

TLC-Screening of 1,4-Benzodiazepines

HARALD SCHÜTZ, EHRENGARD RUMPF

Institut für Rechtsmedizin der Universität Gießen, Bundesrepublik Deutschland

1,4-BENZODİAZEPİNLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE BELİRTİMİ

Özet

İnce tabaka kromatografisi (TLC) benzodiazepinlerin ve bunların metabolitlerinin taranması amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntemin prensibi, hidrolizle elde edilen aminobenzofenon türevlerinin çekitlendikten sonra TLC ile ayrılmasına ve fotolitik olarak dezalkillenmesine dayanır. Diazolandırılmış ürünler azo boyalarıyla kenetlenir (örneğin, Bratton-Marshall ayrırıcı). Yöntem, çok sayıda benzodiazepine uygulanmış (1-5) ve özgülüğü kanıtlanmıştır (6).

Summary

Thin-layer chromatography (TLC) is the preferred method for screening benzodiazepines and their metabolites. The procedure involves hydrolysis to yield aminobenzophenone derivatives, which are then extracted, separated by TLC and photolytically dealkylated. The products are diazotized and coupled with azo-dye (e.g. the Bratton-Marshall reagent). The method has already been applied to numerous benzodiazepines (1-5) and its specificity established (6).

Key words : Benzodiazepines - TLC - Hydrolysis - Photolytic dealkylation - Diazotization

EXPERIMENTAL

Reference Substances

ABFB	2-amino-5-bromo-2'-fluorobenzophenone (e.g. from haloxazolam)
ABP	(2-amino-5-bromophenyl) (2-pyridyl) methanone (e.g. from bromazepam)
ACB	2-amino-5-chlorobenzophenone (e.g. from oxazepam)
ACFB	2-amino-5-chloro-2'-fluorobenzophenone (e.g. from desalkylflurazepam)
ADB	2-amino-2'-5-dichlorobenzophenone (e.g. from lorazepam)
ANB	2-amino-5-nitrobenzophenone (e.g. from nitrazepam)
ANCB	2-amino-2'-chloro-5-nitrobenzophenone (e.g. from clonazepam)
ANFB	2-amino-2'-fluoro-5-nitrobenzophenone (e.g. from 1-desmethyl-flunitrazepam)
CCB	5-chloro-2- [(cyclopropylmethyl) amino] benzophenone (e.g. from prazepam)
CFMB	5-chloro-2'-fluoro-2-(methylamino) benzophenone (e.g. from fludiazepam)
CFTB	5-chloro-2'-fluoro-2-(2,2,2-trifluoroethylamino) benzophenone (e.g. from quazepam)
CPB	5-chloro-2-(2-propinyl) benzophenone (e.g. from pinazepam)
MACB	5-chloro-2-(methylamino) benzophenone (e.g. from diazepam)
MDB	2', 5-dichloro-2-(methylamino) benzophenone (e.g. from lormetazepam)
MNB	2-(methylamino) -5-nitrobenzophenone (e.g. from nimetazepam)
MNFB	2'-fluoro-2-(methylamino) -5-nitrobenzophenone (e.g. from flunitrazepam)
TCB	5-chloro-2-(2,2,2-trifluoroethylamino) benzophenone (e.g. from halazepam)

Adli Tıp Derg., 6, 3- 8 (1990)

Spray Solution (Bratton-Marshall Reagent)

Dissolve 1 g of N-(1-naphthyl)ethylenediamine in a mixture of 50 ml of dimethylformamide and 50 ml of 4 M hydrochloric acid, with warming if necessary. Filter the cooled solution if it is not clear. A slight violet colour does not affect its use. If kept in the refrigerator the solution is stable for about a year.

Standard Solution for TLC

Dissolve 1 mg each of the reference substances in 2 ml of methanol. Note that for screening not all the reference substances are absolutely necessary, but ANB, ACB, MACB and TCB should all be used for comparison purposes and for calculation of the corrected R_f value. If stored in glass bottles in the refrigerator (4°C) and protected from light, the solution is stable for several months.

To avoid interference in the TLC, no other substances should be present that give a colour with the Bratton-Marshall reagent.

Hydrolysis

Place 100 ml of the urine sample in a 500 ml erlenmeyer flask and add 50 ml of concentrated hydrochloric acid. Heat the mixture for 30 min under a reflux condenser, in a boiling water-bath, and if necessary rinse the condensate from the condenser into the flask with a little concentrated hydrochloric acid.

Neutralization and Extraction

After the hydrolysis, cool the solution to room temperature, and then, with further cooling, adjust the pH to between 8 and 9 (universal indicator paper) by addition of 8 M sodium hydroxide (about 5 ml or so will be needed). Wear safety goggles during this operation, which should be conducted under an efficient fume-hood on account of the very unpleasant smell. Extract the aminobenzophenone derivatives with about 200 ml of diethyl ether. Note that the acid hydrolysis of bromazepam and its metabolites yields not benzophenone derivatives, but only benzoylpyridine compounds, but as these behave like primary aromatic amines, they can be detected with Bratton-Marshall reagent. To increase the yield, the extraction can be repeated with 100 ml of diethyl ether, at pH 11. Reduce the combined extracts to a volume of about 3 ml in a rotary evaporator, and transfer this concentrate to a glass-stoppered centrifuge tube and carefully evaporate it to dryness (at about 30-40°C; it is not necessary to use reduced pressure). Cool the residue to 4°C and reserve it for analysis; for this dissolve it in 0.1 ml of methanol.

Thin-Layer Chromatography

Use 20x20 cm Kieselgel 60 F254 TLC plates, layer thickness 0.25 mm. Apply the sample and standard spots 1.5 cm from the lower edge of the plate, with 2- μ l capillaries. For each sample use three capillary-loads overlapped to give an approximately straight line of sample. To avoid any cross-contamination apply the test solutions before the standards. Run the chromatogram until the solvent front has travelled 10 cm. Use the ascending method, without chamber saturation. No special activation of the plates is needed, and would not improve the results anyway. Use about 100 ml of toluene as the mobile phase.

Photolytic Dealkylation

After the development of the chromatogram (which takes 30-40 min), leave the plate to drip in the development tank for a short time, then dry it in a cold air-stream under the fume-hood. Expose the dried plate to a suitable ultraviolet source (e.g. a sun-lamp) at a distance of 30-40 cm for about 20 min. For rapid analysis a 6 min exposure is sufficient. Immediately cool the plate to room-temperature, or the yield in the diazotization step will be impaired.

Note that the dealkylation step is only necessary when testing for diazepam, camazepam, temazepam, ketazolam, prazepam, flurazepam, flunitrazepam, lormetazepam, fludiazepam, nimetazepam, pinazepam, quazepam and halazepam (3).

Diazotization

Place the cool dry plate in an empty chromatographic tank, on the bottom of which is a small beaker (20-50 ml) containing 10 ml of 20 % sodium nitrite solution. Pipette 5 ml of 25 % v/v hydrochloric acid into the beaker as fast as possible, to liberate nitrogen oxides, and seal the tank with its lid. Leave the plate in the tank for 3-5 min, which is sufficient time for diazotization of primary aromatic amine groups. Remove the lid, and when most of the nitrous gases have dispersed take out the plate and leave it under the fume-hood for 20-30 min in a stream of cold air (e.g. from a fan heater set at "cold"). For rapid work it is sufficient to air the plate for only 5 min to remove the nitrous gases and then to spray it gently with a 1 % aqueous solution of urea. Finally spray the plate thinly and uniformly (meander pattern) with Bratton-Marshall reagent at 4°C to couple the diazonium salts. The result: violet and redviolet colours.

RESULTS

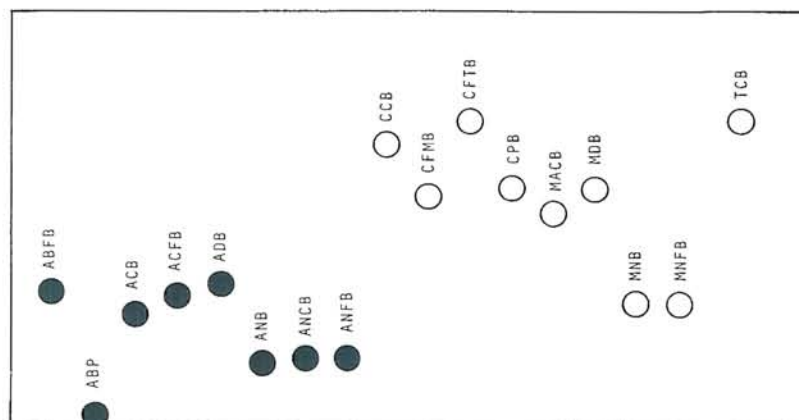


Figure 1. hR_f^c -values of 17 hydrolysis derivatives of commonly used 1,4-benzodiazepines (Stationary phase: Silicagel; Solvent-system: Toluene) (● = detectable without photolytical desalkylation ; ○ = detectable with photolytical desalkylation prior to diazotization).

Corrected R_f -Values of Hydrolysis Products of Benzodiazepines

The corrected hR_f -values of commonly used benzodiazepines using the 10 standardized TLC-systems are listed in Table I. However some special benzophenones (e.g. ACB from oxazepam, ACFB from desalkylflurazepam and ADB from lorazepam) can hardly be distinguished when using the systems 1 to 10. So we developed an additional system (=system 11) using toluene as solvent, silica as adsorbent and the following reference compounds:

ANB	$hR_f^c = 15$
ACB	$= 27$
MACB	$= 52$
CCB	$= 68$

Table I. Hydrolysis products and corrected R_f - values in system 1-11*

Hydrolysis Product	Corrected R_f - values in system										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ABFB	70	69	74	83	81	93	83	11	71	69	32
ABP	64	61	66	85	86	88	77	9	68	69	2
ACB	76	69	76	86	90	91	78	12	76	71	27
ACFB	76	68	74	86	89	93	78	11	75	70	31
ADB	77	70	76	87	89	93	78	11	76	70	33
ANB	71	65	68	85	90	91	77	5	69	69	15
ANCB	72	66	70	86	87	93	77	4	69	70	16
ANFB	71	66	68	86	87	91	77	4	69	70	16
CCB	83	74	82	88	92	95	80	58	82	74	68
CFMB	71	69	81	83	77	90	75	48	77	69	55
CFTB	74	73	80	85	77	93	79	44	77	73	74
CPB	75	73	80	86	86	91	83	48	77	72	57
MACB	82	72	82	88	89	93	79	53	81	71	52
MDB	81	69	81	87	82	93	75	49	81	71	57
MNB	66	66	80	83	76	86	73	31	77	68	29
MNFB	79	63	80	86	89	90	77	20	79	71	29
TCB	81	74	81	89	94	95	82	49	81	75	74

* Solvent system 1 = Chloroform-acetone (80:20); 2 = Ethyl acetate, 3 = Chloroform-methanol (90:10); 4 = Ethyl acetate-methanol-conc.ammonia (85:10:5); 5 = Methanol; 6 = Methanol-n-butanol (60:40; 0.1 mol/l NaBr); 7 = Methanol-conc.ammonia (100:1.5), 8 = Cyclohexane-toluene-diethylamine (75:15:10); 9 = Chloroform-methanol (90:10); 10 = Acetone; 11 = Toluene.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the different manufacturers who generously gave their help and provide substances for obtaining these data. Finally, the authors would like to acknowledge the support from many members of the DFG Commission for Clinical-Toxicological Analysis and the TIAFT. The investigations were supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

REFERENCES

- 1 Schütz, H. (1982) *Benzodiazepines A Handbook*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, Tokyo.
- 2 Schütz, H. (1982) *Ärztl. Lab.*, **28**, 47.
- 3 Schütz, H. (1986) *Dünnschicht-chromatographische Suchanalyse für 1,4-Benzodiazepine im Harn, Blut und Mageninhalt* (Mitteilung VI der Senatskommission der DFG für Klinisch-toxikologische Analytik), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- 4 Schneider, W.-R., Schütz, H., Zeller, M. (1986) *Adli Tıp Derg.*, **2**, 56-60.
- 5 Schütz, H. (1989) *Benzodiazepines II*, Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo.
- 6 Schütz, H., Fitz, H., Suphachearabhan, S. (1983) *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **314**, 44.

Reprints request to :

Prof. Dr.rer.nat. Harald Schütz
Institut für Rechtsmedizin der
Universität Gießen
Frankfurter Str. 58
D-6300 Gießen
Bundesrepublik Deutschland

Türk Çocuklarının Derioymacığ Bulguları IV. Elin Palmar Yüzeyindeki Temel Çizgi Sonlanmaları

METİN ATASU

Marmara Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

DERMATOGLYPHICS OF TURKISH CHILDREN IV. MAIN LINE TERMINATIONS ON THE PALMAR SURFACE OF THE HANDS

Summary

The main line terminations on the palmar surface of the hands of 250 male and 250 female Turkish children were investigated and compared with those of in the literature. The A-line terminations were 5>5>1 on the left hands in both sexes and were 5'>3>11 on the right hands of the males and 5'>3>5" on the same hands of the females. The B-line terminations were 5">5">7 on the left hands of the males, and 7>5">5' on the right hand. The C-line terminations were 7>9>5" on the left hands and 9>7>5" on the right in both sexes. The D-line terminations were 9>7>11 and 9>7>5" on the left hands of the males and females, respectively and were 11>9>7 on right palms in both sexes.

Key words : *Dermatoglyphics - Population study - Palmar surfaces - Main line terminations*

Özet

250 erkek ve 250 kız Türk çocuğunun ellerinin palmar yüzeyindeki temel çizgi sonlanmaları değerlendirilmiş ve sonuçlar literatürdekiler ile karşılaştırılmıştır.

GİRİŞ

Derioymacıklarının normal değişimi ile ilgili yabancı kaynaklı yayınlar olmakla beraber, Türk toplumunu ilgilendiren derioymacığ çalışmalarından elin palmar yüzeyindeki temel çizgi sonlanmalarını değerlendiren tek çalışma vardır (1). Bu çalışmalar tıpta kromozom ve doğmalık el kusurlarında (2,3), fiziksel antropolojide ve biyolojide önem taşımaktadır.

Sunulan çalışmadaki amaç, yurt içi ve yurt dışında bu konuda daha önce yapılmış çalışmalarda elde edilen sonuçları buradakiler ile karşılaştırmaktır.

MATERYAL ve METOD

Materyali Ankara Hasanoğlu İlkokulu'ndan rastgele seçilen, sağlıklı, 7-14 yaşları arasında, Türkçe konuşan, islam 250 erkek ve 250 kız öğrenci oluşturmuştur.

Öğrencilerin ellerinin volar yüzeyindeki derioymacıkları Faurot Inc. firması tarafından imâl edilen kimyasal bir sıvı ile ıslatılmış ıstampa ve bu sıvıya duyarlı özel kağıtlar ile alınmıştır (9).

Elin volar yüzeyindeki temel çizgi sonlanmaları klasik metoda göre değerlendirilmiştir (5).

SONUÇ

Türk çocuklarının temel çizgi sonlanmaları Tablo I ve II'de gösterilmiştir. Erkek ve kızlarda A-temel çizgisi sol elde daha çok 3. pozisyonda olmakla beraber, sağ elde 5' ve 5". yerde sonlanmaktadır. Özellikle, erkek ve kızlarda bu temel çizgi sol elde daha çok 1. yerde görülmektedir. B-temel çizgisinin sonlanma yeri erkeklerin sol ellerinde daha çok 5", sağ ellerinde 7. yeredir. Kızlarda bu temel çizginin sonlanma yeri her iki elde daha çok 7. pozisyondadır. C-temel çizgisinin sonlanma yeri erkek ve kızların sol ellerinde daha çok 7., sağ ellerinde 9. yeredir. D-temel çizgisinin sonlanma yeri erkek ve kızlarda sol elde 9., sağ elde 11. yerde en fazladır.

TARTIŞMA

Cummins ve Midlo (5), 1281 Alman erkeğin ellerinin volar yüzeyindeki temel çizgi sonlanma yerlerini belirtmişlerdir. Bulgularımız, bu araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırıldığında, erkek Türk çocuklarının sol ellerinin A-temel çizgisi 1,2,3. yerlere daha az, 4. bölgeye daha sık, sağ ellerinde 1,3,5'. yerlere daha az, 4. yere daha sık sonlanmaktadır. B-temel çizgisi, Alman erkeklere göre erkek Türk çocuklarının sol ellerinde 5', 5", 6 ve 7. yerlere, sağ ellerinde daha sık 5'. yere sonlanmaktadır. C-temel çizgisi, Alman erkeklere göre sol elde 9. yerde daha az, D-temel çizgisi sol elde 7. yerde daha sık, 9 ve 11. yerde daha az, sağ elde 7 ve 9. yerde daha sık görülmektedir. *Singh ve Garg* (12), D-temel çizgisinin daha çok 7. yerde sonlandığını belirtmişler; ayrıca C-temel çizgisinin ulnar tipte olduğunu göstermişlerdir. Sunulan çalışmada D-temel çizgisi daha çok 11. yere açılmaktadır. *Dash Sharma* (7), 97 Bengalees'in palmar C triradiusunun eksikliğini araştırmış, Oraon, Banari, Ranchi, Mundas, Khanti kabilelerinden 929 bireyinkiler ile karşılaştırmış ve toplam 1026 bireyden 64'ünde C-triradiusunun noksanlığını bulmuştur; yazara göre, B-temel çizgisi daha çok ulnar (4,5 ve 6. yerler), sonra distal (7,8 ve 9. yerler) ve radial (11,12 ve 13. yerler) 'dir. Temel çizgi indeks değeri sol elde 8.33 ve sağ elde 10.09 olarak bulunmuştur. Erkek ve kızlarda A-temel çizgisi sol elde 1. yere % 3.1 ve sağ elde % 1.6 oranında açılmaktadır. Sol elde A-temel çizgisinin sonlanma yerlerinin sıklığı 3>5>1 sırasındadır.

Tablo I. Erkek çocukların palmar temel çizgi pozisyonlarının yüzde frekansları.
(n:250)

Pozisyon	A - Temel Çizgisi		B - Temel Çizgisi		C - Temel Çizgisi		D - Temel Çizgisi	
	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ
1	16.4	4.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	50.0	37.2	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	4.8	7.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5'	22.0	39.2	31.2	18.0	1.2	0.0	0.0	0.0
5''	0.4	5.2	39.6	30.0	16.0	11.2	0.4	0.0
6	0.0	0.0	1.2	0.8	1.2	1.6	0.4	0.0
7	0.4	0.0	25.6	47.2	31.6	20.8	26.4	14.8
8	0.0	0.0	0.0	0.8	1.2	0.0	1.6	0.4
9	0.0	0.0	0.4	2.4	28.4	50.8	39.6	31.6
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	3.6	2.0
11	4.0	4.8	0.0	0.0	0.4	2.0	27.6	50.8
12	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
13	0.4	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0
X	0.0	0.0	0.4	0.4	0.4	9.2	0.0	0.0
x	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	3.2	0.0	0.4
0	0.0	0.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.0	0.0

Temel çizgi sayısı indeksi : Sol el : $X = 12.536 \pm 0.183$, Sağ el : $\bar{X} = 14.092 \pm 0.178$

Sağ elde ise sıklık sırası 5>3 'tür. B-temel çizgisi sol elde ulnarda, sağ elde distalde fazladır. D-temel çizgisi sol ve sağ ellerde 11>9>7 sırasındadır (7). Veeraj (13), C-temel çizgisinin sonlanımını 265 erkek ve 285 kız bireyde incelemiş ve her iki cinsiyette sol elde I. tip (3,4,5',5'',6 ve 7. yerlerde biten) ve sağ elde II. tip (9,10,11,12 ve 13. yerlerde biten) temel çizgileri fazla bulmuşlardır. Dange ve Gupta (6), 104 erkek ve 95 kız Bhaksas bireyinde temel çizgi pozisyonlarını incelemiş ve A-temel çizgisinin erkeklerde sol elde 0.96 oranında sonlandığını ve kızların her iki elinde bu temel çizgiyi saptayamadığını belirtmişlerdir. A-temel çizgisinin erkeklerde sonlanma yerlerinin sıklığı sol elde 3>2>4, sağ elde 3>4>5, kızlarda sol elde 3>4>2, sağ elde 3>4>5'tir. B-temel çizgisinin sonlanma yerlerinin sıklığı erkeklerde her iki elde 5>7>2>4, kızlarda sol elde 5>7>6, sağ elde 5>7>4'tür. C-temel çizgisinin sonlanım yerlerinin sıklık sırası erkeklerin sol ellerinde 5>7>9, sağ ellerinde 7>9>5, kızların sol ellerinde 7>9>11 ve sağ ellerinde 9>7>5'tir. D-temel çizgisinin sonlanım yerlerinin sıklığı erkeklerin sol ellerinde 7>9>11, sağ ellerinde 9>7>11, kızların sol ellerinde 7>9>11, sağ ellerinde 9>7>11'dir (6).

Tablo II. Kız çocukların palmar temel çizgi pozisyonlarının yüzde frekansları.
(n:250)

Pozisyon	A - Temel Çizgisi		B - Temel Çizgisi		C - Temel Çizgisi		D - Temel Çizgisi	
	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ
1	16.4	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	46.4	37.2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	4.8	10.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5'	27.2	41.2	28.0	16.0	0.4	0.8	0.0	0.0
5"	1.6	4.4	34.8	27.2	16.4	11.2	0.4	0.0
6	0.0	0.0	0.8	0.4	0.0	0.4	0.0	0.0
7	0.4	0.4	36.0	55.6	33.2	20.8	24.4	15.2
8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4
9	0.0	0.0	0.0	0.8	32.0	52.0	38.0	27.2
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.4
11	2.0	3.6	0.0	0.0	0.0	0.8	34.8	53.2
12	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
13	0.8	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
X	0.0	0.0	0.0	0.0	10.8	7.2	0.0	1.2
x	0.0	0.0	0.0	0.0	7.2	6.8	0.0	0.0
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Temel çizgi sayısı indeksi : Sol el : $X = 12.732 \pm 2.646$, Sağ el : $\bar{X} = 13.684 \pm 0.228$

Balgir (4), 100 normal erkek ve 100 normal kız bireyde D-temel çizgisinin sonlanımını en sık 11. pozisyonunda bulmuş ve modal tipleri 11>9>7 olarak saptamıştır. Yazara göre, erkek ve kızlarda C-temel çizgisi daha çok radial, daha sonra ulnar ve proksimal pozisyonadadır. *deDiaz Ungria* ve *Martin* (8), 5 Yukpa kabilesinde temel çizgi indeksi değerlerinin 21, erkek Chaparro bireyinde 7.36, 33 erkek Pariri bireyinde 6.52, 30 erkek Irapa bireyinde 6.08, 15 Macoa erkek bireyinde 6.80, 13 Japreria erkek bireyinde 6.15 ve total 112 erkek bireyde 6.55 ± 1.51 , 19 Chaparro kız bireyde 6.50, 26 Pariri kız bireyde 5.87, 22 Irapa kız bireyde 6.57, 20 Macoa kızda 6.8, 8 Japrena kızda 6.38 ve total 97 kız bireyde 6.40 ± 1.37 saptamışlar; Chaparro ve Pariri, Chaparro ve Irapa kabilelerinde indeks değerleri bakımından önemli farklar bulmuşlardır. *Satyanarayana Rao* (11), Andhra Pradesh'ten 130 Konda Reddy kabile erkeklerinde A-temel çizgisi sıklığının 4>3>5', B-temel çizgisinin sıklığının 5'>7>5">4, C-temel çizgisi sıklığının 9>5">5', D-temel çizgisi sıklığının 11>9>7 sırasında olduğunu saptamışlardır. *Malhotra* ve *Sarkar* (10), 48 Nicobarase erkek bireyinde A-temel çizgisinin 1. yere sonlanım oranını sol elde 17.02 olarak saptamış, sağ elde gözleyememiş; A-temel çizgisinin bitim yeri sırası sol elde 3>1>5>4, sağ elde 3>5>4, C-temel çizgisinin ulnar tipte, D-temel çizgisinin sonlanım yer sırasını sol elde 9>7>11, sağ elde 11>9>7 olarak bulmuşlardır.

