T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ /
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

TÜRK TOPLUMUNDAKİ RHD VARYANTLARININ GENOTİPLENDİRİLEREK SEROLOJİK TANI İLE KORELASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

LEVENT TUFAN KUMAŞ

DOKTORA TEZİ

BURSA-2022

LEVENT TUFAN KUMAŞ (TIP) MİKROBİYOLOJİ / İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ 2022

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ / İMMÜNOLOJİ
ANABİLİM DALI

TÜRK TOPLUMUNDAKİ RHD VARYANTLARININ GENOTİPLENDİRİLEREK SEROLOJİK TANI İLE KORELASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Levent Tufan KUMAŞ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL

Proje No: UAP(T) – 2011/54

BURSA-2022

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak sunduğum "Türk Toplumundaki RhD Varyantlarının Genotiplendirilerek Serolojik Tanı İle Korelasyonunun Araştırılması" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Levent Tufan Kumaş

30.06.2022

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

30/06/2022

Adı Soyadı: Levent Tufan KUMAŞ

Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji/İmmünoloji

Tez Konusu: Türk Toplumundaki RhD Varyantlarının Genotiplendirilerek Serolojik Tanı İle Korelasyonunun Araştırılması

ÖZELLİKLER	**UYGUNDUR**	**UYGUN DEĞİLDİR**	**AÇIKLAMA**
Tezin Boyutları	☒	❑	
Dış Kapak Sayfası	☒	❑	
İç Kapak Sayfası	☒	❑	
Kabul Onay Sayfası	☒	❑	
Sayfa Düzeni	☒	❑	
İçindekiler Sayfası	☒	❑	
Yazı Karakteri	☒	❑	
Satır Aralıkları	☒	❑	
Başlıklar	☒	❑	
Sayfa Numaraları	☒	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	☒	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	☒	❑	
Kaynaklar	☒	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. H. Barbaros ORAL

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak
İç Kapak
ETİK BEYANI II
KABUL ONAY III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU IV
İÇİNDEKİLER V
TÜRKÇE ÖZET VI
İNGİLİZCE ÖZET VII
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
3. GEREÇ ve YÖNTEM 10
3.1. Rh tiplendirme **11**
3.2. Rh subtiplendirme **12**
3.3. Zayıf D testi **12**
3.4. Basit seroloji **13**
3.5. İleri seroloji **13**
3.6. Moleküler tiplendirme **14**
3.7. İstatistiksel analiz **16**
4. BULGULAR 18
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 21
6. KAYNAKLAR 25
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 29
8. EKLER 30
9. TEŞEKKÜR 32
10. ÖZGEÇMİŞ 33

TÜRKÇE ÖZET

Güçlü immün yanıt oluşturma potansiyeli nedeniyle "RhD", en önemli eritrosit antijenlerinden biridir. Bazı *RHD* mutasyonları "varyant D" fenotiplere neden olur. RhD varyasyonları "Zayıf D" ve "Parsiyel D" olmak üzere iki ana gruba ayrılır.

RhD varyasyonlarının, bağışçılarda, hastalarda ve gebelerde doğru tiplendirilmesi önemlidir. Hatalı bir şekilde Rh (-) veya Rh (+) olarak saptanmaları anti-D alloimmünizasyonuna, hemolitik transfüzyon reaksiyonlarına ve gebelerde yenidoğanın hemolitik hastalığına (YDHH) yol açabilir. Bu nedenle hastalar ve gebelerde zayıf D/ parsiyel D ayrımının doğru yapılması son derece önemlidir. Zayıf D ve parsiyel D gibi RhD varyasyonlarının belirlenmesinde, genotiplendirme referans yöntem olarak kabul edilir. Ancak D antijeninin farklı epitoplarına karşı üretilmiş monoklonal anti-D antikorlar kullanılarak, serolojik tiplendirme yapılabileceği öne sürülmektedir.

Çalışmamızda öncelikle bölgemizde sık görülen "RhD varyasyonlarını genotiplendirme ile belirlemeyi amaçladık. Ayrıca, rutin kan gruplamada "RhD varyant" olarak belirlenen bu örnekler, poliklonal (human) ve çeşitli monoklonal anti-D antikorlar kullanılarak serolojik yöntemle de tiplendirildi. Serolojik yöntemle elde edilen sonuçlar, etkinlik ve güvenilirlik açısından genotiplendirme ile karşılaştırıldı.

Çalışmamızda değerlendirilen varyant D örneklerde "zayıf D" %48,8, parsiyel D ise %51,2 sıklıkta bulunmuştur. En sık görülen varyasyonlar "zayıf D tip 1" ve "zayıf D tip 15" olarak belirlenmiştir. Gerek zayıf D - parsiyel D ayrımı, gerekse RhD varyasyonlarının tiplendirilmesi amacıyla serolojik yöntemle elde edilen sonuçlar, genotiplendirme sonuçları ile karşılaştırıldığında etkin ve güvenilir bulunmamıştır.

Anahtar Sözcükler: RhD varyasyonları, zayıf D, parsiyel D, RhD genotiplendirme, moleküler kan grubu tiplendirme.

İNGİLİZCE ÖZET

GENOTYPING RHD VARIATIONS IN TURKISH POPULATION AND INVESTIGATE THE CORRELATION OF MOLECULAR RESULTS WITH SEROLOGIC IDENTIFICATION

Due to its strong immunogenicity, “RhD” is the most important erythrocyte antigen after ABO antigens. Some mutations in the *RHD* gene lead to "D variant" phenotypes. RhD variations are categorized in two main groups as “Weak D” and “Partial D”.

Incorrect detection of RhD variations as Rh(-) in the donor or Rh(+) in the recipient can lead to hemolytic transfusion reactions, anti-D alloimmunization, and hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN). In order to prevent the risk, it is recommended to make a weak D/partial D differentiation in patients and pregnant women. Molecular typing is accepted as the reference method for weak D and partial D discrimination. However, it is also accepted that a safe distinction can be made by serological method using panels of monoclonal antibodies.

The aim of this study was to determine the most frequent RhD variations in our country and to compare the reliability of the serological method with the molecular method in typing RhD variations.

In our study, the frequency of weak D and partial D was found to be close to each other (48.8% - 51.2% respectively), and the most common weak D variation was found to be "weak D type 1" and partial D variation as "weak D type 15". When molecular typing is taken as the gold standard, it has been shown that weak D/partial D discrimination and partial D typing cannot be reliably performed by serological method.

Keywords: RhD variants, weak D, partial D, RhD genotyping, molecular blood group typing

1. GİRİŞ

Antijenik farklılıklara bağlı olarak gelişen alloimmünizasyon ve hemolitik transfüzyon reaksiyonları ciddi transfüzyon komplikasyonlarındandır ve güvenli kan transfüzyonu önündeki en önemli engellerden biridir. Günümüzde 43 farklı Kan Grubu Sistemi ve 360'dan fazla eritrosit antijeni tanımlanmıştır. Avusturyalı bilim insanı Karl Landsteiner, kan grubu sistemleri içerisinde güvenli kan transfüzyonu için en önemlisi kabul edilen ABO kan grubu sistemi ve antijenlerini bulmuş ve ilk kez 1901 yılında yayınlamıştır. Doğum sonrasında, ortalama ilk 6 ay içerisinde, mikroorganizmalar ve besinlerde bulunan A- ve B-benzeri antijenlerle karşılaşma sonucunda, bebek kan grubuna göre (kendinde bulunmayan antijenlere karşı) "izohemaglütinin" olarak da adlandırılan anti-A ve anti-B antikorlar gelişir. Bu izohemaglütininlerin akut hemolitik transfüzyon reaksiyonuna (HTR) yol açma potansiyelleri nedeniyle, transfüzyon öncesinde ABO kan grubunun doğru saptanması ve kan grubu uyumlu transfüzyon yapılması hayati önem taşımaktadır (Smart, & Armstrong, 2020). Güçlü immün yanıt oluşturma potansiyeli nedeniyle "RhD", en önemli eritrosit antijenlerinden biridir. Bazı RHD mutasyonları "varyant D" fenotiplere neden olur. RhD varyasyonları "Zayıf D" ve "Parsiyel D" olmak üzere iki ana gruba ayrılır:

Zayıf D: RhD proteinin antijenik bütünlüğü bozulmamış, ancak hücre zarında eksprese edilen antijen sayısı azalmıştır. Rh(+) kan transfüzyonu yapılan zayıf D hastaların antikor yanıtı oluşturmayacakları kabul edilir.

Parsiyel D: RhD antijeninin yapısı değişmiş olduğundan, Rh(+) kan transfüzyonu yapılan parsiyel D hastalar anti-D antikor oluşturabilirler (Daniels, 2013a).

Rutin kan gruplama testinde kullanılan anti-D antikorlarla, varyant D fenotiplerde zayıf reaksiyon veya negatif sonuç gözlenebilir. Özellikle kan bağışçılarında saptanan negatif sonucun, indirekt aglütinasyon yöntemi ile bir kez daha doğrulanması gerekir. Bu nedenle RhD varyasyonlarının Rh pozitif (hasta) ya da Rh

negatif (bağışçı) olarak yanlış sonuçlandırılmaları ciddi komplikasyonlara neden olabilir. HTR ya da alloimmünizasyona neden olmamak için "RhD varyant" hastalara Rh(-) kan transfüzyonu yapılmalıdır. Yine, "RhD varyant" gebelerde alloimmünizayona bağlı yenidoğanın hemolitik hastalığı (YDHH) riski bulunduğundan profilaktik olarak Rh immünglobulin (RhIg) uygulanması önerilir. Bu güvenli yaklaşımın olumsuz yönü ise bazı gebelere (özellikle zayıf D tip 1, 2 ve 3) gereksiz yere profilaktik anti-D uygulanmasıdır. Ayrıca Rh negatif kan kaynağı yetersiz olduğundan, güvenli davranmak adına yine zayıf D tip 1, 2 ve 3 varyasyonları olan hastalara Rh negatif kan verilmesi yetersiz stoğun verimsiz kullanılmasına neden olacaktır. Eğer RhD varyasyonları tiplendirilebilirse gerek transfüzyon açısından hastalara, gerekse YDHH riski açısından gebelere doğru yaklaşımda bulunulabilinir. RhD varyasyonlarının belirlenmesinde güvenilir yöntem RHD genotiplendirmedir. Ancak RhD antijenine yönelik farklı anti-D antikorlar kullanılarak (serolojik yöntemle) "zayıf D" ya da "parsiyel D" tiplendirmesi yapılabileceği öne sürülmekte ve hatta bu amaçla kullanılan ticari kitler de bulunmaktadır (Daniels, 2013b; Sandler et al., 2015).

Tez çalışmamız iki temel amaçla gerçekleştirilmiştir: Moleküler yöntemle Bursa bölgesindeki RhD varyasyonlarını tiplendirmek ve sıklıklarını belirlemek. Bu doğrultuda elde edilen sonuçlar gelecekte yapılacak çalışmalara da önemli bir veri desteği sağlayacaktır. Ayrıca, rutin kan gruplamada "RhD varyant" olarak belirlenen bu örnekleri, poliklonal (human) ve çeşitli monoklonal anti-D antikorlar kullanarak serolojik yöntemle de tiplendirip RHD genotiplendirme sonuçlarıyla korelasyonunu araştırmak.

