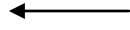
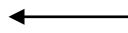


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MATERNAL KANDAN FETAL DNA İZOLASYONU İLE
RHESUS D VE CİNSİYET GENOTİPLEMESİ**

BÜŞRA YAŞA

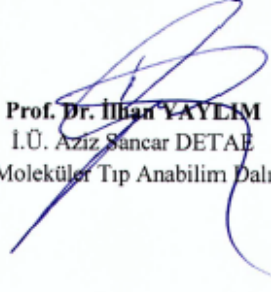
**DANIŞMAN
DOÇ.DR.SELÇUK SÖZER TOKDEMİR**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

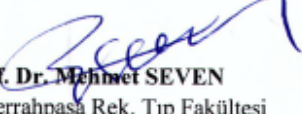
İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Büşra YAŞA tarafından Doç. Dr. Selçuk SÖZER TOKDEMİR'in danışmanlığında hazırlanan "Maternal Kandan Fetal DNA İzolasyonu ile Rhesus D ve Cinsiyet Genotiplenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 08.01.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı


Doç. Dr. Selçuk S. TOKDEMİR
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı


Prof. Dr. Mehmet SEVEN
İ. Ü. – Cerrahpaşa Rek. Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

BÜŞRA YAŞA



İTHAF

Hazırladığım çalışmayı en başta desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hatalarımda beni hoşgörüyü karşılayan tezimin hazırlanmasında emeğini ve desteğini esirgemeyen danışmanıma, çok değerli hocam Doç.Dr.Selçuk Sözer Tokdemir'e ,

Tez çalışmam için gerekli hasta grubunu temin edip, çalışmama önemli katkısı olan sayın Uzm.Dr.Orhan Şahin'e

Çalışmam sırasında hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen labratuvar arkadaşlarım Bio. Selin Fulya Toprak, Bio. Can Veysel Şoroğlu, Bio. Çağıl Koçana, MSc.Hilal Hekimoğlu ve MSc.İldeniz Uslu'ya

Akademik hayatımıza beraber başladığımız arkadaşlarım Bio.Pınar Köseoğlu, MSc.Burcu Salman,Bio. Elif Darbuka ve Dr.Ekin Kuntsal' a

Tez hazırlama ve yazımı sırasında stresime, endişeme, heyecanıma, derdime destek olup her türlü sıkıntıyı hoşgörüyü karşılayıp çalışmama manevi destek veren sözlüm Gürkan Çevik'e,

En çok da hayatımın en değerli ve en anlamlı varlıkları eğitim öğretim hayatım boyunca yardımını desteğini görüşlerini esirgemeyen canım annem Nurgül YAŞA ve Babam Şakir Ufuk Yaşa'ya ve kardeşlerim Uzm.Klinik.Psk Elif Nazlı YAŞA ve Asya Yaşa sonsuz teşekkür ederim.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29083



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1. Araştırmanın Konusu	1
1.2. Araştırmanın Önemi.....	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kan Grupları	3
2.2. Rhesus(RH) D Faktörü	4
2.3. Rh Uyuşmazlığı	5
2.4. Eritroblastosis Fetalis.....	6
2.5. Konjenital Adrenal Hiperplazi.....	7
2.6. Maternal Kandaki Fetüse Ait Hücreler	8
2.7. Hücre Dışı Fetal DNA	8
2.8. Rh ve SRY Genotiplemeesi	11
2.8.1. Rutinde Kullanılan Girişimsel Olmayan Tanı Yöntemleri	11
2.8.2. Rutinde Kullanılan Girişimsel Tanı Yöntemleri	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Örneklerin Toplanması	13
3.2. Kan Ürünlerinin Toplanması ve Ayırıştırılması	13
3.3. Araştırmada Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	13
3.3.1. Kullanılan Cihazlar	13
3.3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	14

3.4. Plazmadan DNA izolasyonu	14
3.4.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Malzemeler	14
3.4.2. Hücre Dışı DNA İzolasyonu	15
3.4.3. Maternal DNA İzolasyonu	16
3.5. Örneklerin RT PCR Analizinin Yapılması	17
3.5.1. Gerçek Zamanlı PCR İşlemi İçin Gerekli Malzemeler	17
3.5.2. RH D Geni Ekzon 5 Bölgesinin Primer ve Probenun Hazırlanması	18
3.5.3. RH D Geni Ekzon7 Bölgesinin Primer ve Probenun Hazırlanması	19
3.5.4. SRY Geni Primer ve Probenun Hazırlanması.....	20
3.5.5. GAPDH Geni Primer ve Probenun Hazırlanması.....	21
3.6. PCR Protokolü	22
3.7. Gerçek Zamanlı PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	22
3.8. Kontaminasyona Karşı Ölçütleri.....	23
3.9. İstatiksel Analiz	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Olguların Genel Değerlendirilmesi.....	24
4.2. Maternal DNA'ların Analizleri.....	29
4.3. Fetal Hücre Dışı DNA'ların Analizleri.....	29
4.3.1. Hücre dışı DNA Analizi ile Fetüsün Rh (-) Olarak Değerlendirilmesi.....	29
4.3.2. Hücre dışı DNA Analizi ile Fetüsün Rh (+) Olarak Değerlendirilmesi.....	30
4.3.3. Hücre dışı DNA Analizi ile SRY Amplifikasyonun Değerlendirilmesi	30
4.4. Hücre Dışı DNA Analiz Sonucu ile Doğum Sonrası Sonuçların Karşılaştırılması	31
4.5. Maaliyet Analizi.....	34
5. TARTIŞMA	36
6. KAYNAKLAR	43
ETİK KURUL KARARI	49
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	50
ÖZGEÇMİŞ	51

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Ekzon 5,Ekzon 7, SRY ve GAPDH Genlerinin Primer ve Prob Dizileri.....	17
Tablo 2: Ekzon 5 Gen Bölgesi RT-PZR Karışımı	18
Tablo 3 :Ekzon 7 Gen Bölgesi RT-PZR Karışımı	19
Tablo 4 : SRY Geni RT-PZR Karışımı.....	20
Tablo 5 :GAPDH Geni RT-PZR Karışımı.....	21
Tablo 6: Çalışmaya Katılan Olguların Yaş ve Gebelik Trimesterlerine Göre Dağılımı	24
Tablo7: Olguların Yaş, Gebelik Haftası, Baba Rh Durumu ve Gebelik Öyküsü	25
Tablo 8: hddNA ile Yapılan Fetal Rh D ve SRY sonuçları.....	31
Tablo 9: Trimesterler Arasında Doğruluk Yüzde Değerlerinin Karşılaştırılması	34
Tablo10: SağlıkBakanlığı SUT Verilerine Göre Rh (-) Gebelere Yapılan Ek Testlerin Ücretleri	34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil1: ABO ve Rh AntijenlerininGösterimi.....	4
Şekil 2: Rh(-) Gebenin İlk Gebelikte Anti-D Duyarlaşması Sonucu İkinci Gebelikte Rh Uyuşmazlığının Oluşması.....	7
Şekil 3: Rh(-) Ekzon 5 ve Ekzon 7 RT-PZR ile Gösterilmesi.....	29
Şekil 4: Rh(+) Ekzon 5 ve Ekzon 7 RT-PZR ile Gösterilmesi.....	30
Şekil 5 : Kız ve Erkek Fetüsün Jel Elektroforezi Görüntüsü.....	31



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HdDNA: Hücre Dışı DNA

Rh: rhesus D

CVS: korionvillüsbıyopsis

DCT: direkt coombs testi

ICT: indirectcoombs testi

DNA: deoksiribonükleik asit

Ig D: immünglobulin D

Ig G: immünglobulin G

Kb: kilobaz

PZR:Polimeraz Zincir Reaksiyon

RT-PZR: Gerçek Zamanlı PZR

USG: Ultrason

EDTA: Etilen DiaminTetraasetik Asit

KAH: Konjenital Adrenal Hiperplazi

MCA: Orta Serebral Arter

ÖZET

Yaşa B. Maternal Kandan Fetal DNA İzolasyonu ile Rhesus D ve Cinsiyet Genotiplenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi İstanbul. 2019.

Eritroblastosis Fetalis, gebelerde annenin Rhesus (Rh) faktör negatif (-), fetüsün ise Rh pozitif (+) olmasıyla gerçekleşen ve fetal hidropsa sebebiyet vererek ölüme neden olabilen yenidoğanın hemolitik hastalığıdır. Hamilelik sürecinde, Rh ve cinsiyet tespitinde kullanılan koryon villüs, amniyosentez ve kordosentez örnekleme gibi invaziv yöntemler düşük riskine neden olmakta ve müdahale zamanı da gebelik haftasına bağlı olarak değişmektedir. Bunların yanında, invaziv olmayan ultrasonografi, indirekt ve direkt coombs testleri gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Ancak bu tetkiklerin duyarlılığı invazif yöntemler kadar yüksek olmadığından yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda gelişen maternal kandan elde edilen hücre dışı (hd)fetal DNA'ların tesbitinin yapılması prenatal tanıda önemli tekniklerin geliştirilmesine olanak tanımıştır.

Çalışmamızda, invaziv işlem gerektirmeden gebelerden alınan periferik kandan fetüse ait hdDNA izole edilerek, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle RhD genine ait ekzon 5 ve ekzon 7 bölgeleri ve SRY genine özgü tasarlanan primerler yardımıyla Fetal Rh ve cinsiyet belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, toplam 100 Rh (-) gebeden toplanan örneklerde hdDNA'lar izole edilerek Rh D ve SRY analizleri yapıldı. 100 olgunun 54'ü bu süreçte doğum gerçekleştirdi ve elde edilen sonuçlar doğum sonrası bebeğe ait Sağlık Bakanlığı Bebek Takip Sistemi'nde bulunan sonuçlar ile karşılaştırıldı. Analiz sonuçlarımızla Yenidoğan Takip Sisteminden elde edilen sonuçlarla yapılan karşılaştırmada, Rh D geni için 54 vakada 3 uyuşmayan negatif sonuç, SRY için ise 1 uyuşmayan negatif sonuç belirlenmiştir. Kalan 46 olgunun karşılaştırmalı analizi ise doğumlar gerçekleştirdikten sonra yapılacaktır. Bulunan sonuçlar bebek takip sistemi güncellendikçe konfirme edilecektir.

Elde edilen sonuçlara göre, bu teknik ile maternal plazmadan yeterli miktarlarda ve kalitede hdDNA elde edilerek genetik tanı amacıyla fetal Rh D ve SRY'nin belirlenebileceği anlaşılmıştır. Bu metod kullanılarak, Rh uyumsuzluğundan kaynaklanan Eritroblastosis Fetalis ve cinsiyetin belirlenmesine katkı sağlayabileceği, Konjenital Adrenal Hiperplazi, Hemofili, Duchenne Muscular Distrofi gibi hastalıkların erken dönemde belirlenmesine imkân sağlayabilecektir. Böylece, bu teknik kullanılarak elde edilen veriler ışığında erken dönemde tedaviye başlanılabilmesi ve gereksiz yapılan tedavi ve maliyetin önüne geçilebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Hücre dışı DNA, Eritroblastosis Fetalis, Rh D, SRY, Konjenital Adrenal Hiperplasia

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29083



ABSTRACT

Yaşa B. Rhesus D and Sex Genotyping with Fetal DNA İsolation from Maternal Blood. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics MSc. Thesis. İstanbul. 2019.

Erythroblastosis Fetalis is a condition in which the mother is Rhesus (Rh) factor negative (-) and the fetus is Rh positive (+) and can cause causing fetal hydropsia and death. During pregnancy, invasive methods including corion villus, amniocentesis and cordocentesis sampling could be used in the detection of Rh and gender, which all might cause miscarriages and the interference time of these procedures varies depending on the gestational week.

In addition, non-invasive methods including ultrasonography, indirect and direct coombs tests are also applied. However, the sensitivity of these tests is not as high as the invasive methods. For these reasons, new methods are needed. Detection of cell free fetal DNA derived from maternal blood in recent years has enabled the development of important techniques in prenatal diagnosis.

In our study, fetal Rh and gender analysis were performed by utilizing the fetal cell free DNA obtained from pregnant women whole blood with non-invasive procedure with the specific primers of exons 5 and 7 for RhD gene and SRY gene and were analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR) method.

For this purpose, a total of 100 Rh (-) pregnant women were collected and cell free DNAs were isolated and Real Time PCR and Rh D and SRY analyzes were performed. 54 of the 100 cases that we collected were delivered their babies during this process and the analysis results were compared with the Turkish Ministry of Health New Born Follow up System. In the Rh D comparison, there were 3 false negative results in 54 cases and SRY gene there were 1 false negative result. The remaining 46 cases the analysis were completed and will be confirmed when the system is updated with new born babies.

According to these results, the use of this technique could be applied as a genetic diagnostic test to the determine the fetal RhD and the SRY from maternal plasma. The early diagnosis of erythroblastosis fetalis due to Rh mismatch and Congenital Adrenal Hyperplasia, Hemophilia and Duchenne Muscular Disrophy due to the presence of SRY may lead to apply this technique as an early diagnostic test and early assessment of the result for the treatment modalities. Therefore, the unnecessary stress, treatment and the cost to the patient could be prevented.

Key Words: Cell free DNA, Erythroblastosis Fetalis, Rh D, SRY, Congenital Adrenal Hyperplasia The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 29083

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Araştırmanın Konusu

Günümüzde prenatal tanı kadın doğum ve tıbbi genetik uzmanları için önemli bir yer edinmiştir. Kullanılan girişimsel olmayan ultrasonografi (USG), 2'li ve 3'lü testler ve indirect coombs (ICT) testleri yeterli duyarlılığa sahip olmadığı için prenatal tanıda yetersiz kalmıştır[1]. Girişimsel olarak kullanılan korion villus örnekleme, amniyosentez ve kordosentez uygulamalarının yüksek abortus riski ve işlem süresinin uzunluğu nedeniyle araştırmacılar komplikasyon riski daha az ve daha kısa sürede sonuç alınabilecek yöntemlere yönelmişlerdir[2].

Kişinin hamileliği boyunca hücre dışı DNA, eksozom gibi bebeğe ait olabilecek genetik materyal taşıyan hücrelerin plasenta yoluyla bebekten anneye geçtiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiş ve elde edilen yeterli miktarda materyalin prenatal tanıda kullanılmasına olanak sağlamıştır[3]. Prenatal tanıda kullanılabilecek duyarlılığı ve doğruluğu yüksek olan aynı zamanda girişimsel olmayıp düşük riski ve maliyet gerektirmeyen bir tanı yöntemi ortaya çıkmıştır[4]. Maternal kanda fetüse ait hücrelerin az sayıda olması ve izolasyonundaki zorluklar nedeniyle maternal serumda hücre dışı fetal DNA çalışmaları önem kazanmıştır[5].

Hücre dışı fetal nükleik asitlerin prenatal tanıdaki öneminin anlaşılmasıyla bu genetik materyal fetüste olabilecek çeşitli hastalıkların tespitinde de kullanılmıştır. Preeklamsi, fetal gelişme geriliği durumlarında ortaya çıkabilecek komplikasyonların belirlenmesinde, Konjenital Adrenal Hiperplazi gibi hastalıklara yatkın gebelerin fetüslerinde cinsiyet taraması yapılmasında ve eritroblastosis fetalis gibi yenidoğanda hemolitik hastalık ve ölümle sonuçlanabilecek komplikasyonların oluşmasında rol oynayan Rhesus D geninin belirlenmesinde hücre dışı fetal DNA'lar kullanılabilmektedir[6].

Bunu gerçekleştirmek üzere çalışmamızda maternal kandan ayrıştırılan plazmadan DNA izolasyonu ile Eritroblastosis Fetalis'de kullanılmak üzere Rhesus(RH) D genindeki Ekzon 5 ve Ekzon 7 bölgelerinin ve cinsiyeti belirlemek için SRY geninin Gerçek Zamanlı PZR yöntemiyle analizi yapılarak girişimsel olmayan bir yöntemle tesbit edilmesi mümkün olabilecektir.