Dash Sharma (7) ile *Dange* ve *Gupta* (6) A-temel çizgisinin 1. yere sonlanımı ile ilgili oranı düşük, *Malhotra* ve *Sarkar* (10) ise, sunduğumuz çalışmadakine yakın oranda bulmuşlardır. Sunulan çalışmada A-temel çizgisinin sonlanım yer sıralanımı erkek ve kızların sol ellerinde $3>5'>1$, erkeklerin sağ ellerinde $5'>3>11$, kızların sağ ellerinde $5'>3>5''$ olarak saptanmıştır ve *Dash Sharma* (7) 'nın sonuçlarına uyum göstermektedir. B-temel çizgisi erkeklerin sol ellerinde $5''>5'>7$, sağ ellerinde $7>5''>5'$, kızların sol ellerinde $7>5'>5''$, sağ ellerinde $7>5''>5'$ sonlanım sırası göstermekte olup, literatürdekinden farklılık arz etmektedir. C-temel çizgisi erkeklerin sol ellerinde $7>9>5''$, sağ ellerinde $9>7>5''$ sonlanım sıralanımı göstermekte olup, *Dange* ve *Gupta* (6)'nın materyalinin sağ ellerindeki bulgulara uyum göstermektedir. D-temel çizgisi erkeklerin sol ellerinde $9>7>11$, sağ ellerinde $11>9>7$, kızların sol ellerinde $9>7>5''$, sağ ellerinde $11>9>7$ yer sıralanımı göstermekte ve *Balgir* (4), *Dange* ve *Gupta* (6), *Satyanarayana Rao* (9)'nun materyallerinin sağ ellerindeki, *Dash Sharma* (7)'nin materyalinin her iki ellerindeki yer sıralanım bulgularına uymaktadır. *Atasu* (1)'nin bulguları ile buradakiler karşılaştırılacak olunursa, sunulan çalışmada erkek Türk çocuklarının sol ellerinin 4. yerinde A-temel çizgisinin sonlanımı siktir. A-temel çizgisinin aynı elde 5'. yerde fazla, sağ elde 1. yerde sık, 11. yerde az görülmektedir. B-temel çizgisi sol 5'. yere fazla, 7. yere az açılmaktadır. C-temel çizgisi sol 9. bölgede ve X 'te az, sağ 7. yerde fazla, 9. yerde azdır. D-temel çizgisi sol elin volar yüzeyinin 11. yerinde az, sağ 7. ve 11. yerinde az, 9. yerde fazla sonlanmaktadır.

Temel çizgi indeks değeri *deDiaz Ungra* ve *Martin* (7), *Dash Sharma* (6) 'nunkiler ile farklılık göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1 Atasu, M. (1981) *Türk çocuklarının derioymacığ ı bulguları*, XX. Türk Pediatri Kongresi Tebliğler Kitabı, sayfa: 609-623.
- 2 Atasu, M. (1976) *Derioymacıklarının tıpta kullanımı*, XIV. Türk Pediatri Kongresi Tebliğler Kitabı, sayfa: 188-201.
- 3 Atasu, M. (1976) *Herediter işaret parmağ ı polidaktilisi. Büyük bir ailede gözlenen fenotipik, radyolojik genetik bulgular*, XIV. Türk Pediatri Kongresi Tebliğler Kitabı, sayfa: 293-299.
- 4 Balgir, R.S. (1980) *Dermatoglyphics*, 12, 9-14.
- 5 Cummins, H., Midlo, C. (1962) *Finger Prints, Palms and Soles*, Philadelphia, Blakiston, New York, Dover.
- 6 Dange, A., Gupta, P. (1980) *Dermatoglyphics*, 8, 49-55.
- 7 Dash Sharma, P. (1980) *Dermatoglyphics*, 8, 33-42.
- 8 deDiaz Ungria, A.G., Martin, J. (1984) *Dermatoglyphics*, 12, 21-38.
- 9 Ford Walker, N. (1957) *J.Pediat.*, 50, 27.
- 10 Malhotra, R., Sarkar, B.N. (1984) *Dermatoglyphics*, 12, 59-67.

- 11 Satyanarayana Rao, K.V. (1984) *Dermatoglyphics*, **12**, 49-58.
- 12 Singh, S.P., Garg, R.K. (1985) *Dermatoglyphics*, **13**, 10-14.
- 13 Veerajju, P. (1980) *Dermatoglyphics*, **8**, 21-32.

Ayrı baskı için:

Prof.Dr. Metin Atasu
Marmara Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye

Türk Çocuklarının Derioymacılığı Bulguları V. Ayak Tabanı Örnekleri

METİN ATASU

Marmara Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

DERMATOGLYPHICS OF TURKISH CHILDREN: V. SOLE PATTERNS

Summary

Sole patterns of 250 male and 250 female Turkish children were investigated and compared with those of in the literature. There were more II loops and z' triradii on the soles of the males and were less I and IV loops, and p' and z triradii on the soles of the females. There were less III loops and p' and z' triradii and were more V loops and c triradii on the soles in both sexes.

Key words: *Dermatoglyphics - Population study - Sole patterns*

Özet

250 erkek ve 250 kız Türk çocuğunun ayak tabanlarındaki örnekler değerlendirilmiş ve sonuçlar literatürdekiler ile karşılaştırılmıştır.

GİRİŞ

Derioymacılıkları ile ilgili yabancı kaynaklı yayınlar olmakla beraber, Türk toplumunu ilgilendiren derioymacılığı çalışmalarında, ayak tabanı örnekleri ile ilgili değerlendirme verileri yoktur. Bu çalışmalar tıpta, kromozom anomalileri (1) ve doğmalık el kusurları (2)'nda önem taşımaktadır.

Sunulan çalışmada amaç, tıpta derioymacılığı çalışması yapacaklara kontrol verilerini sağlamak ve çalışmada gözlenen bulguları literatürdekilerle karşılaştırmaktır.

MATERYAL ve METOD

Materyali Ankara Hasanoğlu İlkokulu'ndan rastgele seçilen, sağlıklı, 7-14 yaşları arasında, Türkçe konuşan, islam 250 erkek ve 250 kız öğrenci oluşturmuştur. Öğrencilerin ayak tabanlarındaki derioymacılıkları Faurot Inc. firması tarafından imâl edilen kimyasal bir sıvı ile ıslatılmış ıstampa ve bu sıvıya duyarlı özel kağıtlar ile alınmıştır (3). Ayağın volar yüzeyindeki örnekler *Penrose* ve *Loesch* (4)'ün topolojik metoduna göre değerlendirilmiştir.

Tablo I. Türk çocuklarının plantar örnek tiplerinin yüzde ve mutlak frekansları.

Örnek Tipi	Sol ayak		Sağ ayak		Sol + Sağ ayak	
	Erkekler	Kızlar	Erkekler	Kızlar	Erkekler	Kızlar
<u>İlmelekler</u>						
I	209 (83.6)	210 (84.0)	214 (85.6)	210 (84.0)	423 (84.6)	420 (84.0)
Î	119 (47.6)	102 (40.8)	89 (35.6)	93 (37.2)	208 (41.6)	195 (39.0)
II	17 (6.8)	17 (6.8)	16 (6.4)	18 (7.2)	33 (6.6)	35 (7.0)
IÎ	70 (28.0)	49 (19.6)	69 (2.6)	54 (21.6)	139 (27.8)	103 (20.6)
III	142 (56.8)	120 (52.0)	154 (61.6)	146 (58.4)	296 (59.2)	276 (55.2)
IIÎ	47 (18.8)	21 (8.4)	50 (20.0)	31 (12.4)	97 (19.4)	52 (10.4)
IV	35 (14.0)	17 (6.8)	47 (18.8)	24 (9.6)	82 (16.4)	41 (3.2)
IV̂	5 (2.0)	6 (2.4)	8 (3.2)	4 (1.6)	13 (2.6)	10 (2.0)
IV ^f	1 (0.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.2)	0 (0.0)
V	0 (0.0)	1 (0.4)	6 (2.4)	3 (1.2)	6 (1.2)	4 (0.8)
V̂	46 (18.4)	35 (14.0)	52 (20.0)	46 (18.4)	98 (19.6)	81 (16.2)
<u>Triradiuslar</u>						
e	132 (52.8)	106 (42.4)	97 (38.8)	84 (33.6)	229 (45.8)	190 (38.0)
f	210 (84.0)	189 (75.6)	209 (83.6)	199 (79.6)	419 (83.8)	408 (80.1)
g	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
p	73 (29.2)	56 (22.4)	124 (49.6)	104 (41.6)	197 (39.4)	160 (32.0)
p'	73 (29.2)	77 (30.8)	47 (18.8)	56 (22.4)	120 (24.0)	133 (26.6)
p''	27 (10.0)	11 (4.4)	32 (12.8)	12 (4.8)	59 (11.2)	23 (4.6)
h	45 (18.0)	36 (14.4)	54 (21.6)	48 (19.2)	99 (19.8)	84 (16.8)
z	104 (41.6)	79 (31.6)	111 (44.4)	79 (31.6)	215 (43.0)	158 (31.6)
z'	28 (11.2)	18 (7.2)	24 (9.6)	23 (9.2)	52 (10.4)	41 (8.2)
z''	6 (2.4)	3 (1.2)	7 (2.8)	3 (1.2)	13 (2.6)	6 (1.2)
Örnek sıklığı	2.796 ± 0.082	2.508 ± 0.061	2.508 ± 0.742	2.316 ± 0.065	5.120 ± 0.150	4.816 ± 0.128

SONUÇ

Erkek ve kız Türk çocuklarının plantar derioymacığ ı örnekleri TabloI'de gösterilmiştir. Erkek çocuklarının sol ayaklarında $\hat{I}\hat{I}$, $\hat{V}$ ilmekleri, e ve f triradiusları, sol sağ ve her iki ayaklarında $\hat{I}\hat{I}\hat{I}$, IV ilmekleri, p" ve z triradiusları kızlarınkine göre fazladır. Erkek ve kız Türk çocuklarının sol ayaklarında $\hat{I}$ ilmeğ i, f ve p' triradiusları fazla, III ilmeğ i ve p triradiusu az, kızların sağ ayaklarında $\hat{I}\hat{I}\hat{I}$ ve $\hat{V}$ ilmekleri fazladır.

TARTIŞMA

Penrose ve Loesch (4), İngiliz popülasyonundaki plantar örneklerini kendi buldukları sisteme göre sınıflandırmış ve örnek frekanslarını belirtmişlerdir. Bu sınıflandırma şekli özellikle derioymacığ ı örneklerinin daha kesin gruplandırılması ve simetri açısından önem taşımaktadır. Sunulan çalışmadaki Türk çocuklarının plantar derioymacıkları daha önceki araştırmaların sonuçları geçenlerinkiler ile karşılaştırıldığında, erkeklerde plantar $\hat{I}\hat{I}$ ilmeğ i ve z' triradiusu, kızlarda $\hat{I}$ özellikle IV ilmeğ i, ayrıca, p" ve z triradiusları, her iki cinsiyette $\hat{I}\hat{I}\hat{I}$ ilmeğ i, p' ve z' triradiusları az, özellikle $\hat{V}$ ilmeğ i ve ayrıca, e triradiusu fazladır.

KAYNAKLAR

- 1 Atası, M. (1976) *Derioymacıklarının tıpta kullanımı*, XIV. Türk Pediatri Kongresi Tebliğler Kitabı, sayfa, 188-201.
- 2 Atası, M. (1976) *J. Med. Genet.*, **13**, 469-476.
- 3 Ford Walker, N. (1957) *J. Pediat.* **50**, 27.
- 4 Penrose, L.S. and Loesch, D. (1969) *Hum. Biol.*, **41**, 427-448.

Ayrı baskı için:

Prof.Dr. Metin Atası
Marmara Üniversitesi, Dişhekimliği Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
İstanbul, Türkiye

Evaluation of Hepatitis-B Surface Antigen As a Forensic Marker

D.V. RAO ^{a)}, V.K. KASHYAP ^{a)}, C.M. HABIBULLAH ^{b)}

^{a)} Central Forensic Science Laboratory, Bureau of Police Research & Development
Ministry of Home Affairs, Ramanthapur, Hyderabad, India

^{b)} Department of Gastroenterology, Osmania General Hospital, Hyderabad, India

HEPATİTİS B YÜZEY ANTİJENİNİN ADLI İŞARET OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ

Özet

Kanda yabancı antijenlerin bulunması ikizleri ve yakın akrabaları birbirinden ayırmada adli açıdan çok büyük önem taşıyabilir. Bu görüşten yola çıkılarak hepatit yüzey antijeninin (HbsAg) kan lekelerinin kaynağını belirlemede adli marker (işaret) olarak kullanılabileceği düşünüldü. Çift antikor sandviç prensibine dayanan ELISA yöntemi kullanılarak kan lekelerinde HbsAg varlığı araştırıldı. Kan lekelerinde HbsAg'nin dayanıklılığı ve Haydarabad popülasyonundaki frekansı incelendi. Normal koşullarda 5 hafta bekletilen kan lekelerinde dahi HbsAg'nin saptanabildiği görüldü. Taranan 2150 kişinin %11.4'ünde HbsAg'ye rastlandı. Frekansı 0.08 olarak hesaplanan HbsAg'nin incelenen popülasyonda amibli dizanteri, influenza ve tüberküloz kadar yaygın olmaması sayesinde, bu antijenin adli işaret olarak kullanılabileceği, ikizleri ve yakın akrabaları birbirinden ayırmada yararlanılabileceği sonucuna varıldı.

Summary

The presence of extraneous antigens in blood may be of unique forensic importance in discriminating source among identical twins and genetically close related individuals. Hepatitis surface antigen (HBsAg) as a forensic marker in establishing the source of blood stains has been evaluated by studying the stability of HBsAg in stains and its frequency in Hyderabad population. Microstrip based double antibody sandwich ELISA is employed to detect HBsAg in blood stains. HBsAg was found to be stable up to 5 weeks in blood stains exposed to ambient conditions.

Key words: HBsAg - ELISA - Storage - Stability - Frequency

INTRODUCTION

Human blood contains several components which are highly useful in forensic analysis (1). Species specific antigens (2), blood group substances (3), polymorphic enzymes (4), and human leucocyte antigens (5), which constitute the expressed part of genome are being extensively studied to find out the source and to individualize blood and its stains.

Adli Tıp Derg., 6, 19 - 24 (1990)

Analysis of highly variable tandem repeats (HVTR) of DNA by using multilocus probes (MLPs) and single locus probes (SLPs) with or without polymerase chain reaction (PCR) is a new advancement being applied as a final test for individualization or sexing of bodyfluid stains and tissues (6). Blood may also harbour antigens derived from pathogenic bacteria, virus, protozoa or other micro-organisms in free or as circulating immune complexes (7) which could be highly informative as forensic marker in individualization of source of blood stains especially where genetic markers fail to distinguish biological samples derived from two related individuals. An elaborate study of extraneous antigens and their potential in forensic investigation therefore assumes unique importance.

In this study we have evaluated the stability of hepatitis surface antigens (HBsAg) as an extraneous marker by examining (a) the stability of HBsAg antigens in stains stored for various lengths of time at room temperature and (b) prevalence of HBsAg in population at Hyderabad. Microstrip based double antibody sandwich and highly sensitive ELISA is employed to detect HBsAg.

MATERIALS and METHODS

Microstrips (16 wells) coated with antibodies to HBsAg were purchased from Hoechst India Ltd (India). Wells were blocked with 2 % BSA. Second antibody to HBsAg labelled with horse radish peroxidase enzyme was also obtained from the same source. All incubations were carried out in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2 and washings at the end of each binding step were carried out in PBS, pH 7.2 with 0.1 % Tween 20 (8).

Blood stains: Hepatitis positive blood samples were obtained from Gastroenterology Department of Osmania General Hospital, Hyderabad. Sixty blood stains, each approximately 1.0 cm², were prepared on sterile cotton cloth by pouring sufficient volume of blood. Stains were divided into 6 groups, each comprising of 12 stains and left at room temperature in petridishes. On the first day each group was screened for the presence of HBsAg and subsequently testing was done at the end of every week up to 5 weeks. Two stains from each group were used as representatives of group during each testing.

Stain extracts: Stains were cut into fine pieces and extracted in 500 µl of normal saline for one hour, in separate microfuge tubes (1.0 ml). Later the bottom of the microfuge tube was punctured, placed in 1.5 ml tube and centrifuged for 15 mins at 1000 rpm. Stain extract was collected in the outer tube. 100 µl of extract of each stain was used to detect the presence of HBsAg.

ELISA procedure: Anti-HBsAg antibody coated microstrip was taken out from the refrigerator and acclimatised at room temperature.

First two wells of microstrips were charged with 100 µl of positive controls. Extracts of stains of 6 experimental groups (Figure 1) were tested in remaining 12 wells. From each group two stain extracts were tested side by side in serial order. Wells after loading with extracts were covered with adhesive foil and incubated at 37°C for 4 hours. Thereafter, wells were washed 3 times with washing buffer. 100 µl of second antibody (1:1000 dil) were added in each well and incubated for 30 min at 37°C. Wells were again washed three times with washing buffer and 100 µl of 0.2 % o-phenyldiamine (OPD) in citrate buffer, pH 5.5 was added to each well, covered and kept for 30 min at room temperature in dark.

The reaction was terminated by adding 100 µl of 2 N HCl. The intensity of the colour was read visually against positive and negative controls (Figures 1 and 2 ; Table I).

Population Study: 2150 individuals were screened for the presence of HBsAg in their blood by using the ELISA method.

1	2	3	4	5	6	7	8
+ve	+ve	-ve	-ve	I	I	II	II
III	III	IV	IV	V	V	VI	VI
9	10	11	12	13	14	15	16

Figure 1. Schematic diagram showing the controls (wells 1 to 4) and test samples in wells 5-16 of microstrip.

Table I. Stability of HBsAg in blood stains.

	Reaction intensities in various groups*					
	I	II	III	IV	V	VI
'0' day	4+	4+	4+	4+	4+	4+
1st week	4+	4+	4+	4+	4+	4+
2nd week	3+	3+	3+	3+	3+	3+
3rd week	2+	3+	3+	3+	1+	3+
4th week	2+	2+	2+	2+	1+	1+
5th week	1+	1+	1+	1+	2+	1+

* 4+ = very strong, 3+ = very strong, 2+ strong, 1+ = weak

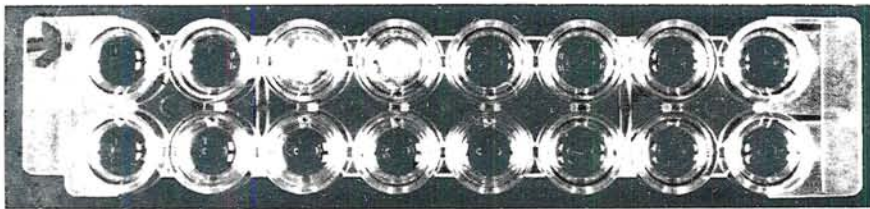


Figure 2. Typical 16 well Microstrip used in the study.

Wells no. 1-2 contain positive control, 3-4 negative control and the rest are used for the blood stain extracts. Positive reactions are clearly seen in comparison with the negative controls.

RESULTS AND DISCUSSION

The stability of a biological marker for forensic analysis depends upon the amount of information it can provide and its stability in body fluids and their stains besides somatic and germline stability. Many endogenous genetic systems present in blood and other body fluids are highly polymorphic, stable in the stains for longer periods (9) and follow Mendelian fashion of inheritance (10). Hence endogenous markers are highly informative and routinely analysed for forensic purpose, an extraneous marker can be of forensic utility provided it is stable in stains and its frequency distribution in a given population is known.

Hepatitis is a very important disease and the hepatitis surface antigens are easily detected in the body fluids of infected persons. We have therefore opted HBsAg as a useful marker for forensic study. We could successfully detect HBsAg in blood stains stored up to 5 weeks. Stains of one day and one week old gave very strong positive reactions and thereafter the intensity of the reaction gradually declined with the length of storage period. In five-week old stains the reaction was relatively weak. HbsAg positive stains could clearly be detected from negative controls. HbsAg are spherical and high molecular weight proteins measuring 22 nm in diameter (11). High molecular weight and strong antigenicity of HBsAg are responsible for its extreme stability. Isolated HBsAg was found to be stable for more than 20 years when stored at -20°C and it is not destroyed by UV radiation (12). It is reported that HBsAg retains its antigenicity in conditions in which the infectious virus is rapidly inactivated (13). Eventhough temporal disintegration of HBsAg has been observed in stains exposed to ambient climatic conditions, the rate of deterioration is significantly low (Figure 3) and their presence was unambiguously detected even after five weeks.

Table II. Incidence of HBsAg in Hyderabad population.

S. No.	Population group	No. of subjects tested	% of positive cases of HBsAg
1.	Hospital staff	314	10.0
2.	Professional and voluntary blood donors	1300	7.2
3.	Antinatal	300	3.0
4.	Mentally retarded	86	26.7
5.	Prison children	150	22.0
Total		2150	11.4 %

$$\text{Frequency of HbsAg} = 1 \times \frac{1}{11.4} = 0.08$$

Several authors reported the successful detection of HBsAg in fresh tissues and body fluids (14,15). But no reports were available on the stability of HBsAg in stains and their detectability. From the present study it is clear that the HBsAg present in blood stains are highly stable, that they could withstand the stress of normal climatic conditions up to 5 weeks and could be detected by using a suitable method.

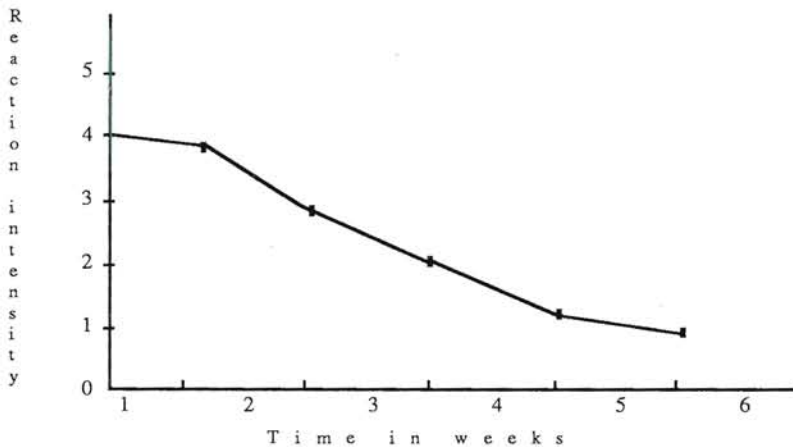


Figure 3. Temporal disintegration of HBsAg in blood stains stored for different lengths of time.

Disease marker of high prevalence is not satisfactory for forensic considerations. In this respect HBsAg marker is highly suitable for forensic investigation as its distribution is not very high in the population unlike other diseases such as amoebiasis, influenza and tuberculosis. However, meaningful conclusions could only be drawn for extraneous marker analysis, when other genetic systems are also simultaneously examined. Hepatitis is not endemic to India and its prevalence is moderate. The frequency of HBsAg in Hyderabad population was found to be 0.08 (Table II). The probability of finding another stain with HBsAg depends upon the frequency of the marker in that population. Lower the frequency of a marker, lower will be the probability and it is highly suitable for the forensic analysis.

The presence of HBsAg in the stains found at crime scene and also in the blood of suspect could be of immense help as additional marker to supplement the findings obtained by typing the other genetic systems. Merits of HBsAg in forensic analysis supersedes the inherent demerits of lack of germline and somatic stability and infective risk posed by antigen, especially in cases requiring discrimination between identical twins and genetically very close related individuals.

REFERENCES

- 1 Levkov, J.S. (1987) *J. Forensic Sci.*, **32**, 357-363.
- 2 Tahir, M.A. (1989) *Sci. Int. (Lahore)*, **1**, 281-282.
- 3 Tahir, M.A., Brown, M.L. (1984) *J. Forensic Sci.*, **29**, 660-662.
- 4 Keller, P.J., Kuufman, A.D., Allan, B.J., Williams, B.L. (1971) *Biochem.*, **10**, 4867-4874.
- 5 Netron, M.S., Turner, L.L., Reisher, E.G. (1983) *J. Forensic Sci.*, **28**, 608-614.
- 6 Waye, J.S., Presley, L.A., Budowle, B., Shutter, G.G., Fourney, R.M. (1989) *Biotechniques*, **7**, 852-855.
- 7 Kashyap, V.K., Rao, D.V. (1989) *Application of extraneous serological markers in forensic investigation*, in Proceeding of Short-term Course in Immunological Methods in Forensic Investigation, Nov. 6-10.
- 8 Inconescu, M. (1985) *J. Immunol. Methods*, **76**, 307-316.
- 9 Buckleton, J.S., Walsh, K. (1987) *J. Forensic Sci. Soc.*, **27**, 103-112.
- 10 Grunbaum, B.W., Selvin, S., Pace, N., Black, D.M. (1978) *J. Forensic Sci.*, **3**, 577-587.
- 11 Peterson, A. (1981) *J. Biochem.*, **256**, 6975.
- 12 Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. (1987) in *Review of Medical Microbiology*, pp. 445, Prentice-Hall International, Inc., U.S.A.
- 13 Blumerg, B.S. (1977) *Science*, **197**, 17.
- 14 Zuckerman, A.J. (1981) *J. Infect. Dis.*, **143**, 301.
- 15 Lander, J.J., Alfer, H.J., Purcell, R.H. (1971) *J. Immunol.*, **106**, 1166.