2. GENEL BİLGİLER

Rh kan grubu sistemi, 56 antijen içeren en karmaşık kan grubu sistemidir. Bu antijenler, birinci kromozomda birbirine yakın komşulukta yer alan iki ayrı gen (*RHD* ve *RHCE*) tarafından kodlanan iki ayrı protein (RhD ve RhCE) üzerinde bulunur (Daniels, 2013a). Güçlü immün yanıt oluşturma potansiyelinden dolayı rutin kan gruplama testlerinde ABO antijenlerine ek olarak "D" antijeni de tiplendirilir. Ancak yukarıda da anlatıldığı gibi, çeşitli antijenik varyasyonlarının bulunmasından dolayı özel durumlarda doğru kan bileşenlerinin seçilmesi ve gebelikte YDHH yönetiminde doğru yaklaşımın belirlenmesi açısından ayrıca önemlidir. Bu nedenle Rh kan grubu sisteminin tanımlanması, genetik, yapısal ve antijenik özelliklerinin kısaca anlatılması yararlı olacaktır.

Rh kan grubu sistemine ilişkin ilk gözlem Levine ve Stetson tarafından 1939'da New York'ta yapıldı. Doğum sonrası kanaması olan bir kadın hastaya eşinden alınan alınan kan verilmiş ve sonrasında da hemolitik transfüzyon reaksiyonu gözlenmiştir. Başka ABO uyumlu kanlarla da %80 oranında uyumsuzluk gösteren bu antikorun daha sonra anti-D olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra Landsteiner ve Wiener, rhesus maymun eritrositleriyle tavşanlarda yaptıkları deneyler sonucunda bu antikoru anti-rhesus olarak adlandırdılar. Ancak tavşanlardan elde edilen anti-rhesus antikorlarla insan kaynaklı antikorların, benzer serolojik ilişkileri görülmesine rağmen farklı antijenik hedefleri olan antikorlar oldukları anlaşıldı. "Anti-rhesus" antikorların, eritrosit hücre zarındaki ICAM4 (intercellular adhesion molecule 4) molekülüne karşı geliştiği anlaşılınca "anti-LW" (Landsteiner-Wiener) olarak yeniden adlandırıldı. Dolayısıyla insan kaynaklı antikorlar anti-D, yeni belirlenen kan grubu sistemi ise "Rh" olarak isimlendirildi. Daha sonra gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalar, iki ayrı loküs teorisini (Tippet) [(D-d), (C-c ve E-e)] destekledi (Avent, & Reid, 2000).

"D" antijeni Rh kan grubu sisteminin en önemli antijeni olmakla birlikte, aşağıda da ayrıntılı olarak belirtildiği gibi, gebelerde ve sık/sürekli kan alan hastalarda antikor

gelişimine neden olan C, c, E ve e antijenleri de transfüzyon tıbbı açısından önem taşımaktadır. Eritrosit antijenlerinin tanımlanmasında standardizasyonu sağlamak amacıyla Uluslararası Kan Transfüzyonü Derneği (International Society of Blood Transfusion, ISBT) tarafından sayısal bir adlandırma sistemi önerilmiştir. Ancak Rh haplotiplerini adlandırmada Wiener ve Fisher-Race terminolojisi yaygın olarak kullanılmaktadır (Smart, & Armstrong, 2020).

Rh fenotipler, birinci kromozomda yer alan iki gen (*RHD* ve *RHCE*) tarafından belirlenir: Birbirine benzeyen (%94 dizilim benzerliği) bu iki gen 10 eksondan oluşur. Aynı kromozom üzerinde zıt yönlü konumlanmışlardır. Yakın konumlu bu iki gen arasında bir başka gen (*SMP1*) yer alır. RhD proteini *RHD* geni tarafından, RhCE proteini (dolayısıyla C/c ve E/e antijenleri) ise *RHCE* geni tarafından kodlanır (Chou, & Westhoff, 2009).

417 amino asitten oluşan RhD ve RhCE proteinleri, haplotipe bağlı olarak, birbirlerinden yaklaşık %8 farklılık gösterirler. Proteinlerin her iki ucu da sitoplazmik bölgede yer alan, çok membran geçişli (12 transmembran segment), oldukça karmaşık proteinlerdir. Altı hücre içi ve altı da hücre dışı halkadan oluşurlar. Antijenik bölgeler hücre dışı halkalarda bulunur ve bu halkaların birbirleriyle oluşturdukları kimyasal bağlar nedeniyle üç boyutlu yapısal özellikler taşırlar. Gendeki mutasyonlara bağlı olarak proteinin herhangi bir bölgesindeki amino asit değişikliği yeni antijenik yapıların oluşmasına yol açabilir. Bu nedenle, 56 farklı antijenden oluşan "Rh" en karmaşık kan grubu sistemidir (Smart, & Armstrong, 2020).

RhD ve RhCE proteinleri hücre zarında, Rh-ilişkili glikoprotein (RhAG) olarak adlandırılan, %33 benzerlik gösterdikleri bir protein ile birlikte heterotrimerik bir yapı oluştururlar. Altıncı kromozomda bulunan *RHAG* geni tarafından kodlanan RHAG bir başka kan grubu sistemidir. Hücre zarında Rh proteinlerinin ekspresyonunda RhAG önemli bir rol oynar. Eksikliği Rh antijenlerinin ekspresyonunu bozar. RhD, RhCE ve RhAG'den oluşan heterotrimerik yapı, hücre zarındaki bir protein makrokompleksinin içinde yer alır. Glikoforinler (GPA, GPB), band 3 (AE1), ICAM4 (LW) ve CD47 gibi moleküler yapılardan oluşan bu protein kompleksinin çeşitli işlevleri vardır (Peyrard, & Wagner, 2020).

RhD, RhCE ve RhAG, çok farklı canlılarda bulunan amonyum transport proteinlerine benzer yapıdadırlar. RhAG, hayvan ve bitkilerde Mep proteinleri olarak

adlandırılan amonyum taşıyıcılarla benzerlik (%25) gösterir. Rh_{null} (hücre zarında RhD ve RhCE proteinlerinin eksprese edilmeme durumu) hücrelerde transmembran amonyum taşınma hızının azaldığı gösterilmiştir. Bundan hareketle, RhAG'nin, NH_4^+ ve NH_3'ün eritrositlerin içinde taşınmasını sağlayarak amonyumun böbrek ve karaciğere taşınmasını kolaylaştırdığı ve bu mekanizmayla koruyucu bir fizyolojik işlevinin olduğu öne sürülmüştür (Westhoff, Ferreri-Jacobia, Mak, & Kevin Foskett, 2002).

Rh proteinlerinin, hüre zarından CO_2 geçişinde rol oynayabileceğini gösteren kanıtlar da vardır. Heterotrimerik Rh protein kompleksinin, içinde yer aldığı, yukarıda da tanımlanan protein makrokompleksi ile birlikte O_2/CO_2 gaz değişim işlevi olabileceği de düşünülmektedir. Hem karbonik anhidraz II (CAII), hem de hemoglobinin band 3'le bağlantılı olması, makrokompleksin, eritrositlerdeki O_2 ve CO_2 değişiminde önemli bir işlevinin olduğunu düşündürmektedir (Iwamoto, 2005).

Ayrıca, Rh_{null} bireylerde görülen stomatositoz ve sferositoz (ve buna bağlı artmış hemoliz), Rh protein kompleksinin, eritrosit membranının membran altı protein iskelete bağlanmasında ve eritrosit morfolojisinin korunmasında rol oynadığını düşündürmektedir (Burton, & Anstee, 2008).

"Rh"ın, 56 antijenden oluşan oldukça karmaşık bir kan grubu sistemi olduğu yukarıda belirtilmişti. Bu karmaşık yapının temel nedeni, Rh proteinlerini kodlayan iki farklı gen olması ve bu yakın konumlu benzer genlerde meydana gelen çeşitli mutasyonlardır. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), inzersiyon, delesyon, gen rekombinasyonlarına bağlı hibrit proteinlerin oluşması gibi çeşitli mekanizmalar antijenik çeşitliliğe neden olur (Chou, & Westhoff, 2009).

"D" antijeni, güçlü immün yanıt oluşturma potansiyeli nedeniyle Rh kan grubu sistemindeki en önemli antijendir. Anti-D, YDHH ve HTR'ye yol açan, klinik önemi olan bir antikordur. Rh(+) kan aldıklarında, Rh(-) bireylerin anti-D oluşturma olasılıkları oldukça yüksektir (%20-90). Sağlıklı bireylerde immünizasyon oranı %80-90 iken hastalarda antikor yanıtı %20-50 olarak bildirilmiştir. D antijeninin güçlü immünojenitesinin nedeni, Rh(-) bireylerde bulunmayan ve çok sayıda antijenik bölge (epitop) içeren RHD proteininin immün yanıt oluşturma potansiyelinin yüksek olmasıdır (Flegel, 2011).

Haplotipe (Eşlik eden C/c ve E/e antijenleri) göre değişmekle birlikte, Rh pozitif bir kişinin eritrosit membranında ortalama 20-30000 D antijeni bulunur.

Rh pozitif ve Rh negatif dağılımı farklı coğrafyalarda, farklı toplumlarda farklı oranlarda görülmektedir. Avrasya tek bir kıta olarak kabul edilirse doğu ucunda, Asyalı bazı topluluklarda Rh pozitif görülme sıklığı %100 iken batıda, Avrupalılarda bu oran %82-88 civarındadır.

RhD proteinin hücre zarında bulunmaması, yani D antijeninin yokluğu Rh(-) olarak tanımlanır. Bu durum çoğunlukla *RHD* geninin silinmesinden (delesyon) kaynaklanır., beyaz ırkta hemen tamamen, eşit olmayan çapraz değişim (unequal crossing-over) sonucu. Rh(-) fenotipe yol açan, daha çok siyah Afrikalılarda görülen bir başka mekanizma ise 4. eksonda 37 baz-çiftlik duplikasyonla birlikte (inzersiyon) 6. eksondaki bir nonsense mutasyona bağlı olarak ortaya çıkan erken stop kodon nedeniyle oluşan inaktif *RHD* (*RHDψ*) genidir (Flegel, 2011).

RHD geninde gerçekleşen bazı mutasyonlar ise "varyant D" olarak adlandırılan varyasyonlara yol açar. RhD varyasyonları kabaca ikiye ayrılabilir:

RhD proteininin transmembran veya hücre içi bölgelerdeki amino asit değişikliklerine yol açan mutasyonlar Zayıf D fenotiplere neden olur. Bu mutasyonlarla, D antijeninin hücre dışı yapısının değişmediği, fakat hücre yüzeyinde eksprese edilen antijen sayısının azaldığı kabul edilmektedir. Bazı varyasyonlarda eritrosit membranındaki D antijeni sayısı 300-500'e kadar azalmıştır. Bu nedenle zayıf D bireylerde yapılan kan gruplama testinde, anti-D ile negatif ya da zayıf aglütinasyon reaksiyonları gözlenebilmektedir. Proteinin ekstrasellüler bölgelerinde bir değişiklik olmadığı düşüncesiyle, zayıf D bireylerin Rh pozitif kan transfüzyonu sonrasında anti-D yanıtı oluşturmayacakları varsayılmaktaydı. Yakın zamanda biriken gözlemler, zayıf D olarak adlandırılan pek çok fenotipin (tip 4.2, 15 ve 21 gibi) anti-D yanıt oluşturduğunu göstermiştir. Bu nedenle, zayıf D tip 1, 2 ve 3 dışındaki RhD varyasyonlarının parsiyel D gibi değerlendirilmelerinin daha güvenli olacağı bildirilmektedir (Sandler ve ark., 2015).