1.2. Araştırmanın Önemi

Eritroblastosis Fetalis, hamilelikte ortaya çıkan annenin Rhesus(Rh) (-) bebeğin ise Rh (+) olması durumunda görülen izoimmünizasyon sonucu anneden fetüse geçen antikorların fetal hemolize sebep olduğu ve bunun sonucunda fetüste anemiye ve fetal hidropsa sebebiyet veren bir hastalıktır. Tedavi edilmemesi fetal ölümlere sebebiyet verir. Bu durumda klinikte yapılan uygulama 28. Haftadan itibaren gebeye yapılan Rh D proflaksisidir (Rhogam) [7]. Bu durumun tesbit edilebilmesi için rutinde kullanılan girişimsel olmayan indirekt coombs testi yeterli duyarlılığa ulaşamamıştır. Bu yüzden Rh (-) olan bütün gebelere Rh D proflaksisi uygulanmaktadır. Bu durum, anneye gereksiz antikor uygulanmasına ve gereksiz maliyete yol açmaktadır. Bu çalışmada gebelik takibinde önemli bir sorun teşkil eden fetüsün Rh(+) olmasının girişimsel olmayan yöntemlerle hamileliğin erken dönemlerinde belirlenip izlenecek tedavide gereksiz uygulamaların önüne geçmeyi sağlamaktır.

Bunun yanında, fetal hDNA ile bebeğin cinsiyetin belirlenmesi Konjenital Adrenal Hipeplazi'nin tanısında ve tedavide kullanılabileceği gibi[8] Hemofili ve Duchenne Muskuler Distrofi benzeri X'e bağlı kalıtılan hastalıkların erken dönemde tanısında mümkün olabilecektir[9].

HİPOTEZ: Maternal dolaşımda invazif olmayan bir yöntemle elde edilen hücre dışı fetal DNA'ların fetüse ait bilgi taşıdıkları bilindiğine göre erken dönemde fetal Rh ve cinsiyet gerçek zamanlı PZR tekniğiyle kolay ve ucuz bir şekilde belirlenebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kan Grupları

Kan kişilere göre değişebilen özellikler taşımaktadır. Kan 3 farklı hücre grubunun bir araya gelmesiyle oluşur. Bunlar eritrosit, lökosit ve trombositlerdir. Kan gruplamalarında en çok eritrosit yüzeyindeki antijenler kullanılmıştır. Eritrositlerin yüzeylerinde 200 den fazla antijen saptanmıştır ve bu antijenlere göre 21 farklı kan grubu sistemi mevcuttur. Fakat günümüzde klinikte kullanılan sistemler ABO ve RH D sistemleridir[10].

ABO sistemi 1901 yılında Amerikalı Biyolog Karl Landsteiner tarafından oluşturulmuştur. Landsteiner eritrosit yüzeyindeki antijenlerin birbirleriyle girdiği tepkimelere dayanarak A, B, 0 ve AB kan gruplarını tanımladı. Eritrositler ile serum arasındaki reaksiyonların eritrositler üzerindeki antijenlerin ve serumdaki antikorların varlığı ile ilişkili olduğunu açıkladı[10]. Aglütinasyon, eritrosit antijenlerinin serumdaki antikorlar tarafından bağlanması sonucu ortaya çıkar. Bu karşılaştırma A ve B antijenlerine göre yapıldı ve eritrositlerin ifade ettiği antijene bağlı olarak, A veya B grubu olarak değerlendirildi. Üçüncü bir kan grubu, A ve B'nin özelliklerinden yoksun gibi tepki gösteren eritrositler içermektedir. Grup daha sonra "O" anlamına gelen "Ohne" kelimesinden sonra "O" olarak adlandırıldı. Sonraki yılda, dördüncü kan grubu olarak AB, ABO kan grubu sistemine eklenmiştir. Bu eritrositlerin yüzeyinde hem A hem de B antijenlerinin ifadesiyle ortaya çıkarılmıştır[10]. Bu bilgilerin özeti Şekil 1'de gösterilmiştir.

ABO lokusu, eritrositler üzerinde A ve B antijenlerini sentezleyen spesifik glikoziltransferazları kodlar. ABO lokusu 9. kromozomun 9q34.1-q34.2 bölgesi üzerinde yer almaktadır. 18 kb'den fazla genomik DNA ve 7 ekson içerir. Ekzon 7 gen bölgesi en büyük olanıdır ve kodlama dizisinin çoğunu içerir[11].

	Alyuvardaki antijen (aglutinojen)	Kan plazmasındaki antikor (aglutinin)
ABO kan grubu	A	Anti-B
	B	Anti-A
	AB	—
	0	Anti-A ve Anti-B
Rh kan grubu	Rh (+)	—
	Rh (-)	Anti-Rh (Anti-D)

Şekil1: ABO ve Rh AntijenlerininGösterimi

2.2. Rhesus(RH) D Faktörü

Rh kan grubu sistemi en az 45 bağımsız antijen içeren insan kan gruplarının en polimorfik olanıdır[12]. Transfüzyon ve eritroblastosis fetalis gibi durumlarda en önemli klinik faktördür. Rh faktörü ilk defa 1940 yılında Landsteiner ve Wiener, Rhesus maymunları üzerinde yaptığı aglütinasyon çalışmaları sırasında bulunmuştur.

Rhesus D proteini eritrositler üzerinde bulunur ve lipoprotein yapıdadır. Membran içindeki ATPaz ile etkileşimde bulunarak hücre membranının stabilitesini sağlar[13].

Kromozom 1' in p kolunda yer alan Rh D geni 10 adet ekzon içererek otozomal dominant kalıtım gösterir. İki tane aleli vardır. Bunlar rhD ve rhCE dir[13].Bunlardan Rh D, D alelini kodlarken Rhce, cc ve Ce yi kodlar. Rh geninin 3' ucundaki 30 kb'lık SMPI ve 9 kb'lık rhesus kutusu Rh D ve Rhce arasındaki en büyük farklılıktır. Rh(-) kişilerde D antijenine rastlamazken Rh(+) kişilerde D antijeni mevcuttur. Bazı durumlarda D antijenin ifadesinin azalmasıyla zayıf D dediğimiz az da olsa D antijenin bulunması durumu mevcuttur[14].

Antijenler, RhD ve RhCE olmak üzere Rhesus proteini üzerinde lokalizedir ve protein dizilerindeki farklılık tarafından üretilmesi gerçekleşir.Diğer kan grup proteinlerinin farkı, Rhesus proteinleri sadece eritrositlerin zarlarında ifade edilir[15].

Kromozom 1'e yakın olan iki gen (RHD, RHCE) Rh proteinlerini, RhD ve RhCE'yi kodlar; biri D antijeni taşır ve diğeri CE antijenlerini çeşitli kombinasyonlarda taşır (ce, Ce, cE veya CE). Genler, % 97 oranında özdeşdir, her biri 10 ekzona sahiptir.

Rh D antijenin yüksek immünojenik etkili kan grubu antijeni olarak bilinir ve fetal eritrositlerin membranında 9. Haftadan itibaren görülmeye başlanır. Rh D eritrosit yüzeyindeki yapısal proteinler olarak bilinir.

Şayet bir kişi RhD geni mevcut ve aglütinasyon gerçekleşiyor ise kişi Rh (+) olarak, RhD'de aglütinasyon gerçekleşmez ise Rh(-) olarak değerlendirilir.

2.3. Rh Uyuşmazlığı

Rh uyuşmazlığı gebelik durumunda ortaya çıkan annenin Rh(-) olması ve bebeğin Rh(+) olması durumudur[16]. Gebelikte 9 haftadan itibaren oluşan D antijeni anne kanına karışmasıyla karşı antikor oluşturur. Plasenta yoluyla oluşan antikorların fetüse geçmesiyle fetüsü tehlikeye sokar. İlk gebeliklerde ortaya çıkmamasına rağmen 2. Gebelikte hızlı cevap oluşturarak fetal hidropsi sebebiyet verir[17]. Bu da fetüste fetal anemi ve ölümle sonuçlanabilir. 28. Haftadan itibaren uygulanan anti D uygulamasıyla ve bu uygulamanın her kanama sırasında uygulanması gibi bir klinik söz konusudur[18]. Anti D profilaksisinin sürekli uygulanması hem ağır maliyet hemde gereksiz antikor oluşumuna sebebiyet vermektedir.

Rh(-) olan bir gebenin önceki gebeliği düşük veya küretaj ile sonlandırılmışsa fetal eritrosit geçişinden dolayı duyarlanmış olma olasılığı yüksektir. Rh(-) gebenin tekrar hamile olması durumunda klinikteki uygulamada ilk önce baba Rh'ı belirlenmeli ve Rh'ının pozitif olması durumunda 12-16, 28-32 ve de 36 haftalarda Ig-G düzeyi ölçülüp anne kanında Ig-G yapısındaki antikor oluşumuna bakılarak hemoliz durumu belirlenmelidir[19].

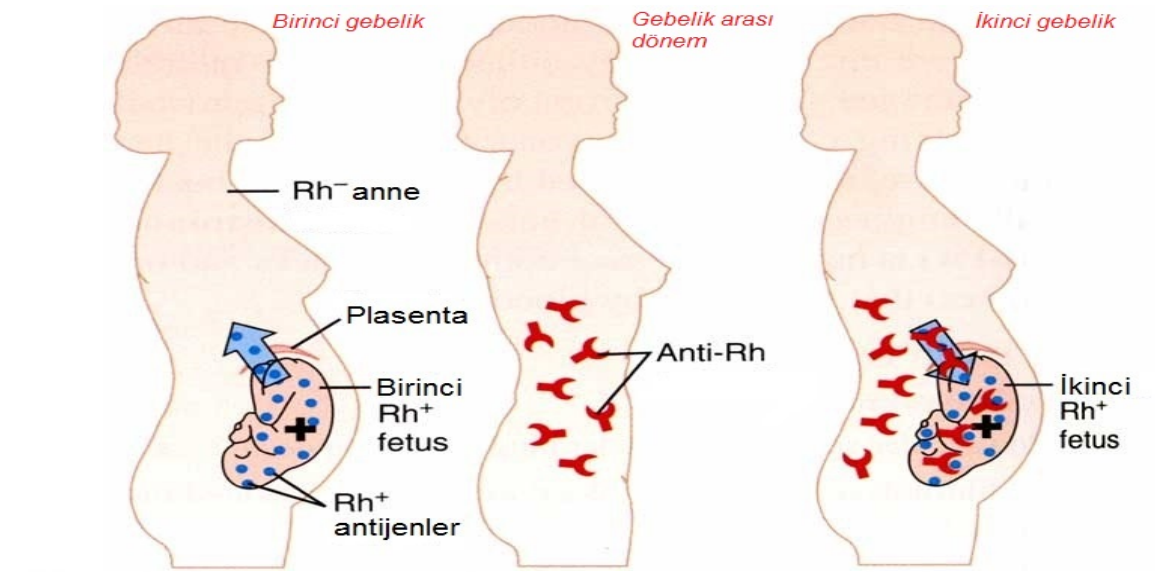
Rh uyuşmazlığı çok azda olsa birinci gebelikte ortaya çıkabilir. Büyükanne teorisi bu durumu açıklar niteliktedir. Bu teoriye göre Rh (-) gebenin Rh(+) annesi vardır ve doğum sırasında Rh(-) bebek Rh(+) antijenleriyle karşılaşarak duyarlılık kazanmıştır[20].

2.4. Eritroblastosis Fetalis

Eritroblastosis fetalis olarak adlandırılan yenidoğan hemolitik hastalığı eritrositlerin yüzey antijenlerin yol açtığı maternal immün reaksiyonla sonuçlanabilen anne ve fetus arasındaki kan uyumsuzluğu durumudur. Yeni doğanda sarılığın ve aneminin en önemli nedenidir[17].

Rh ve ABO kan grubu sistemleri yeni doğan hemolitik hastalığıyla yakından ilişkilidir. Rh sistemi Rh (-) bi gebe Rh(+) bi fetus algıladığında hastalığın ortaya çıkabilen en şiddetli formundan sorumludur[17]. Rh alt grup antijenleri anne ve babadan genetik yollarla fetüse geçer bu alt gruplar C,c,D,d, E,e faktörleridir ve kan uyumsuzluğunun en büyük sebebi D antijenidir.

Annenin Rh(-) ama fetusun Rh(+) olduğu durumda gebelik ve doğum sırasında anneye fetal eritrositlerin karışmasıyla anne duyarlı hale gelir ve anti-D antikorü üretir(Şekil 2). Fetusden anneye geçen az bir miktar kan en başta 19S fraksiyonda ve IgM yapısı içeren antikorlar oluşturur. Bu molekül 19S büyüklüğünde olduğunda plasentadan geçebilecek boyutta değildir. Fakat ikinci kez oluşan kanama sonrası anneye geçen fetal eritrositler bu defa 7S büyüklüğünde IgG yapısında antikor oluşması bu 7S büyüklüğündeki fraksiyonun plasentadan fetüse geçmesine izin vererek hemolitik durumu oluşturur[21]. Böyle bi durumda hemolitik olayın şiddetine göre hafif hemoliz ya da ağır anemiler oraya çıkabilir. Ağır anemin oluşması dalak ve karaciğerde tolere edilmeye çalışılır bu durumda dalak ve karaciğer büyümesi meydana gelir ve buna bağlı olarak kalp yetmezliği ve dolaşımda sıkıntılar meydana gelebilir. Görülen bu klinik tabloya fetal hidrops denilmektedir[22]. Hidrops gelişmesi durumda hem fetal dönemde hem de doğum sonrasında ölümlere sebebiyet verebilir.



Şekil 2: Rh(-) Gebenin İlk Gebelikte Anti-D Duyarlaşması Sonucu İkinci Gebelikte Rh Uyuşmazlığının Oluşması.

Annede Rh duyarlaşmasının önlenmesi için Rh pozitif bebeğin doğumundan yada düşük ektopik gebelik gibi durumlar sonrası 72 saat içinde 300ug insan anti-D antikor uygulaması yapılmalıdır[23]. Bununla fetüsten anneye geçebilecek yaklaşık 10 ml kanın nötralizasyonu gerçekleşir. Gebeliğin 28-32 haftalarında ve doğumdan sonra yapılan 2 doz anti D uygulamasının yararlı olabileceği çalışmalarla gösterilmiştir[24].

ABO ve Rh Uyuşmazlığı dışında alt grup uyuşmazlıkları da az sıklıkla olsa da yeni doğan hemolitik hastalığına neden olabilir[20].

2.5. Konjenital Adrenal Hiperplazi

Konjenital Adrenal Hiperplazi (KAH), adrenal korteksten salgılanan 5 enzimden biri olan 21 hidroksilaz enzimi eksikliğiyle karakterize olan ve otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır[25]. Hastalıkta kortizol eksikliğinin yanı sıra androjen fazlalığı ve buna eşlik eden aldosteron eksikliği görülür. Klinik olarak 15 binde 1 görülür. KAH sonucu doğan bebeklerde dışı fetüste virilizasyon görülür. Tedavide androjen yapımını baskılamak için yüksek dozda glukokortikoid verilir[26]. KAH şüphesi bulunan hastalara gebeliğin erken dönemlerinde cinsiyeti belirlemeden uygulanan tedavi eğer fetüs dışı ise gerekli bir yaklaşım olurken, dışı erkek ise gereksiz androjen baskılanmasına sebebiyet verir[27].

2.6. Maternal Kandaki Fetüse Ait Hücreler

1893 yılında alman patolog Schmorl fetal orijinli tromblast hücrelerine, eklemsi sonucu ölmüş 17 kadını akciğerlerinde rastlamasıyla fetal hücrelerinde annede olabileceğini keşfetti[28]. 1969 yılında fetal lenfositlerin maternal dolaşıma geçmesiyle erkek fetüs taşıyan gebe kadınlarda Y kromozomuna rastlanmasıyla devam eden gelişmeler PCR ve FISH tekniklerinin gelişmesiyle maternal dolaşımdaki fetal hücrelerin belirlenmesini sağladı[3].