Reprints request to :

Dr. V.K. Kashyap
Assistant Director
Central Forensic Science Laboratory,
Bureau of Police Research & Development,
Ministry of Home Affairs,
Ramanthapur, Hyderabad 500 013
India

Ions As Vital Reaction Markers Comparative Study with Histamine and Serotonin

JOSÉ ANTONIO LORENTE, CLAUDIO HERNANDEZ-CUETO, ENRIQUE VILLANUEVA

Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain

İYONLARIN CANLILIK BELİRTECİ OLARAK KULLANIMI, HİSTAMİN VE SEROTONİN VERİLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Özet

Adli tıptaki önemli konulardan birisi de, cesetlerin üzerindeki yaraların ne zaman (ölümünden önce veya sonra) meydana geldiğini tesbit edebilmektir. Bu amaçla, domuz derisi üzerinde ölüm öncesi ve sonrası belirli zaman aralıklarında oluşturulan yaralarda kalsiyum, magnezyum, bakır ve çinko düzeyleri atomik soğurma spektrofotometrisi; histamin ve serotonin düzeyleri ise spektrofotometri yöntemiyle izlendi.

4 aylık olan 10 domuzun kullanıldığı araştırmamızda, hayvanlar canlıyken sırt derisine cerrahi bistüri ile 6 insizyon yapıldı. Bu işlemi izleyen değişik süreler (0,10, 20, 30, 60 ve 120 dakika) içerisinde öldürülen hayvanlarda, aynı yöntemle, postmortem yaralar oluşturuldu. Lezyonlardan alınan 7-8 cm çapındaki deri parçaları -30°C'da donduruldu. Elde ettiğimiz sonuçlar, histamin ve serotoninin canlılık belirteci olarak önemlerini doğrulamış, ayrıca, adı geçen iyonların belirtiminde kullanılan kolay, duyarlı ve özgül yöntemin yara yaşını saptamada taşıdığı önemi kanıtlamıştır.

Summary

We have studied the behaviour of the ions Ca, Mg, Cu, Zn and Fe with atomic absorption spectrophotometry (AAS) and the behaviour of histamine and serotonin by spectrofluorimetry in vital and postmortem wounds of different time of evolution made over pig skin.

Our results confirm the usefulness of histamine and serotonin as vitality markers and also confirm the great value of the ions studied with the same purpose because it is an easy, sensitive and high specific method.

Key words: *Ions - Histamine - Serotonin - Vital reaction*

INTRODUCTION

The application of enzymohistochemical and biochemical studies has supposed an important contribution to the differential diagnosis between vital and postmortem wounds. The study of the activity of some enzymes at the edge of wounds (alkaline phosphatase, esterase, aminopeptidase, etc.) mainly by *Raekallio* (1-3) and the study of some lysosomal enzymes such as cathepsins by ourselves (4-6) has been added to former investigations using histamine and serotonin (7-10). This kind of markers permit the detections of signs of vitality in wounds performed only few minutes before death.

Adli Tıp Derg., 6, 25 - 32 (1990)

Forensic practice need to employ these markers when wounds were made in moments closed to death; in these situations it is going to be difficult to differentiate the vital origin from the postmortem one only with macroscopic techniques. From some years ago we have been working in this field, looking for vitality markers of great sensibility and specificity. One of the markers that have been studied are some metallic ions (Ca, Mg, Cu, Zn, Fe) that showed the best results in former works (12,13). As we have also demonstrated their postmortem stability (6), these kind of markers can be specially usefull in those situations where the autopsy is performed in cadavers recovered some days after death.

At the same time we have determined the levels of the well known amines histamine and serotonin to compare their levels and evolution along the time with the ion's ones, following a previous work in the same kind of investigation from our Department (5). If ions show a correlation with histamine and/or serotonin, they could be useful not only to stablish if a wound was performed after or before the death, but also how many minutes before death was performed.

MATERIALS and METHODS

We have employed ten domestic pigs (age: 4 months; body weight: ~100 kg). Six vital incised wounds were made with a surgical blade scalpel to every animal in the back. Each wound has a different "*time of evolution*" (time elapsed between the moment of wounding and the moment of death). These times were of 0, 10, 20, 30, 60 and 120 minutes. The animals were sacrificed by dellocation, washed with water and gently shaved; after shaving we made another identical wound (postmortem wound), in a homolateral place of the back. To obtain the samples we cut a piece of skin of 7-8 cm around the wound that was immediatly frozen at -30°C until using.

Before making determinations, each wound were divided as follows:

VITAL WOUNDS

B₁ : edge of vital wound, until 3 mm

B₂ : edge of vital wound, from 3 mm

A : control zone: skin not injured

POSTMORTEM WOUNDS

C₁ : edge of postmortem wound, until 3 mm

C₂ : edge of postmortem wound, from 3 mm

To determine ions we have employed a method formerly employed by ourselves (6,12,13). Once weighted, one gram of dried pig-skin without fat was calcinated in an electric oven at 500°C for 6 hours; ashes were dissolved in 3 ml of concentrated HCl and dried out in a heater and diluted in 25 ml of 3 % HCl, where were made the different determinations. The levels of Ca, Mg, Cu, Zn and Fe were measured by AAS with a Perkin-Elmer Spectrophotometer mod. 560 ; working conditions are expressed in Table I. Standard curves for control were made with standard solutions of each element (Carlo Erba, R) diluted in 3 % HCl.

Histamine was determined according to a classical and efficient method (14) based on the butanolic extraction of histamine; this butanolic layer is further mixed with NaOH and heptane to eliminate contaminants and closely-related products; finally, histamine is extracted with 0.1 N HCl and condensed with ortho-phthalaldehyde (OPT, Sigma, R) in acid medium, resulting a strong fluorescence that was measured with a Perkin-Elmer mod. MPF43A spectrofluorimeter (Exc: 360 nm; Em: 450 nm). Calculations were made by comparison of the results with standard curves of histamine (Sigma, R).

To determine serotonin we have followed the method formerly employed with the same purposes by *Raekallio et al* (9), who made a modification of the original procedure (15). This method is based in the native fluorescence of serotonin in acid medium (pH: 2.5), that can be measured with a spectrofluorimeter (Exc: 295 nm; Em: 345 nm). Results were plotted against a standard curve made with serotonin (Sigma, R).

The statistical study of the results was carried out with a Student's-*t* test for coupled samples to compare differences between diverse zones. Additionally we made tests of linear regression and correlation to compare the evolution of histamine and serotonin levels with those of the different ions.

Table I. Working conditions for AAS.

<i>Element</i>	<i>Wavelength (nm)</i>	<i>Slit (nm)</i>	<i>Fuel (kg/cm²)</i>	<i>Oxidant (kg/cm²)</i>	<i>Standards</i>
Ca	422.7	0.7	40	55	0.10 mg %
					0.20 mg %
Mg	285.2	0.7	40	20	50 µg %
					100 µg %
Cu	324.7	0.7	40	20	50 µg %
					100 µg %
Zn	213.9	0.7	40	20	50 µg %
					100 µg %
Fe	248.3	0.7	40	20	50 µg %
					100 µg %

Table II. Markers with statistical signification between wounds edge and control zones.

<i>Marker</i>	<i>Time of Evolution</i>	<i>Signification</i>
Ca	0,10,60	p < 0.01
	20	p < 0.10
Mg	0,10,20,30	p < 0.01
Cu	0,10,20,30	p < 0.01
	120	p < 0.10
Zn	0,10,20,30	p < 0.01
Fe	0	p < 0.01
	60	p < 0.05
Histamine	All the series	p < 0.01
Serotonin	All the series	p < 0.01

RESULTS

Our results are expressed in Figures 1 to 7 where are represented the levels obtained for each marker at the different time of evolution (0, 10, 20, 30, 60 and 120 min) in all the zones (A,B1,B2,C1 and C2).

Table II shows only the statistically significant results.

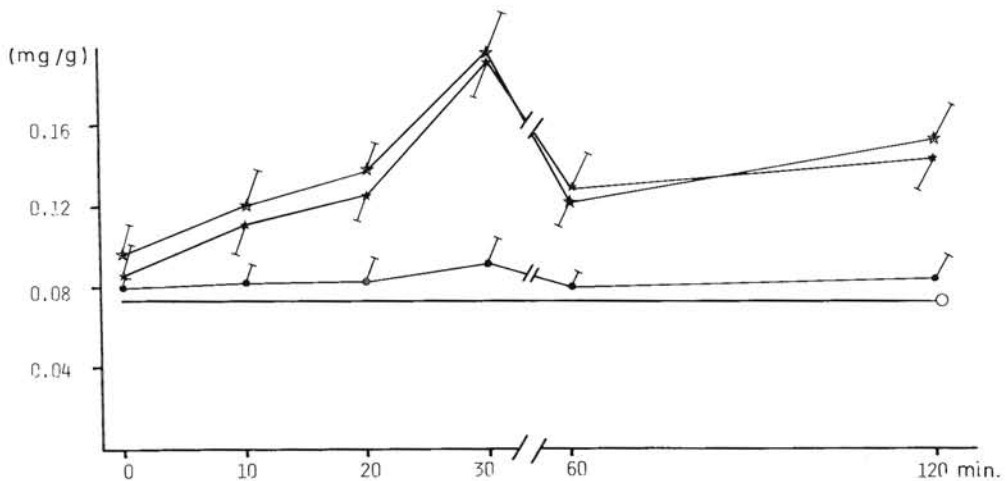


Figure 1. Evolution along the time of Ca levels in all the zones.
(★ B₁ ; ☆ B₂ ; ○ A ; ■ C₁ and C₂)

DISCUSSION

We have obtained statistically significant differences in all the times studied for histamine and serotonin. Their evolution along the time at the edge of vital wounds has been according to many previous authors (1,2,3,5,9,10,12). Ion's levels are really useful to differentiate vital from postmortem wounds.

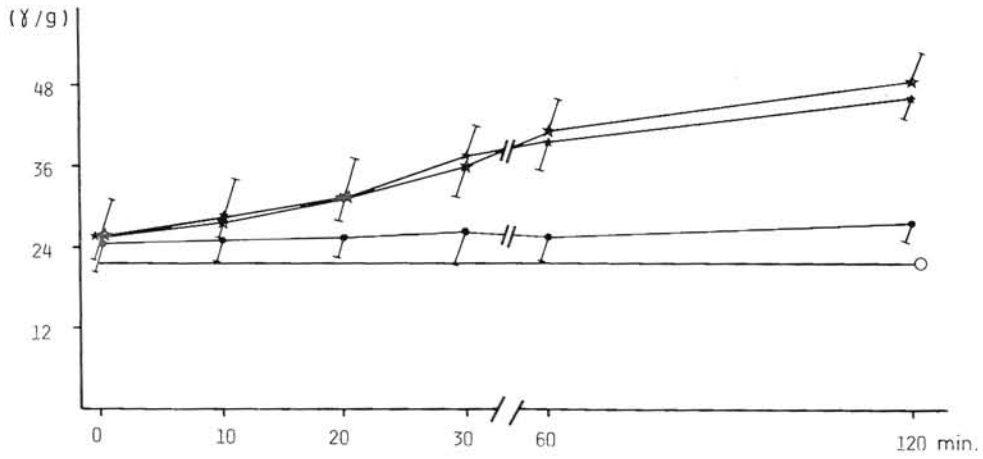


Figure 2. Evolution along the time of Mg levels in all the zones.
(★ B₁ ; ☆ B₂ ; ○ A ; ■ C₁ and C₂)

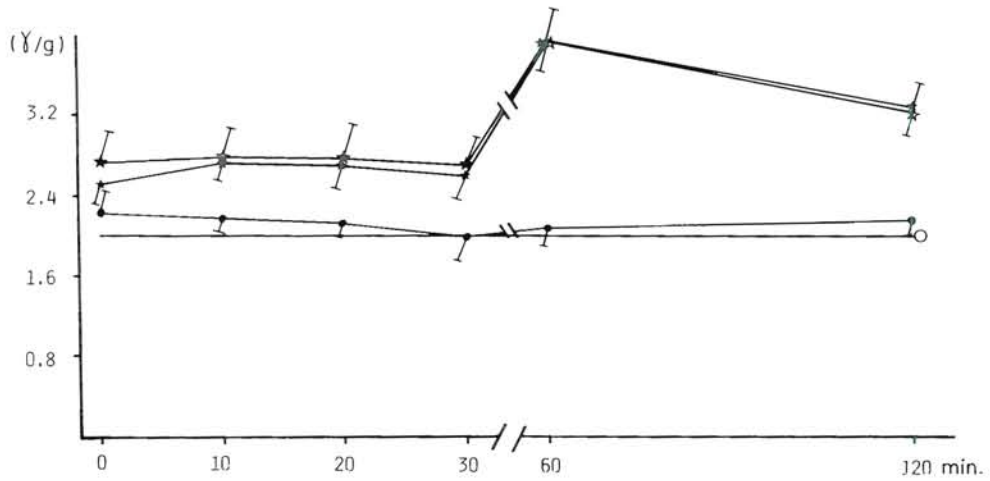


Figure 3. Evolution along the time of Cu levels in all the zones.
(★ B₁ ; ☆ B₂ ; ○ A ; ■ C₁ and C₂)

The best results are obtained with Ca, but all the ions are useful (Table II). Nevertheless, the main problem we have is originated by the relatively high standard deviation (SD) that, although they are lower than in our previous works (6,12,13) they are still important. This high SD is due to the employ of different and not typical animals of laboratory; so, the biological variation is here specially increased, although we have to take account that this variation is going also to be observed in human samples and is going to be necessary everytime to compare a piece of wounded skin with a homolateral and not-wounded one (in our samples, zones A, C1 and C2).

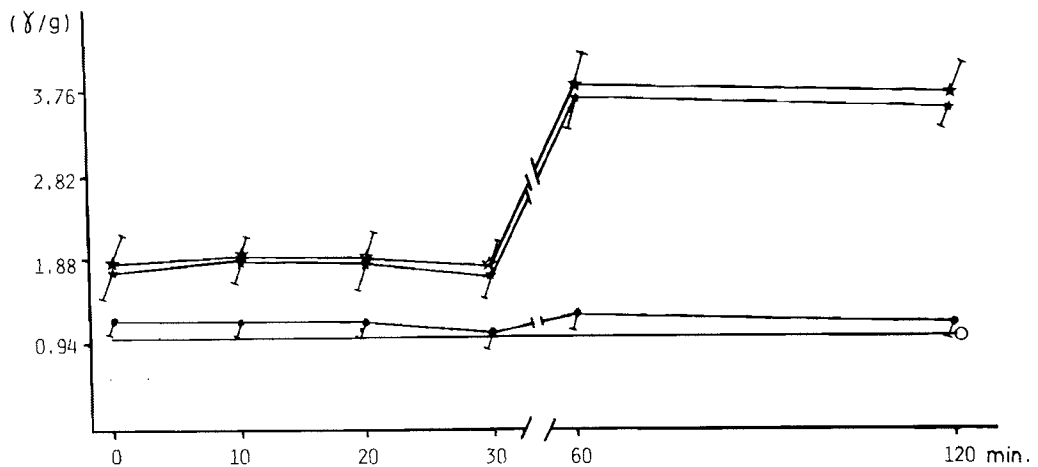


Figure 4. Evolution along the time of Zn levels in all the zones.

(★ B1 ; ☆ B2 ; ○ A ; ■ C1 and C2)

The statistically significative increasing of the levels of the ions at the edge of the vital wounds (B1 and B2) in relation to the edge of the postmortem (C1 and C2) and the control zones (A) show their ability as markers of the vitality of the wound (Table II). They are involved in many physiological processes in the skin and also in the response of the tissues to injuries (acute inflammatory reaction) do perfectly justify their increasing.

Nevertheless, the no correlation between histamine and Ca, between serotonin and Ca and among the different ions themselves or with histamine or serotonin, make us to doubt about the usefulness of these elements to determine the data of vital wounds.

In summary, we can conclude that the study of the levels of Ca, Mg, Cu, Zn and Fe at the edge of the wounds is very useful to establish the differential diagnosis between vital and postmortem wounds. At the same time, the employ of histamine and serotonin as markers of vitality is very useful to establish -besides- the data of the vital wounds.

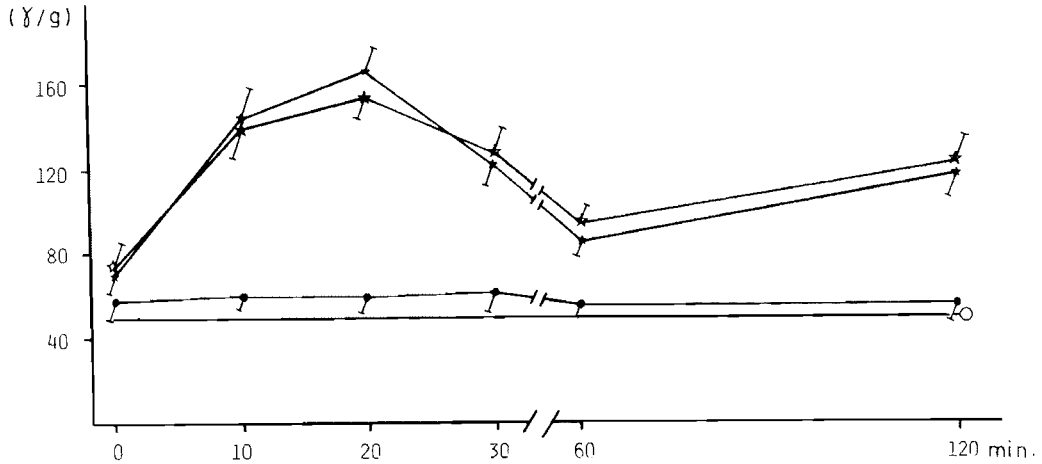


Figure 5. Evolution along the time of Fe levels in all the zones.
(★ B₁ ; ☆ B₂ ; ○ A ; ■ C₁ and C₂)

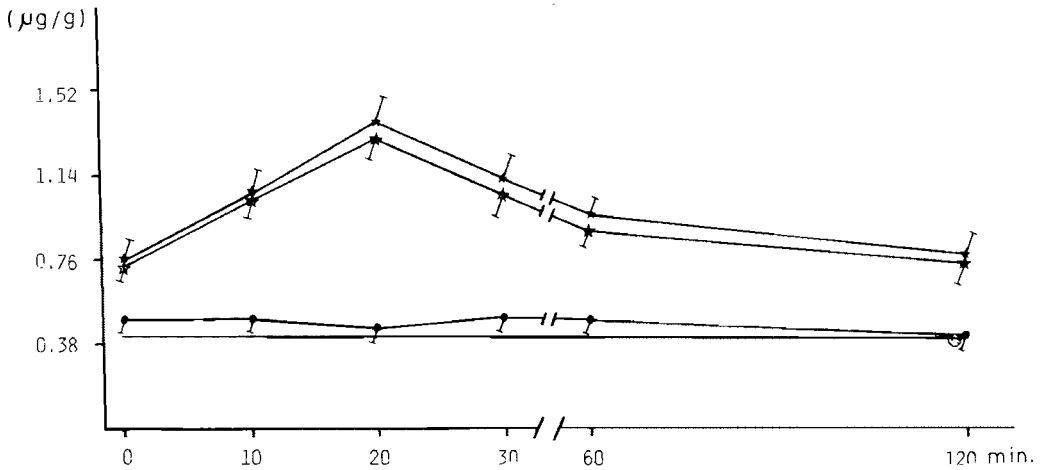


Figure 6. Evolution along the time of histamine levels in all the zones.
(★ B₁ ; ☆ B₂ ; ○ A ; ■ C₁ and C₂)

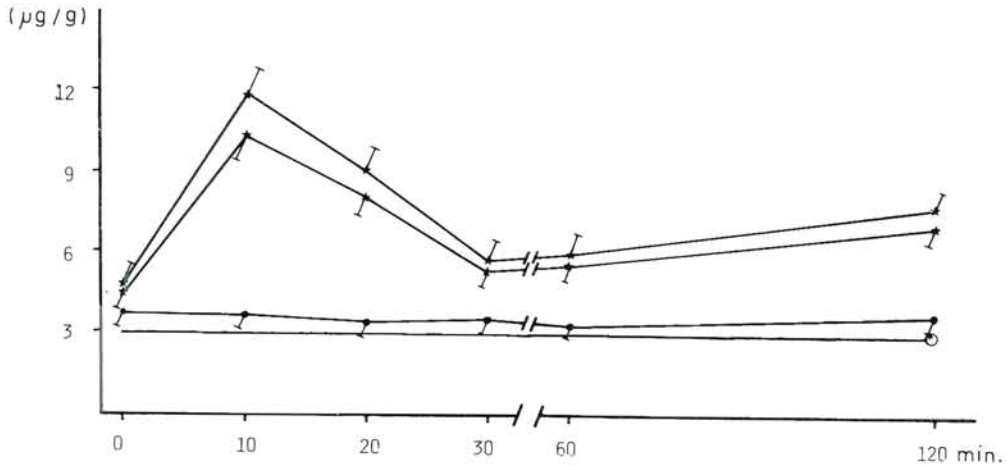


Figure 7. Evolution along the time of serotonin levels in all the zones.
(★ B1 ; ☆ B2 ; ○ A ; ■ C1 and C2)

REFERENCES

- 1 Raekallio, J. (1960) *Nature*, **188**, 234-235.
- 2 Raekallio, J. (1964) *J. Forensic Sci.*, **9**, 107-118.
- 3 Raekallio, J. (1966) *J. Forensic Med.*, **13**, 85-91.
- 4 Hernandez-Cueto, C., Luna, A., Lorente, J.A., Villanueva, E. (1987) *Forensic Sci. Int.*, **35**, 51-60.
- 5 Lorente, J.A., Hernandez-Cueto, C., Villanueva, E. (1987) *Z. Rechtsmed.*, **98**, 95-101.
- 6 Girela, E., Hernandez-Cueto, C., Lorente, J.A., Villanueva, E. (1989) *For. Sci. Int.*, **40**, 123-130.
- 7 Fazekas, I.Gy., Viragos-Kis, E. (1965) *Disch. Z. Gerichtl. Med.*, **56**, 250-258.
- 8 Fazekas, I.Gy., Viragos-Kis, E. (1969) *Zacchia*, **45**, 526-547.
- 9 Raekallio, J. (1980) *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, **1**, 213-218.
- 10 Raekallio, J. (1980) *Krimm. For. Wissen.*, **40**, 33-39.
- 11 Fatch, A. (1972) in *Legal Medicine Annual*, (Wecht, C., ed) pp. 27-46 Appeltion Century Crofts, New York.
- 12 Hernandez-Cueto, C., Villanueva, E., Luna, A. (1987) *Adli Tıp Dergisi*, **3**, 14-23.
- 13 Hernandez-Cueto, C., Luna, A., Villanueva, E. (1984) *J. Forensic Sci. Soc.*, **24**, 301-302.
- 14 Shore, P.A., Burkhalter, A., Cohn, V.H. (1959) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **127**, 182-186.
- 15 Udenfriend, S., Weissbach, H., Clark, C.T. (1955) *J. Biol. Chem.*, **215**, 337-344.

Reprints request to :

Prof. Dr. Claudio Hernández-Cueto
Departamento de Medicina Legal,
Facultad de Medicina
18071 Granada
Spain

Alkol Almış ve Kafa Travmasına Maruz Kalmış Kişilerde Klinik Tanının Önemi

ŞEBNEM KORUR FİNCANCI, BİLGE KIRANGİL, ŞEVKİ SÖZEN

Adli Tıp Kurumu, İstanbul, Türkiye

IMPORTANCE OF CLINICAL DIAGNOSIS IN CASES OF DRUNKENNESS AND HEAD INJURY

Summary

As the clinical features of drunkenness and head injury are similar a person with a head injury showing minimal or no scalp lesions who has had a few drinks, may be examined and treated only for his drunkenness; it is well to remember that a high blood alcohol does not exclude grave head injury.