Parsiyel D fenotipler daha çok gen rekombinasyonlarına bağlı oluşan hibrit protein yapılardan kaynaklanır. "D" antijeninin bütünlüğü bozulmuş ve bazı epitoplar kayıptır. Bu nedenle parsiyel D hastalara Rh pozitif kan transfüzyonu yapılırsa anti-D antikor oluşturabilirler.

D_{el} fenotipte eritrosit membranındaki D antijen sayısı, direkt ya da indirekt aglütinasyon gibi rutin serolojik testlerle saptanamayacak düzeyde azalmıştır. Kuşkulanılan olgularda ancak elüsyon/adsorbsiyon testleriyle saptamak mümkündür. Daha çok Doğu Asya toplumlarında görülmektedir. Bazı bölgelerde Rh negatif olarak saptanan bireylerin %10-30'unun D_{el} olduğu bildirilmiştir (Westhoff, 2004).

"D" kadar güçlü immünojen olmasalar da "C, c, E ve e" antijenlerine karşı gelişen antikorlar HTR ve YDHH'ye yol açabilirler. Bu nedenle, herhangi bir Rh antikoru olan hastaya antijen uyumlu transfüzyon yapılması doğru yaklaşımdır. *RHCE* geninde gerçekleşen ve RhCE proteinindeki bazı amino asit değişikliklerine yol açan SNP'ler farklı "C-c ve E-e" haplotiplere neden olur. "C-c" polimorfizmi ikinci ekstrasellüler halkada meydana gelen Ser103Pro değişikliğinden kaynaklanırken "E-e" polimorfizmi ise dördüncü ekstrasellüler halkada meydana gelen Pro226Ala değişikliğinden kaynaklanır (Chou, & Westhoff, 2009).

Rh "Çıplak Fenotip" Rh_{null} oldukça nadir görülür. Eritrosit membranında RhD ve RhCE proteinlerinin bulunmaması durumu "Rh_{null} fenotip" olarak tanımlanır. Bu duruma yol açan iki ayrı mekanizma tanımlanmıştır. Rh(-) bireylerde (RhD proteini yoktur) aynı zamanda *RHCE* gen inaktivasyonun bulunması nedeniyle RhCE proteini de üretilemez. Ya da *RHAG* gen inaktivasyonu nedeniyle RhAG proteininin üretilemediği durumlarda normal aktif *RHD* ve *RHCE* genleri olsa bile RhAG yokluğuna bağlı olarak RhD ve RhCE proteinleri de membranda eksprese edilemez. Rh_{null} hücreler işlevsel ve morfolojik olarak anormaldir. Rh_{null} bireylerde, splenektomi gerektirecek düzeylerde hemolitik anemi görülebilir (Burton, & Anstee, 2008).

Rh negatif gebelerde oluşan anti-D, YDHH'ye neden olabilir. Gebelik takibi sırasında ve doğumdan hemen sonra anneye uygulanan RhIG YDHH'yi önlemede etkilidir. Uzun zamandır Rh negatif gebelere rutin olarak profilaktik RhIG uygulanmaktadır ve bu sayede anti-D kaynaklı YDHH sıklığı günümüzde oldukça azalmıştır. *RHD* genotiplendirme yapılamadığı durumlarda "varyant D" annelerde de YDHH gelişme riski göz önünde bulundurularak, gerektiğinde profilaktik olarak RhIG uygulanmalıdır (Urbaniak, 2006).

Pek çok ülkede, sık ve sürekli kan transfüzyonu yapılan hastalarda (hemoglobinopatiler) C, c, E ve e gibi diğer Rh antijenleri de tiplendirilerek antijenik olarak uyumlu kan tercih edilmektedir. Bazı ülkelerde ise sık/sürekli kan alan hastalara

ek olarak doğurganlık çağındaki kadınlara ve kız çocuklarına C, c, E, e ve K eşleştirilmiş transfüzyon yapılması önerilmektedir.

Yukarıda bahsedilen çeşitli varyasyonlardan dolayı eritrositlerde RhD kan gruplamada dikkatli olmak gerekir. Bu konuda yayınlanan çeşitli ulusal ve uluslararası rehberlerde, hasta ve bağışçılar için farklı önerilerde bulunulmaktadır. Bağışçılarda (ve yenidoğanlarda): RhD kan gruplama testinde iki farklı monoklonal anti-D antikor (biri DVI+ olmalı) kullanılması gereklidir. Anti-D ile reaksiyon görülmeyen eritrositlere indirekt antiglobülin test (IAT) yöntemi ile "Zayıf D testi" yapılmalıdır. İlk anti-D kan grubu testi ile veya zayıf D testi ile pozitif saptanan örnekler RhD pozitif olarak tanımlanmalıdır. İlk anti-D kan grubu testi ve zayıf D testi negatif olan örnekler Rh negatif olarak tanımlanır. Hastalarda (ve Gebelerde): RhD kan gruplamada (DVI-) anti-D kullanılır. Rh negatif olarak saptanan hastalarda zayıf D testi yapılmasına gerek yoktur.

Amaç RhD varyasyonlarının hatalı tiplendirilmesinden kaynaklanabilecek riskleri önlemektir. Bağışçılarda RhD varyasyonlarının (zayıf ya da parsiyel D), yanlışlıkla Rh negatif olarak tanımlanması, bu kan bileşeninin Rh negatif hastaya verileceği düşünülürse, anti-D alloimmünizasyona ya da HTR'ye yol açabilir. Bundan dolayı, kan grubu Rh negatif olarak belirlenen bağışçı örnekleri varyant D yönünden ikinci bir kez test edilir (zayıf D testi).

Rh kan gruplamada moleküler yöntemler çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Genotiplendirme ile D, C, c, E, e gibi Rh antijenlerinin saptanması ve RhD varyasyonlarının tiplendirilmesi mümkündür. Bu amaçla Sekans Spesifik Primer-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (SSP-PCR), Real-time PCR ve dizileme (next generation sequencing, NGS) gibi yöntemlerden yararlanılmaktadır. Moleküler yöntemler araştırma ya da referans laboratuvarlarda sorun çözmek amaçlı kullanılmakla birlikte bazı ülkelerde rutin uygulamaya da girmiştir. RhD varyasyonlarının tiplendirilmesi ve fetal RhD genotiplendirme amacıyla kullanılmaktadırlar.

Şimdiye dek RhD varyasyonlarına yol açan yüzlerce alel tanımlanmıştır (150'den fazla Zayıf D). Tüm bu karmaşık çeşitliliğin çözümlenebilmesi ve hatta yalnızca zayıf D/parsiyel D ayrımının yapılabilmesi bile serolojik olarak mümkün değildir. "Zayıf D Tip 1, 2 ve 3"ün Rh pozitif olarak kabul edilebileceğini yukarıda belirtmiştik. Dolayısıyla genotiplendirme ile bu varyasyonlardan birine sahip hastaya

Rh pozitif kan güvenle kullanılabilir (Kısıtlı Rh negatif kan kaynağı gereksiz yere kullanılmamış olur). Yine, Zayıf D Tip 1, 2 veya 3 olarak tiplendirilen bir gebeye gereksiz yere anti-D (RhIG) profilaksisi uygulanmamış olur.

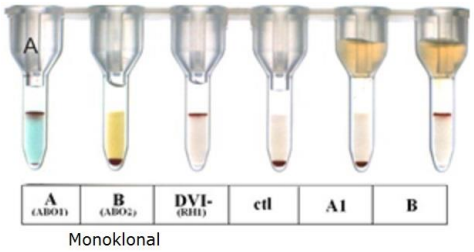
Genellikle ilk trimestir sonlarında, Rh negatif gebelerin kan örneğinde bulunan "Hücre Dışı (cf) Fetal DNA"dan fetal RHD belirlemek mümkündür. Fetüs Rh negatif olarak tiplendirilirse Rh negatif anneye gereksiz yere anti-D (RhIG) profilaksiden kaçınılmış olur.

Tez çalışmamız iki temel amaçla gerçekleştirilmiştir: Moleküler yöntemle Bursa bölgesindeki RhD varyasyonlarını tiplendirmek ve sıklıklarını belirlemek. Bu doğrultuda elde edilen sonuçlar gelecekte yapılacak çalışmalara da önemli bir veri desteği sağlayacaktır. Ayrıca, rutin kan gruplamada "RhD varyant" olarak belirlenen bu örnekleri, poliklonal (human) ve çeşitli monoklonal anti-D antikorlar kullanarak serolojik yöntemle de tiplendirip *RHD* genotiplendirme sonuçlarıyla korelasyonunu araştırmak.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 2011-10/27 numaralı onayıyla gerçekleştirildi. Bu çalışma, 2011-2014 yılları arasında, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Raşit Durusoy Kan merkezinde yapılan rutin kan gruplama testleri sonucu "varyant D" olarak saptanan bağışçılardan alınan 46 kan örneğiyle gerçekleştirildi. RhD kan gruplamada zayıf aglütinasyon gösteren ya da ilk gruplamada negatif reaksiyon gösterip zayıf D testi ile pozitif saptanan örnekler "varyant D" olarak tiplendirildi. "Varyant D" olarak saptanan ve Kan Merkezine geri çağrılan 46 bağışçıdan alınan yeni örneklerde önce RhD tiplendime, Rh subgrup tiplendirme (C, c, E, e ve Cw antijenleri) ve serolojik yöntemle (basit ve ileri), "zayıf D"/"parsiyel D" ayrımı yapıldı. Basit serolojik analizde poliklonal (Human) anti-D kullanılarak "zayıf D"/"parsiyel D" ayrımı yapılırken; ileri serolojik analizde farklı RhD epitoplarına karşı 12 farklı monoklonal antikordan oluşan bir panel ile "zayıf D"/"parsiyel D" tiplendirmesi yapıldı. Serolojik testler çalışıldıktan sonra örnekler, -20°C'de dondurularak saklandı. Bütün örneklerin toplanmasının ardından dondurulan örnekler çözdürüldü ve PCR-SSP yöntemiyle RhD genotiplendirme yapıldı.

Serolojik testler Jel Santrifügasyon yöntemi ve kartları (Mikrokolon) (Bio-Rad Laboratories 1785 Cressier FR Switzerland) yardımıyla gerçekleştirildi (Şekil-3.1). Eritrosit hattının mikrotüpün yüzeyinde olması veya içinde dağılım göstermesi pozitif reaksiyon, dibinde, dağılım göstermeden bulunması negatif reaksiyon olarak değerlendirildi. Pozitif reaksiyon, mikrotüp içindeki eritrositlerin ilgili antikorlar ile spesifik olarak bağlandığını ve aglütinasyonun oluştuğunu gösterirken, negatif reaksiyon herhangi bir aglütinasyonun olmadığını göstermektedir.



Şekil-3.1: Serolojik testlerde kullanılan kartlara örnek

3.1. Rh tiplendirme: Kan örneklerinde RhD tiplendirmesi monoklonal anti-D antikorlar [hücre serileri LHM 59/20 (LDM3) + 175-2] kullanılarak yapıldı. Tiplendirme için aşağıdaki basamaklar izlendi.

3.1.1. Elli µL tam kan örneği ve 500 µL ID-Dilüent 2 (Bio-Rad Laboratories 1785 Cressier FR Switzerland) ile %5'lik test örneği hazırlandı.

3.1.2. Test reajenlerinin sıcaklığı kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.

3.1.3. Elli µL "ID-DiaCell A_1" beşinci mikrotüpe, 50 µL "ID-DiaCell B" altıncı mikrotüpe eklendi (Bio-Rad Laboratories 1785 Cressier FR Switzerland).