1893 de maternal dolaşımda fetal hücrelerin olduğu görülmesiyle başlayan araştırmalar maternal kanda fetüse ait trofoblastların, lökositlerin, hemotopoetik kök hücre ve fetal nükleotitli kırmızı kan hücrelerinin keşfedilmesini sağladı. Bu hücrelerin maternal dolaşıma plasentada olan çeşitli kanamalar sonucu geçtiği düşünülmektedir.[4]

Maternal fetüse ait bilgi barındıran trofoblastlar şekillerinden dolayı kolay ayırt edilebildiği için kullanılmaya başlanmıştır fakat gebeliğin birinci trimester döneminde akciğer dolaşımı nedeniyle kandan temizlenmeleri hücre sayısında belirgin bir düşüşe sebep olduğu için izolasyonu sırasında sıkıntılar ortaya çıkmıştır. Diğer olumsuz tarafı, plasentaya ait hücreler olduğu için mozaiksizme sebep olabileceğinden tanı için zorluk çıkarabilecekleri düşünülmüştür[29]

Diğer hücre tipi olan lökositler HLA antijenleri sayesinde kolaylıkla ayırt edilebiliyorken yapılan çalışmalarda lenfosit antijenlerine özgül monoklonal antikörlerin oluşmaması bir önceki hamilelikle kontamine olabileceği şüphesiyle önemini yitirmiştir[30]

Eritroblastların fetal hücre kaynağı olarak tanı testlerinde kullanılmasını engelleyen en önemli faktör eritroblastların %20 sinin maternal kaynaklı olmasıdır.[4]

2.7. Hücre Dışı Fetal DNA

Hücre dışı fetal DNA (hdfDNA), maternal plazmada serbest bulunan kısa fragmente haldeki DNA parçalarıdır. Gebeliğin 4 haftasından itibaren dolaşımda bulunarak fetüse ait genetik bilgileri barındırır[31]. Maternal kandaki plazmanın gebelik haftasıyla değişmekle birlikte ortalama %10 ununu oluşturur[28]. Hücre dışı fetal DNA'nın fetal genomu ait bilgiler barındırması ve gebelik spesifik olup maternal

sirkülasyondan kısa sürede temizlenmesi prenatal tanıda önemli bir kaynak olarak görülmesine neden olmuştur[32].

1997 yılında Lo ve arkadaşlarının hcfDNA'yı maternal dolaşımda keşfetmesiyle maternal kandaki nükleik asit sirkülasyonuna dayanan girişimsel olmayan prenatal tanı için çeşitli metodlar geliştirmiştir[33]. İlk klinik uygulamalarda konjenital adrenal hiperplazi[34] ve X'e bağlı hastalıklarda fetal cinsiyet belirlenmesinde ve yenidoğan hemolitik hastalığı için Rh(-) kadınlarda fetal Rh belirlenmesinde kullanıldı[35]. Sonraki çalışmalarda NIPT (girişimsel olmayan prenatal test) olarak nitelendirildi ve tek gen hastalıklarında tanımlaması için de kullanılmaya başlandı[36]. Fetal cinsiyetin belirlenmesinde konjenital adrenal hiperplazi ve X'e bağlı geçiş gösterebilen hastalıkların yanı sıra Dushenne muskular distrofi ve Hemofili için sonuçların kullanışlı olabileceği düşünülmektedir. Fetal cinsiyet belirlenmesinde gebeliğin 7 haftasında %70, 9. haftasından sonra %100 başarı sağlanmıştır. Rh D genotiplemesi kan uyuşmazlığı durumunda kullanılarak neofetal kanamalar sonucu duyarlaşabilecek anneye yapılan gereksiz anti D uygulamasını ortadan kaldırabilecektir. Hollanda Fransa ve İngiltere de Rh D genotiplemesi rutin testler arasına girerek gereksiz uygulamaların önüne geçilmeye çalışılmıştır[37]. Tek gen bozukluklarının tesbit edilmesinde kullanılan fetal DNA'lar Akondroplazi, hemoglobinopatiler, konjenital adrenal hiperplazi, kistik fibroz, Huntington hastalığı, Miyotonik distrofi gibi giderek artan çeşitlilikte kalıtsal hastalıkların test edilmesinde kullanılmaktadır[38].

Hücre dışı fetal DNA gebeliğin değişen şartlarından etkilenebileceği için preeklamsi ve anöploidi düşündüren durumlarda Fetal DNA'nın derişimin artması bu durumları tanımlamada kullanılmıştır[39].

Erken dönem girişimsel olmayan prenatal tanıda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) dayalı protokoller mevcuttu fakat sonraki dönemlerde MPS, digital PZR ve yeni nesil dizileme ile anöploidi ve maternal ve paternal orijin belirlenerek monogenik hastalıkların belirlenmesi için çalışmalar yapılmaya başlanmıştır[40].

Hücre dışı DNA aynı zamanda kanser araştırmaları için kullanılmaktadır. Kanserli hücrelerden açığa çıkabile hcfDNA dolaşıma katılıp serumda bulunmasıyla kanserde biyomarker olarak kullanılabileceği araştırmalarda gösterilmiştir[41]. Kanserli hastalarda tümör yükünün tedavi yanıtını izlemeye kullanılabileceği düşünülmektedir.

Hücre dışı DNA'nın, yapılan araştırmalarda hücrede gerçekleşen apoptoz ve nekroz olayları sırasında ortaya çıkabileceği gösterilmiştir. Son zamanlardaki çalışmalarda hdDNA kaynağının eksozomlar yoluyla da maternal sirkülasyona katılabileceğini ortaya koydu[42]. Hücrelerin parçalanma nedenleri olarak organizmanın gereksinimi olmayan hücreleri ortadan kaldırması, emrionik gelişim sırasındaki dokunun yapısal durumu ve şeklinin sağlanması ve apoptoz ve nekroz olaylarının gerçekleşmesi gösterilebilir. Bu olaylar sonrasında görülen DNA degradasyonu 50 ile 300 bp arasındaki parçaların plasentadan geçerek maternal dolaşıma katılabileceğini gösterir[43].

Literatür araştırmalarına bakıldığında hdDNA ile ilgili 30.000 bine yakın çalışma olduğu görülmektedir. Bunların %80'i son 10 yıl içerisinde yapılmıştır. Hücre dışı DNA'nın maternal kandaki keşfi ile non-invaziv tanı yöntemlerinin geliştirilmeye çalışılması bu duruma katkı sağlamıştır.

Hücre dışı fetal DNA gebelik sırasında maternal plazmanın %3-6'sını gebelik haftasının ilerlemesiyle ortalama %6-8'ini içerdiği gösterilmiştir. Maternal kanda bulunan hdDNA fragmente haldedir ve bunun %80'inin 193'bp den küçük, %50 sinin 300 bp'den küçük olduğu saptanmıştır[44].

Gebeliğin en erken 32. Gününde görülmeye başlar[38]. Gebeliğin 4 haftasından itibaren maternal dolaşımda görülen hücre dışı DNA miktarında gebeliğin sonunda başlangıcına oranla %21 oranında bir artışı gözlemlenmektedir[45]. Hücre dışı DNA miktarının gebelikten 2 saat, abortustan 24 saat sonra maternal dolaşımdan kaybolması prenatal tanı için önceki gebelikten oluşabilecek kontaminasyonları engellemektedir[46]. Bu nedenle hücre dışı DNA'nın stabilitesini sağlamak için maternal kanın doğru bir şekilde alınması gerekmektedir[47]. Uygun şekilde alınıp saklanmayan örneklerde maternal kaynaklı lokositlerin parçalanmasıyla hücre dışı DNA'nın miktarı büyük ölçüde seyreliş olacak ve fetal fraksiyona miktarının azalmasına yol açabilecektir. Bu amaçla çalışmalarda çeşitli tüpler kullanılır. Maternal kan için, EDTA'lı (etilendiamin tetraasetikasit) veya BCT Cell Free DNA tüpleri mevcuttur. EDTA'lı tüplere alınan kan 6 saat içinde santrifüj edilmeli ve ayrıştırılan plazma -80 °'de muhafaza edilmelidir[48]. Cell-Free DNA BCT tüplerindeki örnekler, oda sıcaklığında 14 gün bozulmadan saklanmaktadır[49]. Fetal fraksiyona olumsuz etkisi olan diğer faktör gebenin obezitesidir[50]. Dolaşımda maternal seruma

göre az ve sabit miktardaki hücre dışı DNA, kilolu hastalarda artan plazma hacmine orantılı seyretmektedir. Ayrıca obez gebelerde maternal doku fazlalığından dolayı maternal kökenli hücre dışı DNA'nın miktarının artışına sebep olmaktadır[51].

Fetal yapıdaki ve plasental yapıdaki bozukluklarında da fetal fraksiyona etki ettiği düşünülmektedir[52]. Maternal serumun %13'ünü oluşturan hücre dışı DNA; Trizomi 21 bulunan fetüslarda yaklaşık %15, Trizomi 18 bulunan fetüslarda yaklaşık %9'unu oluşturur[53]. Bu oran triploid bulunan fetüslarda %2,5-2,8 seviyelerine kadar gerilemektedir. Trizomi 13 ve Monozomi X bulunan fetüslarda, öploidlere yakın sayılmakla birlikte daha düşük hücre dışı DNA oranları görülmektedir[54]. Sadece hücre dışı DNA'nın maternal serumdaki miktarıyla bile yapılacak analizde, Down sendromlu fetüslerin yüksek belirleyiciliğe sahip olmasını açıklamaktadır[55]. Klinik açıdan incelendiğinde, obezite, erken gebelik dönemi ve uygun olmayan numune alımı gibi ek risk faktörü olmayan gebelerde raporlanacak düşük miktarlardaki fetal fraksiyon, triploidiler ve anöploidiler açısından uyarıcı nitelikte olabilmektedir[56].

2.8. Rh ve SRY Genotiplemesi

Kan uyumsuzluğu durumunda fetüsün Rh durumunun öğrenilmesi için Rh D genotiplemesi yapılmaktadır. Rh D geni 10 ekzon içerir ve literatürde yapılan çalışmalarda Ekzon 5, Ekson 7, Ekzon 10 ve intron kombinasyonlarını kullanarak fetal Rh belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız Ekzon 5 ve Ekzon 7 bölgeleri belirlemeye çalışılarak genotipleme yapılmıştır. Ekzon 5 gen bölgesi 82 bp, Ekzon 7 gen bölgesi 122 bp ve SRY geni 137 bp uzunluğunda bu genlere özgü primer ve probler tasarlanarak genotipleme yapılmıştır.

2.8.1. Rutinde Kullanılan Girişimsel Olmayan Tanı Yöntemleri

Rutin klinik uygulamalarda Rh uyumsuzluğu bulunması muhtemel hastaların yani Rh(-) gebe kadınlara; indirekt coombs(İCT),direkt coombs(CT) testleri ve USG ultrason verileri değerlendirilir. Ayrıca gebelik haftasına bağlı, biyokimyasal temelli olarak bakılan 2'li ve 3'lü testlerde bebeğin gelişimi ve genetik açıdan durumu hakkında bilgi vermektedir. Fakat kullanılan bu invazif olmayan yöntemler yüksek doğruluk oranına ve hassasiyete ulaşamadığı için bir tanı yöntemi olarak kullanılamamaktadır.

İndirekt coombs testi, maternal kanda ilk feofetal kanamada yavaşça gerçekleşen anti D'nin IgM yapısının ve ikinci kan geçişi durumunda oluşan anti D'nin IgG yapısının varlığının tesbit edilmesine dayalı bir testtir[12]. Bu durumun anneye fetüsten Rh(+) antikorların geçtiğinin kanıtıdır. İndirekt coombs testi hazır antikorların üzerine maternal serumun eklenip inkübe edilemesi sonucu görülür. Direkt coombs testi fetüsteki eritrositlerin yüzeyinde anneden geçen antikorların tesbit edilmesidir[12].

2.8.2. Rutinde Kullanılan Girişimsel Tanı Yöntemleri

Rutin klinik uygulamalarda yapılan korion villus, amniosentez ve kordosentez işlemleri girişimsel tanı yöntemleri olarak adlandırılır. Amniosentez fetüsün amnion sıvısından alınan hücrelerin kültüre edilip büyümesi esasına dayanarak fetüse ait bilgilere erişmemizi sağlar[57]. Kordosentez hamilelikte 8 haftadan sonra özel bir iğne yardımıyla karın duvarında rahim içerisine girilerek fetüsün göbek kordonundan kan alınması işlemidir[58]. Korion villus gelişmekte olan plasentanın bir kısmının biyopsi ile alınmasıdır[59]. Bu üç yöntemde bebeğe ait bilgi alınmasını sağlar. Ancak %0,5-2 arasında düşük riski taşımaktadır. Bunun yanında sonuç alabilmek için uzun kültür işlemleri gerekmektedir. Bu nedenlerden dolayı araştırmacılar, girişimsel olmayan yöntemlerin gerekliliğine ve geliştirilmesinin önemli olduğuna vurgu yapmaya yönelmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma Aziz Sancar Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez projemiz İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 08.12.2017 tarihli 20 nolu toplantısındaki onay ile başlamıştır ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 29083 nolu proje ile maddi olarak desteklenmektedir.

Çalışmaya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvuran, Rh uyumsuzluğu bulunup gebelik haftası 9 ila 40 hafta arası olan 100 Rh(-) gönüllü gebe, onam formu alınarak çalışmaya dâhil edildi. Katılan bütün gebeler onam formunun okuyup anlayıp imzalaması ardından çalışmaya katıldı.

3.2. Kan Ürünlerinin Toplanması ve Ayrıştırılması

Gebe kadınlardan ön koldan alınan 10 ml venöz kan örneği Streck cfDNA (BCT®) tüplerine alınarak İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirildi. İlk önce 300 xg'de 20 dakika (dk) çevrilerek süpernatantları yani serum kısmı 15'lik falkonlara koyuldu. Çökeltideki beyaz kısım maternal DNA'ların izolasyonunu gerçekleştirmek üzere ayrılıp -80°C'e kaldırıldı. 2. Santrifuj aşaması 5000 xg'de 10 dk santrifuj edilerek süpernatant kısımları hdDNA izolasyonu için alındı. Çökelti kısımları protein ve hücresel atıkları içerdiği için atıldı. Ayrılan serumlar DNA izole edilene kadar -80°C'de saklandı.

3.3. Araştırmada Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.3.1. Kullanılan Cihazlar

- Gerçek Zamanlı PCR (LightCycler® 480-Roche)
- Thermo Scientific™ NanoDrop 2000

- Santrifüj (Beckman Colder)
- Mikrosantrifüj (Mikro 120-Hettich)
- Isıtıcı blok (Eppendorf)
- Vorteks
- Otomatik pipet seti (Eppendorf Research plus 1-10 µl,10-100µl ve 100-1000µl)

3.3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Manuel Nükleik Asit İzolasyon kiti: Qiagen QiAMP DNA Blood Mini Kit, PureLink® Genomic DNA Mini Kit
- Etanol (%96-100)
- TaqMan Primer (Biomatik)
- TaqMan Probe (Biomatik)
- Plate (Light Cycler plateler)
- Streck Cell-Free DNA BCT® EDTA'lı tüp
- 2 ml steril eppendorf tüpleri
- Steril, filtreli 10 µl,100 µl,ve 1000 µl pipet uçları
- Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

3.4. Plazmadan DNA izolasyonu

3.4.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Malzemeler

- Mikrosantrifüj
- Vorteks
- Isıtıcı blok
- Otomatik pipet seti (1-10 µl,10-100µl ve 100-1000µl)
- Qiagen QiAMP DNA Blood Mini Kit

- Etanol (%96-100)
- 2 ml steril ependorf tüp
- Steril, filtreli 10 µl, 100 µl, ve 1000 µl pipet uçları
- Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven
- PCR grade H₂O

3.4.2. Hücre Dışı DNA İzolasyonu

Qiagen QiAMP DNA Blood Mini Kiti, kandan DNA izolasyonu prosedürüne uygun spin kolon yöntemi ile yapılmıştır.

