.: Probable assignment of the locus determining human Red-cell Acid Phosphatase (ACP₁) to chromosome 2 using somatic cell hybrids, Ann Hum. Genet., 38: 1, 1974.
19. Vakita, Y., Narahara, K., Takahashi, Y., Kikkawa, K., Kimura, S., Oda, M., Kimoto, H.: Duplication of 2p 25: Confirmation of the assignment of soluble Acid Phosphatase (ACP₁) locus to 2p 25. Hum. Genet., 71: 259-260, 1985.
20. Nelson, M.S., Smith, E.A., Carlton, W.K., Andrus, R.H., Reisner, E.G.: Three new phenotypes of human Red-Cell Acid Phosphatase: ACP₁ FA, ACP₁ GA, ACP₁ GB. Hum. Genet., 67: 369-371, 1984.
21. Raczek, E., Grezsek, J.: A silent allele for Red-Cell Acid Phosphatase in a Polish family. Hum. Hered., 36: 339-340, 1986.
22. Turowska, B.: Evidence of a new allele of Red-Cell Acid Phosphatase: ACP₁K. Forensic Science International, 26: 165-167, 1984.
23. Baban, N.: Protein Biyokimyası. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. yayını, Nazım Terzioğlu Mat. Araşt. Enst. Baskı Atölyesi, İstanbul 1980, s.77-78.

24. Murch, R.S., Budowle, B.: Applications of isoelectric focusing in Forensic Serology. *Journal of Forensic Sciences*. Vol.: 31, Nu.: 3: 869-880, July 1986.
25. Budowle, B., Sundaram, S., Wenk, R.E.: Population data on the forensic genetic markers: Phosphoglucomutase I, Esterase D, Erythrocyte Acid Phosphatase and Glyoxalase I. *Forensic Science International*, 28: 77-81, 1985.
26. Couture, L., Chagnon, M., Allard, C., Bouchard, C.: Adenosine Deaminase, Adenylate Kinase and Acid Phosphatase polymorphism in a French-Canadian population. *Hum. genet.*, 75: 188, 1987.
27. Hummel, K., Pulverer, G., Schall, K.P., Weidtmann, V.: Häufigkeit der scttypen in den erbsystemen Haptoglobin, Gc, Saure Erythrocytenphosphatase, Phosphoglucomutase und Adenylatekinase sowie den erbeigenschaften Gm (1), Gm(2) und Inv (1) bei Deutschen (aus dem raum Freiburg i. Br. unfd. Köln) und bei Türken. *Hum. Genet.*, 8: 330-333, 1970.
28. Nelson, M.S.: A computer-assisted population frequency study of 14 polymorphic blood grouping system in North Carolina. *Journal of Forensic Sciences*, Vol.:29, Nu.:3: 762, 773, July 1984.
29. Pascali, V., Ranaletta, D.: Erythrocyte Acid Phosphatase (EAP) confirmation after ultra thin layer isoelectric focusing. *Istituto di Medicina Legale Università Cattolica del S. Cuore Viadelle Pineta Sacchetti 644, 00168, Italy.*
30. Stedman r.: Human population frequencies in twelve blood grouping systems. *J. Forensic Sci. Soc.*, 12: 410-411, 1972.
31. Char, K.S.N., Llakshmi, P., Gopalam, K.B., Rao, P.R.: Acid Phosphatase plymorphism in some endogamous populations of Andhra Pradesh. *Hum. Hered.*, 36: 333-335, 1986.
32. Velicangil, S.: Biyoloji, tıp, dış hekimliği ve eczacılık bilimlerinde biyoistatistik. *Filiz Kitabevi, İstanbul 1984, s. 130-134, 300.*

ÖZGEÇMİŞ

M. Bahattin SEÇİLMİŞOĞLU 1959 yılında Ankara'da doğdu. İlk, Orta ve Lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1977 yılında Gazi Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'ne girdi. 1984 yılında mezun oldu.

1985-1988 yılları arasında Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Kimyasal Tahliller İhtisas Dairesi'nde Adli Toksikoloji ve Narkotik Uzmanı olarak görev yaptı. 1988 yılından itibaren halen çalışmakta olduğu aynı kurumun Trabzon Grup Başkanlığı'nda Kimyasal Tahliller İhtisas Dairesi Başkanlığı görevini yürütmektedir. Evli iki çocuk babasıdır. İngilizce bilmektedir.