3.1.4. Elli µL bağışçı plazması beşinci ve altıncı mikrotüplere eklendi.

3.1.5. Kartlar oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

3.1.6. Birden dörde kadar olan tüm mikrotüplere 10 µL hazırlanmış olan %5'lik hasta test örneği pipetlendi.

3.1.7. ID-Centrifuge'de (Bio-Rad Laboratories 1785 Cressier FR Switzerland) 10 dakika 85xg hızında santrifügasyonun ardından reaksiyonlar değerlendirildi (Şekil-3.2).



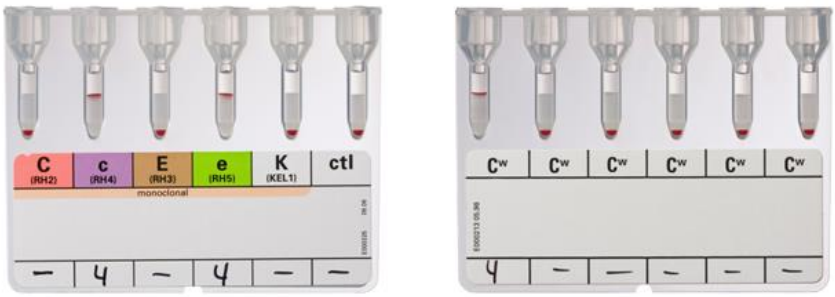
Şekil-3.2: ABO ve Rh tiplendirme sonrası kart görünümü

3.2. Rh subgrup tiplendirme: C, c, E, e ve Cw antijenleri tiplendirmede aşağıdaki basamaklar izlendi:

3.2.1. Elli µL tam kan örneği ve 500 µL ID-Dilüent 2 ile %5'lik test örneği hazırlandı.

3.2.2. Rh subgrup kartının tüm mikrotüplerine %5'lik test örneğinden 10 µL pipetlendi (Bio-Rad Laboratories 1785 Cressier FR Switzerland).

3.2.3. ID-Centrifuge'de 10 dakika, 85xg hızında santrifügasyonun ardından reaksiyonlar değerlendirildi (Şekil-3.3).



Şekil-3.3: Rh subgrup tiplendirme sonrası kart görünümü

3.3. RhD tiplendirme sonrası Rh(-) olarak saptanan örnekler, monoklonal anti-D IgG (hücre serisi ESD1) (Bio-Rad Laboratories 1785 Cressier FR Switzerland) kullanılarak "Zayıf D" analizi yapıldı. Bu amaçla aşağıdaki basamaklar izlendi.

3.3.1. Bir mL ID-Dilüent 2 ve 10 µL eritrosit örneği ile %0,8'lik test örneği hazırlandı.

3.3.2. Elli µL % 0,8'lik test örneği karttaki uygun mikrotüpe pipetlendi.

3.3.3. "Zayıf D" doğrulaması için 50 µL "ID-DiaColon Anti-D" pipetlendi.

3.3.4. Kart 37ºC'da 15 dakika inkübe edildi.

3.3.5. ID-Centrifuge'de 10 dk 85xg hızında santrifügasyonun ardından reaksiyonlar değerlendirildi (Şekil-3.4).

3.3.6. Zayıf D testi pozitif olarak saptanan örneklerde Direkt Antiglobulin Test (DAT) çalışıldı. DAT pozitif olarak saptanan örnekler RhD varyant olarak tiplendirilmedi ve çalışma kapsamı dışında bırakıldı.



Şekil-3.4: “Zayıf D” testi sonrası kart görünümü

3.4. “Zayıf D” analizinin ardından parsiyel D’leri değerlendirmek için poliklonal Anti-D yardımıyla basit serolojik “Varyant D” analizi yapıldı (Bio-Rad Laboratories 1785 Cressier FR Switzerland). Bu aşamada aşağıdaki basamaklar izlendi.

3.4.1. Elli µL tam kan örneği ve 500 µL ID-Dilüent 1 ile %5’lik test örneği hazırlandı (Bio-Rad Laboratories 1785 Cressier FR Switzerland) ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

3.4.2. Test kartının uygun mikrotüpe %5’lik test örneğinden 10 µL pipetlendi (Bio-Rad Laboratories 1785 Cressier FR Switzerland).

3.4.3. ID-Centrifuge’de 10 dakika, 85xg hızında santrifügasyonun ardından reaksiyonlar değerlendirildi.

3.5. “Varyant D”nin basit serolojik yöntemle saptanması ve monoklonal antikorlarla doğrulanmasının ardından, farklı RhD epitoplarına karşı 12 farklı monoklonal antikordan oluşan bir panel yardımıyla ileri serolojik analizle “Varyant D” tiplendirme yapıldı (Bio-Rad Laboratories 1785 Cressier FR Switzerland).

3.5.1. Bir mL ID-Dilüent 2 ve 10 µL yıkanmış eritrosit örneği ile %0,8’lik test örneği hazırlandı.

3.5.2. Anti-D reajeninin oda sıcaklığına ulaşması sağlandı.

3.5.3. Elli µL %0,8’lik test örneği tüm mikrotüplere pipetlendi.

3.5.4. Her bir Anti-D’den (1-12) 25 µL uygun mikrotüplere pipetlendi.

3.5.5. Kartlar 37ºC’da 15 dakika inkübe edildi.

3.5.6. ID-Centrifuge'de 10 dk 85xg hızında santrifügasyonun ardından şekil-3.5'te görülen tablo aracılığıyla reaksiyonlar değerlendirildi.

Anti-D ALBAclone®	Nr.	DII/ DNU	DIII	DIV (1)	DV (2)	DCS	DVI	DVII	DOL	DFR	DAR (3, 5)	DAR-E (3)	DHK / DAU-4 (4)	DBT	DHAR	Weak D (5, 6)
LHM76/58	1	+	+	+	+/-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	weak/ -	+
LHM76/59	2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
LHM174/102	3	+	+	+/-	+/-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
LHM50/2B	4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
LHM169/81	5	+	+	-	+/-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
ESD1	6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
LHM76/55	7	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
LHM77/64	8	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+
LHM70/45	9	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	weak/ -
LHM59/19	10	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
LHM169/80	11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
LHM57/17	12	+	+	+	+/-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+

Şekil-3.5: İleri serolojik yöntemle "Varyant D" tiplendirme paneli

3.6. Serolojik testlerin tamamlanması ve bütün örneklerin toplanmasının ardından dondurulan örnekler çözdürüldü ve PCR-SSP yöntemiyle RhD genotiplendirme yapıldı (inno-train Diagnostik GmbH Kronberg/Taunus Germany).

3.6.1. Genomik DNA izolasyonu, Ready DNA Spin Kit (inno-train Diagnostik GmbH Kronberg/Taunus Germany) yardımıyla gerçekleştirildi.

3.6.2. İzole edilen DNA'lar TRIS buffer (10 mM tris, pH 7-8, maks 1 mM EDTA) ile 25-50ng/µL konsantrasyonda çözüldü.

3.6.3. "Zayıf D" ve "CDE" için mastermixler hazırlandı. PCR şeridindeki kuyucuk başına 6 µL distile su, 3 µL ReadyPCR (RBC-Ready Gene, inno-train Diagnostik GmbH Kronberg/Taunus Germany), 0,08 µL Taq (AxiTag DNA Polymerase, inno-train Diagnostik GmbH Kronberg/Taunus Germany) ve 1 µL DNA örneği kullanıldı.

3.6.4. Mastermixler iyice karıştırıldıktan sonra PCR şeridindeki kuyucuklara 10'ar µL pipetlendi.

3.6.5. Kuyucuklar cover strip/PCR mat ile kapatıldıktan sonra PCR reaksiyonu için Thermal Cycler'a (CG1-96, Corbett Research, Qiagen, Hilden, Düsseldorf, Germany) taşındı.

3.6.6. RhD DNA amplifikasyonu için aşağıdaki basamaklardan yararlanıldı:

3.6.6.1. İki dakika 94°C, bir döngü,

3.6.6.2. Ardışık 20 saniye 94°C ve 60 saniye 65°C'da, 10 döngü,

3.6.6.3. Ardışık 20 saniye 94°C, 60 saniye 61°C ve30 saniye 72°C'da, 20 döngü,

3.6.6.4. Soğuma 10°C.

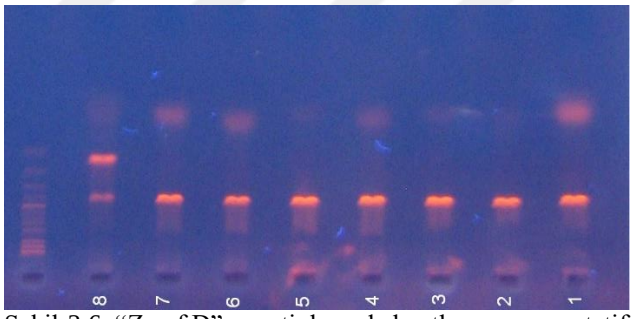
3.6.7. Elektroforez aşaması için önce jel oluşturuldu. %2'lik agaroz jel (1x) tris, borik, EDTA (TBE) yardımıyla oluşturulduktan sonra, ısıtıldı ve soğutuldu. Final konsantrasyonu 0,7 µg/mL olacak şekilde etidyum bromid eklendikten sonra jel döküldü.

3.6.8. Örnek taraklar sıvı jel içine yerleştirildi ve 30 dakika beklemeye bırakıldı.

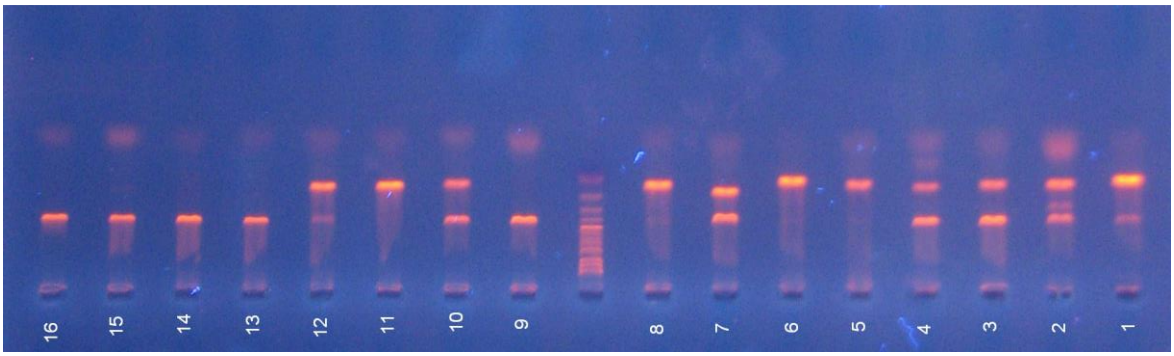
3.6.9. Ardından jel elektroforez bölümüne yerleştirildi ve (1x) TBE eklendi.

3.6.10. Jel yuvaları amplifiye edilen DNA örneklerinin tam hacimleriyle doldurulup ve 3 µL 100 bp ladder (Axygen Biosciences, Union City, USA) eklendikten sonra elektroforez 8-10 V/cm ile yürütüldü (Cleaver, Rugby, CV22 7DH, UK).

3.6.11. Elektroforezde görülen bantların (Şekil-3.6, 3.7) değerlendirilmesi üretici firma talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi (Şekil-3.8, 3.9).