Maternal plazmadan hücre dışı fetal DNA eldesi amacıyla;

- 20 µl Qiagen Proteinaz K temiz 1,5 ml'lik tüpe konuldu.
- 200 µl maternal plazma örneği eklendi.
- Plazma örneğinin üzerine 200 µl AL buffer eklendi ve 15 saniye (sn) vortekslendi.
- Örnek 56°C de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örneğe 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve 15-20 sn vortekslendi.
- Karışım dikkatlice spin kolona aktarıldı. 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası spin kolon temiz toplama tüpüne alındı.

- Spin kolonun üzerine 500 µl AW1 buffer eklendi ve 10000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon temiz toplama tüpüne alındı.

• Spin kolonun kapağı yavaşça dikkatlice açıldı, üzerine 500 µl AW2 buffer eklendi. 16000 xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon 2 ml'lik ependorf tüpe alındı.

- Spin kolonun kapağı dikkatlice açıldı. Üzerine 50 µl AE buffer eklendi ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.

- Sonrasında 10000 xg'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon atıldı.
- Elde edilen DNA Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 ile ölçüldü.

3.4.3. Maternal DNA İzolasyonu

- Maternal DNA izolasyonu Invitrogen PureLink® Genomic DNA Mini Kit ile total nükleik asit Buffycoat protokolü doğrultusunda yapıldı.
- 200 µl buffy coat örneği bir 2 ml'lik eppendorf tüp içine alındı ve 50µl PBS ile süspanse edildi.
- Karışımın içerisine 20µl proteinase K ekledi ardından 20 µl RNAaz eklendi ve 10-15 sn vortekslenerek 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 200µl purelink genomiks lysis/ binding buffer eklendi ve homejen hale gelmesi için 25-30 sn vortexlendi.
- Karışım 55°C lik su banyosunda 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- 200 µl 100% lük etil alkol eklenerek 5 sn vortexlendi.
- Spin kolonlara karışım kenarlara sızmayacak şekilde dikkatlice eklendi.
- Oda sıcaklığında 10000xg de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolon temiz toplama tüpüne alındı.
- Spin kolona 500µl Wash Buffer 1 dikkatli bir şekilde eklendi.
- Oda sıcaklığında 10000xg'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolon temiz toplama tüpüne alındı.
- Spin kolona 500µl Wash Buffer 2 dikkatli bir şekilde eklendi
- Oda sıcaklığında max. hızda 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolon temiz eppendorf tüplerine alındı.
- Spin kolonun içine 50µl purelink genomic elution buffer eklendi. 3-4 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Oda sıcaklığında max hızda 1 dk santrifuj edildi. Santrifuj sonrası spin kolon atıldı.

- Elde edilen DNA Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 ile ölçüldü.

3.5. Örneklerin RT PCR Analizinin Yapılması

Çalışmamızda LightCycler® 480-Roche cihazında Ekzon 5, Ekzon7, SRY ve GAPDH genlerine özgü tasarlanan primerle TaqMan probolar kullanılarak analizler yapılmaya başlandı. Şekil 1’de Ekzon 5, Ekzon7, SRY ve GAPDH genlerine özgü primer ve prob dizileri gösterilmiştir.

Tablo 1: Ekzon 5,Ekzon 7, SRY ve GAPDH Genlerinin Primer ve Prob Dizileri

Gen	Primer (forwardreverse)	Prob
Rh D	F 5’CGCCCTCTTCTTCTTGTGGATG 3’	
Ekzon 5	R 5’GAACACGGCAATTCTTCTTCTTTC 3’	5’TCTGGCCAAGTTTCAACTCTGCTCGCT 3’
Rh D	F 5’GGGTGTTGTAACCGAGTGCTG 3’	
Ekzon 7	R 5’CCGGCTCCGACGGTATC 3’	5’CCCACAGCTCCATCATGGGCTACAA 3’
	F 5’TGGCGATTAAGTCAAATTCGC 3’	
SRY	R 5’CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT 3’	5’AGCAGTAGAGCAGTCAGGGAGGCAG A3’
	F 5’AGCCACATCGCTCAGACAC 3’	
GAPDH	R 5’GCCCAATACGACCAAATCC 3’	UPL PROBE 66

3.5.1. Gerçek Zamanlı PCR İşlemi İçin Gerekli Malzemeler

- Real-Time PCR (LightCycler® 480-Roche)
- Vorteks
- Mikrosantrifüj
- Otomatik Pipet Seti(0,2-1 µl,1-10 µl ve10-100µl)(Eppendorf)
- TaqMan Primer
- TaqMan Prob

- Gennaxxon No Rox PCR mastermix
- 0,2'lik steril ependorf tüp
- Steril, filtreli 10 µl,100 µl,ve 1000 µl pipet uçlar
- Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven
- PCR grade H2O

3.5.2. RH D Geni Ekzon 5 Bölgesinin Primer ve Probenin Hazırlanması

Ticari olarak lipofilize şeklinde sentezlettirilen RhD genininEkzon 5 gen bölgesinin forward ve reverse primerleri: forward primeri için 272 µl; RhD geni Ekzon 5 reverse primer için 234 µl, steril saf su eklenerek 100 pmol/µl elde edilmek üzere çözüldü. 1:10 oranında dilüsyon yapılarak çalışma için solüsyon hazırlanıp -20°C'de saklandı.

Ticari olarak lipofilize şeklinde sentezlettirilen RhD geni Ekzon 5 gen bölgesinin TaqMan probu 71 µl steril saf su eklenerek 100 pmol/µl olacak şekilde çözüldü ve 1:100 oranında dilüsyon yapılarak çalışma için solüsyon hazırlanıp -20°C'de saklandı.

Rh D geni Ekzon 5gen bölgesi için 20µl total hacim olacak şekilde PZR reaksiyonu hazırlandı. Ekzon 5 forward ve reverse primerler için konsantrasyon 200nM, probe için konsantrasyon 100nM olacak şekilde belirlendi. 4µl izole edilen hdDNA kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Ekzon 5 Gen Bölgesi RT-PZR Karışımı

Bileşenler	Final Konsantrasyonları	Miktar
Forward Primer	200nM	0,4µl
Reverse primer	200nM	0,4µl
Master mix	1X	10µl

Probe	100nM	2µl
dH ₂ O	-	3.2µl
DNA	*	4 µl
TOPLAM		20µl

(*Farklı konsantrasyonlarda)

3.5.3. RH D Geni Ekzon7 Bölgesinin Primer ve Probenin Hazırlanması

Ticari olarak lipofilize şeklinde sentezlettirilen RhD geni Ekzon 7 gen bölgesinin forward ve reverse primerleri: reverse primeri için 218 µl ; forward primeri için 296 µl steril saf su eklenerek 100 pmol/µl elde edilmek üzere çözüldü. 1:10 oranında dilüsyon yapılarak çalışma için solüsyon hazırlanıp -20°C’de saklandı.

Ticari olarak lipofilize şeklinde sentezlettirilen RhD geni Ekzon 7 gen bölgesinin TaqMan probu 75 µl steril saf su eklenerek 100 pmol/µl olacak şekilde çözüldü ve 1:100 oranında dilüsyon yapılarak çalışma için solüsyonu hazırlanıp -20°C’de saklandı.

Rh D geni Ekzon 7gen bölgesi için 20µl total hacim olacak şekilde PZR reaksiyonu hazırlandı. Ekzon 7 forward ve reverse primerler için konsantrasyon 200nM, probe için konsantrasyon 100nM olacak şekilde belirlendi. 4µl izole edilen hdDNA kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3 :Ekzon 7 Gen Bölgesi RT-PZR Karışımı

Bileşenler	Final Konsantrasyonları	Miktar
Forward Primer	200nM	0,4µl
Reverse Primer	200nM	0,4µl
Master Mix	1X	10µl

Probe	100nM	2 µl
dH ₂ O	-	3.2 µl
DNA	*	4 µl
TOPLAM		20 µl

(*Farklı konsantrasyonlarda)

3.5.4. SRY Geni Primer ve Probenin Hazırlanması

Ticari olarak lipofilize şeklinde sentezlettirilen SRY geni forward ve reverse primerleri: reverse primeri için 212 µl ; forward primeri için 193 µl steril saf su eklenerek 100 pmol/µl elde edilmek üzere çözüldü. 1:10 oranında dilüsyon yapılarak çalışma için solüsyon hazırlanıp -20°C’de saklandı.

Ticari olarak lipofilize şeklinde sentezlettirilen SRY geni TaqMan probu 63 µl steril saf su eklenerek 100 pmol/µl olacak şekilde çözüldü ve 1:100 oranında dilüsyon yapılarak çalışma için solüsyonu hazırlanıp -20°C’de saklandı.

SRY geni için 20 µl total hacim olacak şekilde PZR reaksiyonu hazırlandı. SRY forward ve reverse primerler için konsantrasyon 200nM, probe için konsantrasyon 100nM olacak şekilde belirlendi. 4 µl izole edilen hdDNA kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4 : SRY Geni RT-PZR Karışımı

Bileşenler	Final Konsantrasyonları	Miktar
Forward primer	200nM	0,4µl
Reverse primer	200nM	0,4µl
Master mix	1X	10µl

Probe	100nM	2µl
dH ₂ O	-	3.2µl
DNA	*	4 µl
TOPLAM		20µl

(*Farklı konsantrasyonlarda)

3.5.5. GAPDH Geni Primer ve Probenin Hazırlanması

Ticari olarak lipofilize şeklinde sentezlettirilen GAPDH geni forward ve reverse primerleri: reverse primeri için 212 µl; forward primeri için 193 µl steril saf su eklenerek 100 pmol/µl elde edilmek üzere çözüldü. 1:10 oranında dilüsyon yapılarak çalışma için solüsyon hazırlanıp -20°C'de saklandı.

Ticari olarak lipofilize şeklinde sentezlettirilen GAPDH geni TaqMan probu 63 µl steril saf su eklenerek 100 pmol/µl olacak şekilde çözüldü ve 1:100 oranında dilüsyon yapılarak çalışma için solüsyonu hazırlanıp -20°C'de saklandı.

GAPDH geni için 20µl total hacim olacak şekilde PCR reaksiyonu hazırlandı. GAPDH forward ve reverse primerler için konsantrasyon 200nM, probe için konsantrasyon 100nM olacak şekilde belirlendi. 4µl izole edilen hdDNA kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5 :GAPDH Geni RT-PZR Karışımı

Bileşenler	Final Konsantrasyonları	Miktar
Forward primer	200nM	0,4µl
Reverse primer	200nM	0,4µl
Master mix	1X	10µl

Probe	100nM	2µl
dH ₂ O	-	3.2µl
DNA	*	4µl
TOPLAM		20µl

(*Farklı konsantrasyonlarda)

3.6. PCR Protokolü

TaqMan PCR protokolü; 95°C’de 10 dakikalık tek bir döngüden oluşan denatürasyon basamağı, ardından 95°C’de 5 saniye ve 60°C’de 40 saniye olacak şekilde 50 siklüsden oluşan annealing basamağından sonra 72°C’de 2 dakika final basamağıyla PCR tamamlanmıştır. Döngü sırasında florasan probun ışımasıyla ortaya çıkan logaritmik eğriye göre sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.7. Gerçek Zamanlı PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Maternal kandan izole edilen fetal DNA’ların Rh D genotiplemesinin değerlendirebilinmesi için Ekzon5 ve Ekzon7 gen bölgesine 3 tekrarlı olacak şekilde çalışma gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan LightCycler® 480-Roche cihazının ‘‘Absolute Quantification’’ yöntemi ile amplifikasyon oluşmasıyla ortaya çıkan ışıma sonucu logaritmik eğrilerin 26-36 siklus arasında gözlemlenmesi olgunun Rh (+) olduğunu, logaritmik eğrilerin gözlemlenmemesi olgunun Rh (-) olarak değerlendirilmesini sağladı. SRY geninin genotiplemesi için 3 tekrar olarak çalışıldı. LightCycler® 480-Roche amplifikasyon, Etidium Bromür jel görüntüsü ile 137 bp’lik bantlar tesbit edilmesi olgunun erkek, bant elde edilmemesi olgunun kız olarak değerlendirilmesini sağladı.

GAPDH geni örneklerdeki DNA varlığının belirlenmesi ve PZR reaksiyonun doğru çalışıp çalışmadığının belirlenmesi için amacıyla kullanılmıştır. Bütün örnekler için logaritmik eğrinin görülmesi gerekmektedir.

3.8. Kontaminasyona Karşı Ölçütleri

Fetal DNA ve maternal DNA izolasyonlarına kontaminasyonu önlemek için kullanılan tüm yüzey, mikropipetler ve malzemeler %70 lik alkolle temizlendi. Kullanılan bütün sıvılar için aerosol resistant pipet kullanıldı. Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonları UV lambalı PZR kabinlerinde gerçekleştirildi. PZR karışımları için steril filtreli pipet uçları kullanıldı. PZR reaksiyonundaki negatif kontrol kuyucuğu için steril enjeksiyonluk su kullanılmıştır.

3.9. İstatiksel Analiz

Çalışma grubumuzdaki olguların gebelik haftası, yaş bilgileri ve maternal serumdan elde edilen hDNA konsantrasyonları Microsoft Office® programı içerisinde bulunan istatistik programı kullanılarak ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Yöntem duyarlılıkları gruplar arasında yüzde (%) doğruluk şeklinde ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Sağlık Bilimleri Üniversitesi Okmeydanı Eğitim Araştırma Hastanesi'nden toplanan 100 Rh (-) gebenin fetüsünün Rh ve cinsiyeti RT-PZR yöntemiyle tesbit edildi. Doğum sonrası yenidoğan takip sisteminden doğan bebeklerin serolojik sonuçları ile elde edilen sonuçlarımız karşılaştırıldı.

4.1. Olguların Genel Değerlendirilmesi

Çalışmaya gebelik yaşı 9-40 hafta arası olan gebeler dahil edildi. Gebeler çalışma hakkında bilgilendirilerek onam formu alındı. Çalışmaya katılan gebelerin yaş, anti D profilaksisi, baba Rh durumu ve gebelik öyküsü bilgisi Tablo 7'de gösterilmiştir. Çalışmaya katılan gebelerden 65'ine anti D profilaksisi uygulanmıştır. 35'ine anti D profilaksisi uygulanmamıştır.

Çalışmadaki 100 Rh (-) gebenin yaş aralıkları 18 ile 39 yaş, yaş ortalaması 28,49 ± 5.55 dur. 100 gebeden 11'i 21 yaş ve altı, 10'u 35 yaş ve üstü olduğu görülmüştür. Gebelik haftalarının ortalaması 25.81 ± 9.02 'dir ve gebelik haftalarına göre trimester durumları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Gebelik haftası 9-10 hafta olan 5 kişi çalışmada bulunmaktadır.