In this study, high blood alcohol levels were found in 16.41 % of 201 and 14.62 % of 376 cases of head injury in 1985 and 1988 respectively, whose autopsies have been carried out in the Council of Forensic Medicine of Turkey.

When head injury is sustained by a person in a drunken state, the diagnosis must be supported by keen clinical examination, and it is wise to watch such a complex subject for some time, as a patient. This is necessary both for choosing the right medical treatment and for indicating the cause in case of death. If death occurs before diagnosis, autopsy should be carried out. Only an autopsy will avoid juridical doubt.

Key words : *Drunkenness - Head injury - Clinical examination*

Özet

Aşırı alkol alımında ve kafa travmalarında benzer klinik bulguların ortaya çıkması nedeniyle, özellikle olay öncesi alkol almış ve kapalı veya kafadaki lezyonu klinik olarak dikkat çekmeyen kafa travmasına maruz kalmış kişilerde, klinik muayene sırasında solunum havasında alkol kokusu alınması, kafa travmasının göz ardı edilmesine neden olabilir.

Yaptığımız araştırmada, 1985 yılında Adli Tıp Kurumu Morg İhtisas Dairesi'nde otopsi yapılan 201 kafa travması olgusundan % 16.41'inin, 1988 yılında aynı yerde otopsi uygulanan 376 kafa travması olgusundan % 14.62'sinin kanında alkol saptandığı anlaşılmıştır.

Kafa travmasına maruz kalmış ve olay öncesi alkol almış kişilerde, klinik takip ve tetkiklerle kesin tanı konmalıdır. Bu işlem, hem tedavi ve hem de ölüm meydana geldiğinde kesin ölüm nedeninin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu tür olgularda kesin tanıya varılmadan ölüm meydana gelmişse, mutlaka otopsi uygulanarak kesin ölüm nedeni belirlenmelidir. Ancak bu suretle adli bir olayın açığa çıkmadan kapanması önlenemez.

GİRİŞ VE AMAÇ

Kapalı veya görülebilir lezyonu klinik olarak dikkat çekmeyen kafa travmalarına maruz kalmış ve olay öncesi alkol almış kişilerde kafa travmasının varlığı gözden kaçabilir. Koma öncesi ve koma döneminde benzer bulguların hem kafa travmalarında hem de aşırı alkol alanlarda görülmesi nedeniyle, solunum havasında alkol kokusu alınması klinik tanı açısından yanıltıcı olabilir. Dolayısı ile benzer semptomlar veren yüksek miktardaki alkol alımı ile kafa travması arasında ayırıcı tanı şarttır. İleri tetkikler ve klinik takip yapılmaksızın alkol koması ön tanısı konulan ve kafa travmasına maruz kalmış bir kişide ölümün vukua gelmesi bazan adli hatalara neden olabilir. Bu tür olgularda otopsi yapılmadan cesedin gömülmesi de gerçeğin ortaya çıkmasını engelleyebilir.

Bu çalışma, 1985 ve 1988 yıllarında kafa travmasına maruz kalmış ve otopsileri Adli Tıp Kurumu Morg İhtisas Dairesi'nde yapılmış olan olgularda ölmeden önce alkol almış ve alkol almamış olanların araştırılması amacıyla yapıldı.

MATERYAL ve METOD

Konu içeriğine bağlı olarak Adli Tıp Kurumu'na 1985 ve 1988 yıllarında otopsi yapılarak kafa travması saptanan olguların:

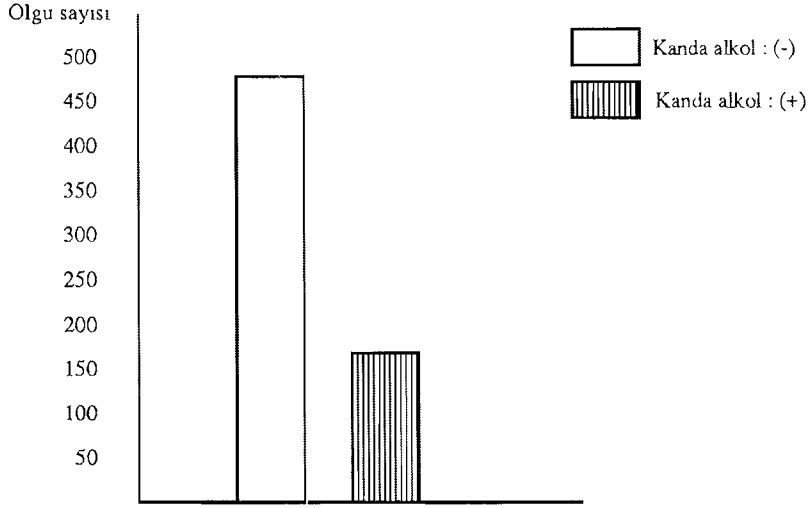
- 1- Kafa travmasının türü ve bunlar arasındaki ölümünden önce alkol almış olguların oranı ile,
- 2- Yaş gruplarına göre dağılımları irdelenmek üzere dökümleri yapıldı.

BULGULAR

Yapılan araştırmada, 1985 yılında otopsi yapılan 201 kafa travması olgusundan % 16.41'ini kapsayan 33 olguda ve 1988 yılında otopsi yapılan 376 kafa travması olgusundan ise % 14.62'sini kapsayan 55 olguda kanda alkol saptanmıştır (Tablo I, Şekil 1).

Tablo I. Kafa travmasına maruz kaldığı anlaşılan ölüm olgularında olay öncesi alkol durumu.

	Alkol : -		Alkol : +		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	
1985	168	83.59	33	16.41	201
1988	321	85.38	55	14.62	376
Toplam	489	84.75	88	15.25	577

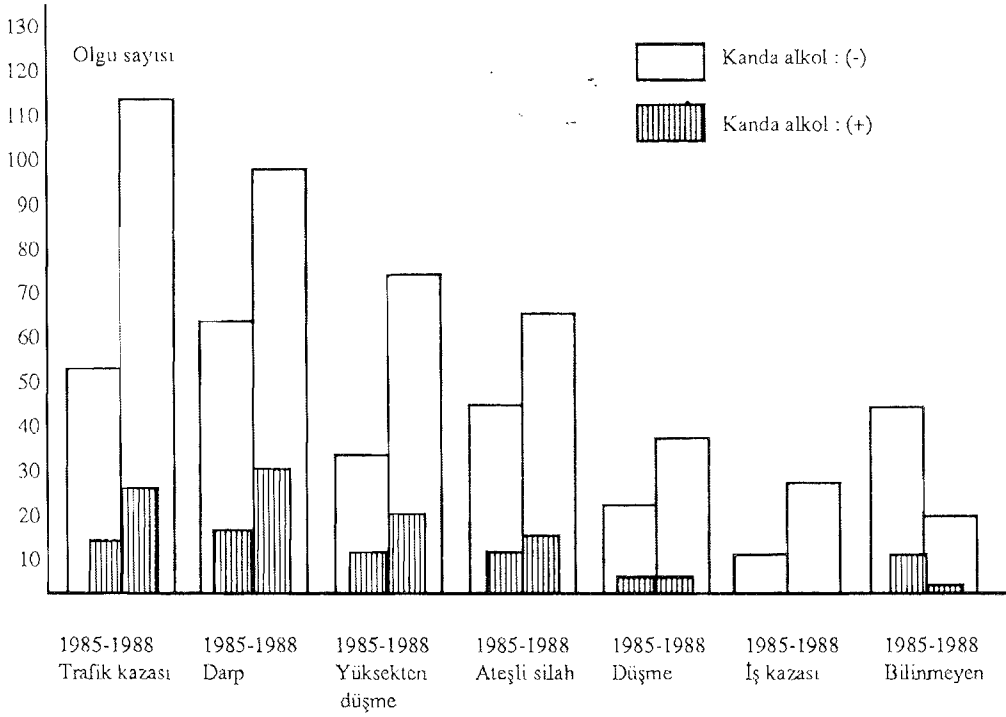


Şekil 1. Kafa travmasına maruz kaldığı anlaşılan ölüm olgularında olay öncesi alkol durumu.

Kafa travmasına yol açan nedenlerin başında, trafik kazası ve darp olayının yer aldığı anlaşılmış ve bu olgularda alkol alımının diğer nedenlere bağlı kafa travmalarından daha fazla olduğu belirlenmiştir (Tablo II, Şekil 2).

Tablo II. Kafa travmasına maruz kaldığı anlaşılan ölüm olgularında olay türüne göre alkol durumu dağılımı.

	1985		1988		Toplam	
	Alkol : -	Alkol : +	Alkol : -	Alkol : +	Alkol : -	Alkol : +
Trafik kazası	39	7	100	16	139	23
Darp	46	8	75	19	121	27
Yüksekten düşme	19	5	52	10	71	15
Ateşli silah	26	5	49	7	75	12
Düşme	9	2	19	2	28	4
İş kazası	4	-	16	-	20	-
Bilinmeyen	25	6	10	1	35	7
Toplam	168	33	321	55	489	88

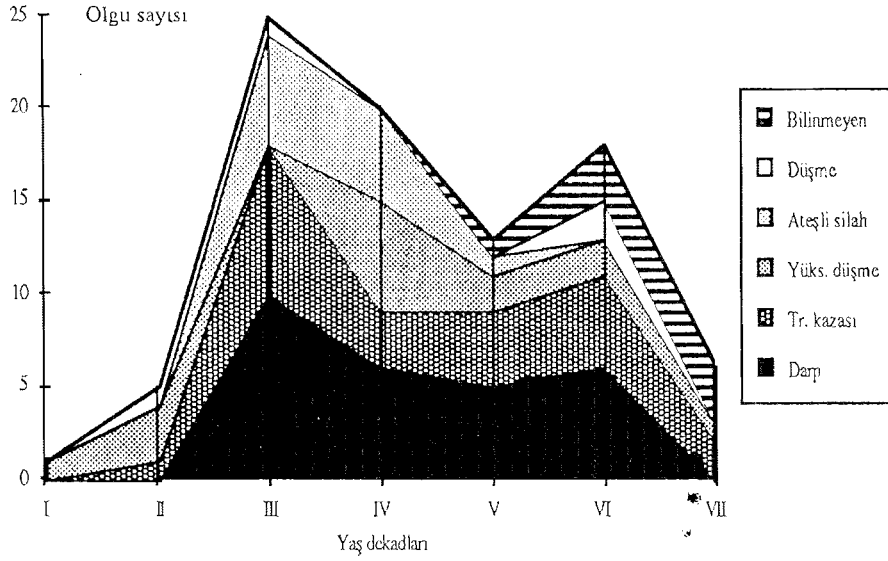


Şekil 2. Kafa travmasına maruz kaldığı anlaşılan ölüm olgularında olay türü ve alkol durumu dağılımı.

Alkol almış ve kafa travmasına maruz kalmış olguların 21-40 yaşlar arasında yoğunluk kazandığı saptanmıştır (Tablo III, Şekil 3). Olgular, otopsi olguları olduğundan, ölümden önceki döneme ait klinik bulgular değerlendirilememiştir.

Tablo III. Kanında alkol saptanan kafa travması olgularının yaş ve olay türüne göre dağılımı.

Yaş	Darp	Trafik kazası	Yüksekten düşme	Ateşli silah	Düşme	Bilinmeyen	Toplam
0-10	-	-	1	-	-	-	1
11-20	-	1	3	-	1	-	5
21-30	10	8	-	6	1	-	25
31-40	6	3	6	5	-	-	20
41-50	5	4	2	1	-	1	13
51-60	6	5	2	-	2	3	18
61<	-	2	1	-	-	3	6
Toplam	27	23	15	12	4	7	88



Şekil 3. Kanında alkol saptanan kafa travması olgularının yaş ve olay türüne göre dağılımı (olay türü saptanamayan 7 olgu değerlendirilmeye alınmamıştır).

TARTIŞMA

Kapalı kafa travmalarında cilde ait lezyonlar görülmez. Açık bir kırık mevcutsa, açık kraniyo-serebral travmadan bahsedilir. Kapalı kafa travmalarında da kafatası kırıkları ile beyin harabiyeti ve kanaması meydana gelebilir. Kafaya yönelik darbe yeteri kadar ağır ise, travmaya maruz kalan kişide, kendinden geçme halinden derin komaya kadar değişen bilinç kayıpları ve hatta ani ölüm ortaya çıkabilir. Kafa travmalarından sonra kırık veya kompresyon olmadan ortaya çıkan kontüzyo serebride, sersemleme, şuur bulanıklığı ve hatta şuur kaybı görülebilir. Ağır kontüzyoda şahıs bulbus felcinden ölebilir. Kontüzyo serebride genellikle travmanın isabet ettiği yerde (coup) ve beyin bu bölgesine uyan karşı tarafında (countre coup) lezyonlar oluşur. Hemen daima subaraknoidal bir kanama meydana gelir. Ağır şekillerinde subdural kanama oluşarak kompresyona serebri belirtilerini ortaya çıkarır. Kontüzyo serebride ödem teşekkül ettiği takdirde, bulbusa baskı sonucu birkaç saatten birkaç güne kadar değişen koma ortaya çıkar. Şahıs çoğu kez komadan açılmadan, bazan da kısa süren bir iyileşme dönemini izleyerek yeniden gelişen komaya bağlı olarak yaşamını yitirir. Ağır beyin kontüzyonunda lezyonun bulunduğu bölgeye ait semptomlar da görülür. Kramplar, irritasyon belirtileri, felçler, piramidal belirtiler, kafa sinirleri felçleri, pupilla değişiklikleri ve santral ateş ortaya çıkabilir (1,2).

Kafa içi basıncının artmasına neden olan intrakraniyal kanamalar veya beyin ödemi ile beyin şişmesi, kafa travmalarını takiben ortaya çıkabilir (2,3). Genellikle kafatası kırıklarında *arteria meningea media* lezyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan epidural hematomlarda, travmaya maruz kalan kişide, travmayı müteakip kısa bir iyilik dönemi (lucid interval, free interval) görülür. Bunu takiben hastanın genel durumu akut olarak bozulur. Subdural hematom, çoğunlukla venöz kökenlidir.

Akut, subakut ve kronik olarak ortaya çıkar. Genellikle travmadan iki hafta sonra belirti vermeye başlayan subdural hematom, kronik olarak kabul edilir. Başağrısı, artıcı nitelikte psiko-organik değişiklikler ile koma ve ölüm hastalığının klasik ilerleyiş şeklidir. İntraserebral kanama ise, daha az sıklıkla görülür. Travma sonucu intraserebral bir damarın yırtılması veya beyin kontüzyonuna bağlı olarak gelişir. Arteriyel nitelikli bir kanama olduğundan belirtiler ortaya çabuk çıkar. Başlangıçta, ağır beyin lezyonları yoksa, açık dönem görülebilir (2,4).

Kafa travmalarında ve aşırı alkol alımında, sonuçta görülen komadan önce, her iki halde de serebellum etkilenmesinden gelişen bulgular ortaya çıkar. Kafa travmalarında kafa içi basıncının artmasına veya serebelluma yönelik ani ölüm tevliid etmeyen travmalara bağlı olarak ortaya çıkan bu bulgular, alkol alımında serebellumun doğrudan etkilenmesiyle oluşur. Denge, tonus ve koordinasyonu sağlayan serebellumun, bu fonksiyonlarına ait bozukluklar ortaya çıkar. Denge kusuru (ataksi) hem istirahat hem de hareket halinde görülür (5,6). Ataksinin aşırı alkol alımı sonucu ve kafa travmalarında oluşması, alkol almış ve kafa travmasına maruz kalmış kişilerde, asıl ve belki de en önemli neden olan kafa travmasının düşünülmesini engelleyebilir (7). Tonus kusuru, hipotoni veya hipertoni şeklinde kendisini gösterir. Koordinasyon bozukluğu sonucu kaslar, istenen görevleri yerine getiremezler. Serebellum sendromu adıyla bilinen bu durumda ölçü, diadokinezi kusurlarının yanısıra, dizartri görülür. Dizartrinin nedeni, konuşma ile ilgili periferik organların kasları arasında sinerjik bir çalışma yapılamamasıdır. Tremor, kişi tam istirahat halindeyken bile görülür. Göz yuvarını ilgilendiren kaslarda ortaya çıkması sonucu, *nistagmus* oluşur (5). Mayo Kliniği araştırma ekibi (8), alkolü de içeren bazı ilaçların serebellar tipte *nistagmus* yaptığını kanıtlamıştır. Normalde, kemik-tendon reflekslerinde bir uyarıya bir yanıt alınır. Ancak, serebellar sendromda yanıt birkaç kez verilir; buna, pandüler refleks denilmektedir (5). Alkol komasında tendon reflekslerinin, uyarılara bazan çok şiddetli yanıt verdiği, bazan da hiç yanıt alınmadığı bildirilmiştir (3). Passivite ve serebellar katelepsi diğer bulgulardır.

Komaya neden olamayacak miktarda alkol almış bir kimsede ayrıca bir kraniyo-serebral travma da varsa, ayırıcı tanı çok güç olabilir. Şuur bulanıklığı, oryantasyon bozukluğu, retrograd amnezi gibi psişik bozuklukların yanısıra, labil dolaşım, vücut ısısı bozukluğu gibi vejetatif semptomlar yalnızca fazla alkol almış kişilerde de görülebilir. Ayırıcı tanı çoğu kez ileri tetkikler ve klinik takiple konabilir. Kafa travmasına maruz kalıp kalmadıkları kesin olarak belirlenemeyen kişilerin bir süre klinikte tutulmaları şarttır (2,9).

Klinik bulgular dikkate alındığında, alkol alımı ile kafa travmasının bir diğerinin bulgularını örtebileceği ve kesin tanı konulmasını zorlaştırabileceği aşıkardır. Bu tür olguların ölümle sonuçlanması halinde, mutlaka otopsi uygulanmalı ve kesin ölüm nedeni açığa çıkarılmalıdır. Klinikte kesin tanısı konulamamış bu tür ölüm olgularında otopsi uygulanmadan cesedin gömülmesi, adli bir olayın karanlıkta kalmasına neden olabilir.

KAYNAKLAR

- 1 Dinçmen, K. (1977) *Nöroloji El Kitabı*, s. 172-177, İnkılap ve Aka Basımevi, İstanbul.
- 2 Burri, C., Beck, H., Ecke, H. (1982) *Kaza Cerrahisi Travmatoloji* (Çeviri: Cever, İ.), s. 248-257, Sermet Matbaası, Kırklareli.
- 3 Gordon, I., Shapiro, H.A., Berson, S.D. (1988) *Forensic Medicine, a Guide to Principles*, pp. 252-340, 396-435, 3rd ed., Churchill Livingstone, Edinburgh.
- 4 Kumral, K., Palalı, İ. (1983) *Intrakranial Kanamalar* (Özdamar, N., ed.) s. 1-25, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Yayın Bürosu Ofset Atelyesi, İzmir.
- 5 Tükel, K. (1966) *Nöroloji*, s. 87-114, Universal Ofset Basımevi, İstanbul.
- 6 Çalışkan, A. (1981) *İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Ders Kitapları* Cilt: 4, Nöroloji (Aktin, E., ed.), s. 16-24, 2. Baskı, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Yayınları, No. 2820, Sanal Matbaacılık, İstanbul.
- 7 French, H. (1945) *An Index of Differential Diagnosis of Main Symptoms*, p. 90, 6th ed., John Wright and Sons, Bristol (Gordon, I., Shapiro, H.A., Berson, S.D.'den naklen).
- 8 Mayo Clinic Staff (1957) *Clinical Examination in Neurology*, pp. 94-96, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- 9 Simpson, K., Knight, B. (1985) *Forensic Medicine*, pp. 107-138, 9th ed., Edward Arnold, London.

Ayrı baskı için :

Dr. Şebnem Korur Fincancı
Adli Tıp Kurumu,
34246 Cerrahpaşa, İstanbul
Türkiye

İnsan İskelet Kalıntılarındaki Yaş Tesbit Çalışmaları

OĞUZ POLAT ^{a)}, ÖMER GÜNHAN ^{b)}, AKİF İNANICI ^{c)}

a) Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

b) Gülhane Askeri Akademisi, Patoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

c) Adalet Bakanlığı, Adli Tıp Kurumu, İstanbul, Türkiye

AGE DETERMINATION IN HUMAN SKELETAL REMAINS

Summary

Age determination in human skeletons can be detected by biologic processes like growth and skeletal remodelling. Morphology of skeletal components related to age show differentiation. This can be used to detect the age of the individual at the time he died by interpretation of morphological differentiation.

In this article, a preliminary report is presented to measure trabecular volume with a bone histomorphometry method depending on the principle that volume of trabecular bone decreases with age, and literature is reviewed.

Key words : *Age determination - Histomorphometry - Trabecular bone volume*

Özet

İnsan iskeletlerinde yaş tayini büyüme ve iskeletsel remodeling gibi biyolojik işlemlerle ilgilidir. Yaşa bağlı olarak iskelet komponent morfolojileri de değişiklik gösterir. Bu morfolojik değişiklikler saptanarak bireyin öldüğü dönemdeki yaşını belirlemede kullanılır.

Bu yazıda, yaş ilerledikçe azalma gösteren trabeküler kemik volümü histomorfometri yöntemiyle ölçülerek yaş tesbiti yapmaya yönelik bir preliminar çalışma literatür gözden geçirilerek sunulmuştur.

İnsan iskelet kalıntılarından yaş tesbit çalışmaları adli antropolojinin en önemli konularından birisidir. İnsan iskeletlerinde biyolojik yaş tesbiti çok sayıda büyüme ve iskeletsel yenilenme gibi biyolojik faktöre bağlıdır; yaşa bağlı olarak iskelet komponentlerinde meydana gelen morfolojik değişimler makroskopik ve mikroskopik düzeyde gözlemlenebilir. Yaş tesbitindeki tüm metodlar iskeletteki morfolojik değişiklikler ile kişinin ölüm anındaki yaşı arasındaki ilişkiye bağlıdır.

Bugüne kadar dişlerin gelişimi, epifizyel yüzeylerin kapanması, kemikleşme noktalarının oluşumunun araştırılması gibi metodlar çocuklarda yaş tesbiti için başarılı sonuçlar vermiştir (1,2). Erişkinlerde ise pubis simfizi morfolojisi, kraniyal suturaların kapanması, kemik ve dişlerde değişim ve aşınmalar (dişlerde abrazyon, vertebralardaki osteofitik oluşumlar ve eklemlerdeki artritik değişimler gibi) yaş tesbitinde kullanılmış ve belli limitler içerisinde yaş tesbiti yapılmasında yararlı sonuçlar vermiştir (3,4). Özellikle son yıllarda kemiklerde mikroskopik düzeyde yapılan çalışmaların başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir (1,5).

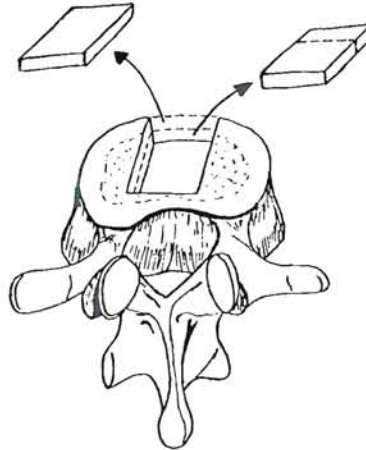
Yaş tesbitinde kullanılan histolojik yaşlandırma yöntemlerinden biri de Kerley'in geliştirmiş olduğu kemik dokudaki mikroskopik düzeydeki oluşumları sayarak yapılan bir çalışmadır. Bu metod femur, tibia ve fibula gibi uzun kemikler üzerine uygulanır(2).

MATERYEL ve METOD

Bu çalışma Malatya-Aslantepe kazısında bulunan insan iskeletleri üzerinde uygulanmıştır. Malatya-Aslantepe kazısı, Roma Üniversitesi Arkeoloji kürsüsünce yürütülen, geç Roma dönemine ait bir eski uygarlık merkezinde yapılan arkeolojik çalışmalardır.

Araştırmamız, trabeküler kemiğin çok yoğun olduğu vertebra kemiği üzerinde uygulanmış, standardizasyonu sağlamak amacıyla L5 vertebra kullanılmıştır.