Şekil-3.6: "Zayıf D" genotiplemede bantların representatif görünümü

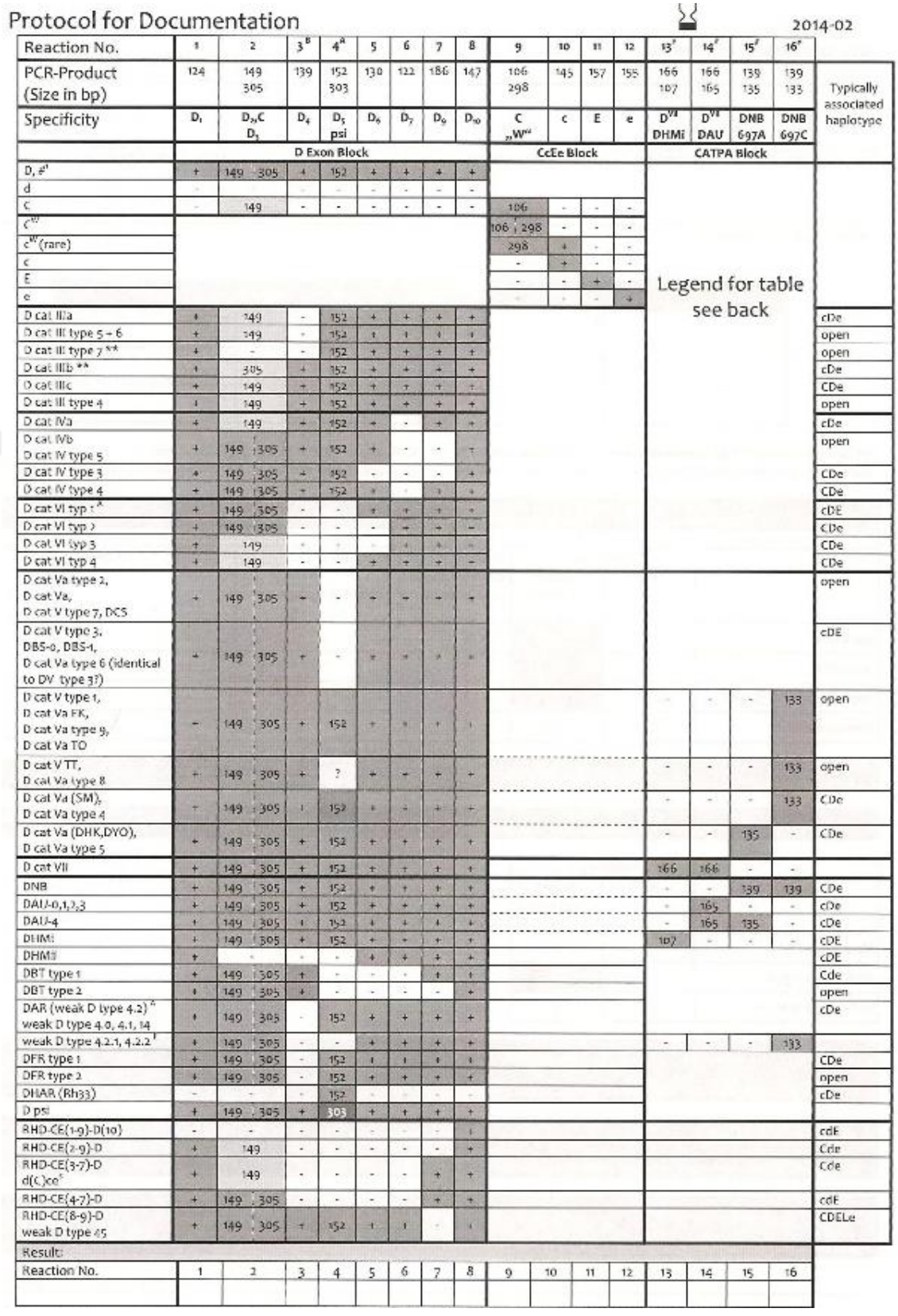


Şekil-3.7: CDE genotiplemede bantların representatif görünümü

3.7. Elde edilen kategorik verilerin değerlendirilmesinde McNemar ve Binomial testlerden yararlanıldı. Anlamlılık değeri olarak α=0,05 alındı. Analizler SPSS Version23 programında yapıldı.

Reaction No.	1	2	3*	4	5	6	7	8
PCR Product (Size in bp)	248 151	126	166	138	112	175 98	221 125	221 136
Specificity	weak D type **1, 1.1**	weak D type **2**	weak D type **3**	weak D type **4, 14**	weak D type **5**	weak D type **4.0/4.1, 11**	weak D type **17, 4.2**	weak D type **17, 15**
weak D type 1	+ (151bp)	-	-	-	-	-	-	-
weak D type 1.1	+/+ (248/151bp)							
weak D type 2	-	+	-	-	-	-	-	-
weak D type 3	-	-	+	-	-	-	-	-
weak D type 4.0/4.1	-	-	-	+	-	+ (175bp)	-	-
weak D type 4.2	-	-	-	+	-	-	+ (125bp)	-
weak D type 5	-	-	-	-	+	-	-	-
weak D type 11	-	-	-	-	-	+ (98bp)	-	-
weak D type 14	-	-	-	+	-	-	-	-
weak D type 15	-	-	-	-	-	-	-	+ (136bp)
weak D type 17	-	-	-	-	-	-	+ (221bp)	+ (221bp)
Results:								

Şekil-3.8: "Zayıf D" genotipleme değerlendirme algoritması



Şekil-3.9: CDE genotipleme değerlendirme algoritması

4. BULGULAR

Çalışmamıza "Varyant D" olduğu belirlenen 46 olgu dahil edildi. Ancak moleküler tiplendirmede bir tane (%2,3) Rh(-), iki tane de (%4,7) Rh(+) olgu saptandığı için değerlendirmeler 43 olgu üzerinden yapıldı.

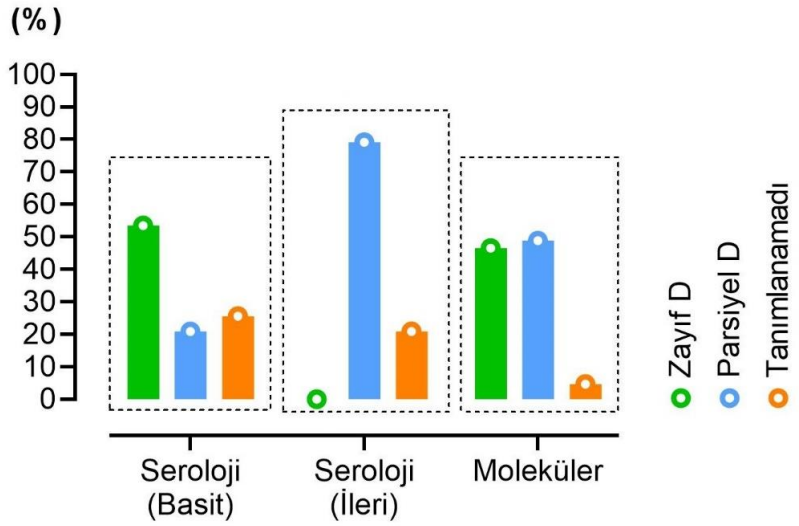
Basit seroloji ile varyasyonların 9'u parsiyel D (%20,9), 23'ü ise zayıf D (%54,5) olarak saptandı ve 11 olgu (%25,6) ise tanımlanamadı. İleri seroloji ile varyasyonların 36'sı (%79,1) parsiyel D olarak saptanırken 9 olgu ise (%20,9) tanımlanamadı. Moleküler tiplendirme ile varyasyonların 21'i parsiyel D (%48,8), 20'si ise zayıf D (%46,5) olarak saptandı ve iki olgu ise (%4,7) tanımlanamadı (Tablo-4.1 ve Şekil-4.1).

Tablo-4.1: Toplu sonuçlar

	Seroloji (Basit)	Seroloji (İleri)	Moleküler
Zayıf D	23 (%54,5)	0	20 (%46,5)
Parsiyel D	9 (%20,9)	34 (%79,1)	21 (%48,8)
Tanımlanamadı	11(%25,6)	9 (%20,9)	2 (%4,7)

İstatistiksel analiz için herhangi bir testte "*Tanımlanamadı*" şeklinde sonuç alınan tüm örneklere ait veri göz ardı edildi. Bu nedenle istatistiksel analiz için üç yöntemle de sonuç alınan 22 adet örnek sonucu kullanıldı.

Basit seroloji ile moleküler yöntemin Rh varyasyonlarını saptamadaki tutarlılıkları McNemar testi ile analiz edildi. Sonuçlar arasında istatistiksel bir farklılık olmadığı ($p=0,625$) ve sonuçların birbiriyle %81,8 oranında tutarlı olduğu belirlendi (Tablo-4.2).



Şekil-4.1: Saptanan "Varyant D"lerin yöntemlere göre dağılımı

Tablo-4.2: Basit seroloji ile moleküler yöntemin istatistiksel analizi

		Seroloji (Basit)		p
		Zayıf D	Parsiyel D	
Moleküler	Zayıf D	11 (%50,0)	1 (%4,5)	*0,625*
	Parsiyel D	3 (%13,6)	8 (%31,8)	

İleri seroloji ile moleküler yöntemin Rh varyasyonlarını saptamadaki tutarlılıklarının analizinde, ileri seroloji ile "Zayıf D" saptanmaması nedeniyle Binomial testten yararlanıldı. İleri serolojide "Parsiyel D" olarak belirlenen olgular moleküler yöntemle %54,5 oranında "Zayıf D", %45,5 oranında "Parsiyel D" saptandığı için, 0,50 oranına göre test edildi. İki yöntem arasında "Zayıf D" ve "Parsiyel D"yi saptamada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı için (*p=0,832*), yöntemler arasında "Zayıf D" ve "Parsiyel D"yi saptamada uyum bulunmadığı belirlendi (Tablo-4.3).

İleri serolojik ve moleküler yöntemlerle tanımlanmış Rh D varyasyonları Tablo-4.4'te ve Şekil-4.2'de gösterilmiştir. Moleküler yöntemle en sık saptanan zayıf D varyasyonu "zayıf D tip 1" iken, parsiyel D varyasyonu "zayıf D tip 15" idi. İleri

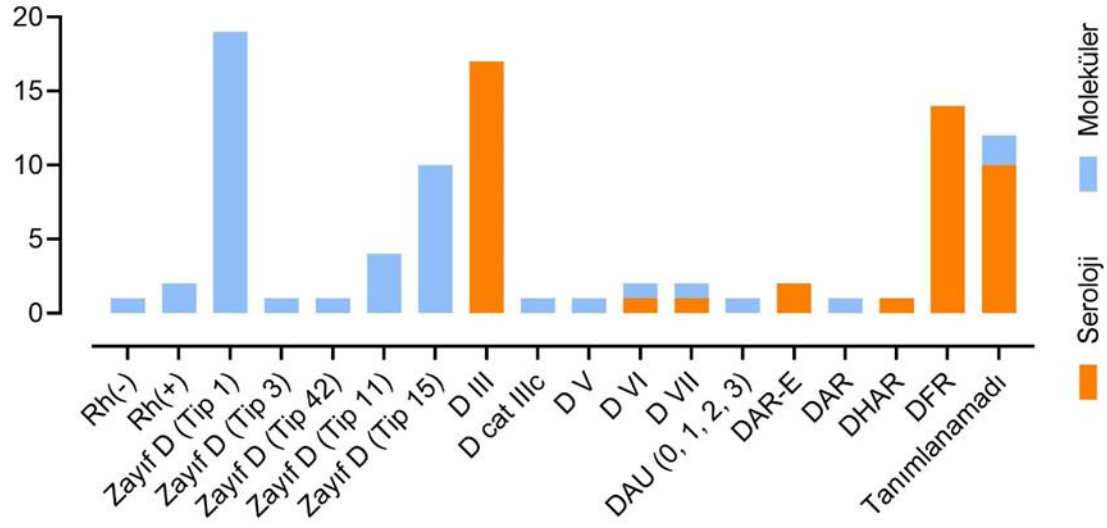
serolojik yöntemle baskın parsiyel D varyasyonu “DIII” ve “DFR” olarak belirlendi. İki yöntemle “DVI” ve “DVII” dışında tiplendirme açısından uyum görülmedi.