Tablo 6: Çalışmaya Katılan Olguların Yaş ve Gebelik Trimesterlerine Göre Dağılımı

Gebelik Ayları	Gebelik Dönemleri	Gebe Sayısı (n=kişi)	Yaş Ortalaması (yıl $\pm$ SD))	Yaş Aralıkları
İlk 3 Ay	I. trimester	10	26,8 $\pm$ 7.64	20-32 yaş
İkinci 3 Ay	II. trimester	39	27,2 $\pm$ 8.33	18-39 yaş
Üçüncü 3 Ay	III.trimester	51	28,9 $\pm$ 8.91	18-39 yaş

Tablo7: Olguların Yaş, Gebelik Haftası, Baba Rh Durumu ve Gebelik Öyküsü

Olgu No	Yaş	Gebelik Haftası	Anti D Durumu	Baba Rh Durumu	DNA kons.	DNA Saflık Değerleri	Gebelik Geçmişi
H1	31	38	+	?	4,6	1,20	G2P1A0
H2	20	40	-	?	4,3	1,27	G1P0A0
H3	28	28	+	?	6,2	1,13	G3P1A1
H4	21	18	-	?	8,1	1,27	G1P0A0
H5	36	38	+	?	5,8	1,31	G4P2A1
H6	25	30	-	?	4,3	1,38	G1P0A0
H7	29	9	-	?	3,9	1,11	G2P1A0
H8	18	36	+	?	7,2	1,18	G1P0A0
H9	30	40	+	?	4,2	1,35	G2P1A0
H10	28	25	+	?	7,6	1,49	G3P1A1
H11	27	36	+	?	4,2	1,91	G2P1A0
H12	27	38	+	?	5,3	1,45	G2P1A0
H13	22	38	-	?	5,9	1,62	G1P0A0
H14	37	15	-	?	9,4	1,66	G1P0A0
H15	35	15	-	?	5,8	1,37	G2P1A0
H16	31	34	+	?	11,4	1,48	G1P0A0
H17	33	36	+	?	10,5	1,34	G2P1A0
H18	25	17	+	?	6,1	1,72	G3P2A0
H19	26	20	+	?	4,9	1,68	G2P1A0
H20	24	30	-	?	4,7	1,29	?
H21	30	32	-	?	5	1,36	?
H22	35	34	+	?	6,2	1,40	G3P2A0
H23	32	36	+	?	5,2	1,53	G2P1A0
H24	32	38	+	?	6,7	1,80	G3P1A1
H25	29	40	+	?	8,3	1,52	G3P2A0
H26	22	10	-	?	6,9	1,8	G1P0A0
H27	20	25	-	A+	3,4	1,72	G1P0A0
H28	24	9	-	0+	5,7	1,59	G2P1A0
H29	32	25	-	A+	6,3	1,57	G4P2A1

H30	23	12	-	O+	4,9	1,5	G1P0A0
H31	27	28	-	B+	5,6	1,8	?
H32	33	27	+	O+	5,3	1,45	G3P2A0
H33	32	28	+	A+	2,9	1,61	?
H34	26	35	-	A+	5,3	1,7	G3P2A0
H35	24	38	+	A+	5,8	1,9	G1P0A0
H36	27	35	+	O+	6,2	2,3	G2P1A0
H37	30	30	+	A+	7,9	1,97	G2P1A0
H38	33	32	+	O+	6,5	1,7	G2P1A0
H39	38	33	+	A+	7,6	1,68	G1P0A0
H40	35	39	-	A+	7,1	1,92	G1P0A0
H41	39	21	+	O+	4,9	1,74	G4P1A2
H42	24	9	-	B+	7,1	1,23	G1P0A0
H43	39	15	+	O+	8,3	1,40	G4P3A0
H44	30	25	+	O+	10,3	1,55	G3P2A0
H45	32	15	+	AB+	9,4	1,38	G2P1A0
H46	25	20	+	?	8,5	1,46	G2P1A0
H47	23	23	-	B+	13,2	1,58	G1P0A0
H48	26	17	-	AB+	8,2	1,1	G1P0A0
H49	24	35	+	A+	49,3	1,3	G2P1A0
H50	25	22	+	A+	69,1	1,23	G2P1A0
H51	26	24	-	A+	26,3	1,13	G2P1A0
H52	27	20	-	A+	5,6	1,68	G1P0A0
H53	29	31	+	O+	38,4	1,18	G1P0A0
H54	27	20	-	A+	65,5	1,21	G1P0A0
H55	32	10	+	O+	6,0	1,36	G3P1A0
H56	25	28	-	B+	19,1	1,34	G1P0A0
H57	39	35	-	A+	42,4	1,1	G3P2A0
H58	23	25	+	A+	68,6	1,12	G3P1A1
H59	29	24	-	B+	60,3	0,88	G1P0A0
H60	30	34	-	A+	106,3	0,89	G2P1A0
H61	27	28	+	O+	41,5	0,92	G2P1A0
H62	39	34	+	A+	39,3	1,28	G3P2A0

H63	24	27	+	A+	15,1	1,65	G3P1A1
H64	26	38	+	0+	10,7	1,59	G2P1A0
H65	25	22	-	B+	15,4	1,69	G1P0A0
H66	25	15	-	A+	12,1	1,76	G1P0A0
H67	27	17	-	AB+	9,8	1,62	G1P0A0
H68	25	39	+	0+	7,0	1,75	G2P1A0
H69	38	40	-	?	13,2	1,65	G2P1A0
H70	32	28	-	A+	11,4	2,41	G2P1A0
H71	36	18	-	0+	8,7	1,76	G2P1A0
H72	32	29	+	0+	19,7	1,41	G2P1A0
H73	30	20	-	?	13,0	2,05	G3P0A2
H74	20	12	+	A+	17,0	1,96	G2P1A0
H75	27	32	-	A+	23,5	1,41	G2P1A0
H76	23	16	+	0+	24,3	1,25	G2P1A0
H77	20	28	-	0+	21,3	1,22	G3P2A0
H78	27	15	?	A+	20,0	2,11	G2P1A0
H79	20	29	-	AB+	2,11	2,09	G1P0A0
H80	34	15	+	A+	19,6	2,16	G3P1A1
H81	29	28	-	A+	9,2	1,51	G1P0A0
H82	45	10	+	B+	8,3	1,56	G8P7A0
H83	25	20	-	B+	5,6	1,46	G2P1A0
H84	34	15	+	0+	10,2	1,75	G3P1A1
H85	33	30	+	0+	23,9	1,98	G2P1A0
H86	21	12	-	A+	8,9	1,97	G2P1A0
H87	20	28	+	A+	9,5	1,9	G2P1A0
H88	28	25	-	0+	14,3	1,85	G1P0A0
H89	34	15	+	B+	11,1	1,68	G3P2a0
H90	35	37	+	A+	28,9	1,62	G3P2A0
H91	30	28	+	A+	24,7	1,89	G2P1A0
H92	25	28	-	0+	27,3	1,50	G2P1A0
H93	18	25	-	A+	19,8	1,26	?
H94	36	33	+	AB+	35,6	1,44	G3P2A0
H95	27	29	+	A+	20,5	1,82	G1P0A0

H96	25	35	+	A+	37,1	1,61	G1P0A1
H97	28	12	-	A+	14,3	1,21	G2P1A0
H98	33	21	+	B+	17,4	1,62	G2P1A0
H99	19	24	-	0+	20,4	1,68	G1P0A0
H100	36	17	-	0+	12,6	1,66	G3P2A0

(H: Hasta, +: anti-D Uygulanmış, -: anti-D Uygulanmamış, G: Geçirilen gebelik sayısı, P: canlı doğum sayısı, A: düşük gebelik sayısı, A+: A Rh(+), B+:B Rh(+), 0+:0 Rh (+), AB+: AB Rh(+)? : Bilinmiyor)

Gebelik öyküsü bilinen 95 olgunun 26'sının ilk gebeliği, 69'unun ise 2 ve üzeri gebeliği mevcuttur.

100 olgudan 51'ine gebelik sırasında kanama,düşükle sonuçlanan gebelik, 2. doğumve ICT pozitifliği gibi nedenlerden dolayı anti D profilaksisi uygulanmış, 49'una uygulanmamıştır.

Elde edilen DNA konsantrasyonları 2.9 ng/μL-106.3 ng/μL arasındadır ve ortalama 15.72±17.08 ng/μL olarak belirlenmiştir. Trimesterlere göre DNA konsantrasyonları Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8: Trimesterlere Göre DNA Konsantrasyonlarının Karşılaştırılması

	DNA Konsantrasyonları Aralığı (ng/μL)	DNA Konsantrasyonları Ortalaması (ort±SD;ng/μL)
I.Trimester	2.9-17.0	8.3±4.19
II.Trimester	3.4-69.1	17.34± 18.07
III.Trimester	4.3-106.3	18.51±18.05

Trimesterlere göre DNA konsantrasyonları karşılaştırıldığında II. ve III. trimesterde I. trimestere göre daha fazla DNA elde edildiği görülmektedir (Tablo 8).

4.2. Maternal DNA'ların Analizleri

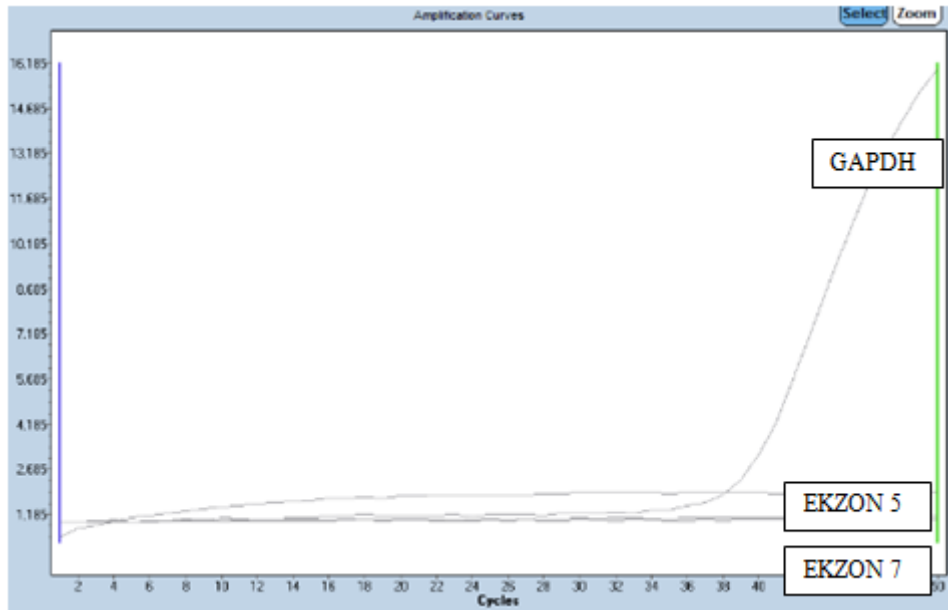
Öncelikle gebelerin Rh D (-) konfirme etmek üzere maternal kandan izole edilen maternal genomik DNA ile Rh D geni Ekzon 5 ve Ekzon 7 bölgeleri kullanılarak RT-PZR ile Rh durumu tespit edilerek doğrulandı. Bu çalışma ayrıca testin optimizasyonunu da sağladı. Bunun neticesinde hiç bir gebede RhD pozitifliği saptanmamıştır.

4.3. Fetal Hücre Dışı DNA'ların Analizleri

Maternal kandan izole edilen DNA ile yapılan RT-PZR ile hem gebelerin Rh durumu doğrulandı hemde testin optimizasyonu kontrol edildi. Bunun sonucunda hiç bir gebede pozitiflik saptanmamıştır.

4.3.1. Hücre dışı DNA Analizi ile Fetüsün Rh (-) Olarak Değerlendirilmesi

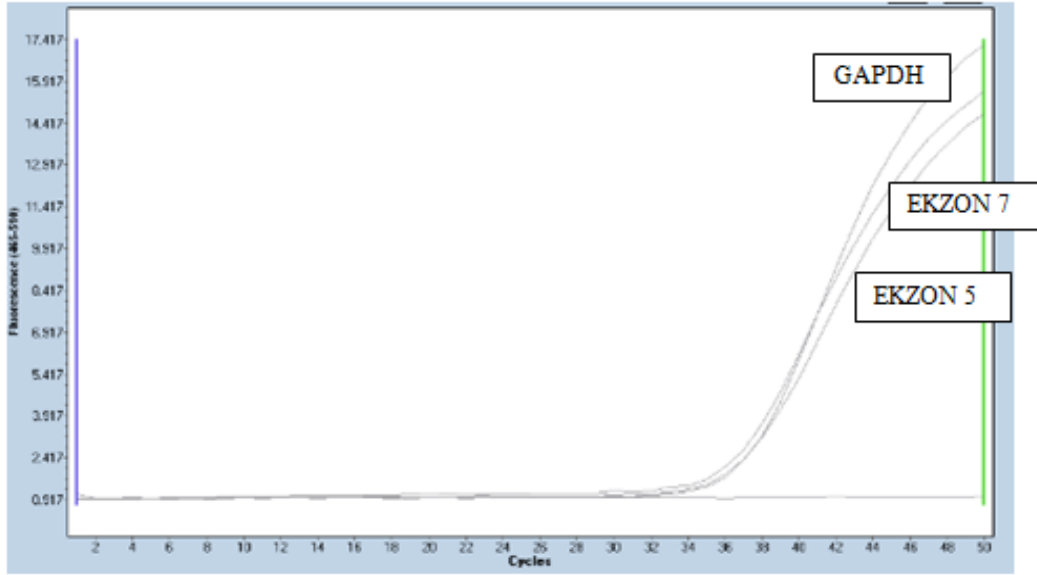
Maternal plazmadan elde edilen hücre dışı DNA'nın Rh D genine özgü ekzon 5 ve ekzon 7 gen bölgelerinin RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Şekil 3'de olgulara belirlediğimiz Ekzon 5 ve Ekson 7 gen bölgelerinin negatif sonuç verdiği analiz gösterilmektedir. Ekzon 5 ve 7 de hiç amplifikasyon görülmemesi olgularımızı Rh(-) olarak değerlendirmemezi sağladı.



Şekil 3: Rh(-) Ekzon 5 ve Ekzon 7 RT-PZR ile Gösterilmesi

4.3.2. Hücre dışı DNA Analizi ile Fetüsün Rh (+) Olarak Değerlendirilmesi

Şekil 4’de Rh D genine özgü Ekzon 5 ve Ekzon 7 gen bölgelerinin pozitif sonuç verdiği analizde gösterilmektedir. Ekzon 5 ve Ekzon 7’de görülen amplifikasyon olguların Rh(+) olarak değerlendirilmesini sağlamıştır.



Şekil 4: Rh(+) Ekzon 5 ve Ekzon 7 RT-PZR ile Gösterilmesi

4.3.3. Hücre dışı DNA Analizi ile SRY Amplifikasyonunun Değerlendirilmesi

Şekil 5’deki jel elektroforezi SRY geni amplifikasyonunu göstermektedir. SRY geninin amplifikasyon göstermediği olguları kız fetüs olarak değerlendirilirken, SRY geninin amplifikasyon gösterdiği olguları erkek fetüs olarak değerlendirilmesi yapıldı. Şekil 5’de 137 bp uzunluğunda olan SRY’nin amplifikasyon gösterdiği ve göstermediği durumu görülürken ve 66 bp uzunluğunda olan GAPDH geninin gösterilen 2 olguda da amplifikasyon görülmesi DNA varlığını göstermektedir.



Şekil 5 : Kız ve Erkek Fetüsün Jel Elektrofrez Görüntüsü

4.4. Hücre Dışı DNA Analiz Sonucu ile Doğum Sonrası Sonuçların Karşılaştırılması

RT-PZR sonucunda yapılan değerlendirmede 47'si kız 53 erkek fetüs saptanmıştır. Bunlardan 14'ü Rh(-) 86'si Rh(+) olarak değerlendirilmiştir. Tablo 8'e bakıldığında bütün hastalardan sonuç elde edildiği görülmektedir.

Olguların doğum sonrası Rh D ve SRY karşılaştırılması yapıldı. 46 olgunun henüz doğumu gerçekleşmemişken 54 olgunun gebeliği sonlanmış ve doğum gerçekleşmiş olup bebeğin Rh ve cinsiyet durumu Tablo 9'da gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki 13 olgunun fetüsünde Rh(-) kan grubunun saptanmasıyla olgulara doğum öncesi yapılan anti D profilaksisinin gereksiz olduğu görülmüştür.