Kemik histomorfometrisi, mikroskopik düzeyde yaşla azalma gösteren trabeküler kemik volümü ile kompakt kemik arasındaki oranın karşılaştırmalı olarak ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Vertebra kemiğinden testere yardımıyla segmentler çıkartılarak (Şekil 1) rutin doku takibi yapılmış ve histolojik kesitler alınmıştır. Bu aşamadan önce dokunun suyunu kazanması ve kemik parçalanmasını önleyebilmek amacıyla çift takip işlemleri uygulanmıştır. Elde edilen kesitler üzerinde Zeiss gratikülü kullanılarak, point counting yöntemi (6, 7) ile trabeküler kemik volümünün ölçümü yapılmıştır.



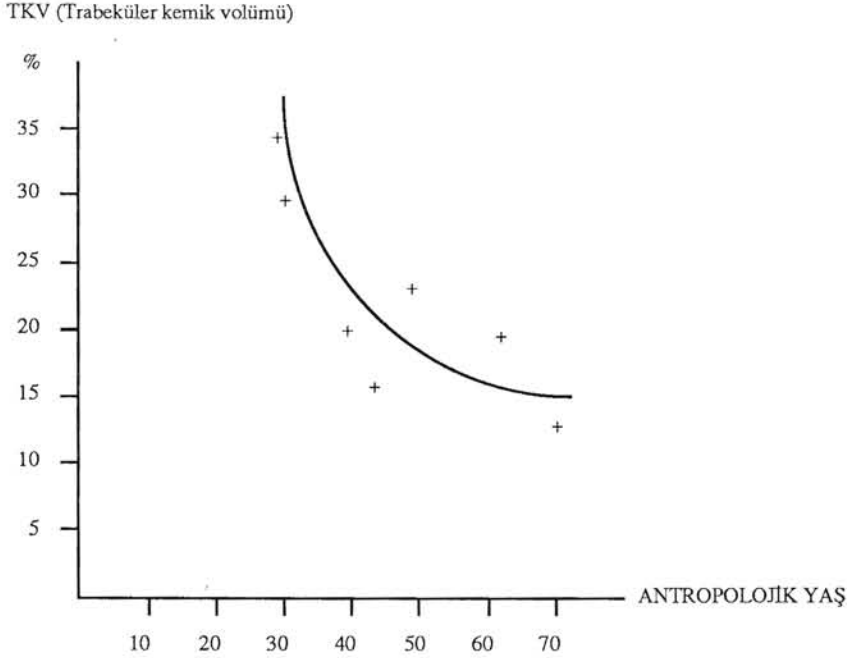
Şekil 1. L5 vertebradan histomorfometrik çalışmalar için örneklerin alındığı yer ve örnek biçimleri.

BULGULAR

İncelenen materyaldeki ölçümler sonucu, 5 kemikte bulunan trabeküler kemik volümü (TKV) oranının, beklenen yaş sınırları içerisinde TKV oranına uygunluk içerisinde bulunduğu, diğer iki kemikte ise birinde çok az düzeyde, diğerinde ise normalin biraz üstünde bir sapma gösterdiği görülmektedir.

Tablo I'de beklenen, yaşlara göre olması gerekli trabeküler kemik volümü oranları gösterilmektedir. Tablo II'de ise, yaptığımız histomorfometrik ölçümler sonunda 7 kemik için ulaştığımız sonuçlar görülmektedir. Tablo II'de ayrıca Prof. Berna Alpogut'un (Ankara Üniv. DTCF Paleoantropoloji Anabilim Dalı) antropolojik yaşlandırması ile Doç. Tuncer Özkan'ın (Selçuk Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı) Kerley'e göre yaş değerlendirmesinin bizim sonuçlarla bir karşılaştırması yer almaktadır.

Şekil 2'de ise, elde edilen sonuçlar ile ortaya çıkan eğri sonuçların beklenildiği gibi çıktığı ve sapmaların çok az bulunduğu görülmektedir.



Şekil 2. L5 vertebradan yapılan incelemelerde trabeküler kemik volümü ile antropolojik yaş arasındaki ilişkiyi gösteren grafik.

Tablo I. Trabeküler kemik volümü ile antropolojik yaş bulguları için beklenen oranların Kerley değerlendirmesine göre gruplandırılması.

TKV	Antropolojik yaş	Kerley
1. Kemik %35.5	28	31-36
2. Kemik %34	30	31-36
3. Kemik %19	42	39-42
4. Kemik %21.1	44	39-48
5. Kemik %24	50	50-60
6. Kemik %20.9	65	64-69
7. Kemik %15.9	70	69-74

Tablo II. Trabeküler kemik volümü ile antropolojik yaş bulguları üzerinde yaptığımız incelemelerin sonuçları.

Yaş	TKV
20-30	% 30 <
30-40	% 25-30
40-50	% 20-25
50-60	% 15-25
60 <	% 16 >

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, aynı insana ait iskelet kalıntıları üzerinde uygulanan iki farklı metodla ortaya çıkan sonuçlarla karşılaştırıldığında, 3. kemik dışındaki sonuçların beklenildiği gibi olduğu gözlenmektedir. Sadece 3. kemikte bir sapma olduğu izlenmektedir. Bu kemikte, TKV % 19, beklenen yaşı 50-60 arası olmasına karşın, antropolojik yaşı 42, Kerley'e göre ise yaşının 39-42 çıktığı görülmektedir. Fizik koşulların sebep olabileceği bu sapmaların ortadan kaldırılabilmesi ve standardizasyonun sağlanabilmesi halinde, bu metodla çok daha başarılı sonuçlar elde etmek mümkün olabilecektir.

Çalışmamızda kullanılan materyalin kısıtlı sayıda olması nedeniyle, verilerimizin kontrolünü aynı iskeletler üzerinde başka metodların uygulamasıyla yaptık.

Trabeküler kemik oranının histomorfometrik yöntemle ölçümü ilkesine dayanan bu ön çalışmada sonucunda bulunan verilerin, beklenen değerlerle uyum içerisinde olması ve elde ettiğimiz eğrinin, trabeküler kemik volümünde yaşlanmayla azalan oranda bir düşüş göstermesi, bu çalışmanın amacına ulaştığını düşündürmektedir; bu nedenle, kullandığımız yöntemin, bu konuda yapılacak yeni araştırmalara ışık tutabilecek bir pilot çalışma olarak kabul edilebileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

- 1 Krogman, W.M. (1962) *The Human Skeleton in Forensic Medicine*, pp. 52-62, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- 2 Ortner, D.J., Putscher, W.G. (1985) *Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*, pp. 30-32, Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- 3 Işcan, M.Y., Loth, S.R. (1986) *J. Forensic Sci.*, **31**, 990-999.
- 4 Mcindl, R.S., Lovejoy, C.O., Mensford, R.P., Walker, R.A. (1985) *Am. J. Phys. Anthropol.*, **68**, 29-45.
- 5 Cormick, W.F. (1980) *J. Forensic Sci.*, **25**, 736-741.
- 6 Revell, P.A. (1983) *J. Clin. Path.*, **36**, 1323-1331.
- 7 Melsen, F., Melsen, B., Moserilde, L. (1978) *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **86**, 68-69.

Ayrı baskı için :

Dr. Oğuz Polat
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Adli Tıp Anabilim Dalı
Haydarpaşa, İstanbul
Türkiye

Arteriovenöz Fistüller

AYLA SAYIN, HASAN TÜZÜN, MEHMET ÖZER, YILMAZ KARAÖZBEK, AYTEKİN ERDAĞ

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Göğüs-Kalp-Damar Cerrahisi Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye

ARTERIOVENOUS FISTULAE

Summary

Sixty patients with traumatic and 10 patients with congenital arteriovenous fistulae were treated at the Cerrahpaşa Medical Faculty, Istanbul University. Two patients with congenital arteriovenous fistulae were reoperated upon because of the recurrence after four months and five years, respectively. Because of the post-operative complications, reintervention was performed in five patients with traumatic arteriovenous fistulae. There were no early or late post-operative deaths.

Key words : *Arteriovenous fistulae - Traumatic arteriovenous fistulae - Congenital arteriovenous fistulae - Parkers-Weber syndrome*

Özet

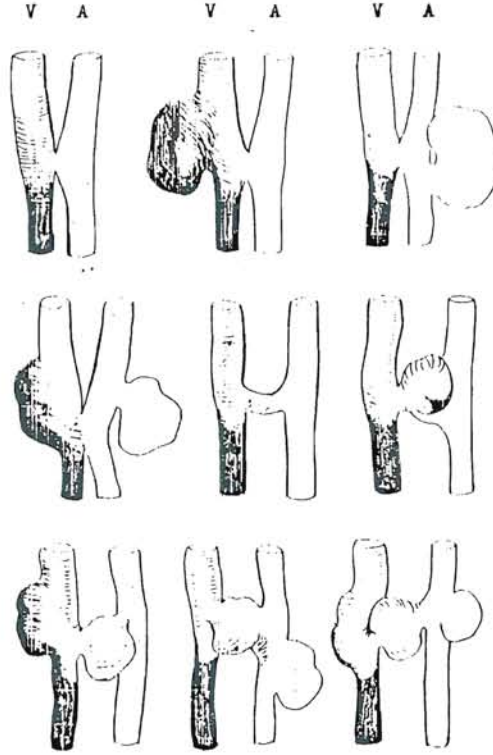
Anabilim dalımızda ameliyatla tedavi edilmiş 70 arteriovenöz fistül (60 travmatik, 10 konjenital) olgusu retrospektif olarak gözden geçirilmiştir. İki konjenital arteriovenöz fistül olgusuna, ilk ameliyatlarından 4 ay ve 5 yıl sonra residiv nedeniyle ikinci kez cerrahi girişimde bulunulmuştur. Çeşitli etyolojik faktörlerin neden olduğu arteriovenöz fistüllerden 5'i, birinci ameliyat sonrasında gelişen komplikasyonlar nedeniyle ikinci kez ameliyat edilmişlerdir. Serideki olgularda, erken ve geç ölüm görülmemiştir. Arteriovenöz fistüllerin adli tıp uygulamaları açısından önemi tartışılmıştır.

GİRİŞ

İlk travmatik arteriovenöz fistül (TAVF) tanımı 1757 yılında (1), konjenital arteriovenöz fistül (KAVF) tanımı ise daha önceleri (1,2) kullanılmıştır. 1920 yılında literatürü gözden geçiren *Callender* (3), 3'ü konjenital 449 arteriovenöz fistül (AVF) olgusu saptadığını bildirmiştir. I. ve II. Dünya Savaşları ile Kore ve Vietnam Savaşları sırasında, özellikle TAVF'ler ve bunların cerrahi tedavilerine ilişkin yeni bilgiler edinilmiştir (2,4,5).

Yukarıda da görüldüğü gibi, AVF'ler klasik olarak, konjenital ve edinsel (travmatik) olarak 2 tipte bulunurlar. KAVF'lerin oluşumunda, embriyolojik gelişimin kesintiye uğraması, kromozom defekti, gebeliğin başlarında annenin geçirdiği bir infeksiyon has-

talığı, travmanın yol açtığı bası, hemodinamik faktörler gibi etkenler ileri sürülmektedir. Neden ne olursa olsun, KAVF'ler, tek ya da çok sayıda, lokalize veya diffuz olarak bulunurlar. Edinsel AVF'ler ise, sıklıkla penetre yaralanmalarla, künt travmalarla ve bazı cerrahi girişim ve teşhis metodlarının uygulanması sırasında oluşturmaktadırlar. Ayrıca, karsinomlar, infeksiyonlar ve arter anevrizmalarının aşındırıcı etkisi etyopatogeneizde ön plana çıkabilmektedir (1-5).



Şekil 1. Travmatik arteriovenöz fistül tipleri (vendeki arterializasyon oluşumu gösterilmiştir).

MATERYAL ve METOD

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs-Kalp-Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Kliniği'nde, son 20 yılda tedavi edilmiş 208 travmatik damar yaralanması sonrasında meydana gelmiş 60 edinsel AVF, son 5 yılda ise, 10 KAVF olgusu ameliyat edilmiştir.

Olguların tümü AVF'nin etyolojisi, klinik belirtileri, lokalizasyonları, uygulanan cerrahi tedavi ve alınan sonuçlar, erken komplikasyonlar yönünden gözden geçirilmiştir. Arteriografik inceleme KAVF olgularının tümüne, edinsel olanların ise bir bölümüne uygulanmıştır. Yardımcı teşhis metodları olarak, venöz kanda oksijen saturasyonu tesbiti ve dopplerle sistolik-diastolik üfürüm kontrolü yöntemleri kullanılmıştır.

TAVF operasyonunda, fistülü ortadan kaldırıp arter ve venanın devamlılığının sağlanması amaçlanmıştır. Arter devamlılığını temin edebilmek için, 2 cm'nin altındaki defeklerde uç-uca anastomoz yapılırken, 2 cm'nin üzerindeki defeklerde greft kullanılmıştır. Graft materyali olarak, mümkün olabildiğince otojen vena grefti kullanılmaya özen gösterilmiş, mümkün olmadığı koşullarda sentetik greftler uygulanmıştır. Endoanevrizmorafi sınırlı sayıdaki hastaya tatbik edilmiştir; fistülün ortadan kaldırılmasını takiben arter ve vena devamlılığının sağlanması, arter devamlılığı yanında vena ligasyonu veya distal lokalizasyonlarda arter ve vena ligasyonu tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır. Fistülün kaldırılmasını müteakip, vena çeperinde oluşan defekt çoğunlukla lateral sütürle kapatılmış, ancak distal fistüllerde vena ligasyonu yapılmıştır. Lokal yerleşim gösteren KAVF'lerde total ekstirpasyon uygulanmıştır. Diffuz formlarında ise, damarlar sketelize edilerek fistülün ortadan kaldırılmasına çalışılmıştır.

Sentetik greft olarak Dacron ve Gorotex kullanılmıştır. Sütür materyali olarak, önceleri atravmatik ipekten yararlanılmış, sonraları prolene kullanımı benimsenmiştir.

BULGULAR

Serideki 70 olgudan 60'ı (% 85.7) TAVF, 10'u (% 14.3) KAVF olgusudur. TAVF olguları 4-64, KAVF'ü olan hastalar ise, 20-65 yaşları arasında bulundu. KAVF olgularında cinsiyet ayrımı görülmezken, TAVF'lerin büyük bir çoğunluğu erkek hastalardan oluşuyordu.

TAVF'lerin etyolojisinde ilk sırayı 33 olgu (% 51.7) ile kurşunla yaralanma alıyordu (Resim 1,2); bunu, 17 (% 28.3) bıçakla yaralanma (Resim 3,4) ve 4 (% 6.7) künt travma sonucu yaralanma izliyordu. Geri kalan 6 olguda (% 10) cam ve saçma tanesi yaralanmaları ile yatrogen yaralanmalar tesbit edildi (Tablo I). KAVF'li olgularda, doğumdan itibaren lokal klinik gelişim bulguları göze çarpmıştır; bu olguların birinde, derideki doğumsal hemangiomun yanısıra venöz yetmezlik belirtilerinin bulunduğu ve bu belirtilerin gebelik ve doğum sonrasında belirginleştiği görülmüştür.

Palpasyonla trill (50 olguda, % 83.3) ve pulsatil kitle (28 olguda, % 46.7) TAVF'de tesbit edilen başlıca klinik semptomlar olarak bulundu. Nicholadoni-Brahman belirtisine 19 olguda (% 31.7) rastlandı. 2 olguda (% 3.3) kalp büyümesi saptanmış olup, bunlardan birinde geçirilmiş bir herni diskal ameliyatını, diğerinde *A.iliaca* yaralanmasını takiben AVF meydana gelmişti. Ayrıca, bir başka herni diskal ameliyatını izleyen olguda, AVF'ün kalp yetmezliğine yol açtığı ve bu nedenle acilen ameliyat edildiği saptanmıştır (Tablo II).

Devamlı üfürüm, trill, lokal ağrı ve yerel ısı artışı KAVF'lerin tümünde tesbit edilen başlıca bulguları. Diğer bulgular, KAVF'ün lokal veya diffuz oluşuna göre değişik oranlarda tesbit edildi (Tablo III).

AVF'lerin lokalizasyonlarına göre yapılan değerlendirmelerde, TAVF'ler %75 oranında bacaklarda (45 olgu), %15 oranında kollarda (9 olgu), % 5 oranında gövdede (3 olgu) ve % 5 oranında baş-boyun bölgesinde (3 olgu) bulundu (Tablo IV). Damarlar açısından yapılan incelemede, *A.femoralis superficialis* ile *A.poplitea* ilk sıralarda bulundular. KAVF'lerin ise, olguların % 50'si kollarda (5 olgu), %30'u baş-boyun bölgesinde (3 olgu) ve % 20'si bacaklarda (2 olgu) lokalize oldukları görüldü; 10 olgudan 9'u lokal, 1'i diffuz tipte bulundu (Tablo V).

Tablo I. Arteriovenöz fistüllü 60 olgunun etyolojik nedenleri, damar yaralanmalarına göre dağılımı ve aralarındaki ilişki.

	Kurşun	Bıçak	Cam	Künt travma	Saçma	Yatrojen
A-V fistül n: 60	33 %51.7	17 %28.3	3 %5	4 %6.7	1 %1.7	2 %3.3
Damar yaralanması N: 208	95	49	20	12	3	18
n/N 60/208 %28.8	33/95 %34.7	17/49 %34.7	3/20 %15	4/12 %33	1/3 %33.3	2/18 %11.1

Tablo II. 60 AVF olgusunda saptanan klinik belirtiler.

Klinik belirtiler	Olgu sayısı	%
Palpasyonla trill	50	83.3
Dinlemekle devamlı üfürüm	55	91.7
Pulsatil kitle	28	46.7
Varisler	17	28.3
Ülser ve pigmentasyon	8	13.3
Ekstremitede hipertrofi	8	13.3
Nicholadoni-Brahman belirtisi	19	31.7
Kalpde global büyüme	2	3.3

Tablo III. TAVF olgularında lokalizasyon ve damar yaralanmalarına göre dağılım.

Lokalizasyon	Damar yaralanması (N:208)		AVF (n:60)		n/N (60/208) %
	Olgu sayısı	%	Olgu sayısı	%	
<i>A. iliaca communis</i>	2	1	1	1.7	50
<i>A. iliaca interna</i>	1	0.5	1	1.7	100
<i>A. iliaca externa</i>	2	1	1	1.7	50
<i>A. femoralis communis</i>	17	8.2	8	13.3	47
<i>A. femoralis superficialis</i>	79	38	18	30	22.8
<i>A. femoralis profunda</i>	10	4.8	1	1.7	10
<i>A. poplitea</i>	29	14	16	26.7	55.2
<i>A. tibialis anterior</i>	5	2.4	1	1.7	20
<i>A. tibialis posterior</i>	7	3.4	1	1.7	14.3
<i>A. carotis interna</i>	1	0.5	1	1.7	100
<i>A. carotis externa</i>	2	1	0		
<i>A. subclavia</i>	8	3.8	1	1.7	12.5
<i>A. axillaris</i>	11	5.3	2	3.4	18.2
<i>A. brachialis</i>	25	12	3	5	12
<i>A. radialis</i>	10	4.8	2	3.3	20
<i>A. vertebralis</i>	2	1	0		
<i>A. temporalis superficialis</i>	5	2.4	2	3.4	40
<i>A. ulnaris</i>	3	1.5	1	1.7	33.3

Tablo IV. 10 KAVF olgusunun çeşitli özellikleri.

KAVF tipi	Lokalizasyon	Ameliyat	Residiv	Reoperasyon
<i>Lokal (9)</i>	Temporal (1)	<i>A. carotis externa</i> ligasyonu/ kas embolizasyonu	- +	Total ekstirpasyon
	Oksipital (1)	Total ekstirpasyon	-	
	Servikal (1)	Total ekstirpasyon	-	
	Ön kol (5)	Total ekstirpasyon	-	
	Bacak (1)	Total ekstirpasyon	-	
<i>Diffuz (1)</i>	Kruris (1)	<i>A. poplitea</i> anevrizması rezeksiyo- nu + ven greftle by-pass + multipl ligasyon	+	Multipl ligasyon

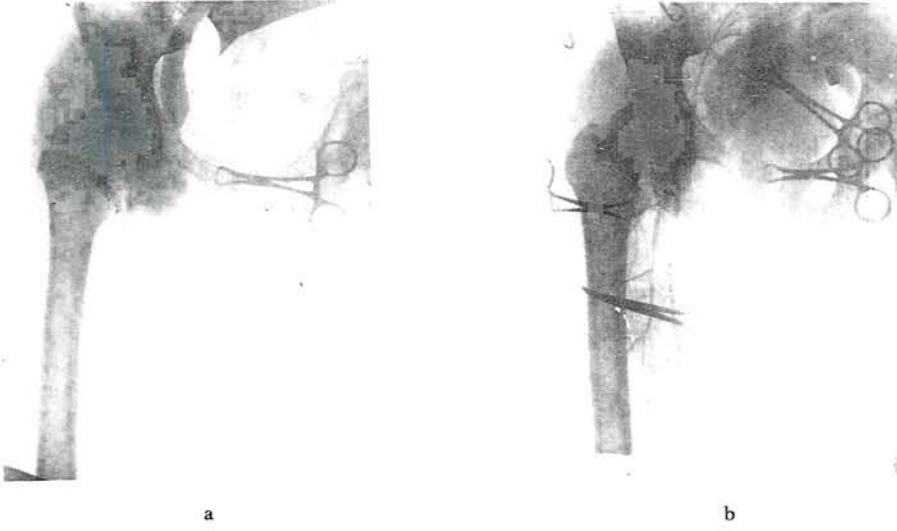
Cerrahi tekniklere göre gruplandırıldığında, TAVF'li 17 olguda (%21.6) artere uç-uca anastomoz ve venaya lateral sütür, 13 olguda (%21.6) artere otojen greftle by-pass ve venaya lateral sütür, 7 olguda (%11.8) artere venaya lateral sütür, 6 olguda (%10) endoanevrizmorafi uygulanan başlıca yöntemlerdi (Tablo IV,V). Sentetik greft 3 olguda (%5) tatbik edilmişti. KAVF'ün lokal formu bulunan 9 olgudan 8'inde (%88.9) fistülün total ekstirpasyonu yapılmış, öteki olguda ise, arter ligasyonu ve aynı yolla adele embolizasyonu uygulanmıştı. Diffuz KAVF'ü olan tek olguda, anevrizma rezeksiyonu, vena greftiyle by-pass ve multipl damar ligasyonu yapılmıştı (Tablo IV,V).

TAVF'li olguların ameliyatından sonra, 15 olguda (%25) erken komplikasyonlar, 5 olguda (%8.3) geç komplikasyonlar meydana geldi. 3'ü erken, 2'si geç komplikasyonlu toplam 5 olguda (%8.3) ikinci ameliyat zorunluluğu doğmuştu. Erken komplikasyonlu 3 olguda görülen başlıca bulgular greft tıkanması, kanama, arter tıkanması idi. Geç komplikasyonlu 2 olguda ise, arter tıkanması, yara enfeksiyonu ve fistül residivi bulguları mevcuttu (Tablo V). Lokal KAVF'li ve ameliyat sonrası residiv görülen olgulardan birine fistül ekstirpasyonu, diffuz KAVF'ü olan hastada da fistül residivinin tedavi için multipl ligasyon teknikleri uygulandı (Tablo IV,V).

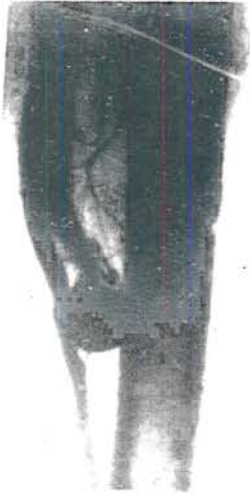
Seriye oluşturan 70 olguda, ölüm, gangren ve amputasyon gerektiren bir komplikasyona rastlanmadı.



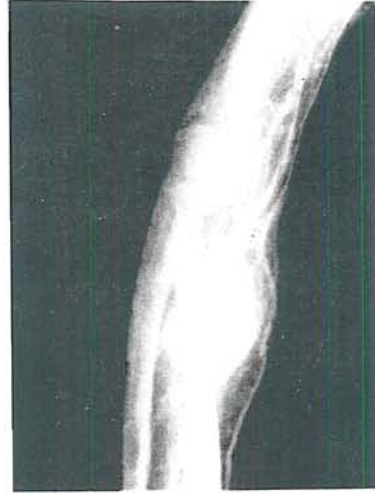
Resim 1. Kurşunla yaralanma olgusunda fibula kırığı ile birlikte gelişen arteriovenöz fistül olgusunda anjiyografi bulguları: a) ameliyat öncesi, b) ameliyat sonrası.