Tablo-4.3: İleri seroloji ile moleküler yöntemin istatistiksel analizi

		Seroloji (İleri)	p
		Parsiyel D	
Moleküler	Zayıf D	12 (%54,5)	*0,832*
	Parsiyel D	10 (%45,5)	

Tablo-4.4: İleri seroloji ve moleküler yöntemlerle saptanan RhD ve D varyant sonuçları

	Rh(-)	Rh(+)	Zayıf D (Tip 1)	Zayıf D (Tip 3)	Zayıf D (Tip 4.2)	Zayıf D (Tip 11)	Zayıf D (Tip 15)	D III	D cat IIIc	D V	D VI	D VII	DAU (0, 1, 2, 3)	DAR-E	DAR	DHAR	DFR	Tanımlanamadı
Seroloji								17			1	1		2		1	14	10
Moleküler	1	2	19	1	1	4	10		1	1	1	1	1		1			2



Şekil-4.2: İleri seroloji ve moleküler yöntemle saptanan sonuçlar

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Rh, iki farklı gen (*RHD* ve *RHCE*) tarafından kodlanan, en karmaşık kan grubu sistemidir. Çeşitli mutasyonlardan kaynaklanan ve çoğunluğu, bu mutasyonların neden olduğu hibrit RHD/RHCE proteinleri üzerinde bulunan 55 farklı antijenden oluşur. Rh genlerinde gerçekleşen çeşitli mutasyonlar, RHD proteininde, Rh negatif, DEL, Zayıf D, Parsiyel D gibi fenotiplere neden olan çok sayıda varyasyona yol açmaktadır. Araştırmamızın konusu olan Zayıf D ve Parsiyel D fenotiplere bakıldığında, tanımlanmış yüzlerce RHD varyasyonunun olduğu ve sürekli yenilerinin eklendiği görülecektir (Lyu, Jiao, Ma, & Hu, 2021; Qian ve ark., 2019).

Uluslararası literatür incelendiğinde farklı RHD varyasyonlarının farklı toplumlarda farklı sıklıklarda saptandığı görülmektedir. Arjantin'in merkezi bölgesindeki büyük şehirlerden birinde (Rosario) farklı etnik kökenlerden oluşan bir popülasyonun araştırıldığı çalışmada %25 oranında DVII (Parsiyel D) saptanırken zayıf D tip 1 %23,86 oranında bulunmuştur (Brajovich ve ark., 2012). Kuzeybatı Arjantin'de bir yerli Amerikalı toplulukta yapılan araştırmada ise en sık saptanan varyasyon zayıf D tip 93 (%25,11) olarak belirlenmiştir (Trucco Boggione ve ark., 2019). Hırvatistan'da yapılan bir çalışmada en sık saptanan varyasyonlar zayıf D tip 3 (%46,1) ve zayıf D tip 1 (%37,7) olarak görülmektedir (Dogic ve ark., 2011). Avustralyalı kan bağışçılarında yapılan bir araştırmada ise zayıf D tip 1 (%43,3), zayıf D tip 2 (%25,8) ve zayıf D tip 3 (%8,2) en sık saptanan varyasyonlar olarak bulunmuştur (McGowan ve ark., 2017). Avusturya'da da en sık zayıf D tip 1 saptanırken (%35,8) zayıf D tip 2 %14,4 ve tip 3 %9,5 oranlarında bulunmuştur (Polin, Danzer, Hofer, Gassner, & Gabriel, 2007). Yunanistan'da kan bağışçılarında yapılan bir çalışmada zayıf D tip 1 %57,8, zayıf D tip 3 %12,5, zayıf D tip 11 %7,8, zayıf D tip 5 %4,7, zayıf D tip %3,1, zayıf D tip 15 ve RHD*DAR4 (zayıf D tip 4.1) %1,6 oranında saptanmıştır (Koutsouri ve ark., 2019). Brezilya'nın güneyinde (Parana bölgesinde) yapılan bir çalışmada en sık zayıf D tip 1 saptanırken (%38,5) zayıf D tip

4 %20,5, zayıf D tip 3 ve DAR %12,8 oranında bulunmuştur (Zacarias ve ark., 2016). Türkiye'de (İstanbul'da) yapılan bir çalışmada zayıf D tip 15 (26.9 %), DFR (14.9 %), zayıf D tip 11 (14.9 %) ve zayıf D tip 1 (13.4 %) olarak saptanmıştır (Yanasik ve ark., 2021). Bir başka çalışmada Danimarka'da zayıf D tip 1 %78,9, zayıf D tip 2 %8,8, zayıf D tip 5 ve DVI %3,5 oranında saptanırken ABD'de zayıf D tip 1 %26,7, zayıf D tip 4.0 %18,8, zayıf D tip 2 ve DAR %13,9 oranında saptanmıştır (Vege ve ark., 2020). İki ayrı ülkede ortak yürütülen bir çalışmada, Bosna Hersek'te (Banja Luka) zayıf D tip 3 %58,8, tip 1 %35,3 ve DNB %1,2 olarak saptanırken Sırbistan'da (Belgrad) zayıf D tip 1 %41,9, tip 3 %30,7, tip 14 %6,5, tip 15 ve DNB %1,6 olarak saptanmıştır (Guzijan, Srzentic, Pavlovic Jankovic, Djilas, & Lilić, 2019). Çin'de, etnik Han popülasyonunda yapılan bir çalışmada 305.572 bağışçının kan grubu değerlendirilmiş, %99,53 RhD(+), %0,46 RhD(-) ve %0,0105 RhD varyant olarak belirlenmiş, en sık saptanan RhD varyasyonu zayıf D tip 15 (%34,4) olarak saptanmıştır (Yan, Wu, Zhu, Hong, & Xu, 2007). Güney Kore'de yapılan bir çalışmada 188.852 örnek değerlendirilmiş, %99,74 RhD(+), %0,24 RhD(-) ve %0,0169 RhD varyant olarak belirlenmiş, en sık saptanan RhD varyasyonları zayıf D tip 15 (%20,1) ve tip 13 (%17,4) olarak saptanmıştır (Chung, Kim, Yu, Bae, & Cho, 2021). Kuzey Hindistan'da yapılan bir çalışmada en sık saptanan varyasyonlar zayıf D Tip 1 (%17,9) ve DFR1 (%17,9) olarak belirlenmiştir (Khetan, Verma, Chaudhary, & Shukla, 2020). Tayland'da yapılan bir çalışmada en sık saptanan varyasyon DVI.3 (%29,4) olarak saptanmıştır (Thongbut ve ark., 2021). Avusturya ve Almanya'da gerçekleştirilen bir çalışmada Tirol bölgesinde (Avusturya) zayıf D tip 3 %50, zayıf D tip 1 %33, zayıf D tip 2 %8 bulunurken Kuzey Almanya'da zayıf D tip 1 %65, zayıf D tip 2 %17, zayıf D tip 3 %17, Güneybatı Almanya'da ise zayıf D tip 1 %60, zayıf D tip 2 %27, zayıf D tip 3 %9 olarak saptanmıştır (Müller ve ark., 2001). Brezilya'da yapılan bir çalışmada zayıf D tip 4.2 %31,3 olarak saptanırken tip 3 %18,7, tip 4.0/4.1 %18,7, tip 1 %12,5 ve tip 2 %6,3 olarak belirlenmiştir (Cruz, Chiba, Moritz, & Bordin, 2012). İran'da yapılan bir çalışmada zayıf D tip 15 %43, zayıf D tip 1 %13, DLO %12 ve zayıf D tip 5 %9 olarak saptanmıştır (Oodi, Daneshvar, Goudarzi, & Amirizadeh, 2020). Belçika'nın Flanders bölgesinde yapılan bir çalışmada zayıf D tip 1 %53,5, tip 2 %29,5, tip 3 %2,6 olarak bulunurken DVI %5,6 olarak saptanmıştır (Van Sandt ve ark., 2015). Brezilya'da yapılan bir çalışmada zayıf D Tip 1 %31,4, tip 2 %19,7, tip 3

%11,7, tip 4.0 ise %11,2 olarak saptanmıştır (Campos ve ark., 2016). Japonya'da RhD varyasyonlarının araştırıldığı bir çalışmada en sık zayıf D tip 15 görülürken (%27) zayıf D tip 1, tip 2 ve tip 3 hiç saptanmamıştır (Ogasawara ve ark., 2016). Portekiz'de yapılan bir çalışmada zayıf D tip 2 %63,6, tip 1 %16,2 ve tip 3 ise %14,1 olarak bulunmuştur (Araújo ve ark., 2006).

Farklı ülkelerde, farklı coğrafyalarda gerçekleştirilen çalışmalar, farklı topluluklarda RhD varyasyonlarının dağılımının çok farklı sıklıklarda saptandığını göstermektedir. Aynı ülkenin farklı bölgelerinde dahi farklı sonuçlarla karşılaşmak mümkün görünmektedir. Bizim, Bursa bölgesinde yaptığımız çalışmada, tanımlanan olgular içerisinde en sık saptadığımız varyasyonlar zayıf D tip 1 (%46,3), zayıf D tip 15 (%24,4) ve zayıf D tip 11 (%9,7) olarak bulunmuştur (Tablo-4.4). Ancak, Bursa her ne kadar ülkenin farklı bölgelerinden göç alan büyük bir sanayi şehri olsa da elde ettiğimiz verilerin Türkiye genelini yansıtması beklenemez. Bir toplumdaki RhD varyasyonlarının belirlenmesi rutin kan gruplamada D antijeninin saptanmasında kullanılacak uygun monoklonal antikorların tercih edilmesi açısından da önemlidir (Person ve ark., 2020). Bu amaçla daha çok sayıda olguyla farklı bölgeleri içeren çok merkezli çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

Şimdiye dek çok sayıda farklı RhD varyasyonu tanımlanmıştır. Cevabı aranan soru ise bunları serolojik olarak tiplendirmek mümkün müdür? Beyaz ırkta amino asit diziliminde farklılıklara yol açan *RHD* gen varyasyonları %1-2 sıklıkta görülmektedir. Bu varyasyonlar farklı "konformasyonel epitoplara" neden olabildiğinden RhD tiplendirmede kullanılan farklı test yöntemleri (tüp, mikroplak, mikrokolon aglütinasyon) ve farklı monoklonal anti-D antikorlarla çelişkili sonuçlar gözlemlenmesi mümkün olmaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi, transfüzyonda uygun kan bileşeni seçimi ve gebelikte anti-D alloimmünizasyonunu doğru yönetmek açısından özellikle Zayıf D Tip 1, Tip 2 ve Tip 3'ün diğer RhD varyasyonlarından ayırt edilmesi önem taşımaktadır. Farklı ülkelerde, farklı coğrafi bölgelerde ve farklı etnik topluluklarda yapılan çalışmalar RhD varyasyonlarının dağılımının çok farklı olduğunu göstermiştir. Bu doğrultuda serolojik tiplendirmenin uygun bir yöntem olmadığı öne sürülmektedir (Sandler ve ark., 2015; Westhoff, 2007). Hindistan'da yapılan bir çalışmada serolojik tiplendirmenin doğru sonuç vermediği, hatta moleküler tiplendirmede yaygın olarak kullanılan ticari kitlerin de bölgeye özgü bazı

varyasyonların (zayıf D tip 150) tanımlanmasında yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Mishra ve ark., 2020). Mısır'da yapılan bir çalışmada serolojik ve moleküler tiplendirme sonuçları arasında bir korelasyon saptanmamış ve RhD varyasyonlarının belirlenmesinde güvenli yöntem olarak genotiplendirme önerilmiştir (Abdelrazik, Elshafie, Ezzat Ahmed, & Abdelaziz, 2013). Fas'ta yapılan bir çalışmada serolojik testlerle saptanan bir uyumsuzluk durumunda genotiplendirme yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (El Housse ve ark., 2019). Danimarka'da gerçekleştirilen bir çalışmada, serolojik testlerin kullanımının rutin kan gruplamada uygun olmakla birlikte RhD varyasyonlarının belirlenmesinde yetersiz olduğu ve gerçek kategorizasyon için genotiplendirmenin doğru yöntem olduğu belirtilmektedir (Christiansen ve ark., 2008).