Tablo 9: hddDNA ile Yapılan Fetal Rh D ve SRY sonuçları

Olgu No	Ekzon5	Ekzon7	SRY	GAPDH	Negatif Kontrol	DoğumSonrasıSonuçlar
H1	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H2	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H3	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H5	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H6	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H8	P	N	P	P	N	ERKEK RH(+)
H9	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)

H10	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H11	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H12	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H13	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H16	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H17	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H19	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H20	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H21	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H22	N	N	P	P	N	ERKEK RH(-)
H23	N	N	P	P	N	ERKEK RH(+)
H24	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H25	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H27	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H29	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H31	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H32	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H33	N	N	N	P	N	KIZ RH(-)
H34	N	N	P	P	N	ERKEK RH(+)
H35	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H36	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H37	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H38	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H39	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H40	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H41	N	N	N	P	N	KIZ RH(-)
H43	N	N	P	P	N	ERKEK RH(+)
H44	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H49	N	N	P	P	N	ERKEK RH(+)
H53	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H56	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H59	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H60	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)

H61	N	N	N	P	N	KIZ RH(-)
H62	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H64	N	N	P	P	N	ERKEK RH(-)
H68	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H69	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H72	N	N	N	P	N	KIZ RH(-)
H75	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H77	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H79	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H81	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H86	P	P	N	P	N	KIZ RH(+)
H94	P	P	P	P	N	ERKEK RH(+)
H96	N	N	P	P	N	ERKEK RH(-)

(P:Pozitif, N:Negatif)

Analiz sonuçlarıyla doğum sonrası sonuçlar karşılaştırıldığında 49. olguda deneyler sırasında negatif SRY sonucu elde edildiği fakat doğum sonrası sonuçlarda fetüsün erkek olduğu belirlendi. 23,34,43. olgularda Rh D analizinde sistem verileri ile uyuşmayan sonuç görüldü.

Olgu 8 ve olgu 91’de 2 ekzon çalışılan Rh D’de Ekzon 5’in pozitif amplifikasyon, Ekzon 7’nin negatif amplifikasyon gösterdiği görüldü. Yapılan değerlendirmede bu 2 gen bölgesinin en az birinde amplifikasyon görülmesi o olguyu pozitif kabul etmemizi sağladı.

Tablo 10: Trimesterler Arasında Doğruluk Yüzde Değerlerinin Karşılaştırılması

	Rh D Analiz Sonucu/Serolojik Değerlendirme	Doğruluk Yüzdesi(%)	SRY Analiz Sonucu/Fenotipik Değerlendirme	Doğruluk Yüzdesi(%)
I.Trimester	2/2	%100	2/2	%100
II.Trimester	8/8	%100	8/8	%100
III.Trimester	44/41	%93.18	44/43	%97.72

Analiz sonucunda elde ettiğimiz verilerle doğumu gerçekleştiren 54 olgudan elde ettiğimiz sonuçların doğruluk değerlerinin trimesterler arasında karşılaştırılması Tablo 10’da verilmiştir. Yaptığımız karşılaştırmada III.trimesterde diğer trimesterlerle karşılaştırıldığında doğruluk yüzde değerinin düştüğü görülmüştür.

4.5. Maaliyet Analizi

Sağlık Bakanlığının Devlet hastaneleri için kullandığı ücretlendirme sistemi Sağlık Uygulama Tebliği (SUT 2018) verilerine göre yaptığımız analizde kullandığımız Gerçek Zamanlı PZR tekniği ücretlendirilmesi 154 TL olarak belirlenmiştir. Klinikteki Rh(-) gebelere uygulanan işlemlerin ücretleri Sağlık Uygulama Tebliği’ne göre Tablo 11’de verilmiştir. Tabloya göre bu işlemlerin toplam maliyeti 442.09 TL olduğu belirlenmiştir.

Tablo11: Sağlık Bakanlığı SUT Verilerine Göre Rh (-) Gebelere Yapılan Ek Testlerin Ücretleri

İşlemler	Maaliyet (TL)
Gebe Muayenesi	55 TL
İndirect coombs (ICT)	6,60 TL

Anti D Proflaksisi	317.23 TL
Fetal USG	8,08 TL
Fetal MCA Doppler	55.18 TL



5. TARTIŞMA

Fetus ve yenidoğanda görülen Eritroblastosis Fetalis, gebelikte sık görülen bir patolojidir. Aynı zamanda fetal ve neonatal morbidite ve mortalite üzerinde önemli bir etkiye sahip olan büyük bir obstetrik problem oluşturur. En yaygın nedenler, Rhesus (Rh) antijenlerine, ağırlıklı olarak da Rh D'ye özgü reaksiyonlardır[60].

Her yıl çok sayıda gebeyi etkileyen fetal ve neonatal sonuçları olabilen kan uyuşmazlığını erken dönemde belirleyip ortaya çıkan komplikasyonlarını engellemek, risk altındaki fetüsün noninvazif olarak izlenmesine odaklanan yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir[61].

Son zamanlarda klinikte uygulanan antikor seviyesinin belirlenmesi, babanın Rh durumu, anti D proflaksisinin uygulanması[62], fetal ultrasonografi, orta serebral arter (MCA) doppler , düzenli gebelik takibi gibi invaziv olmayan, ayrıca bunlara ek olarak uygulanabilecek amniosentez, koryon villüs gibi invaziv işlemler uygulanmaktadır[46].

1997'de Lo ve arkadaşlarının fetüse ait hücre dışı DNA'ları maternal serumda tanımlamasıyla noninvaziv tarama yöntemleri geliştirilmiş ve çeşitli hastalıkların fetal dönemde belirlenebilmesine olanak sağlamıştır[63].

Maternal kandan izole edilen hücre dışı DNA'da Rh D ve SRY geninin tesbitinin yapıldığı çalışmamızda 100 olgudan doğum sonrası serolojik sonuçları belirlenen 54 olgunun 3'ünde Rh D sonucunun sistem verileri ile uyuşmayan negatif ve 1'inde de SRY sonucunun sistem verileri ile uyuşmayan sonuç olduğu tesbit edildi. Diğer olguların analiz sonuçları serolojik sonuçlarla karşılaştırıldığında sonuçların uyuştugu görülmüştür. Uyuşmayan sonuçların görülmesi, Rh D ve SRY'de genomik düzeyde elde ettiğimiz sonuçlarla yenidoğan sistemindeki serolojik ve fiziksel muayene ile elde edilen sonuçların karşılaştırılmasından kaynaklanabilir. Bunun için uyuşmayan sonuçlara sahip olgularda detaylı genomik analizi yapılarak durum aydınlatılabilir.

Maternal sirkülasyonda fetüse ait genetik materyal, DNA ve RNA şeklinde karşımıza çıkabilir[64]. Hücre dışı DNA'nın asıl kökeni plasentadaki sinsityotrofoblastların apoptozu olduğu bilinmektedir [65]. Hücre dışı DNA plasenta kaynaklı olduğundan plasentadan kaynaklı mozaizm varlığı ve fetoplasental uyumsuzluklar yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlara sebep olabilir[66].

Konjenital Adrenal Hiperplazi, adrenal bezden salgılanan enzimlerin salgılanma mekanizması bozukluğunda görülmekte olup, en çok karşılaşılan 21 hidroksilaz enzim eksikliğidir[67, 68]. Erkek fetüslerde yenidoğan döneminde fenotipik bir etki görülmezken dişi fetüslerde virilizasyona yol açabilmektedir[69]. KAH riski bulunan gebeliklerde uygulanabilecek SRY geni analizi ile bebeğin cinsiyetinin belirlenmesi tedavideki yolun belirlenmesinde önemlidir[34]. Erken haftalarda belirlenen cinsiyet ile erkek fetüslere uygulanacak fazla glukokortikoid tedavisinin önüne geçilmiş olacaktır[70]. Çalışmamızda %98.14 doğrulukla belirlediğimiz yöntem ile gereksiz uygulamaların önüne geçilebilecektir.

Konjenital Adrenal Hiperplazi'ye ek olarak X'e bağlı kalıtılan Duchenne Muskular Distrofi ve Hemofili gibi kalıtsal hastalıklara gebeliğin erken dönemde tanı koyulması gebeliğin sonlandırılması yada ileri prenatal genetik tanı (PGD) tekniklerinde işe yarayacak seviyeye gelebilir[71].

Olgu 8 ve 91'deki Ekson 7 negatifliği Rh D genin en uzun ekzonu olması ve hücre dışı DNA fragmanlerinin boyutunun %80'inin 193bp'dan küçük olması nedeniyle amplifikasyon göstermemesine neden olabilir[72]. Bu durum Ekson 5 ile yapılan çalışmaların daha spesifik olabileceğini göstermektedir.

Çalışmada kullandığımız Rh D gen bölgesi olan Ekson 5 ve Ekson 7 olarak 2 gen bölgesi ve bu gen bölgelerin 3 tekrarlı olarak çalışılması ile yanlış pozitifliklerin önüne geçilmeye çalışılmıştır. Sadece Ekson 5 veya Ekson 7 ile yapılan çalışmalarda doğruluk oranlarında hafif bir azalma söz konusu olduğu görülmüştür[73]. Bu nedenle çalışma planlanırken doğruluk oranını en yüksek düzeyde elde etmek amacıyla 2 ekzon bölgesi çalışılmıştır.

Rh D ve SRY sonuçları Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile elde edilen CT değerlerine göre belirlendi. Ekson 5 ve Ekson 7'nin CT değerinin 32-40 arasında görülmesi bir amplifikasyon olduğunun ve sonucun pozitif olduğunun göstergesidir. SRY için elde edilen ifadenin EtBr jel elektroforozinde gösterilmesi SRY'nin pozitif olduğunu gösterir. Bu yöntemle yapılan çalışmamız Rh ve cinsiyet belirlemede geliştirilerek, güvenli bir yöntem olabileceği literatürdeki diğer çalışmalar ile gösterilmiştir[74],[75]. Az olgunun olduğu çalışmalarda görülen %100'lük doğruluk oranının çok olgulu çalışmalarla karşılaştırıldığında doğruluk oranı az da olsa düştüğü görülmektedir.

Olgu 13 ve 59'da yapılan ilk çalışmamızda görülen Ekzon 5 ve Ekzon 7'deki negatif değerlendirmede gerçek sonuçlarla bağdaşmaması sonucu, yaptığımız 2'inci 3 tekrarlı çalışmada pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu sonucun teknik yada kişisel kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Olgu 8 ve 91'de gördüğümüz Ekzon 5 pozitif, Ekzon 7 negatif amplifikasyonun sebebi ekzon 7'nin Rh D'nin en büyük ekzonu olmasıyla tasarladığımız primer ve probun bağlanma oranını azaltılabileceği düşünülmektedir.

Trimesterlere göre DNA konsantrasyonları karşılaştırıldığında, II. ve III. trimesterde I. trimestere göre daha fazla DNA elde edilmiştir. Trimesterlere göre yapılan sıralamada en çok konsantrasyon III. trimesterde, en az konsantrasyon I.trimesterde görülmektedir. Elde ettiğimiz bu sonuçların literatür sonuçlarıyla uyduğu görülmektedir[61][63][72].

Rh uyuşmazlığı tesbit edilen gebelere her kanama sonrası veya 28. Haftada yapılan anti-D profilaksisi uygulanması rutin uygulamada görülmektedir. Çalışmamıza katılan 100 Rh (-) olgudan 10 olgunun I.trimesterde, 39 olgunun II. Trimesterde bulunması ve yüksek doğruluk oranına erişmemiz gebelik takiplerinin bu yönde başarıyla gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır. Olgulardaki en erken gebelik haftası olan 9. Haftada elde edilen sonuçlar Kadın Doğum Uzmanları için tedavide yol gösterici olabilecektir. Bunun yanında daha erken gebelik haftalarından da testin değerlendirmesinin yapılması uygundur ve bu şekilde tespit edilebilecek en erken gebelik hafta aralığı tespit edilmiş olur.

Çoklu doğum ve abortus sonrası maternal sirkulasyonda yıllarca kalabilen fetal hücrelerin aksine hücre dışı DNA'nın kısa sürede maternal sirkülasyondan temizlenmesi önceki doğumlardan kalan cinsiyet ve Rh kalıntılarının takibinin yapılmasını gereksiz kılmıştır[76]. Bu nedenle de hücre dışı DNA analizi bu bakımdan avantaj sağlamaktadır.

Çalışmada kullandığımız BCT Streck cfDNA tüpleri, diğer EDTA'lı tüplerle karşılaştırıldığında özellikle tüp kaynaklı hücre dışı DNA kaybını engellemekte olduğu için olgulardan alınan maternal kanların toplanmasında kullanılmıştır[77].EDTA'lı tüplerde görülen transfer koşul şartları, plazma ayrışımı için geçen süre ve elde edilen DNA konsantrasyon düşüklüğü gibi olumsuz durumlar mevcuttur. Fakat BCT Streck cfDNA tüplerinde transfer koşullarının oda sıcaklığında olması, plazma ayrıştırılması işlemi için sürenin 14 güne kadar uzaması ve konsantrasyon kaybının olmaması gibi

durumlar gebelik takibi için kullanılan rutin testler arasına girmesine kolaylık sağlayabilir[77].

Plazma ayırştırmak için kullanılan 2 aşamalı santrifuj işlemi, ilk aşamada eritrosit ve plazmanın ayırştırılması, 2'inci aşamada hücre kalıntıları, lökosit ve trombositlerin uzaklaştırılması işlemi literatüre uygun şekilde gerçekleşerek plazmada sadece hücre dışı DNA'nın diğer hücrelerle kontaminasyonun engellenmesi sağlandı[74],[75],[78]. Ama literatürlerdeki santrifuj basamaklarındaki hız farklılıkları çalışma öncesi yapılan denemelerdeki DNA konstrasyonunda belirli bir değişime sebep olmamıştır. Çalışmamızda ilk santrifuj aşaması için 300 xg'de 20 dk, ikinci aşama için 5000 xg'de 10'dk olacak şekilde plazmalar ayrılıp -80°C'de saklanarak yada taze bir şekilde DNA izolasyonu yapılmıştır.

Hücre dışı DNA'nın izolasyonunda kullanmak üzere literatürde belirlenen birçok kit bulunmaktadır. QIAamp DNA Blood Mini Kit, Magna Pure LC (Roche, Mannheim, Germany)[78], QIAamp CNA Kit[79], QIAamp Ultrasens Virus Kit[79] ve QIASymphony DSP Kit[79] en çok kullanılan hücre dışı DNA izolasyon yöntemlerindendir. Fakat son dönemlerde hücre dışı DNA çalışmalarının artmasıyla çeşitli firmalardan elde ettiğimiz ZYMO Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit, The E.Z.N.A.® Circulating DNA Kit ve QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit'lerde çalışma sırasında yaptığımız denemelerde ZYMO Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit'in protokolündeki elution miktarının çalışmamız için yetersiz olduğu, E.Z.N.A.® Circulating DNA Kit'in saflık değerlerinin nanodrop ölçümlerinde 1.7-1.9'dan çok düşük seviyelerde bulunduğu, QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit'inin çalışmamıza uygun olduğu fakat maliyetinin fazla olması çalışmamızı literatürde daha çok kullanılan ve verim elde edilen QIAmp DNA Blood Mini Kit ile gerçekleştirmemizi sağladı.

QIAamp DNA Blood Mini Kit ile yaptığımız optimizasyonlarda aynı olgudan alınan örnek miktarını 200µl, 400µl ve 600µl plazma kullanılarak elde ettiğimiz DNA konsantrasyonlarındaki az miktardaki değişiklik sonucunda 400µl örnekle izolasyonun yapılmasına karar verildi.

Rh D belirlenmesinde kullanılan Ekzon 5 ve Ekzon 7 gen bölgelerinin seçilmesinde literatürden faydanılmıştır. Çeşitli çalışmalarda Ekzon 5, Ekson 7 ve ekson 10 kombinasyonunda olguların gerçek sonuçlarıyla yapılan doğruluk değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür[73],[61],[75],[80],[81].