Resim 2. Kurşunla yaralanma olgusunda fibula kemiği ile birlikte gelişen arteriovenöz fistül olgusunun : a) ameliyat öncesi, b) ameliyat sonrası anjiyografi bulguları.



Resim 3. Kesici alet yaralanmasına bağlı arteriovenöz fistül gelişimi.



Resim 4. Önkolda kesici alet yaralanması sonrasında gelişmiş arteriovenöz fistül olgusu.

Tablo V. 60 TAVF olgusunda uygulanan cerrahi yöntemler, komplikasyonlar ve reoperasyon nedenleri.

Ameliyat tekniği	Olgu sayısı	%	Komplikasyonlar	Olgu sayısı	%
Artere ve vene lateral sütür	7	11.8	Erken komplikasyonlar	15	25
Artere uç-uca anastomoz/ vene lateral sütür	13	21.6	Yara enfeksiyonu	12	20
Artere ven greftle by-pass/ vene lateral sütür	13	21.6	Greft tıkanması	1	1.7
Artere ven greftle by-pass/ vene ligatür	4	6.7	Kanama	1	1.7
Artere ven patch vene ligatür	3	5	Arter tıkanması	1	1.7
Artere sentetik greftleme/ by-pass vene lateral sütür	3	5	Geç komplikasyonlar	5	8.3
Arter ve vena ligasyonu	4	6.7	Arter tıkanması	1	1.7
Endoanevrizmorafi	6	10	Nörolojik defisit	2	3.3
Artere ven patch/ vene lateral sütür	5	8.3	Seksüel impotans	1	1.7
Artere lateral sütür/ vene ligatür	2	3.3	Yara enfeksiyonu ve residiv	1	1.7
			Reoperasyon görülenler	5	8.3
			Erken greft tıkanması	1	
			Kanama	1	
			Arter tıkanması	2	
			İnfeksiyon ve residiv	1	

TARTIŞMA

AVF tanısıyla tedavi edilen 70 olgudan 60'ının (%87.1) edinsel olması, bu olguların % 96.7'sinin travmatik ve %3.3'ünün yatrojen nedenlere bağlı bulunması literatür verilerine uygunluk göstermektedir. 60 edinsel AVF olgusunun, travmatik ve yatrojen 208 damar yaralanmasından sonra meydana çıktığı izlenmiştir; % 28.8 gibi bir oran gösteren bu komplikasyon, literatürdeki sivil serilere ait çalışmaların sonuçlarına uygunluk gösterirken savaş serilerine göre düşük bulunmaktadır (2,6,9). TAVF oluşumuna neden olan damar yaralanmalarındaki etkili araçlar açısından yapılan incelemelerimiz literatür bulguları ile benzer sonuçlar vermiştir (1,2,4,6,11). Yatrojen nedenlere bağlı olgulardan 2'sinde, AVF'ün bir herni diskal ameliyatını izlemesi ilginçtir; literatürde bildirilmiş 26 olguya (12) yeni bir katkı niteliğinde görülmüştür. Yatrojen kökenli 2 AVF olgumuzda, global kalp büyümesi ve kalp yetmezliği belirtilerinin bulunması, özellikle herni diskal ameliyatlarından sonra ortaya çıkan kalp yetmezliklerinde bir AVF oluşumu ihtimalini gözden uzak tutmamak gereğini düşündürmektedir. Lokalizasyon incelemelerimizde, TAVF olgularımızdaki bacak damarları yerleşiminin literatürdeki serilere (2,6,9,13,14) oranla fazla oluşu dikkat çekicidir.

KAVF olgularında herhangi bir kromozom incelemesi yapılamadığı için, kromozom anomalisi ve kalıtım teorileriyle ilgili fikir edinemedik. Ancak, derisinde hemangiom bulunan bir olguda doğum sonrası AVF teşekkülü, deri hemangiomu bulunan kişilerdeki AVF ihtimalinin fazla olabileceğini düşündürdü. KAVF olgularımızın klinik belirtileri ve Nicholadoni-Brahman belirtisinin olguların tümünde negatif bulunması literatüre uygunluk gösterdi (1,15). Diffuz KAVF saptanan bir olguda, deri hemangiomu, yaygın varikozite ve bacakta hipertrofi özellikleriyle şekillenen Parkers-Weber sendromu tanımlanmıştır; bu olguda kalpte sistolik üfürüm ve taşikardi bulunuşu, literatürde yalnızca diffuz olgularda saptanabilmesi mümkün kalp yüklenmesinin belirtisi olarak kabul edilmiştir (15,16).



Resim 5. Parkers-Weber sendromunda saptanan ameliyat sonrası residiv olgusu.

Tedavi yöntemlerimizdeki amaç AVF'ün ortadan kaldırılması olmuştur. Bunu yaparken, mecbur kalınmadıkça sentetik greft kullanılmamıştır. Post-operatif komplikasyonlar açısından yaptığımız karşılaştırmalarda, olgularımızdaki yara enfeksiyonu literatüre oranla fazla bulunurken, greft tıkanması, kanama, arter tıkanması ve diğer komplikasyonlar literatürdeki oranların (11,14) üzerine çıkmamıştır. Bir olgumuzda enfeksiyon ve fistül residivi olmuştur; bu olgunun residiv yapmasında enfeksiyonun sorumlu olduğu kanısına varılmıştır.

KAVF'lerin lokal tiplerinde tedavinin amacı total ekstirpasyondur (1,15,16). Diffüz tiplerde ise, cerrahi tedaviden kısa bir süre sonra residivlerden söz edilmekte ve bu nedenle, varislerin ve ülserlerin tedavisine yönelik cerrahi girişimin yanısıra elastik bandaj tatbiki savunulmaktadır (16-18). Bizim bir diffüz KAVF olgumuz da residiv yapmış ve bu nedenle ikinci kez ameliyata alınmıştı. Literatürde herhangi bir AVF ameliyatından sonra, ameliyat bölgesinde anevrizma oluşumu ile ilgili vakalar (19) bildirilmekle beraber, olgularımız arasında böyle bir komplikasyona rastlamadık.

KAYNAKLAR

- 1 Malan, E., Tardito, E. (1984) in *Vascular Surgery* (Haimovici, H. ed) pp. 777-794, 2nd ed., Appleton-Century-Crofts, New York.
- 2 Jahnke, E.J.Jr., Seeley, S.F. (1953) *Ann. Surg.*, **138**, 158-177.
- 3 Callender, C.L. (1920) *Ann. Surg.*, **71**, 428-459.
- 4 Freeman, N.E. (1946) *Ann. Surg.*, **124**, 888-919.
- 5 Shumacker, H.B., Stahl, N.H. (1949) *Surgery*, **26**, 928-944.
- 6 Rich, N.M., Banch, J.H., Hughes, C.W. (1970) *J. Trauma*, **10**, 359-369.
- 7 Özgür, M., Alper, A., Emre, A., Kurtoğlu, M., Ülgen, N., Diriker, M. (1980) *Tıp Fak. Mecm. (İstanbul)*, **43**, 379-384.
- 8 Sungur, İ., Önder, S. (1983) *Cerrahpaşa Tıp Fak. Derg.*, **14**, 363-369.
- 9 Reynolds, R.R., Holf, A.M., Arnold, G.D. (1979) *Ann. Surg.*, **198**, 700-708.
- 10 Dodson, T., Quindlen, E., Orowell, R., McEnamy, M.T. (1980) *Surgery*, **87**, 343-346.
- 11 Mavroudis, C., Roon, A.J., Baker, C.C., Thomas, A.N. (1980) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **80**, 342-349.
- 12 Nişancı, Y., Çobanoğlu, M.A., Ural, M., Levi, S., Deligönül, U., Meriç, M., Onursal, E., Büyükoztürk, K. (1985) *Tıp Fak. Mecm. (İstanbul)*, **48**, 127-134.
- 13 Heberer, G., Rau, G., Löhr, H.H. (1966) *Aorta und Grosse Arterien*, Springer-Verlag, New York.
- 14 Rich, N.M., Hobson R.W., Collins, G.J (1975) *Surgery*, **78**, 817-828.
- 15 Lindenauer, S.M. (1984) in *Vascular Surgery* (Rutherford, R.B., ed) pp.904-912, Chapter 86, 2nd ed., WB Saunders, Philadelphia.
- 16 Sumner, D.S. (1984) in *Vascular Surgery* (Rutherford, R.B., ed) pp.83-85/856-903, Chapter 83-85, 2nd ed., WB Saunders, Philadelphia.
- 17 Dry, L.R., Conn, J.H., Chaves, C.M., Hardy, J.D. (1972) *Am. J. Surg.*, **38**, 154.
- 18 Szilagyi, D.E., Elliott, J.P., DeRusso, F.J., Smith, R.F. (1965) *Surgery*, **57**, 61-81.
- 19 Graham, J.M., McCollum, C.H., Crawford, E.S., DeBakey, M.E. (1980) *Ann. Surg.*, **191**, 200-202.

Ayrı baskı için:

Doç.Dr. Ayla Sayın
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Göğüs-Kalp-Damar Cerrahisi Anabilim Dalı
34246 Cerrahpaşa, İstanbul
Türkiye

Türkiye'de Alyuvar Esteraz D Polimorfizmi

SEVİL ATASOY ^{a,b,c)}, MUKADDES ÖZTÜRK ^{b)}, ERSİ ABACI ^{a)}, ASİM CENAN ^{c)},
ÜMRAN KIYMETLİ ^{b)}

- ^{a)} İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, Türkiye
^{b)} Adalet Bakanlığı, Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, İstanbul, Türkiye
^{c)} İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

RED-CELL ESTERASE D POLYMORPHISM IN TURKEY

Summary

A sample of 170 unrelated individuals from different regions of Turkey was studied for red-cell esterase D polymorphism. The following allele frequencies were observed: $ESD*1 = 0.897 \pm 0.016$, $ESD*2 = 0.103 \pm 0.016$ ($\chi^2 = 0.0255$, $0.8 < p < 0.9$).

Key words: *Polymorphism - Red-cell esterase D - Turkey*

Özet

Türkiye'nin değişik yörelerinde oturan ve akrabalık ilişkileri bulunmayan 170 kişide alyuvar esteraz D enzim sisteminin fenotipleri incelendi ve literatürdekiler ile karşılaştırıldı. Selüloz asetat elektroforezi ile elde edilen alel frekansları $ESD*1 = 0.897 \pm 0.016$, $ESD*2 = 0.103 \pm 0.016$ ($\chi^2 = 0.0255$, $0.8 < p < 0.9$)'dır.

GİRİŞ

Kan ve kan lekelerinin, ayrıca değişik vücut sıvılarının kime ait olduğunun belirlenebilmesi; şüpheli babalar arasında gerçek biyolojik babanın saptanması gibi sorunlar adli açıdan çok büyük önem taşır. Bu amaçla kan grupları ve polimorfik enzim sistemlerinden, kısacası *genetik işaret* 'lerden yararlanılır. Ancak olasılık hesaplarının yapılabilmesi için incelenen polimorfik sistemin toplum içindeki fenotip dağılımının ve gen frekansının bilinmesi gerekir. Öte yandan kimi toplumlarda genetik işaretlerden biri, diğer toplumlardakinden farklı özellikler taşıyabilir. Böyle bir işaret o topluma özgüdür ve popülasyonlar arasındaki ilişkilerin aydınlığa kavuşturulmasında büyük değer taşır.

Adli Tıp Derg., 6, 57 - 60 (1990)

Alyuvarın polimorfik enzim sistemleri arasında esteraz D (ESD; E.C. 3.1.1.1) enzimi de yer alır (1). Türk toplumunda ESD fenotip dağılımı ve gen frekansına ilişkin bir çalışmaya rastlanmaması nedeniyle bu araştırma gerçekleştirilmiş, elde edilen bulguların bir bölümü daha önce yayınlanmıştır (1).

İnsan alyuvar esteraz D enziminin genetik polimorfizm gösterdiği ilk kez 1973 yılında *Hopkinson* ve ark. (2) tarafından nişasta jel elektroforezi kullanılarak gösterilmiştir. Bu tarihten sonra gerçekleştirilen çok sayıda popülasyon incelemesinde genellikle iki otozomal kodominant alel (*ESD*1* ve *ESD*2*) tarafından denetlenen 3 fenotipe (1, 2-1 ve 2) rastlanmıştır (3). Bunların dışında bireylerde, aile ve etnik gruplarda bir dizi nadir ESD aleline de rastlanmaktadır.

1974'te *Bender ve Frank* (4) *ESD*3* alelinin, 1976'da *Berg ve ark.* (5) *ESD*4* varyant alelinin, 1977'de *Marks ve ark.* (6) sessiz bir alelin (*ESD*Q0*) varlığını bildirmiştir. Ayrıca polimorfik tipler arasında kantitatif varyasyonlar bulunduğu ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır (7). Yüksek voltaj agaroz jel elektroforeziyle *ESD*2* aleli ayrıca *ESD*5* aleline ayrılabilmiştir (8). *ESD*5* aleli sayesinde ESD'nin beyazlardaki ayırımı olasılığı (discriminating probability) 0.35'ten 0.43'e yükselmiştir (9).

*ESD*6*, *Radam* ve ark. (10) tarafından bulunmuştur. *ESD*1* 'in alt aleli olarak tanımlanan *ESD*7* gerek Almanya'da *Siege* ve *Schwehn* (11) tarafından, gerekse Japonya'da *Nishigaki* ve *Itoh* (12) tarafından gözlenmiştir. *Eriksen* ve *Dissing* (13) Danimarka'da *ESD*Kopenhagen* 'i saptamışlardır. 1984 yılında *Henke* ve *Basler* (14) *ESD*Düsseldorf* 'u, 1985'te *Weidinger* ve ark. (15) *ESD*Berlin* 'i, 1986 yılında *Henke* ve ark. (16) *ESD*11* 'i bildirmiştir. 1988 yılında *Weidinger* ve *Henke* (17) agaroz jelde gerçekleştirdikleri izoelektrik odaklama ile iki yeni varyanta, *ESD Rehren* ve *ESD Ravensburg* 'a rastlamışlardır. Aynı yıl *Huckenbeck* ve ark. (18) izoelektrik odaklama ile *ESD Düs 2* 'yi saptamışlardır.

Bugüne değin incelenen toplumların tümünde en yüksek frekansa *ESD*1* alelinde rastlanmıştır. Siyah ırkta, *ESD*1* frekansı (*ESD*1* = 0.913, *ESD*2* = 0.085) beyazlara (*ESD*1* = 0.881, *ESD*2* = 0.100) oranla daha yüksek bulunmaktadır (19). En düşük *ESD*1* frekansı gösteren toplum, Japonlardır (*ESD*1* = 0.600, *ESD*2* = 0.389) (20). İtalyanlarda *ESD*1* frekansı 0.845 (21), Norveçlilerde 0.900 (22), İngilizlerde 0.886 (23), İsviçrelilerde 0.863 (24) olarak belirlenmiştir. Daha önce de ifade edildiği gibi, alyuvar esteraz D izozim sisteminin Türk popülasyonundaki polimorfizmine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Türkiye'nin değişik yerlerinden gelen ve akrabalık ilişkisi bulunmayan 170 kişi incelendi. Sodyum sitrat üzerine alınan kan örneklerinin santrifüjlenerek plazmaları ayrıldıktan sonra alyuvarlar 1:1 oranında destile su ile seyreltildi, iki kez dondurup çözülerek hemoliz tamamlandı. Kullanılınca dek -20°C'de bekletildi. Esteraz D izozimlerinin belirlenmesinde *Grunbaum* (25) tarafından geliştirilen selüloz asetat elektroforez yöntemi kullanıldı.

I. Elektroförez tamponları : a) Tank tamponu : Tris - maleik asid, pH 7.4 (0.1 M Tris, 0.1 M maleik asid, 0.0087 M EDTA, 0.01 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) ; b) Membran tamponu : Tank tamponu 1 : 10 seyreltilerek kullanıldı. II. Tepkime karışımı : 25 ml 0.05 M sodyum asetat tamponu, pH 5.2 üzerine, çok az miktarda asetonda çözünmüş 2 mg 4-metil-umbeliferil asetat ve 250 mg agar katılarak hazırlandı.

Hemolizatlar, selüloz asetat membrana tankın katod yönüne gelecek şekilde uygulandı, oda sıcaklığında 200 Volt'te 60 dakika yürütüldü. Oda sıcaklığında tepkime karışımı ile 5-10 dakika inkübe edildi, uzun dalga boylu mor-ötesi ışık altında incelendi.

BULGULAR ve SONUÇ

ESD izozimlerinin analizi için çalışılan 170 kan örneğinin incelenmesi sonucunda 137 kişinin homozigot 1-1, 31 kişinin heterozigot 2-1, 2 kişinin homozigot 2-2 olduğu saptandı. Gözlenen ve beklenen değerler Tablo I'de birarada sunulmuştur. Elde edilen *ESD*1* alel frekansı 0.897 ± 0.016 , *ESD*2* frekansı 0.103 ± 0.016 'dır. Hesaplanan χ^2 değeri 0.0255, serbestlik derecesinin 1 olarak kabul edildiği bu koşullarda p değeri, 0.8 ile 0.9 arasındadır. Görüldüğü gibi sonuçlar Hardy-Weinberg yasasına uygundur. Bulguları sunulan bu çalışmada Türk popülasyonunda esteraz D polimorfizminin Avrupa topluluklarına benzer bir özellik gösterdiği sonucuna varıldı.

Tablo I. Türkiye'de alyuvar esteraz D izozimlerinin fenotip dağılımı ve alel frekansları.

<i>Fenotipler</i>	<i>Gözlenen</i>	<i>Beklenen</i>	<i>Alel Frekansları</i>
ESD 11	137	136.8	<i>ESD*1</i> = 0.897 ± 0.016
ESD 21	31	31.4	<i>ESD*2</i> = 0.103 ± 0.016
ESD 22	2	1.8	

$\chi^2 = 0.0255$; Serbestlik derecesi = 1 ; $0.8 < p < 0.9$

KAYNAKLAR

- 1 Öztürk, M. (1989) *Türk Popülasyonunda Esteraz D İzozimlerinin Gen Frekansları* (İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Adli Bilimler Master Tezi) İstanbul.
- 2 Hopkinson, D.A., Mestriner, M.A., Cortner, J., Harris, H. (1973) *Ann. Hum. Genet.*, **37**, 119-137.
- 3 Prokop, O., Göhler, W. (1986) in *Die Menschlichen Blutgruppen* pp.138-140, Fisher Verlag, Stuttgart.
- 4 Bender, K., Frank, R. (1974) *Hum. Genet.*, **23**, 315-318.
- 5 Berg, K., Schwarzfischer, F., Wischerath, H. (1976) *Hum. Genet.*, **32**, 81-83.
- 6 Marks, M.P., Jenkins, I., Nurse, G.T. (1977) *Hum. Genet.*, **37**, 49-54.
- 7 Nishigaki, I., Itoh, T. Ogasawara, N. (1983) *Ann. Hum. Genet.*, **47**, 187-192.
- 8 Martin, W. (1979) *Ärztl. Lab.*, **25**, 65-67.
- 9 Budowle, B., Sunduram, S., Wenk, R. (1985) *Forensic Sci. Int.*, **28**, 77-81.
- 10 Radam, G., Strauch, H., Martin, W. (1980) *Blut.*, **40**, 337-341.
- 11 Siege, M., Schwehn, B. (1983) *Ärztl. Lab.*, **29**, 288-290.
- 12 Nishigaki, I., Itoh, T. (1984) *Hum. Genet.*, **66**, 92-95.
- 13 Henke, J., Basler, M. (1984) *Z. Rechtsmed.*, **92**, 35-37.
- 14 Eriksen, M., Dissing, J. (1979) *Human red cell esterase D polymorphism in Denmark and its application to paternity cases*. Ref. 8. Int. Tgg Ges. forens. Blutgruppenk., London.
- 15 Weidinger, S., Gradl, G., Cleve, H., Schwarzfischer, F. (1985) *Genetic study of red cell esterase D polymorphism by isoelectric focusing*. Abstracts 11th Congress of the Society for Forensic Haemogenetics. Copenhagen.
- 16 Henke, J., Schweitzer, H., Bär, W., Weidinger, S., Weissmann, J., Baur, M.P. (1986) *Hum. Genet.*, **73**, 89-90.
- 17 Weidinger, S., Henke, J. (1988) *Electrophoresis*, **9**, 429-432.
- 18 Huckenbeck, W., Bonte, W., Weidinger, S. (1988) *Hum. Hered.*, **38**, 378-380.
- 19 Dykes, D.D., Polesky, H.F., Miller, S. (1982) *Hum. Genet.*, **62**, 162-162.
- 20 Yuaso, I., Tamaki, N., Suenaga, K., Ito, K., Inoue, T., Okada, K. (1985) *Electrophoresis*, **6**, 588-592.
- 21 Destro-Bisol, Menchicchi, F., Ranalletta, D., Spedini, G. (1986) *Hum. Hered.*, **36**, 154-157.
- 22 Olaisen, B., Siverts, A., Jonassen, R., Mevag, B., Gedde-Dahl, T. (1981) *Hum. Genet.*, **57**, 351-353.
- 23 Divall, G.B. (1983) *Proceedings of the 10th Congress of the Society for Forensic Haemogenetics*, pp. 501-505, Münih ,
- 24 Bär, W., Häni, M., Biederman, V. (1984) *Electrophoresis*, **5**, 280-281.
- 25 Grunbaum, B.W. (1981) in *Handbook for Forensic Individualization of Human Blood and Bloodstains*, Published by Sartorius GmbH, pp. 71-72, Göttingen.

Ayrı baskı için:

Prof. Dr. Sevil Atasoy
İstanbul Üniversitesi
Adli Tıp Enstitüsü
34246 Cerrahpaşa, İstanbul,
Türkiye

Türkiye'de Alyuvar Asid Fosfataz 1 Polimorfizmi

GÜLSEREN ATEŞ ^{a,b}), SEVİL ATASOY ^{a,b,c}), ASİM CENAN ^c), ERSİ ABACI ^a),
ÜMRAN KIYMETLİ ^b)

^a) İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

^b) Adalet Bakanlığı, Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, İstanbul, Türkiye

^c) İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

RED-CELL ACID PHOSPHATASE 1 POLYMORPHISM IN TURKEY

Summary

A sample of 100 unrelated individuals from Turkey was studied for red-cell acid phosphatase 1 (ACP1) polymorphism. The following allele frequencies were observed. $ACP^*A = 0.270 \pm 0.031$, $ACP^*B = 0.700 \pm 0.032$, $ACP^*C = 0.030 \pm 0.012$ ($\chi^2 = 0.5497$; D.F. = 3; $0.1 < p < 0.2$).

Key words: Polymorphism - Red-cell acid phosphatase - Turkey

Özet

Türk toplumu içindeki alyuvar asid fosfataz izozim sisteminin fenotip dağılımını belirlemek amacıyla, akrabalık ilişkisi bulunmayan 100 kişi incelendi. Allel frekansları $ACP^*A = 0.270 \pm 0.031$, $ACP^*B = 0.700 \pm 0.032$, $ACP^*C = 0.030 \pm 0.012$ ($\chi^2 = 0.5497$; D.F. = 3; $0.1 < p < 0.2$) bulundu.

GİRİŞ

Adli amaçlarla kana kişilik kazandırmak (individualizasyon) istendiğinde, kanda bulunan kalıtsal olarak denetlenen başlıca iki protein grubu incelenir. Bunlardan ilki hücre antijenleri, diğeri polimorfik enzim ve proteinlerdir. ABO, Kelly, Duffy gibi kan grupları birer hücre antijenidir ve hemen tüm adli laboratuvarlarda immunolojik yöntemler kullanılarak rutin bir şekilde incelenmektedirler. Ancak kan grupları babalık belirtimlerinde, ya da bir kan lekesinin kime ait olduğunu tam olarak belirlemeye kimi zaman yeterli olamamaktadır. Bu nedenle yapılan incelemelere günümüzde polimorfik enzim sistemlerinin araştırılması da dahil edilmektedir. Ancak elde edilen bulguların

istatistiksel açıdan değerlendirilebilmesi ve olasılık hesaplarının yapılabilmesi için, çalışılan genetik işaretin, bulunulan toplumdaki dağılım şeklinin, bir başka deyişle alelfrekansının kesin olarak bilinmesini gerektirir. Bulguları sunulan bu araştırma, Türk toplumunun genetik yapısını belirlemeye yönelik geniş çaplı bir projenin içinde yer almaktadır ve polimorfik özellik gösteren alyuvar asid fosfataz 1 izozim sisteminin Türkiye popülasyonu içindeki dağılımını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Alyuvar asid fosfatazını (EAP, AcP, ACP1 ; E.C. 3.1.3.2) sentezleyen gen, otozomal kromozomlardan 2 nolu kromozomun kısa kolunun 2.5 bandında bulunur (1-5).