Çalışmamızda, poliklonal anti-D (human) kullanılarak basit serolojik yöntemle "zayıf D" - "parsiyel D" ayrımının yapılıp yapılamayacağı araştırılmıştır. Moleküler yöntemle tanımlama referans olarak alındığında, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmasa da, çelişkili/uyumsuz sonuçların varlığı serolojik yöntemle "zayıf D" - "parsiyel D" ayrımının yapılmasının ve bu doğrultuda transfüzyon/tedavi kararının alınmasının güvenilir olmadığını göstermiştir.

Çalışmamızda cevap aradığımız bir diğer soru da RhD varyasyonlarının serolojik olarak tiplendirilip tiplendirilemeyeceğidir. Bu amaçla 12 farklı monoklonal anti-D içeren bir ticari kit kullanılmış (ileri serolojik yöntem) ve moleküler yöntemle karşılaştırıldığında, DVI ve DVII olarak tiplendirilen iki olgu dışında sonuçların tamamen uyumsuz olduğu gözlemlenmiştir (Tablo-4.4) (Şekil-4.2).

Sonuç olarak; araştırmamız, ülkemizde RhD varyasyonlarının moleküler tiplendirmesinin yapıldığı ilk çalışmadır ve bu konuda önemli veriler elde edilmiştir. Çalışmamızda değerlendirilen varyant D örneklerde "zayıf D" %48,8, parsiyel D ise %51,2 sıklıkta bulunmuştur. En sık görülen varyasyonlar "zayıf D tip 1" ve "zayıf D tip 15" olarak belirlenmiştir. Gerek "zayıf D" – "parsiyel D" ayrımı, gerekse RhD varyasyonlarının tiplendirilmesi amacıyla serolojik yöntemle elde edilen sonuçlar, *RHD* genotiplendirme sonuçları ile karşılaştırıldığında etkin ve güvenilir bulunmamıştır.

6. KAYNAKLAR

Abdelrazik, A. M., Elshafie, S. M., Ezzat Ahmed, G. M., & Abdelaziz, H. M. (2013). Combining serology and molecular typing of weak D role in improving D typing strategy in Egypt. *Transfusion*, 53(11 PART 2), 2940–2944. https://doi.org/10.1111/trf.12100

Araújo, F., Rodrigues, M. J., Monteiro, F., Chabert, T., Tavares, G., Sousa, G., … Guimarães, J. E. (2006). Weak D type 2 is the most prevalent weak D type in Portugal. *Transfusion Medicine*, 16(1), 63–67. https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2005.00638.x

Avent, N. D., & Reid, M. E. (2000). The Rh blood group system: A review. *Blood*, 95(2), 375–387. https://doi.org/10.1182/blood.v95.2.375

Brajovich, M. E. L., Trucco Boggione, C., Biondi, C. S., Racca, A. L., Tarragõ, M., Nogués, N., … Cotorruelo, C. M. (2012). Comprehensive analysis of RHD alleles in Argentineans with variant D phenotypes. *Transfusion*, 52(2), 389–396. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03297.x

Burton, N. M., & Anstee, D. J. (2008). Structure, function and significance of Rh proteins in red cells. *Current Opinion in Hematology*, 15(6), 625–630. https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328311f422

Campos, F. C. A., Mota, M. A., Aravechia, M. G., Torres, K. B., Bub, C. B., Kutner, J. M., & Castilho, L. (2016). Variant RHD Types in Brazilians With Discrepancies in RhD Typing. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(6), 845–848. https://doi.org/10.1002/jcla.21946

Chou, S. T., & Westhoff, C. M. (2009). Molecular biology of the Rh system: clinical considerations for transfusion in sickle cell disease. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2009(1), 178–184. https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.178

Christiansen, M., Samuelsen, B., Christiansen, L., Morbjerg, T., Bredahl, C., & Grunnet, N. (2008). Correlation between serology and genetics of weak D types in Denmark. *Transfusion*, 48(1), 187–193. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01504.x

Chung, Y. N., Kim, T. Y., Yu, H. B., Bae, J. C., & Cho, D. (2021). Molecular basis of serological weak D phenotypes and RhD typing discrepancies identified in the Korean population. *Blood Transfusion*, 19(4), 327–334. https://doi.org/10.2450/2020.0128-20

Cruz, B. R., Chiba, A. K., Moritz, E., & Bordin, J. O. (2012). RHD alleles in Brazilian blood donors with weak D or D-negative phenotypes. *Transfusion Medicine*, 22(2), 84–89. https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2011.01129.x

Daniels, G. (2013a). *Human Blood Groups*. *Wiley-Blackwell* (3rd ed.). Chichester: Wiley-Blackwell.

Daniels, G. (2013b). Variants of RhD - current testing and clinical consequences. *British Journal of Haematology*, 161(4), 461–470. https://doi.org/10.1111/bjh.12275

Dogic, V., Bingulac-Popovic, J., Babic, I., Hundric-Haspl, Z., Jurakovic-Loncar, N., Mratinovic-Mikulandra, J., … Jukic, I. (2011). Distribution of weak D types in the Croatian population. *Transfusion Medicine*, 21(4), 278–279. https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2011.01071.x

El Housse, H., El Wafi, M., Ouabdelmoumene, Z., Zarati, F., Alid, R., Nourichafi, N., … Habti, N. (2019). Comprehensive phenotypic and molecular investigation of RhD and RhCE variants in Moroccan blood donors. *Blood Transfusion*, 17(2), 151–156. https://doi.org/10.2450/2018.0153-18

Flegel, W. A. (2011). Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfusion and Apheresis Science*, 44(1), 81–91. https://doi.org/10.1016/j.transci.2010.12.013

Guzijan, G., Srzentic, S. J., Pavlovic Jankovic, N., Djilas, I., & Lilić, M. (2019). Implementation of Molecular RHD Typing at Two Blood Transfusion Institutes from Southeastern Europe. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(2), 114–120. https://doi.org/10.1159/000496751

Iwamoto, S. (2005). Molecular aspects of Rh antigens. *Legal Medicine*, 7(4), 270–273. https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2004.12.002

Khetan, D., Verma, A., Chaudhary, R. K., & Shukla, J. S. (2020). Molecular characterisation of RhD variants in North Indian blood donor population. *Transfusion Medicine*, 30(4), 295–303. https://doi.org/10.1111/tme.12690

Koutsouri, T., Chaiκali, A., Giannopoulos, A., Douramani, P., Flesiopoulou, I., Panos, P., … Politou, M. (2019). Frequency distribution of RHD alleles among Greek donors with weak D phenotypes demonstrates a distinct pattern in central European countries. *Transfusion Medicine*, 29(6), 468–470. https://doi.org/10.1111/tme.12623

Lyu, H., Jiao, S., Ma, W., & Hu, B. (2021). A novel RHD allele caused by c.739 G> C mutation was identified in a Chinese individual. *Transfusion*, 61(1), E1–E2. https://doi.org/10.1111/trf.16133

McGowan, E. C., Lopez, G. H., Knauth, C. M., Liew, Y. W., Condon, J. A., Ramadi, L., … Hyland, C. A. (2017). Diverse and novel RHD variants in Australian blood donors with a weak D phenotype: implication for transfusion management. *Vox Sanguinis*, 112(3), 279–287. https://doi.org/10.1111/vox.12488

Mishra, G., Sachan, D., Krishna, D., Parchure, D., Madkaikar, M., & Kulkarni, S. (2020). Characterising Indian RhD variants by serological and molecular methods. *Transfusion Medicine*, 30(4), 324–326. https://doi.org/10.1111/tme.12689

Müller, T. H., Wagner, F. F., Trockenbacher, A., Eicher, N. I., Flegel, W. A., Schönitzer, D., … Gassner, C. (2001). PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion*, 41(1), 45–52. https://doi.org/10.1046/j.1537-

2995.2001.41010045.x

Ogasawara, K., Sasaki, K., Isa, K., Tsuneyama, H., Uchikawa, M., Satake, M., & Tadokoro, K. (2016). Weak D alleles in Japanese: AC.960G>A silent mutation in exon 7 of the RHD gene that affects D expression. *Vox Sanguinis*, 110(2), 179–184. https://doi.org/10.1111/vox.12322

Oodi, A., Daneshvar, Z., Goudarzi, S., & Amirizadeh, N. (2020). RHD genotyping of serological weak D phenotypes in the Iranian blood donors and patients. *Transfusion and Apheresis Science*, 59(5), 102870. https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102870

Person, R. D. de M., Arnoni, C. P., Muniz, J. G., Vendrame, T. A. de P., Latini, F. R. M., Cortez, A. J. P., … Castilho, L. M. de. (2020). Serologic strategy in detecting RHD altered alleles in Brazilian blood donors. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 42(4), 365–372. https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.08.004

Peyrard, T., & Wagner, F. F. (2020). AABB Technical Manual. In C. S. Cohn, M. Delaney, S. T. Johnson, & L. M. Katz (Eds.), *AABB Technical Manual* (20th ed., pp. 329–354).