Sonuçlara bakıldığında 100 gebelikten 54'ü sonlanmış, kalan 46'sının gebeliği halen devam etmektedir. 54 olgunun doğum sonrası bebeğin serolojik değerlendirilmesine göre değerler belirlenmiştir.

Çalışmaya katılan 100 Rh(-) gebenin total kan örneğinden yapılan maternal genotipleme gebelerin yanlış kan grubu beyanını kontrol etmek hemde çalışmamızın Rh D kontrol basamağını oluşturmaktadır. Ancak karşımıza çıkabilecek böyle bir pozitif sonuç bize yanlış kan grubu beyanı veya düşük Rh D ekspresivitesini düşündürebilirdi. Ayrıca Rh D ekspresivite düşüklüğü daha çok Kafkas ve Afrika ırklarında görülmektedir[82].

Kan uyuşmazlığı durumunda Rh(-) gebelere uygulanacak anti D profilaksi için kadın doğum uzmanları gebeliğin son trimesterinin içinde yer alan 24 ve 27. Haftalarda başlamaktadırlar[45]. Bu süre geçene kadar belirlenebilecek fetüsün Rh grubu, Rh(-) fetüs taşıyan gebelere yapılacak olan gereksiz uygulamaları ortadan kaldıracaktır. Çalışmamızda I. ve II. Trimesterde bulunan 49 Rh (-) olguda belirlenebilen fetüsün Rh grubu gereksiz uygulamayı ortadan kaldırılabilceğini kanıtlar niteliktedir.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında olguların az da olsa bir kısmının Rh ve cinsiyetinin belirlenemediği görülmektedir[61, 73]. Bu açıdan bakıldığında bizim çalışmamızda ise bütün olgularda sonuç alındığı görülmektedir.

Annenin Rh(-), babanın Rh (+) olduğu durumda kan uyuşmazlığı şüphesi bulunur. Bu durumda klinikte uygulanan güncel yaklaşım şu şekildedir. Gebelere 12-16 hafta arası rutin testlere ek olarak indirekt coombs testi yapılır. Eğer indirekt coombs testi negatif sonuç vermiş ise, gebeye 28. haftada anti-D profilaksisi uygulanır[83]. Eğer indirekt coombs testi pozitif ise, titresine bakılarak tedaviye yön verilir. Eğer titre 1/32'den yüksek ise, bebeğin ultrasonografik bulguları değerlendirilmeye alınır. Ultrasonografi sonucuna göre fetal MCA doppler ile bebeğin sistolik basınç değeri fetüsün anemiden etkilenip etkilenilmediğini belirlemede yardımcı olur. Yüksek etkilenme sonucu fetüsün durumuna göre kordosentez önerilir. Indirect coombs pozitifliği anneye önceki gebeliğinde yapılan anti D kaynaklı yalancı pozitifliğe sebebiyet verebilir. Yalancı pozitiflik durumunda yapılacak olan tüm bu işlemler anne ve fetüs için yıpratıcı olmaktadır. Ayrıca, hastanelerin kadın doğum servisleri için gereksiz yük, kordosentez uygulamasında ise komplikasyon olarak fetüste düşüğe sebep oluşturabilir.

Çeşitli ülkelerde Rh D ve SRY genotiplemesinin maaliyet açısından yapılan değerlendirmede rutinde uygulanan tekniğe göre geliştirdiğimiz tekniğin maaliyetinin çok daha düşük olduğu görülmektedir[84-86]

Rh D'nin fetal dönemde belirlenmesi, Rh(-) gebelere yapılan indirect coombs testi, anti D profilaksisi, USG, fetal MCA doppler ile oluşabilecek pozitiflik durumunun oluşmasını engelleyerek maliyetide düşürecektir[85, 86]. Tablo 11'de yapılan işlemlerin maliyet analizi gösterilmiştir. Maliyet analizinde Sağlık Bakanlığının Devlet hastaneleri için kullandığı ücretlendirme sistemi olan Sağlık Uygulama Tebliği (SUT 2018) baz alınmıştır. Bu sisteme göre Rh(-) gebeye uygulanan girişimlerin toplam maliyeti 442.09 TL olarak hesaplanmıştır

Bunun çalışmada uygulanan işlemin maliyeti ise, Gerçek Zamanlı PZR yönteminin karşılığı olan 1-5 çift gen için 154 TL olarak belirlenmiştir. Bu yöntemin rutin gebelik testleri arasına girmesi tedavi seyrini kolaylaştırması anlamının yanında gereksiz uygulama ve ek maliyeti de azaltacağı görülmektedir.

Çalışmamız sırasında elde ettiğimiz bulgular şu şekilde sıralanabilir;

- Maternal serumdan hücre dışı DNA'da Rh D geninin 2 bölgesinin analizi ile yaptığımız değerlendirmede Rh grubunun belirlenebilirliği gösterilmiştir.
- İzole ettiğimiz hücre dışı DNA ile doğum sonrası serolojik sonuçlar karşılaştırıldığında %94.44 doğrulukla tesbit edildiği görülmüştür.
- Hücre dışı DNA ile tesbit ettiğimiz SRY gen analizindeki değerlendirmeyle doğum sonrası sonuçlar karşılaştırıldığında %98.14 doğrulukla tesbit edildiği görülmüştür.
- Cinsiyet belirlemenin Konjenital Adrenal Hiperplazi gibi hastalıklarda fetüse yapılacak intrauterin tedavide yararlı olacağı, Duchenne Muskular Distrofi ve Hemofili gibi cinsiyete bağlı hastalıkların erken tanısında önemli olduğu, hastalık şüphesi bulunan gebelere tanı için yapılan ve düşük riski bulunan invaziv yöntemlere alternatif bir yöntem olacağı gösterilmiştir.

- Rh(-) gebelere yapılan uygulamaların maliyeti değerlendirildiğinde rutinde kullanılan testler ile çalıştığımız yöntem arasında 288.09 TL fark olduğu görülmüştür. Testin rutin tetkikler arasına geçmesiyle; toplumun %15'inin Rh(-) olduğu düşünülürse, kan uyuşmazlığı bulunan hasta sayısının yüksekliği nedeniyle mali yükün önemli ölçüde azalacağı belirlenmiştir[87].

Ayrıca Literatür bilgilerine göre elde edilen bu sonuçların gerçek zamanlı PZR tekniği yerine droplet digital PZR (ddPZR) tekniği kullanıldığında daha yüksek düzeyde pozitif sonuçların alınabileceği düşünülmektedir[46].

Tüm bunlara ek olarak gelecekte Rh ve SRY genotiplemesinin rutin testler arasına girmesiyle doğru tanı ve tedaviye önemli katkı sağlayabileceği bu çalışmayla bir kez daha gösterilmiştir. Microarray ve yeni nesil dizileme tekniklerinin trizomi ve tek gen hastalıklarında kullanılabilirliğinin gösterilmesiyle hücre dışı DNA'nın prenatal tanıdaki önemi artmıştır[88, 89]. Hücre dışı DNA'nın prenatal tanı yapılmasında gösterdiği yüksek başarı oranları hücre dışı DNA metilasyon kaynağı analizlerinde non invaziv tanıda kullanılabileceği öngörülmektedir[29].

Yapılan bu çalışma, fetal Rh D kan grubu ve genotiplenin rutin çalışmalarda yapılabilirliği temel esası göz önünde bulundurularak kurgulanmıştır. Ülkemizde 100 kişilik gebe grubunu içeren ilk hücre dışı Rh ve SRY genotiplemesini konu alması nedeniyle özgün bir çalışmadır. Bundan sonraki çalışmalarda da maternal sirkülasyonda bulunduğu varsayılan diğer fetal genom partikülleri tespit edilerek farklı amaçlarla kullanılabilecektir. Invazif olmayan bu tür tanı testleri özellikle hamilelik sürecinde anneye ve hassas tanı değeri taşıdığı için de hem aileye hem de klinisyene çok büyük destek sağlayacaktır. Bu nedenle gelecek uygulamalarda kaçınılmaz tanı testleri arasında yer alacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Kajiwar, M., [Direct and indirect anti-globulin (Coombs) test]. Nihon Rinsho, 2010. **68 Suppl 6**: p. 792-4.
2. Alfirevic, Z., K. Navaratnam, and F. Mujezinovic, *Amniocentesis and chorionic villus sampling for prenatal diagnosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2017. **9**: p. Cd003252.
3. Choolani, M., A.P. Mahyuddin, and S. Hahn, *The promise of fetal cells in maternal blood*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2012. **26**(5): p. 655-67.
4. Cheng, W.L., et al., *Noninvasive prenatal diagnosis*. Taiwan J Obstet Gynecol, 2015. **54**(4): p. 343-9.
5. Ho, S.S., K. O'Donoghue, and M. Choolani, *Fetal cells in maternal blood: state of the art for non-invasive prenatal diagnosis*. Ann Acad Med Singapore, 2003. **32**(5): p. 597-603; quiz 604.
6. Holzgreve, W., Holzgreve, W., Troeger, C., Schatt, S., Vial, Y., Louwen, F., Gloning, K., Hahn, S., [Prenatal diagnosis with fetal cells in maternal blood: report of experiences in Basel]. Schweiz Med Wochenschr, 1998. **128**(43): p. 1641-5.
7. Haimila, K., Sulin, K., Kuosmanen, M., Sareneva, I., Korhonen, A., Natunen, S., Tuimala, J., Sainio, S., *Targeted antenatal anti-D prophylaxis program for RhD-negative pregnant women - outcome of the first two years of a national program in Finland*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2017. **96**(10): p. 1228-1233.
8. Yau, M., A. Khattab, and M.I. New, *Prenatal Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2016. **45**(2): p. 267-81.
9. Bachelot, A., Bachelot, A., Grouthier, V., Courtillot, C., Dulon, J., Touraine, P., *MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: update on the management of adult patients and prenatal treatment*. Eur J Endocrinol, 2017. **176**(4): p. R167-r181.
10. Dean, L., *ABO Blood Group*, in *Medical Genetics Summaries*, V. Pratt, et al., Editors. 2012, National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD).
11. Daniels, G., *Molecular blood grouping*. Vox Sang, 2004. **87 Suppl1**: p. 63-6.
12. Izetbegovic, S., *Occurrence of ABO And RhD Incompatibility with Rh Negative Mothers*. Mater Sociomed, 2013. **25**(4): p. 255-8.
13. Westhoff, C.M., *The Rh blood group system in review: a new face for the next decade*. Transfusion, 2004. **44**(11): p. 1663-73.
14. Yazer, M.H., Brunker, P., A., Bakdash, S., Tobian, A., A., Triulzi, D., J., Earnest, V., Harris, S., Delaney, M., *Low incidence of D alloimmunization among patients with a serologic weak D phenotype after D+ transfusion*. Transfusion, 2016. **56**(10): p. 2502-2509.
15. Walters, T.K. and T. Lightfoot, *A delayed and acute hemolytic transfusion reaction mediated by anti-c in a patient with variant RH alleles*. Immunohematology, 2018. **34**(3): p. 109-112.
16. Baker, J.M., Baker, J., M., Campbell, D., M., Bhutani, V., K., Sgro, M., *Rh sensitization in Canada is not obsolete*. Paediatr Child Health, 2017. **22**(4): p. 238-239.
17. Ghesquiere, L., Y. Lee, T. J. Tse, , *Management of red blood cell alloimmunization in pregnancy*. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2018. **47**(5): p. 197-204.

18. Fyfe, T.M., Ritchey, M. J.Taruc, C.Crompton, D.Galliford, B.Perrin, R, *Appropriate provision of anti-D prophylaxis to RhD negative pregnant women: a scoping review*. BMC Pregnancy Childbirth, 2014. **14**: p. 411.
19. Nassar, G.N. and C. Wehbe, *Erythroblastosis Fetalis*, in *StatPearls*. 2018, StatPearls Publishing
20. Karagol, B.S., Zenciroglu, A.Okumus, N.Karadag, N.Dursun, A.Hakan, N., *Hemolytic disease of the newborn caused by irregular blood subgroup (Kell, C, c, E, and e) incompatibilities: report of 106 cases at a tertiary-care centre*. Am J Perinatol, 2012. **29**(6): p. 449-54.
21. Fasano, R.M., *Hemolytic disease of the fetus and newborn in the molecular era*. Semin Fetal Neonatal Med, 2016. **21**(1): p. 28-34.
22. Costumbrado, J. and S. Ghassemzadeh, *Rh Incompatibility*, in *StatPearls*. 2018, StatPearls Publishing
23. Cortey, A. and Y. Brossard, *[Prevention of fetomaternal rhesus-D allo-immunization. Practical aspects]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2006. **35**(1 Suppl): p. 1s123-1s130.
24. Kent, J., A.M. Farrell, and P. Soothill, *Routine administration of Anti-D: the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice*. BMC Pregnancy Childbirth, 2014. **14**: p. 87.
25. El-Maouche, D., W. Arlt, and D.P. Merke, *Congenital adrenal hyperplasia*. Lancet, 2017. **390**(10108): p. 2194-2210.
26. Gondim, R., F. Teles, and U. Barroso, Jr., *Sexual orientation of 46, XX patients with congenital adrenal hyperplasia: a descriptive review*. J Pediatr Urol, 2018.
27. Song, J.H., Lee, K. H.Kim, S. D.Cho, B. S., *Long-term Follow up of Congenital Adrenal Hyperplasia Patients with Hyponatremia*. Electrolyte Blood Press, 2007. **5**(2): p. 140-6.
28. Norwitz, E.R. and B. Levy, *Noninvasive prenatal testing: the future is now*. Rev Obstet Gynecol, 2013. **6**(2): p. 48-62.
29. Hui, W.W. and R.W. Chiu, *Noninvasive prenatal testing beyond genomic analysis: what the future holds*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2016. **28**(2): p. 105-10.
30. Hatt, L., , *A new marker set that identifies fetal cells in maternal circulation with high specificity*. Prenat Diagn, 2014. **34**(11): p. 1066-72.
31. Taglauer, E.S., L. Wilkins-Haug, and D.W. Bianchi, *Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease*. Placenta, 2014. **35** Suppl: p. S64-8.
32. Hahn, S., et al., *Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia*. Placenta, 2011. **32** Suppl: p. S17-20.
33. Ramezanzadeh, M., S. Khosravi, and R. Salehi, *Cell-free Fetal Nucleic Acid Identifier Markers in Maternal Circulation*. Adv Biomed Res, 2017. **6**: p. 89.
34. Khattab, A., Yuen, T.Sun, L.Yau, M.Barhan, A.Zaidi, M.Lo, Y. M.New, M. I., *Noninvasive Prenatal Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia*. Endocr Dev, 2016. **30**: p. 37-41.
35. Gerson, K.D. and B.M. O'Brien, *Cell-Free DNA: Screening for Single-Gene Disorders and Determination of Fetal Rhesus D Genotype*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2018. **45**(1): p. 27-39.
36. Kotsopoulou, I., Tsoplou, P.Mavrommatis, K.Kroupis, C., *Non-invasive prenatal testing (NIPT): limitations on the way to become diagnosis*. Diagnosis (Berl), 2015. **2**(3): p. 141-158.