Bu genin *ACP*A*, *ACP*B*, *ACP*C* olarak üç kodominant alelinin bulunduğu ve bu alellerin de A, B, C, AB, AC ve BC olmak üzere toplam altı fenotip meydana getirdiği ilk olarak 1963-1964 yılları arasında *Hopkinson* (3) tarafından tarif edilmiştir. Sözü edilen bu üç alele ek olarak, elektroforetik mobiliteyi *ACP*A*, *ACP*B*, *ACP*C* alellerinden farklı olan bir dizi nadir gen saptanmış olmakla birlikte, bunlar arasında adli uygulamalar açısından önem taşıyan *ACP*R* alelidir. *ACP*R* siyah popülasyonda çok yüksek polimorfik frekans gösterir.

Yeryüzünde en sık gen frekansı *ACP*B* alelinde görülmekte olup, Afrikalı ve Asyalılarda daha yüksek olmak üzere 0.8899-0.5466 arasında değişmektedir.

İkinci sıklıkta *ACP*A* aleli bulunmakta olup, Afrika ve Asyalılardan Avrupalılara doğru gittikçe artmakta ve 0.1111 ile 0.3938 arasında değişmektedir.

*ACP*C* alelinin gen sıklığı ise çok düşük olup, Afrika ve Asyalılarda hiç görülmemekte, beyaz ırkta ise çok düşük oranlarda görülmekte ve en fazla 0.0963 olarak belirlenmiştir.

*ACP*B* alelinin gen sıklığı ise daha önce de belirtildiği gibi çok düşüktür, sadece Kuzey Karolina'daki siyah ırkta 0.0230 ile Güney Afrika siyah ırkında 0.0619 olarak bulunmuştur (6-8).

Bulguları sunulan bu araştırma Türk toplumunda alyuvar asid fosfatazın polimorfik özelliklerine ilişkin yeterli çalışma bulunmaması nedeniyle gerçekleştirilmiş, verilerin bir bölümü daha önce tez şeklinde yayınlanmıştır (9).

GEREÇ ve YÖNTEM

Türkiye'nin farklı bölgelerinden gelen ve birbiriyle akrabalık ilişkisi bulunmayan 100 kişi incelendi. Tam kan santrifüjlendi, plazma ayrıldı. Alyuvarlar 1:1 oranında destile su ile seyreltildi, iki kez dondurup çözülerek hemoliz tamamlandı. Kullanılncaya dek -20°C'de bekletildi. Çalışmada *B.W. Grunbaum*'un (10) geliştirdiği selüloz asetat elektroforez sistemi kullanıldı ve bu sisteme uygun olan *B.W. Grunbaum*'un yöntemi uygulandı.

Elektroforez tamponları a) Tank tamponu: fosfat-sitrat, pH 5.9 {0.024 M sodyum dihidrojen fosfat + 0.015 M trisodyumsitrat }; b) Membran tamponu: Tank tamponu 1:5 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Tepkime karışımı: 25 ml 0.05M sitrat tamponu, pH 5.0, 10 mg 4-metil-umbeliferil fosfat, 4.5 ml gliserol ve 250 mg agardan oluştu. Örnekler tankın katod yönüne uygulandı, 250 Volt'ta 40-60 dakika, oda sıcaklığında elektroforez uygulandıktan sonra, selüloz asetat membranlar tepkime karışımıyla 37°C'ta 8-10 dakika inkübe edildi. Uzun dalga boylu mor- ötesi ışık altında incelendi.

BULGULAR

Araştırmamızda değerlendirmeye alınan 100 kişide, eritrosit asid fosfataz izozim fenotipleri 7 kişide homozigot A, 48 kişide homozigot B, 39 kişide heterozigot AB, 1 kişide heterozigot AC ve 3 kişide heterozigot BC olarak saptandı. CC homozigot fenotipe rastlanmadı. Bu fenotiplerden hesaplanan gen frekansları ACP^*A için 0.270 ± 0.031 , ACP^*B için 0.700 ± 0.032 ve ACP^*C için 0.030 ± 0.012 dir (Tablo I).

Tablo I. Türkiye'de alyuvar asid fosfataz enzim sisteminin fenotip dağılımı ve alel frekansları.

<i>Fenotip</i>	<i>Gözlenen</i>	<i>Beklenen</i>	<i>Alel frekansı</i>
A	7	7.29	$ACP^*A = 0.270 \pm 0.031$
B	48	49.00	$ACP^*B = 0.700 \pm 0.032$
C	0	0.09	$ACP^*C = 0.030 \pm 0.012$
AB	39	37.8	
AC	1	1.62	
BC	5	4.20	

$$\chi^2 = 0.5497 ; \text{Serbestlik Derecesi} = 3 ; 0.1 < p < 0.2$$

Sonuçlar *Hardy-Weinberg* yasasına uymakta olup, Türk toplumunun alyuvar asid fosfataz izozimleri gen frekanslarının daha çok İrlanda ve İtalyan toplumlarına benzediğini ve genel olarak Asyalılar ile Avrupalılar arasında bir yer aldığını göstermektedir.

Almanya'daki Türklerde ($ACP^*A = 0.2920$, $ACP^*B = 0.6807$, $ACP^*C = 0.0273$) (11) ve İngiltere'deki Kıbrıs Türklerinde ($ACP^*A = 0.2810$, $ACP^*B = 0.6798$, $ACP^*C = 0.0392$) (12) saptanan gen frekansları bizim bulgularımızla uygunluk göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1 Bergsma, D. (1975) *Hum. Genet.*, Mapping 2. Rotterdam Conference (1974) XI (3), 7-8.
- 2 Golden, V.L., Sensabaugh, G.F. (1986) *Hum. Genet.*, 72, 340-343.
- 3 Hopkinson, D.A., Spencer, N., Harris, H. (1963) *Nature*, 199, 969-971.
- 4 Povey, S., Swallow, D.M., Bobrow, M., Craig, I., Heymingen, V. Van (1974) *Hum. Genet.*, 38, 1.
- 5 Vakita, Y., Narahara, K., Takahashi, Y., Kikkawa, K., Kimura, S., Oda, M., Kimoto, H. (1985) *Hum. Genet.*, 71, 259-260.
- 6 Char, K.S.N., Lakshmi, P., Gopalan, K.B., Rao, P.R. (1986) *Hum. Hered.*, 36, 333-335.
- 7 Nelson, M.S. (1984) *J. Forensic Sci.*, 29, 762-773.
- 8 Couture, L., Chagnon, M., Allard, C., Bouchard, C. (1987) *Hum. Genet.*, 75, 188.
- 9 Ateş, G. (1989) *Türk Popülasyonunda Asit Fosfataz İzozimlerinin Gen frekansı* (İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Adli Bilimler Yüksek Lisans Tezi), İstanbul.
- 10 Grunbaum, B.W. (1981) in *Handbook For Forensic Individualization of Human Blood and Bloodstains*, Sartorius GmbH Göttingen, West Germany.
- 11 Hummel, K., Pulverer, G., Schall, K.P., Weidman, V. (1970) *Hum. Genet.*, 8, 330-333.
- 12 Stedman, R. (1972) *J. Forensic Sci. Soc.*, 12, 410-411.

Ayrı baskı için:

Prof. Dr. Sevil Atasoy
İstanbul Üniversitesi
Adli Tıp Enstitüsü
34246 Cerrahpaşa, İstanbul
Türkiye

Türkiye'de Alyuvar Gliyoksalaz I Polimorfizmi

SEVİL ATASOY ^{a,b,c}, ERSİ ABACI ^a, ASİM CENANİ ^c, MESUT KARA ^a
MUKADDES ÖZTÜRK ^{a, b}, ÜMRAN KIYMETLİ ^b

^a) İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

^b) Adalet Bakanlığı, Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, İstanbul, Türkiye

^c) İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

ERYTHROCYTE GLYOXALASE I POLYMORPHISM IN TURKEY

Summary

The phenotypes of red-cell glyoxalase I (GLO, E.C. 4.4.1.5) were determined by cellulose acetate electrophoresis in 322 unrelated Turkish persons. The gene frequencies were found to be 0.4285 ± 0.019 for GLO^*1 and 0.5715 ± 0.019 for GLO^*2 . ($\chi^2 = 0.365$, $0.6 > p > 0.5$). Rare phenotypes were not observed. The GLO phenotype distribution from all parts of Turkey is comparable with that found in other European populations.

Key words: Red cell glyoxalase I - Polymorphism - Turkey

Özet

Alyuvar Gliyoksalaz I (GLO, E.C. 4.4.1.5) enzim sisteminin Türk toplumundaki gen frekansını belirlemek amacıyla, akrabalık ilişkisi olmayan 322 kişi incelenmiştir. GLO^*1 alel frekansı 0.4285 ± 0.019 , GLO^*2 alel frekansı 0.5715 ± 0.019 bulunmuştur ($\chi^2 = 0.365$, $0.6 > p > 0.5$). Elde edilen sonuçlar daha önce incelenmiş Avrupa popülasyonlarında rastlanan dağılıma benzer özellik taşımaktadır.

GİRİŞ

Gliyoksalaz enzim sistemi, iki farklı enzimi içerir. Bunlardan ilki, laktoil-glütatyon liyaz (GLO, EC 4.4.1.5) adıyla da tanımlanan gliyoksalaz I'dir. Adı geçen enzim, indirgenmiş glütatyon ile metilgliyoksalden S-laktoil-glütatyonun sentezini tersinmez bir şekilde katalizler. Öte yandan gliyoksalaz II, bu bileşiği laktik asid ve indirgenmiş glütatyonla hidrolizler (1). Alyuvarlarda hemen yalnız gliyoksalaz I etkinliği bulunur. İnsan alyuvar gliyoksalaz I'inin genetik polimorfizm gösterdiği ilk kez Kömpf ve ark. (2,3) tarafından 1975 yılında ileri sürülmüştür.

Adli Tıp Derg., 6, 65 - 68 (1990)

Otozomal locus'ta yer alan iki kodominant alel (*GLO*1* ve *GLO*2*) sayesinde genellikle 3 fenotipe (*GLO1*, *GLO2-1* ve *GLO2*) rastlanır (4). Son 15 yılda glikoksalaz I alellerinin değişik toplumlardaki dağılımı incelenmiş ve bunların babalık belirtilerindeki kullanılabilirliği araştırılmıştır. *GLO* fenotiplerinin yalnız taze kanda değil, kan lekelerinde de belirtilebilir olması, adı geçen enzim sisteminin, gerek identifikasyon, gerekse individualizasyon amacıyla, kan gruplarını saptamakla yükümlü adli laboratuvarlarda *genetik işaret* olarak kullanımını yaygınlaştırmıştır (5).

Türk toplumunda alyuvar *GLO* enziminin genetik polimorfizmini inceleyen bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle bu araştırma gerçekleştirilmiş, elde edilen bulguların bir bölümü daha önce sunulmuştur (6,7).

GEREÇ ve YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü laboratuvarlarında gerçekleştirilen deneylerde kullanılan kan örnekleri, birbirleriyle akrabalık ilişkileri olmayan 322 kişiden alındı. Cins ve yaş farkı gözetilmedi. Sodyum sitrat üzerine alınan kan örneklerinin plazmaları ayrıldıktan sonra alyuvarlar üzerine eşit hacimde destile su katıldı. Birkaç kez dondurulup çözülerek elde edilen hemolizat örnekleri kullanılmaya dek, -20°C'de tutuldu. Elde edilen hemolizat 0.18 M ditiyotritol ile 1:1 oranında seyreltilti. Selüloz asetat membranlarının kullanıldığı elektroforez yönteminde tank tamponu olarak 0.15 M, pH 6.7, fosfat tamponundan yararlanıldı. Deneylerin uygulanışında büyük ölçüde *Kömpf ve ark. (2)* ile *Parr ve ark. (4)* önerdikleri yöntemle uyuldu. Membran tamponu olarak adı geçen fosfat tamponu 1:15 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Tepkime karışımı, 25 ml 0.2 M, pH 6.7 fosfat tamponuna katılan 65 mg indirgenmiş glutatyon, 50 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25 ml metil glikoksal (%40 w/v), 10 mg MTT (Tiyazolil mavisi, 3-(4,5-dimetil tiyazolil-2),2,5-difenil tetrazolyum bromür) ve 250 mg agardan oluştu. Elektroforez oda sıcaklığında, 300 V (1.5-2.0 mA) 30 dakika süre ile uygulandı. Membranlar tepkime karışımı ile 37-42°C'ta yaklaşık 20-30 dakika mavi zemin üzerinde beyaz lekeler belirinceye kadar inkübe edildi. Her bir alelin frekansı gen sayımı ile hesaplandı. Alellerin gözlenen sayıları kullanılarak χ^2 testi uygulandı (8,9).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Elektroforezin tamamlanışından ve izozimlerin uygun şekilde görünürleştirilmesinden sonra sıklıkla rastlanan fenotipler *GLO1*, *GLO2-1* ve *GLO2*'dir. *GLO1* ve 2 fenotipleri tek ve yoğun bir band şeklinde görülürler. Her ikisi de anoda doğru göçerlerse de, *GLO1* daha yavaş hareket eder. *GLO2-1* fenotipi üç band şeklinde kendini belli eder. Daha soluk olan iki bandın mobiliteleri, *GLO1* ve *GLO2* izozimlerinin mobilitelerine eşit hızdadır. Üçüncü band daha şiddetlidir ve diğer iki band arasında yer alır. Bu bulgular *GLO* molekülünün dimerik yapıda olduğunun bir kanıtı olarak değerlendirilmektedir.

322 kan örneğinde yapılan çalışmalar sonucunda *GLO* enziminin Türk popülasyonunda rastlanan fenotipleri ve alel frekansları Tablo I'de birarada sunulmuştur. Taranan popülasyonda kullanılan analitik yöntemle herhangi bir nadir gene rastlanmamıştır.

Tablo I. Alyuvar gliyoksalaz I enzim sisteminin Türkiye'deki fenotip ve alel frekansları.

	GLO Fenotipleri			Alel frekansları	İncelenen örnek
	1	2-1	2		
Gözlenen	59	170	107	$GLO*1: = 0.4285 \pm 0.019$	322
Beklenen	61.69	164.56	109.74	$GLO*2: = 0.5715 \pm 0.019$	

$\chi^2 = 0.365$, serbestlik derecesi = 1, $0.6 > p > 0.5$

Beklenen ve gözlenen değerler *Hardy Weinberg* dengesine uygunluk göstermektedir ($\chi^2 = 0.365$). Söz konusu Tablo'nun incelenmesinden de görüleceği gibi, GLO alel frekanslarının dağılımı $GLO*1 = 0.4285$, $GLO*2 = 0.5715$ şeklindedir.

Dünya popülasyonunda GLO enzim sisteminin polimorfizmi etnik gruplara göre oldukça önemli farklılıklar göstermektedir. Kuzey ve Orta Avrupalılar ile Kuzey Amerikalı beyazlarda $GLO*1$ gen frekansı birbirine çok yakın, 0.44 dolayındadır (10-11). Örneğin, Fransa'nın Alsas bölgesinde $GLO*1 = 0.455$ (12), Belçika'da 0.432 (13), Danimarka'da 0.4311 (14), Güney Almanya'da 0.4235 (15), Güney Batı Almanya'da 0.427 (2), Norveç'te 0.442 (16), İngiltere'de 0.44'tür (4). Orta ve Güney İtalya'da $GLO*1$ frekansı biraz daha düşüktür (13). İngiltere'de yaşamakta olan siyah ırktan kişilerde $GLO*1$ frekansı 0.33, sarı ırktan kişilerde ise 0.25 dolayında bulunmuştur (5). Benzer şekilde bir diğer çalışmada da, A.B.D.'de yaşayan beyazlarda $GLO*1$ frekansı 0.436, siyahlarda 0.327, Meksika kökenlilerde 0.308, Asya kökenlilerde 0.075 bulunmuştur (17). Hindistan popülasyonunda $GLO*1$ gen frekansı 0.15 ile 0.33 arasında değişmektedir (18,19).

İsrail'de yaşayan 9 değişik popülasyon grubunun incelendiği bir araştırmada, *Golan* ve *ark*. $GLO*1$ ve $GLO*2$ gen dağılımının homojen olmadığını, İran'dan göçen Yahudilerin en düşük $GLO*1$ frekansına (0.2294), Mısır'dan göçenlerin ise en yüksek frekansa (0.3968) sahip olduklarını belirlemişlerdir. Türkiye orijinli 151 Yahudinin $GLO*1$ gen frekansı 0.3344 bulunmuştur (20).

Ghosh (21), 1977 yılında gerçekleştirdiği geniş bir çalışma sonucunda *GLO*1* gen frekansını İran popülasyonunda 0.4087, Avustralya yerlilerinde 0.1, Yeni Gine yerlilerinde 0.15, Çin'de 0.1544 olarak belirlemiştir. Kuzey Amerikalı beyazlarda *GLO*1* gen frekansının 0.4265 olmasına karşın, siyahlarda 0.3240'ur (22).

Türkiye'nin değişik bölgelerinden gelen 322 kişiyle gerçekleştirilen bu çalışmanın sonuçlarından, Türk toplumunun GLO enzim sisteminin polimorfizmi açısından Avrupa topluluklarına ve Kuzey Amerika'nın beyaz popülasyonuna benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

- 1 Racker, E. (1951) *J. Biol. Chem.*, 190, 685-696.
- 2 Kömpf, J., Bissbort, S., Gussmann, S., Ritter, H. (1975) *Hum. Genet.*, 27, 141-143.
- 3 Kömpf, J., Bissbort, S., Ritter, H. (1975) *Hum. Genet.*, 28, 249-251.
- 4 Parr, C.W., Bagster, I.A., Welch, S.G. (1977) *Biochem. Genet.*, 15, 109-113.
- 5 Emes, E.G., Parkin, B.H. (1980) *Forensic Sci. Int.*, 15, 265-271.
- 6 Abacı, E., Atasoy, S. (1989) *Türk Toplumunda Gliyoksalaz I Enzim Sisteminin Gen Frekansları, Birinci Ulusal Prenatal Teşhis ve Anadolu'nun Genetik Yapısı Sempozyumu özetleri*, s. 222, Eskişehir.
- 7 Kara, M. (1990) *Türk Popülasyonunda Gliyoksalaz İzozimlerinin Gen Frekansı* (İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Adli Bilimler Yüksek Lisans Tezi), İstanbul.
- 8 Documenta Geigy, Scientific Tables (1962) (K. Diem, ed.) pp.36-39, 6th ed. J.R. Geigy S.A., Basle, Switzerland.
- 9 Velicangil, S. (1984) *Biyoistatistik*, Filiz Kitabevi, pp. 130-133, İstanbul.
- 10 Koziol, P., Dobosz, T. (1978) *Hum. Genet.*, 45, 77-79.
- 11 Busi, B.R., Wells, L.J., Volkens, W.S., Ebeli-Struijk, A.C. (1979) *Hum. Genet.*, 49, 105-113.
- 12 North, M.L., Amann, M.M., Tongio, G., Hauptmann, J., Klein, J., Mayer, S. (1981) *Hum. Hered.*, 31, 39-41.
- 13 Hoste, B., Suys, J., Mathy, M.R. (1984) *Hum. Hered.*, 34, 192-193.
- 14 Eriksen, B. (1979) *Hum. Hered.*, 29, 265-271.
- 15 Berg, K., Rodewald, A., Schwarzfischer, F., Wischerath, H. (1977) *Z. Rechtsmed.*, 79, 13-15.
- 16 Olaisen, B., Teisberg, P., Jonassen, R. (1976) *Hum. Hered.*, 26, 454-457.
- 17 Saha, N. (1987) *Hum. Hered.*, 37, 86-93.
- 18 Grunbaum, B.W., Selvin, S., Myhre, B.A., Pace, N. (1980) *J. Forensic Sci.*, 25, 428-444.
- 19 Chahal, S.M.S., Thind, K.K., Mahajan, A. (1989) *Hum. Hered.*, 39, 37-40.
- 20 Goian, R., Ben-Ezzer, J., Szeinberg, A. (1979) *Hum. Hered.*, 29, 57-60.
- 21 Ghosh, A.K. (1977) *Hum. Genet.*, 39, 91-95.
- 22 Budowle, B., Sundaram, S., Wenk, R.E. (1985) *Forensic Sci. Int.*, 28, 77-81.

Ayrı baskı için:

Prof. Dr. Sevil Atasoy
İstanbul Üniversitesi
Adli Tıp Enstitüsü
34246 Cerrahpaşa, İstanbul
Türkiye

Red-Cell Adenylate Kinase 1 Polymorphism in Turkey

ERSİ ABACI ^{a)}, SEVİL ATASOY ^{a,b,c)}, MUALLA TÜRKOĞLU ^{a)}, ASİM CENANİ ^{c)}
MUKADDES ÖZTÜRK ^{b)}, ÜMRAN KIYMETLİ ^{b)}

^{a)} Istanbul University, Institute of Forensic Sciences, Istanbul, Turkey

^{b)} Ministry of Justice, Council of Forensic Medicine, Istanbul, Turkey

^{c)} Istanbul University, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey

TÜRKİYE'DE ALYUVAR ADENİLAT KİNAZ 1 POLİMORFİZMİ

Özet

Biyolojik babanın saptanması ve vücut sıvılarının individualizasyonu amacıyla Türkiye'de alyuvar adenilat kinaz 1 (AK1) enzim sisteminin fenotip dağılımı ve gen frekansları araştırıldı. Bu amaçla akrabalık ilişkisi bulunmayan 359 kişi incelendi. Adenilat kinaz 1 sistemi için elde edilen alel frekansları şöyledir:

$AK1*1 = 0.954 \pm 0.008$ ve $AK1*2 = 0.046 \pm 0.008$ ($\chi^2 = 0.0731$; D.F. = 1; $0.7 < p < 0.8$).

Summary

A sample of 359 unrelated individuals from Turkey was studied for the red-cell adenylate kinase 1 (AK1) polymorphism. The following allele frequencies were observed: for $AK1*1 = 0.954 \pm 0.008$ and $AK1*2 = 0.046 \pm 0.008$ ($\chi^2 = 0.0731$; D.F. = 1; $0.7 < p < 0.8$).

Key words: Red-cell adenylate kinase - Polymorphism - Turkey

INTRODUCTION

Red blood cell adenylate kinase 1 (AK1) polymorphism has been used successfully for blood and bloodstain individualization in criminalistic laboratories (1-3). Although there are some rare phenotypes reported, generally the three distinct phenotypes of AK1 are AK 1-1, AK 2-1 and AK 2-2, directed by two common autosomal alleles $AK*1$ and $AK*2$ (4,6). Due to the fact that it is a very stable enzyme in various conditions, conventional electrophoresis methods give satisfactory results and there are several methods proposed by different studies (3,7,8). There is a good amount of information about AK allele frequencies in European, American and some Asiatic nations available, however there has been very limited work done on the genetic polymorphism of red-cell AK1 in Turkey (9,10).

Adli Tıp Derg., 6, 69 - 71 (1990)

The purpose of the following study was to estimate gene frequencies of the enzyme in order to be used in criminalistic cases and paternity disputes. Part of this work was published elsewhere (11,12).

MATERIAL and METHODS

Blood samples of 359 unrelated individuals were examined for AK1 phenotypes.

Hemolysates were prepared by first centrifuging the fresh blood samples that were taken with sodium citrate as anticoagulant and separating the plasma. The red blood cells were diluted to a ratio of 1:2.5 with distilled water, frozen and then thawed twice to achieve complete lysis and stored in -20°C till the date of investigation which was within a week after the collection of the samples.