Polin, H., Danzer, M., Hofer, K., Gassner, W., & Gabriel, C. (2007). Effective molecular RHD typing strategy for blood donations. *Transfusion*, 47(8), 1350–1355. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01278.x

Qian, C., Li, Q., Yuan, C., Bao, Y., Yu, S., Li, S., … Zhong, J. (2019). A new RhD variant allele is caused by a RhD 26 T > G mutation in a Chinese Han woman with a weak D phenotype. *Transfusion*, 59(4), 1400–1401. https://doi.org/10.1111/trf.15135

Sandler, S. G., Flegel, W. A., Westhoff, C. M., Denomme, G. A., Delaney, M., Keller, M. A., … Simon, C. D. (2015). It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion*, 55(3), 680–689. https://doi.org/10.1111/trf.12941

Smart, E., & Armstrong, B. (2020). Blood group systems. *ISBT Science Series*, 15(S1), 123–150. https://doi.org/10.1111/voxs.12593

Thongbut, J., Laengsri, V., Raud, L., Promwong, C., I-Na-Ayudhya, C., Férec, C., … Fichou, Y. (2021). Nation-wide investigation of RHD variants in Thai blood donors: Impact for molecular diagnostics. *Transfusion*, 61(3), 931–938. https://doi.org/10.1111/trf.16242

Trucco Boggione, C., Nogués, N., González-Santesteban, C., Mufarrege, N., Luján Brajovich, M., Mattaloni, S. M., … Cotorruelo, C. (2019). Characterization of RHD locus polymorphism in D negative and D variant donors from Northwestern Argentina. *Transfusion*, 59(10), 3236–3242. https://doi.org/10.1111/trf.15504

Urbaniak, S. J. (2006). Alloimmunity to RhD in humans. *Transfusion Clinique et Biologique*, 13(1-2 SPEC. ISS.), 19–22. https://doi.org/10.1016/j.tracli.2006.02.020

Van Sandt, V. S. T., Gassner, C., Emonds, M. P., Legler, T. J., Mahieu, S., & Körmöczi, G. F. (2015). RHD variants in Flanders, Belgium. *Transfusion*, 55(6), 1411–1417. https://doi.org/10.1111/trf.12947

Vege, S., Jakobsen, M. A., Antonsen, B., Westhoff, C. M., Yazer, M., & Aeschlimann, J. (2020). Impact of RHD genotyping on transfusion practice in Denmark and the United States and identification of novel RHD alleles, *Transfusion*, 61, 256-65. https://doi.org/10.1111/trf.16100

Westhoff, C. M. (2004). The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. *Transfusion*, 44(11), 1663–1673. https://doi.org/10.1111/j.0041-1132.2004.04237.x

Westhoff, C. M. (2007). Rh complexities: Serology and DNA genotyping. *Transfusion*, 47(SUPPL. 1), 17–22. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01305.x

Westhoff, C. M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D. O. D., & Kevin Foskett, J. (2002). Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 12499–12502. https://doi.org/10.1074/jbc.C200060200

Yan, L., Wu, J., Zhu, F., Hong, X., & Xu, X. (2007). Molecular basis of D variants in Chinese persons. *Transfusion*, 47(3), 471–477. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.01138.x

Yanasik, M., Oguz, F. S., Besisik, S. K., Huslu, M., Ozturk, G., Temurhan, S., & Aydin, F. (2021). Frequency of RHD variants in serologically weak D Turkish blood donors. *Transfusion and Apheresis Science*, 60(2), 103024. https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.103024

Zacarias, J. M. V., Pereira, E. M. de F., Visentainer, J. E. L., Guelsin, G. A. S., de Melo, F. C., & Sell, A. M. (2016). Frequency of RHD variants in Brazilian blood donors from Parana State, Southern Brazil. *Transfusion and Apheresis Science*, 55(1), 120–124. https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.04.016

7. SİMGELER ve KISALMALAR

HTR	Hemolitik transfüzyon reaksiyonu
IAT	İndirekt antiglobulin test
ICAM4	Hücrelerarası adezyon molekülü 4
ISBT	Uluslararası Transfüzyon Derneği
SSP-PCR	Sekans Spesifik Primer-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RHAG	Rh ilişkili glikoprotein
RhIg	Anti-D immünglobulin
YDHH	Yenidoğanın hemolitik hastalığı

8. EKLER

EK1

Şekil 8.1 Etik kurul karar formu (Sayfa 1)

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ ARAŞTIRMA ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	**Türk Toplumundaki RhD Varyantlarının Genotiplendirilerek Serolojik Tanı İle Korelasyonunun Araştırılması**
	ARAŞTIRMA SORUMLULARI	Prof.Dr.Güher Göral
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Dr.Levent Tufan Kumaş, Dr.Salih Haldun Bal, Prof.Dr.Barbaros Oral, Doç.Dr.Yasemin Heper, Doç.Dr.Ferah Budak
	ARAŞTIRMANIN TAHMİNİ SÜRESİ KATILACAK GÖNÜLLÜ SAYISI	2 yıl 100
	DESTEKLEYİCİ KURULUŞ	UÜ.BAP, TÜBİTAK
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ / NİTELİĞİ	İnsanlardan elde edilen materyallerin (kan,idrar,doku vb) veya rutin tanı yöntemlerinin kullanıldığı araştırma / Uzmanlık tez çalışması

	Belge Adı	Tarihi	Dili
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	03.05.2011	Türkçe
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	03.05.2011	Türkçe
	ARAŞTIRICILAR İÇİN TAAHHÜTNAME FORMU	01.04.2011	Türkçe

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2011-10/27 Tarih : 10 Mayıs 2011 Fakültemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Güher Göral'ın sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; 1- Araştırmanın yapılmasının uygun olduğuna. 2- Etik Kurul kaşesi bulunan *"Onam"* formunun kullanılması ve bu formun gönüllüye çalışma hakkında sözlü bilgi verilmesi sonrasında eksiksiz bir şekilde doldurulması. 3- Araştırmanın başlama tarihinin bldirilmesi ve araştırma tamamlandığında özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesi. 4- Araştırma protokolünde ve başvuru formunda yapılacak tüm değişiklikler için Etik Kuruldan izin alınması gerektiğinin sorumlu araştırıcılara iletilmesine oybirliği ile karar verildi.

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN Başkan	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji AD.	K	☐ E ■ H	■ E ☐ H	
Prof.Dr.Betül Berrin SEVİNİR Başkan Yardımcısı	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	☐ E ■ H	☐ E ■ H	
Prof.Dr.Engin ULUKAYA Üye	Biyokimya	U.Ü.T.F. Tıbbi Biyokimya AD.	E	☐ E ■ H	■ E ☐ H	
Doç.Dr.Necdet KARLI Üye	Nöroloji	U.Ü.T.F. Nöroloji AD.	E	☐ E ■ H	☐ E ■ H	
Doç.Dr.Elif BAŞAĞAN MOĞOL Üye	Anesteziyoloji	U.Ü.T.F. Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD.	K	☐ E ■ H	■ E ☐ H	
Doç.Dr.Murat CİVANER Üye	Deontoloji	U.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	☐ E ■ H	■ E ☐ H	
Yrd.Doç.Dr.Bülent EDİZ Üye	Biyoistatistik	U.Ü.T.F. Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD.	E	☐ E ■ H	■ E ☐ H	

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Şekil 8.2 Etik kurul karar formu (Sayfa 2)

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ ARAŞTIRMA ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

Yrd.Doç.Dr.Şaduman BALABAN ADIM Üye	Patoloji	U.Ü.T.F. Tıbbi Patoloji AD.	K	☐ E ■ H	■ E ☐ H
Yrd.Doç.Dr.Pınar VURAL Üye	Psikiyatri	U.Ü.T.F. Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	☐ E ■ H	■ E ☐ H
Yrd.Doç.Dr.Tuna GÜLTEN Üye	Tıbbi Genetik	U.Ü.T.F. Tıbbi Genetik AD.	K	☐ E ■ H	■ E ☐ H
Araş.Gör.Dr.Çiğdem Mine YILMAZ Üye	Hukuk	U.Ü.Hukuk Fakültesi	K	☐ E ■ H	■ E ☐ H
Ecz.Zeynep Gözde TUNCER Üye	Eczacı	UÜ.SUAM	K	☐ E ■ H	■ E ☐ H
Ahmet GÖREN Üye	Sağlık mesleği mensubu olmayan üye	Serbet Meslek	E	☐ E ■ H	■ E ☐ H

9. TEŞEKKÜR

Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı alanıyla birlikte akademik hayata adım atmamı sağlayan, desteğini hep yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Okan TÖRE'ye,

Sınırsız bir sabır ve hoşgörüyle bana hep destek olan değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Güher GÖRAL ve Prof. Dr. H. Barbaros ORAL'a,

Çalışmamın her aşamasında ve özellikle de moleküler testlerin çalışılmasında bana yardımcı olan İmmünoloji Laboratuvarının göz bebeği, özverili, çalışkan ve bir o kadar da alçak gönüllü Figen AYMAK'a,

Serolojik testlerin çalışılmasında bana yardımcı olan, birlikte çalışmaktan gurur duyduğum, yetkin ve çalışkan Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezi personeline,

Her sabah gülümseyerek geldiğim işyerimi bana evim gibi hissettiren, zor zamanlarımda hep yanımda olan, bana her zaman her konuda koşulsuz destek olan ablam Doç. Dr. Yasemin HEPER'e ve elim, ayağım, gözüm, kulağım olan "arkaTAŞ"ım, kardeşim S. Haldun BAL'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

10. ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta ve lise eğitimini Bursa'da tamamlamıştır. 1985 Yılında girdiği Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 1992 yılında mezun olmuş, sırasıyla Pınarbaşı (Kayseri) SSK Sağlık İstasyonu, Bursa SSK Hastanesi ve Mudanya (Bursa) SSK Sağlık İstasyonu'nda görev yapmıştır.

Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı alanındaki Yüksek Lisansını 2008 yılında tamamlamış, 2005 yılından bu yana Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Raşit DURUSOY Kan Merkezinde görev yapmaktadır.

Halen Türkiye Kan Merkezleri ve Transfüzyon Derneği Yönetim Kurulu Üyeliği ve Bursa Tabip Odası Yönetim Kurulu Başkanlığı görevlerini de yürütmektedir.

Yayınlar

Bal, S. H., Heper, Y., Kumaş, L. T., Mistik, R., & Töre, O. (2009). Izole anti-HBc pozitif olgularda HBV-DNA varliğinin araştirilmasi ve bu olgularin kan bankaciliği açisindan önemi [Investigation of the presence of HBV-DNA in isolated anti-HBc positive cases and their importance in blood banking]. *Mikrobiyoloji bulteni*, 43(2), 243–250.

Bal, S. H., Heper, Y., Kumaş, L. T., Guvenc, F., Budak, F., Göral, G., & Oral, H. B. (2018). Effect of storage period of red blood cell suspensions on helper T-cell subpopulations. *Blood transfusion*, 16(3), 262–272.

Bal, S. H., Kumaş, L. T., Heper, Y., Budak, F., Göral, G., Can, F. E., & Oral, H. B. (2020). Impact of Storage Period on CD4+/CD8+ T Lymphocyte Ratio in Erythrocyte Suspensions. *Turkish Journal of Immunology*, 8(2), 44-49.

Ödüller

Sözlü Bildiri Üçüncülük Ödülü (2015). Türk Toplumundaki RhD Varyantlarının Genotiplendirilerek Serolojik Tanı İle Korelasyonunun Araştırılması. Kumaş, L. T., Bal, S. H., Heper, Y., Budak, F., Oral, H. B., & Göral, G. VII. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi, 14-18 Aralık 2015, Antalya, Türkiye

Poster Bildiri Birincilik Ödülü (2015). Trombosit Süspansiyonlarının Depolanma Sürecinin Oksidatif Stresle İlişkisi. Kumaş, L. T., Bal, S. H., Tüysüz, Ö., Heper, Y., Budak, F., Göral, G., & Oral, H. B. VII. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi, 14-18 Aralık 2015, Antalya, Türkiye

Sözlü Bildiri Birincilik Ödülü (2017). RHD Varyasyonlarının Moleküler Tiplendirilmesinde Yöntem Olarak SSP-PCR ile Floresan PCR Karşılaştırılması. Kumaş, L. T., Bal, S. H., Heper, Y. X. Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi, 12-15 Mart 2017, Antalya, Türkiye

Sözlü Bildiri Üçüncülük Ödülü (2020). Preparation of Erythrocyte Cell Panel for Alloadsorption Test in the Presence of Autoantibody. Kumaş, L. T., Bal, S. H., Heper, Y. XIIIth National / Ist International Congress of Blood Banking & Transfusion Centers of Turkey, 8 -12 March 2020, Antalya, Turkey