37. Galeva, S., Konstantinidou, L.Gil, M. M.Akolekar, R.Nicolaides, K. H., *Routine first-trimester screening for fetal trisomies in twin pregnancies: cell-free DNA test contingent on results from the combined test*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2018.
38. Daley, R., M. Hill, and L.S. Chitty, *Non-invasive prenatal diagnosis: progress and potential*. 2014. **99**(5): p. F426-F430.
39. Contro, E., D. Bernabini, and A. Farina, *Cell-Free Fetal DNA for the Prediction of Pre-Eclampsia at the First and Second Trimesters: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Mol Diagn Ther, 2017. **21**(2): p. 125-135.
40. Keravnou, A., Ioannides, M.Tsangaras, K.Loizides, C.Hadjidaniel, M.,D.Papageorgiou, E. A.Kyriakou, S.Antoniou, P.Mina, P.Achilleos, A.Neofytou, M.Kypri, E.Sismani, C.Koumbaris, G.Patsalis, P. C., *Whole-genome fetal and maternal DNA methylation analysis using MeDIP-NGS for the identification of differentially methylated regions*. Genet Res (Camb), 2016. **98**: p. e15.
41. Sherwood, K. and E.T. Weimer, *Characteristics, properties, and potential applications of circulating cell-free dna in clinical diagnostics: a focus on transplantation*. J Immunol Methods, 2018. **463**: p. 27-38.
42. Fernando, M.R., Jiang, C.Krzyzanowski, G. D.Ryan, W. L., *New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0183915.
43. Guan, Y., Zhang, W.Wang, X.Cai, P.Jia, Q.Zhao, W., *Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress*. Clin Chim Acta, 2017. **473**: p. 213-217.
44. Yang, Q., Du, Z.Song, Y.Gao, S.Yu, S.Zhu, H.Ren, M.Zhang, G., *Size-selective separation and overall-amplification of cell-free fetal DNA fragments using PCR-based enrichment*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 40936.
45. Yagel, S., *Re: Effectiveness of 12-13-week scan for early diagnosis of fetal congenital anomalies in the cell-free DNA era*. Ultrasound Obstet Gynecol, 2018. **52**(4): p. 550.
46. D'Aversa, E., Breveglieri, G.Pellegatti, P.Guerra, G.Gambari, R.Borgatti, M., *Non-invasive fetal sex diagnosis in plasma of early weeks pregnant using droplet digital PCR*. Mol Med, 2018. **24**(1): p. 14.
47. Stray, J. and B. Zimmermann, *Isolation of Cell-Free DNA from Maternal Plasma*. Methods Mol Biol, 2019. **1885**: p. 309-323.
48. Almazi, J.G., Pockney, P.Gedye, C.Smith, N. D.Hondermarck, H.Verrills, N. M.Dun, M. D., *Cell-Free DNA Blood Collection Tubes Are Appropriate for Clinical Proteomics: A Demonstration in Colorectal Cancer*. Proteomics Clin Appl, 2018. **12**(3): p. e1700121.
49. Warton, K., Yuwono, N. L.Cowley, M. J.McCabe, M. J.So, A.Ford, C. E., *Evaluation of Streck BCT and PAXgene Stabilised Blood Collection Tubes for Cell-Free Circulating DNA Studies in Plasma*. Mol Diagn Ther, 2017. **21**(5): p. 563-570.
50. Rolnik, D.L., Yong, Y.Lee, T. J.Tse, C.McLennan, A. C.da Silva Costa, F., *Influence of Body Mass Index on Fetal Fraction Increase With Gestation and Cell-Free DNA Test Failure*. Obstet Gynecol, 2018. **132**(2): p. 436-443.
51. Livergood, M.C., K.A. LeChien, and A.S. Trudell, *Obesity and cell-free DNA "no calls": is there an optimal gestational age at time of sampling?* Am J Obstet Gynecol, 2017. **216**(4): p. 413.e1-413.e9.

52. Gil, M.M., Accurti, V., Santacruz, B., Plana, M. N., Nicolaides, K. H., *Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis*. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2017. **50**(3): p. 302-314.
53. Taylor-Phillips, S., Freeman, K., Geppert, J., Agbebiyi, A., Uthman, O. A., Madan, J., Clarke, A., Quenby, S., Clarke, A., *Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis*. *BMJ Open*, 2016. **6**(1): p. e010002.
54. Rink, B.D. and M.E. Norton, *Screening for fetal aneuploidy*. *Semin Perinatol*, 2016. **40**(1): p. 35-43.
55. Malan, V., L. Bussieres, and L.J. Salomon, *[Cell-free fetal DNA screening tests for trisomy 21]*. *Gynecol Obstet Fertil*, 2016. **44**(12): p. 675-678.
56. Kazemi, M., M. Salehi, and M. Kheirollahi, *Down Syndrome: Current Status, Challenges and Future Perspectives*. *Int J Mol Cell Med*, 2016. **5**(3): p. 125-133.
57. Levy, B. and M. Stosic, *Traditional Prenatal Diagnosis: Past to Present*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1885**: p. 3-22.
58. Delay, F., Dochez, V., Biquard, F., Cheve, M. T., Gillard, P., Arthuis, C., Winer, N., *Management of fetal goiters : 6-year retrospective observational study in three prenatal diagnosis and treatment centers of the Pays de Loire perinatal network*. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2018: p. 1-191.
59. Gezer, C., Ekin, A., Goynumer, G., Pakay, K., Acar, H., Solmaz, U., Taner, C., E. Ozeren, M., *Comparison of adverse perinatal outcomes after single-needle and double-needle CVS techniques*. *J Perinat Med*, 2017. **45**(2): p. 199-203.
60. Clausen, F.B., M.B. Damkjaer, and M.H. Dziegiel, *Noninvasive fetal RhD genotyping*. *Transfus Apher Sci*, 2014. **50**(2): p. 154-62.
61. Macher, H.C., Noguerol, P., Medrano-Campillo, P., Garrido-Marquez, M., R. Rubio-Calvo, A. Carmona-Gonzalez, M. Martin-Sanchez, J. Perez-Simon, J. A. Guerrero, J. M., *Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: results in clinical benefits and cost saving*. *Clin Chim Acta*, 2012. **413**(3-4): p. 490-4.
62. Clausen, F.B., Rieneck, K., Krog, G. R., Bundgaard, B. S., Dziegiel, M. H., *Noninvasive Antenatal Screening for Fetal RHD in RhD Negative Women to Guide Targeted Anti-D Prophylaxis*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1885**: p. 347-359.
63. Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., Wainscoat, J. S., *Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum*. *Lancet*, 1997. **350**(9076): p. 485-7.
64. Tamminga, S., van Maarle, M., Henneman, L., Oudejans, C. B., Cornel, M. C., Sistermans, E. A., *Maternal Plasma DNA and RNA Sequencing for Prenatal Testing*. *Adv Clin Chem*, 2016. **74**: p. 63-102.
65. Tjoa, M.L., Cindrova-Davies, T., Spasic-Boskovic, O., Bianchi, D. W., Burton, G. J., *Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(2): p. 400-4.
66. Guibert, J., Benachi, A., Grebille, A. G., Ernault, P., Zorn, J. R., Costa, J. M., *Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique*. *Hum Reprod*, 2003. **18**(8): p. 1733-6.
67. New, M.I., Tong, Y. K., Yuen, T., Jiang, P., Pina, C., Chan, K. C., Khattab, A., Liao, G. J., Yau, M., Kim, S. M., Chiu, R. W., Sun, L., Zaidi, M., Lo, Y. M., *Noninvasive*

- prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma.* J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(6): p. E1022-30.
68. Kazmi, D., Bailey, J.Yau, M.Abu-Amer, W.Kumar, A.Low, M.Yuen, T., *New developments in prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2017. **165**(Pt A): p. 121-123.
 69. Vermeulen, C., Geeven, G.de Wit, E.Verstegen, MjamJansen, R. P. M.van Kranenburg, M.de Bruijn, E.Pulit, S. L.Kruisselbrink, E.Shahsavari, Z.Omrani, D.Zeinali, F.Najmabadi, H.Katsila, T.Vrettou, C.Patrinou, G. P.Traeger-Synodinos, J.Splinter, E.Beekman, J. M.Kheradmand Kia, S.Te Meerman, G. J.Ploos van Amstel, H. K.de Laat, W., *Sensitive Monogenic Noninvasive Prenatal Diagnosis by Targeted Haplotyping.* Am J Hum Genet, 2017. **101**(3): p. 326-339.
 70. Breveglieri, G., Bassi, E.Carlassara, S.Cosenza, L. C.Pellegatti, P.Guerra, G.Finotti, A.Gambari, R.Borgatti, M, *Y-chromosome identification in circulating cell-free fetal DNA using surface plasmon resonance.* Prenat Diagn, 2016. **36**(4): p. 353-61.
 71. Miura, K., Higashijima, A.Shimada, T.Miura, S.Yamasaki, K.Abe, S.Jo, O.Kinoshita, A.Yoshida, A.Yoshimura, S.Niikawa, N.Yoshiura, K.Masuzaki, H., *Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders.* J Hum Genet, 2011. **56**(4): p. 296-9.
 72. Chan, K.C., Zhang, J.Hui, A. B.Wong, N.Lau, T. K.Leung, T. N.Lo, K. W.Huang, D. W.Lo, Y. M., *Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma.* Clin Chem, 2004. **50**(1): p. 88-92.
 73. Hromadnikova, I., Vechetova, L.Vesela, K.Benesova, B.Doucha, J.Kulovany, E.Vlk, R., *Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma.* Fetal Diagn Ther, 2005. **20**(4): p. 275-80.
 74. Moezzi, L., Keshavarz, Z.Ranjbaran, R.Aboulizadeh, F.Behzad-Behbahani, A.Abdollahi, M.Ramezani, A.Samsami, A.Sharifzadeh, S., *Fetal RHD Genotyping Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Cell-Free Fetal DNA in Pregnancy of RhD Negative Women in South of Iran.* Int J Fertil Steril, 2016. **10**(1): p. 62-70.
 75. Schmidt, L.C., Cabral, A. C.Faria, M. A.Monken, F.Tarazona-Santos, E.Martins, M. L., *Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma in an admixed Brazilian population.* Genet Mol Res, 2014. **13**(1): p. 799-805.
 76. Kolialexi, A., Tsangaris, G. T.Antsaklis, A.Mavroua, A., *Rapid clearance of fetal cells from maternal circulation after delivery.* Ann N Y Acad Sci, 2004. **1022**: p. 113-8.
 77. Hyland, C.A., Millard, G. M.O'Brien, H.Schoeman, E. M.Lopez, G. H.McGowan, E. C.Tremellen, A.Puddephatt, R.Gaerty, K.Flower, R. L.Hyett, J. A.Gardener, G. J., *Non-invasive fetal RHD genotyping for RhD negative women stratified into RHD gene deletion or variant groups: comparative accuracy using two blood collection tube types.* Pathology, 2017. **49**(7): p. 757-764.
 78. Sorensen, K., *Determination of fetal RHD type in plasma of RhD negative pregnant women.* Scand J Clin Lab Invest, 2018. **78**(5): p. 411-416.
 79. Warton, K., Kjeldsen-Kragh, J.Husby, H.Akkok, C. A., *Comparison of 4 commercial kits for the extraction of circulating DNA from plasma.* Cancer Genet, 2018.

80. Papasavva, T., Martin, P., Legler, T. J., Liasides, M., Anastasiou, G., Christofides, A., Christodoulou, T., Demetriou, S., Kerimis, P., Kontos, C., Leontiades, G., Papapetrou, D., Patroclos, T., Phylaktou, M., Zottis, N., Karitzie, E., Pavlou, E., Kountouris, P., Veldhuisen, B., van der Schoot, E., Kleanthous, M., *Prevalence of RhD status and clinical application of non-invasive prenatal determination of fetal RHD in maternal plasma: a 5 year experience in Cyprus*. BMC Res Notes, 2016. **9**: p. 198.
81. Grande, M., Ordonez, E., Cirigliano, V., Cid, J., Grau, E., Pericot, A., Teixido, I., Marin, J. L., Borrell, A., *Clinical application of midtrimester non-invasive fetal RHD genotyping and identification of RHD variants in a mixed-ethnic population*. Prenat Diagn, 2013. **33**(2): p. 173-8.
82. Osaro, E. and A.T. Charles, *Rh isoimmunization in Sub-Saharan Africa indicates need for universal access to anti-RhD immunoglobulin and effective management of D-negative pregnancies*. Int J Womens Health, 2010. **2**: p. 429-37.
83. Huchet, J., Y. Defossez, and Y. Brossard, *Detection of transplacental hemorrhage during the last trimester of pregnancy*. Transfusion, 1988. **28**(5): p. 506.
84. Saramago, P., Yang, H., Llewellyn, A., Palmer, S., Simmonds, M., Griffin, S., *High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal Rhesus D genotype to guide antenatal prophylaxis with anti-D immunoglobulin: a cost-effectiveness analysis*. Bjog, 2018. **125**(11): p. 1414-1422.
85. Kostenko, E., Chantraine, F., Vandeweyer, K., Schmid, M., Lefevre, A., Hertz, D., Zelle, L., Bartha, J. L., Di Renzo, G. C., *Clinical and Economic Impact of Adopting Noninvasive Prenatal Testing as a Primary Screening Method for Fetal Aneuploidies in the General Pregnancy Population*. Fetal Diagn Ther, 2018: p. 1-11.
86. Sparks, T.N. and A.B. Caughey, *How should costs and cost-effectiveness be considered in prenatal genetic testing?* Semin Perinatol, 2018. **42**(5): p. 275-282.
87. Sandler, S.G., L.N. Chen, and W.A. Flegel, *Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype*. Br J Haematol, 2017. **179**(1): p. 10-19.
88. Rezaei, M., Winter, M., Zander-Fox, D., Whitehead, C., Liebelt, J., Warkiani, M., Hardy, T., Thierry, B., *A Reappraisal of Circulating Fetal Cell Noninvasive Prenatal Testing*. Trends Biotechnol, 2018.
89. Yang, J., X. Ding, and W. Zhu, *Improving the calling of non-invasive prenatal testing on 13-/18-/21-trisomy by support vector machine discrimination*. PLoS One, 2018. **13**(12): p. e0207840.

ETİK KURUL KARARI

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 1473

Tarih : 21.12.2017

Konu: Yard. Doç. Dr. Selçuk Sözer TOKDEMİR hk.

**Sayın Yard. Doç. Dr. Selçuk Sözer TOKDEMİR
Genetik Anabilim Dalı**

İlgi : Genetik Anabilim Dalının 18/10/2017 gün ve 390729 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Büşra YAŞA' nın yürüteceği 2017/1279 dosya numaralı "Maternal Kandan Fetal Dna İzolasyonu ile Rhesus D ve Cinsiyet Genotiplemesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 08/12/2017 tarih ve 20 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MATERNAL KANDAN FETAL DNA İZOLASYONU İLE
RHESUSU D VE CİNSİYET GENOTİPLEMESİ

ORIJİNALLIK RAPORU

%4

BENZERLİK ENDEKSİ

%1

İNTERNET
KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Canakkale Onsekiz Mart
University
Öğrenci Ödevi

%1

2

Submitted to Istanbul University
Öğrenci Ödevi

%1

3

Doruk Cevdi KATLAN, Feride SÖYLEMEZ.
"Cell-Free Fetal DNA in Prenatal Screening",
Türkiye Klinikleri Journal of Health Sciences,
2017
Yayın

<%1

4

www.ejmanager.com
İnternet Kaynağı

<%1

5

Hada C. Macher, Pilar Noguerol, Pablo
Medrano-Campillo, María R. Garrido-Márquez
et al. "Standardization non-invasive fetal RHD
and SRY determination into clinical routine
using a new multiplex RT-PCR assay for fetal
cell-free DNA in pregnant women plasma:

<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Büşra	Soyadı	YAŞA
Doğ.Yeri	İstanbul/Üsküdar	Doğ.Tar.	16.08.1994
Uyruğu	TÜRK	TC Kim No	52258155766
Email	busrayasa94@gmail.com	Tel	05315851280

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez.Yılı
Doktora	-	-
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	-
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2016
Lise	İstanbul Validebağ Anadolu Sağlık Lisesi	2012

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	SB.Okmeydanı Eğitim Araştırma Hastanesi	2016-Devam
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	OkuduğunuA nlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	70	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	EşitAğırlık	Sözel
LES Puanı	70		
(Diğer)Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