AK1 was phenotyped by conventional cellulose acetate electrophoresis using a 0.014 M phosphate buffer, pH 6.25 both as tank and membrane buffers. Electrophoresis was performed at a constant voltage of 300 V for 45 min, at room temperature. The staining was carried according to *Grunbaum* as modified by *Abacı* (11). The reaction mixture consisted of 38 mg adenosine-5-diphosphate, 190 mg dextrose, 12 mg nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), 8.75 units glucose-6-phosphate dehydrogenase, 7.0 units hexokinase, 2 mg 3-(4,5-dimethyl thiazolyl-2)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) tetrazolium, and 2 mg phenazine methosulphate (PMS) dissolved in 15 ml of 0.014 M phosphate buffer (pH 6.25). 200 mg agar were dissolved in 10 ml of the same buffer and the two solutions were mixed when the latter was 55°C. The above reaction mixture was then poured to square petri dishes. After it solidified it was incubated with the cellulose acetate membrane of the electrophoretic run for 10 minutes. The adenylate kinase isoenzymes are visible as blue bands on a clear background.

Gene frequencies were calculated by gene counting and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium by χ^2 .

Table I. Phenotype and gene frequencies of red-cell adenylate kinase 1 in Turkey

<i>Genotypes</i>	<i>Observed</i>	<i>Expected</i>	<i>Allele Frequencies</i>
AK 1-1	326	326.73	AK1*1 = 0.954±0.008
AK 2-1	33	31.50	AK1*2 = 0.046±0.008
AK 2-2	0	0	
$\chi^2 = 0.0731$; D.F. = 1 ; $0.7 < p < 0.8$			

RESULTS and DISCUSSION

The gene frequency distribution of the enzyme found to be as follows: $AKI*1 = 0.954 \pm 0.008$ and $AKI*2 = 0.046 \pm 0.008$ (Table I). Observed and expected values confirmed with *Hardy-Weinberg* equilibrium ($\chi^2 = 0.0731$) The phenotype distribution of 359 unrelated adults from all parts of Turkey is comparable with that found in other European populations. These results are also consistent with the AK1 gene frequencies presented by *Hummel et al* (9), which is concerned about gene frequencies in Turkish people living in Germany ($AKI*1 = 0.9580$, $AKI*2 = 0.420$, $n = 274$) and *Menevşe* and *Ülküer* ($AKI*1 = 0.969$, $AKI*2 = 0.031$, $n = 116$) (10).

REFERENCES

- 1 Culliford, B.J., Wraaxall, B.G.D. (1968) *J. Forensic Sci. Soc.*, **8**, 79-80
- 2 Saenger, M.S., Yates, R.G. (1975) *J. Forensic Sci.*, **20**, 643-645.
- 3 Stombaugh, P.M., Kearney, J.J. (1977) *J. Forensic Sci.*, **22**, 3, 590-594.
- 4 Stedman, R. (1972) *J. Forensic Sci. Soc.*, **12**, 379-413.
- 5 Fildes, R.A., Harris, H. (1966) *Nature*, **209**, 261-263.
- 6 Bowman, J.E., Frischer, H., Ajmar, F., Carson, P.E., Gower, M.K. (1967) *Nature*, **214**, 1156-1158
- 7 Rosalki, S.B. (1970) *Clin. Chim. Acta*, **27**, 497-499
- 8 Grunbaum, B.W. (1981) *Handbook of Forensic Individualization of Human Blood and Bloodstains*. Sartorius GmbH, Göttingen.
- 9 Hummel, K., Pulverer, G., Schaal, K.P., Weidman, V. (1980) *Hum. Genet.*, **8**, 303-333.
- 10 Menevşe, S., Ülküer, Ü. (1989) *Birinci Ulusal Prenatal Teşhis ve Anadolu'nun Genetik Yapısı Sempozyumu*, Tebliğ Özetleri, Anadolu Üniversitesi, s. 208, Eskişehir.
- 11 Abacı, E. (1989) *Türk Popülasyonunda Adenilat Kinaz Enzim Sistemi Gen Frekanslarının Dağılımı* (Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Istanbul University, Specialization Thesis in Biochemistry) Istanbul.
- 12 Türkoğlu, M. (1990) *Türk Popülasyonunda Adenilat Kinaz İzozimlerinin Gen Frekansları* (Institute of Forensic Sciences, Istanbul University, Masters Thesis in Forensic Sciences), Istanbul.

Reprints request to:

Prof. Dr. Sevil Atasoy
 İstanbul Üniversitesi
 Adli Tıp Enstitüsü
 34246 Cerrahpaşa, İstanbul
 Turkey

Zum Begleitstoffmuster cubanischer alkoholischer Getränke

WOLFGANG HUCKENBECK, PETER FREUDENSTEIN, WOLFGANG BONTE

Institut für Rechtsmedizin, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Bundesrepublik Deutschland

KÜBA'DA ÜRETİLEN ALKOLLÜ İÇKİLERDE ETANOLE EŞLİK EDEN MADDELER

Özet

Her alkollü içki belli oranda etanolün yanı sıra , o içki türüne özgü olan oranlarda eşlik eden maddeler (metanol, propanol-1, izobutanol ve 3-metil-butanol-1) de içerir. Alkol kullanmış olan bir kişinin kan analizlerinde eşlik eden maddeler 'in düzeyleri belirlendikten sonra, bunların birbirlerine olan oranları hesaplandığında, kişinin ne tür bir içki tükettiğine karar verilebilir. Bu durum özellikle alkol etkisi altında işlenen trafik suçlarında geri hesap yapabilmek açısından büyük önem taşır. Bu nedenle dünya piyasalarında bulunan içki çeşitlerinin yapısal özelliklerinin saptanması gerekir. Bulguları sunulan bu araştırmada Küba'da üretilen 24 rom çeşidi ile, 11 değişik likör, 2 viski, 1 votka , 1 cin ve 4 ayrı şarabın etanol, metanol, propanol-1, izobutanol ve 3-metil-butanol-1 derişimleri kapiler gaz kromatografi yöntemiyle saptandı. Elde edilen sonuçlar, literatürde bu tür içkiler için verilen değerlerle karşılaştırıldığında, Küba üretimi içkilerin eşlik eden maddeler açısından normal değerlerden sapmadığı ve kan analizi sonuçlarından yola çıkarak tüketilen içki niteliğinin güvenilir bir şekilde belirlenebileceği sonucuna varıldı.

Zusammenfassung

Der vorliegenden Studie liegen die Untersuchungen von insgesamt 51 in Cuba erworbenen alkoholischen Getränken zugrunde. Obwohl zur Abklärung von Nachtrunkbehauptungen meist nur die Begleitstoffmuster relativ hochprozentiger Spirituosen von Bedeutung sind, wurden der Vollständigkeit halber auch Liköre und insbesondere Biere mituntersucht. Es fanden sich Ergebnisse, die innerhalb der für jede Getränkeart erwarteten Wertebereiche lagen. Vergleiche mit früheren Untersuchungen an karibischen Getränken ergaben, daß sich cubanische und puerto-ricanische Rumsorten auch vom Begleitstoffmuster her zusammenfassen lassen und die für dieses Getränk entscheidenden Stoffe (Methanol, Propanol-1, Isobutanol und 3-Methyl-Butanol-1) einer Normalverteilung unterliegen.

EINFÜHRUNG

In der Bundesrepublik Deutschland werden nach Trunkenheitsfahrten mit anschließender Entfernung vom Unfallort in nicht zu unterschätzender Zahl während der Gerichtsverhandlung sogenannte Nachtrunkbehauptungen geltend gemacht. Der Beschuldigte gibt die Einlassung, er habe erst nach dem Unfall -etwa aus Schreck oder Angst- Alkohol zu sich genommen. Infolge der meist nur kurzen zur Verfügung stehenden Zeitspanne und des meist recht hohen gewünschten Nachtrunk-Anteils an der festgestellten Blutalkoholkonzentration spielen hier in der Regel nur höher prozentige Spirituosen eine Rolle.

Adli Tıp Derg., 6, 73 - 80 (1990)

Mit der Entwicklung der sogenannten Begleitstoffanalyse (1-16) wurde eine Möglichkeit geschaffen, solche Einlassungen mit wissenschaftlichen Methoden zu überprüfen. Für den Sachverständigen ist es dabei natürlich von Bedeutung, das Getränk bzw. dessen Begleitstoffmuster zu kennen. Daher zielten zahlreiche frühere Untersuchungen darauf ab, die Begleitstoffmuster möglichst vieler alkoholischer Getränke zu untersuchen und -wenn möglich-, eine Normalverteilung zu berechnen (6).

Mit zunehmendem Bekanntheitsgrad der Begleitstoffanalyse wurde die Methodik dieser Untersuchung aber selbst für den Laien durchschaubarer und so mehrten sich die Fälle, in denen der Nachtrunk exotischer Spirituosen vorgegeben wird. Solche Getränke finden insbesondere durch Urlaubsreisen Eingang in die Hausbar des Normalverbrauchers. Infolge der steigenden bundesdeutschen Urlaubsreisen nach Cuba (die Noch-DDR war schon immer -wenn auch in kleinerer Zahl- dort vertreten) bot sich daher eine Untersuchung kubanischer Getränke, über die noch keinerlei Erkenntnisse vorlagen, an.

MATERIAL und METHODE

Die Probensammlung erfolgte im Sommer 1989 in Cuba. Erfasst wurden sämtliche Alkoholika, die käuflich zu erwerben waren. Die Analysen wurden mittels eines Sigma 2000-Gaschromatographen durchgeführt. Wir benutzten die bereits früher beschriebene Methode (6,7): Kapillarsäulen-Split, Kryofokussierung.

ERGEBNISSE und DISKUSSION

Das Spektrum der in Cuba hergestellten alkoholischen Getränke stellte sich -zumindestens für unsere Erwartungen- als recht weit gefächert dar. Im Handel fanden sich 24 Rumsorten (davon 5 aus Nicaragua importiert), 11 unterschiedliche Liköre, dazu Whisky, Wodka, Cin, Branntwein, Wein und Bier in geringerer Anzahl.

Liköre werden allgemein durch Mischung von Alkohol, Wasser, Zucker, Extrakten und/oder natürlichen ätherischen Ölen hergestellt. Man unterscheidet so Fruchtliköre, Kräuter-, Gewürz- und Bitterliköre, Kakao-, Kaffee- und Teeliköre, sowie Emulsionsliköre (6). Ähnlich weitgefächert zeigt sich auch das cubanische Angebot an Likören. Die Tabelle I zeigt die Begleitstoffmuster, der von uns untersuchten Liköre. Vergleicht man diese Ergebnisse mit früheren Untersuchungen (6), so ergeben sich für die cubanischen Getränke keine Besonderheiten, der Begleitstoffgehalt beschränkt sich -wie allgemein üblich- hauptsächlich auf den Methanol. In Cuba wird überraschenderweise auch Whisky hergestellt. Die zwei untersuchten Marken (Tabelle II) erwiesen sich als relativ begleitstoffreich, wobei einem relativ niedrigen Methanol-Spiegel beachtliche Konzentrationen an Propanol-1 und insbesondere an 3-Methyl-Butanol-1 gegenüberstehen. Der Gehalt an Isobutanol ist -verglichen mit den Befunden an Scotch, Irish und US-Whisky-, eher als niedrig einzustufen, wenn er auch den Gehalt des canadischen Whisky zu übersteigen scheint (6).

Tabelle I. Ethanolgehalt und Begleitstoffmuster cubanischer Liköre

(Begleitalkohole in mg/l)

Marke	Eth Vol %	Eth g/l	Met	P-1	B-1	IsB	3MB1
<i>HAVANA CLUB MARASQUIN</i>	31,8	254	19	-	-	-	-
<i>HAVANA CLUB MENTA ESPECIAL</i>	23,5	188	21	-	-	-	-
<i>HAVANA CLUB MENTA</i>	27,5	220	10	4	-	-	-
<i>HAVANA CLUB DIABOLICO</i>	24,2	194	9	22	-	28	72
<i>HAVANA CLUB CITRICO TROPICAL</i>	32,3	258	11	18	-	-	-
<i>HAVANA CLUB LIMETTE</i>	18,8	150	15	8	-	-	-
<i>HAVANA CLUB BANANA</i>	33,5	268	13	14	-	-	-
<i>HAVANA CLUB POMELO</i>	24,3	194	12	4	-	-	-
<i>HAVANA CLUB ANANAS</i>	27,5	220	57	6	-	-	-
<i>HAVANA CLUB CACAO</i>	22,5	180	8	-	-	-	-
<i>GUYABITA DEL PINAR -seca-</i>	36,8	294	18	-	6	-	-

Eth = Ethanol, Met = Methanol, P-1 = Propanol-1, B-1 = Butanol-1, IsB = Isobutanol,
3MB1 = 3-Methyl-Butanol-1

Die zwei uns bekannt gewordenen Wodka-Produkte erfreuen sich keiner großen Verbreitung in Cuba (Tabelle II). Wie ihr Begleitstoffmuster zeigt, handelt es sich wohl um eine identische alkoholische Grundsubstanz, der nur unterschiedliche Aromastoffe zugefügt werden. Verglichen mit den Befunden früherer Untersuchungen (6) an unterschiedlichen Wodka-Sorten ist der Methanolgehalt als eher hoch zu bezeichnen, die übrigen Begleitstoffe finden sich -wie üblich- gar nicht oder nur in geringen Konzentrationen.

Tabelle II. Ethanolgehalt und Begleitstoffmuster cubanischer Spirituosen
(Begleitalkohole in mg/l)

Marke	Eth Vol %	Eth g/l	Met	P-1	B-1	IsB	3MB1
WHISKY							
OLD HAVANA BLENDED	37,2	298	42	210	8	224	518
OLD HAVANA SUPERIOR	39,0	312	36	170	6	186	474
WODKA							
HAVANA CLUB							
VODKA CON NARANJA	35,5	284	15	10	6	-	-
HAVANA CLUB							
VODKA CON LIMONE	35,5	284	15	10	6	-	-

Gin scheint sich in Cuba keiner großen Beliebtheit zu erfreuen, die einzige (seinerzeit) erhältliche Marke (Tabelle III) weist ein eher bescheidenes Begleitstoffmuster auf und liegt im unteren Drittel der bereits bekannten Begleitstoffmuster dieses Getränkes (6).

Die Branntweine (Aguardiente) erweisen sich da schon als begleitstoffreicher (Tabelle III). Leider war die Ausgangssubstanz nicht feststellbar, da die Produkte durch Aroma-Zugabe geschmacklich verändert waren.

Obwohl Cuba kein traditionelles Weinland ist, und der Weinbedarf über Importe aus vornehmlich östlichen Ländern gedeckt wird, konnte ein Vermuth-Wein cubanischer Herstellung untersucht werden. Beim Vergleich mit bekannten Daten anderer Hersteller (6) erweist sich das Begleitstoffmuster als nicht ungewöhnlich (Tabelle III).

Mehr der Vollständigkeit halber wurden auch die cubanischen Biere in die Untersuchung miteinbezogen. Die sieben verbreiteten Marken zeigten einen Ethanolgehalt von 3,4 bis 5,0 Vol. % und ein Begleitstoffmuster, das als für Bier typisch bezeichnet werden muß (Tabelle IV).

Tabelle III. Ethanolgehalt und Begleitstoffmuster cubanischer Spirituosen
(Begleitalkohole in mg/l)

Marke	Eth Vol %	Eth g/l	Met	P-1	B-1	IsB	3MB1
GIN							
<i>GINEBRA CUBAY SECA</i>	44,2	354	49	18	-	-	-
BRANNTWEIN (AQUARDIENTE)							
<i>SC GREEN LABEL</i>	39,2	314	16	124	4	100	350
<i>BOCOY LIMON</i>	27,5	220	22	30	-	50	138
<i>BOCOY NARANJA 266</i>	25,0	200	17	52	2	98	
WEIN							
<i>DOMANI VINO VERMOUTH</i>							
<i>ROJO DULCE</i>	13,3	106	27	15	1	20	23

Das Hauptinteresse galt dem cubanischen Rum. Allgemein muß bemerkt werden, daß über den karibischen Rum einige Unklarheiten vorherrschen. Für wissenschaftliche Untersuchungen als erschwerend erwies sich immer wieder, daß es sich bei den in Europa erhältlichen Sorten meist um Verschnitte (eigentlich Mischungen) handelt. Daher empfahl sich besonders hier eine Probensammlung vor Ort. Vom Geschmack her allerdings bestehen Zuordnungen, die Produkte aus den ehemals spanischen Departments Cuba und Puerto Rico werden als " trocken, mit leichtem Körper " zusammengefaßt und von den Rumsorten aus Jamaica, Martinique etc. abgegrenzt. Die Tabelle V zeigt unsere Ergebnisse der Analysen. Deutlich zeigt sich auch hier eine Abgrenzung der cubanischen Destillate von den Importprodukten aus Nicaragua, denen allerdings im cubanischen Handel durchaus Verbreitung zukommt.

Zieht man nun die früheren Untersuchungen an Rum aus Puerto-Rico und Jamaica (6) zum Vergleich heran, so ergibt sich, daß sich die Produkte aus Cuba und Puerto-Rico zusammenfassen und von den übrigen Herkunftsregionen abgrenzen lassen. Die insgesamt 24 Rumsorten folgen einer Normalverteilung und für die wichtigsten Begleitstoffe ergeben sich die folgenden Mittelwerte (mg/l) : Methanol = $24,96 \pm 15,23$; Propanol-1 = $42,17 \pm 18,58$; Isobutanol = $48,08 \pm 13,19$; 3-Methyl-Butanol-1 = $158,58 \pm 63,15$.

Tabelle IV. Begleitstoffe cubanischer Biere

(Begleitalkohole in mg/l)

Marke	Eth Vol %	Eth g/l	Met	P-1	B-1	IsB	3MB1
<i>TROPICA</i>	5,0	40.0	5	11	-	12	42
<i>CRISTAL</i>	4,3	34.0	4	8	2	9	43
<i>POLAR</i>	4,2	33.8	4	11	2	11	36
<i>BUCANERO</i>	4,3	34.4	6	8	1	7	38
<i>HATUEY</i>	5,0	40.0	5	18	2	17	48
<i>TINIMA</i>	4,8	38.0	8	14	2	8	34
<i>MANACAS</i>	3,4	27.0	5	12	2	4	27

Faßt man die vorgelegten Ergebnisse zusammen, so ergibt sich, daß die Begleitalkohole cubanischer Getränke innerhalb der Erwartungswerte für die jeweilige Getränkeart liegen. Es ergaben sich keine aus dem Rahmen fallenden Befunde. Der mit solch exotischen Nachtrunkbehauptungen beschäftigte Sachverständige kann bei detaillierten Angaben mit den vorgelegten Analysenergebnissen rechnen, bei allgemeiner gehaltenen Angaben kann er den Erwartungsbereich abschätzen.

Nebenbefundlich ergab sich -aus alkohol-historischer Sicht interessant-, daß sich die Rumsorten aus Cuba und Puerto-Rico nicht nur geschmacklich sondern auch begleitstoffmäßig zusammenfassen lassen. Als eine der möglichen Ursachen bietet sich die historische Gemeinsamkeit beider Inseln, die Zeit spanischen Kolonialherrschaft an.

Tabelle V. Gehalt an Ethanol und Begleitalkoholen im cubanischen Rum
(Begleitalkohole in mg/l)

Marke	Eth Vol %	Eth g/l	Met	P-1	B-1	IsB	3MB1
HAVANA CLUB LIGHT & DRY	38,0	304	19	72	-	56	146
HAVANA CLUB 3 ANOS	38,5	308	19	38	-	54	138
HAVANA CLUB 5 ANOS	37,2	298	22	48	-	62	236
HAVANA CLUB 7 ANOS	38,7	310	29	24	-	62	264
HAVANA CLUB EXQUISITO	38,0	304	20	28	4	56	126
CUBANO BUCANERO							
CARTA ORO	37,5	300	31	64	10	62	160
CUBANO BUCANERO							
CARTA BLANCA	37,8	302	26	28	-	52	196
CUBANO BUCANERO 7 ANOS	37,8	302	35	64	10	66	154
CARIBBEAN CLUB							
CARTA BLANCA 3 ANOS	37,5	300	20	24	-	52	212
CARIBBEAN CLUB							
CARTA ORO 5 ANOS	36,8	294	12	48	6	48	150
VC CARTA BLANCA	37,8	302	16	18	-	34	108
ANEJO LEGENDARIO	39,0	312	19	22	-	56	186
VARADERO 7 ANOS	37,5	300	18	32	-	36	188
DORADO SANTA CRUZ	31,0	248	29	24	-	52	132
CANEY ANEJO	40,0	320	28	56	-	64	260
PUERTO PRINCIPA							
CARTA BLANCA	36,9	295	16	40	-	48	142
PALMAS PATRICRUZADO	38,0	304	21	18	-	18	62
MATUSALEM	38,5	308	21	68	-	62	266
CANEY DARK DRY	40,3	322	18	54	4	40	242
FLOR DE CANA SUPERIOR*	38,0	304	47	240	8	62	264
FLOR DE CANA*	39,3	314	19	24	4	12	4
FLOR DE CANA ORO*	39,8	318	26	112	-	44	2
FLOR DE CANA							
RESERVA ESPECIAL*	41,3	330	28	144	-	66	6
FLOR DE CANA							
ORO 4 ANOS*	39,8	318	28	96	-	48	16

* Importprodukte aus Nicaragua

als Vortrag gehalten auf der 4. Tagung der *Regionalgruppe Mitte* und der *Regionalgruppe Nord* der Gesellschaft für Gerichtliche Medizin der DDR, 14./15.3.1990 in Rostock

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Bonte, W., Stöppelmann, G., Rüdell, E., Sprung, R. (1981) *Blutalkohol*, **18**, 303-310.
- 2 Bonte, W., Rüdell, E., Frauenrath, C., Blanke, E., Kupilas, G., Wochnik, J., Zäh, G. (1981) *Blutalkohol*, **18**, 399-411.
- 3 Bonte, W., Sprung, R., Rüdell, E., Frauenrath, C., Blanke, E., Kupilas, G., Wochnik, J., Zäh, G. (1981) *Blutalkohol*, **18**, 412-426.
- 4 Bonte, W., Rüdell, E., Sprung, R., Frauenrath, C., Facius, H., Reihs, U., Walther, W. (1983) *Blutalkohol*, **20**, 313-327.
- 5 Bonte, W., Sprung, R., Jürgens, H., Manigold, J., Olbrich, P., Pahl, W. (1983) *Zbl. Rechtsmed.*, **25**, 368.
- 6 Bonte, W. (1987) *Begleitstoffe alkoholischer Getränke - Biogenese, Vorkommen, Pharmakologie, Physiologie und Begutachtung*, Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissenschaftlichen Kriminalistik, Band 17, Schmidt Römhild Verlag, BRD.
- 7 Bonte, W. (Hrsg.) (1987) *Congener alcohols and their medicolegal significance*, Proceedings of the International Workshop on Congeners of Alcoholic Beverages, 6-7 September 1987, Düsseldorf.
- 8 Huckenbeck, W., Freudenstein, P., Bonte, W. (1990) *Zum Begleitstoffgehalt in Cuba erhältlicher Getränke*, 4. Tagung der Regionalgruppe Mitte und der Regionalgruppe Nord der Gesellschaft für Gerichtliche Medizin der DDR, 14./15.3.1990, Rostock.
- 9 Iffland, R., Staak, M., Rieger, S. (1982) *Blutalkohol*, **19**, 235-251.
- 10 Kühnholz, B., Bonte, W. (1983) *Blutalkohol*, **20**, 399-410.
- 11 Kühnholz, B., Bonte, W., Nowag, K. (1983) *Zbl. Rechtsmed.*, **25**, 369.
- 12 Kühnholz, B., Wehner, H.D., Bonte, W. (1984) *Blutalkohol*, **21**, 308-318.
- 13 Rüdell, E., Bonte, W., Sprung, R., Kühnholz, B. (1983) *Beiträge gerichtl. Med.*, **41**, 211-218.
- 14 Sprung, R., Bonte, W., Jürgens, H., Manigold, J., Olbrich, P., Pahl, W. (1983) *Zbl. Rechtsmed.*, **25**, 369.
- 15 Sprung, R., Bonte, W., Rüdell, E. (1983) *Beiträge gerichtl. Med.*, **41**, 219-222.
- 16 Sprung, R., Frauenrath, C., Rüdell, E., Bonte, W. (1981) *Blutalkohol*, **18**, 311-314.

Korrespondenzautor:

Prof.Dr. W. Huckenbeck
 Institut für Rechtsmedizin
 Heinrich-Heine-Universität
 4000 Düsseldorf, BRD