



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MATERNAL KANDAN FETAL DNA İZOLASYONU
VE
FETAL RHD ANALİZİ**

Hazırlayan
Bio. Çisem Akurut

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Fatma Sılan

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2014

ÇOMÜ-BAP Proje No: TYL 2014/203



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MATERNAL KANDAN FETAL DNA İZOLASYONU
VE
FETAL RHD ANALİZİ**

Hazırlayan
Bio. Çisem Akurut

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Fatma Sılan

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE-2014

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: TYL-2014/203

TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri
Enstitüsü
Program Adı : Tıbbi Genetik
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Genetik
Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Çisem AKURUT
Tez Başlığı : Maternal Kandan Fetal DNA Eldesi ve Fetal RhD Analizi
Sınav Yeri : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma Hastanesi
Sınav Tarihi : 18.06.2014

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Sınav Jürisi

| Danışman (Unvan ve Adı) | Kurumu | İmza |
|---|---------------|------|
| Prof. Dr. Fatma Sılan | Tıp Fakültesi | |
| Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları) | | |
| Prof. Dr. Öztürk Özdemir | Tıp Fakültesi | |
| Doç. Dr. Emine Coşar | Tıp Fakültesi | |
| Yrd. Doç. Dr. Öztekin Çıkman | Tıp Fakültesi | |
| Yrd. Doç. Dr. Ahmet Uludağ | Tıp Fakültesi | |

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans Tezi Enstitü Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Canakkalale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name : Medical Genetics

Programme Level : Master of Science (X) Doctor of Philosophy ()

Department : Medical Genetics

Student Name and Surname: Cisem AKURUT

Title of the Thesis : Isolation of Fetal DNA from Maternal Blood and Analysis of Fetal RhD

Examination Place : Canakkalale Onsekiz Mart University Research Hospital

Examination Date : 18.06.2014

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science Thesis.

| Supervisor (Title and Name) | Institution | Signature |
|---|-----------------------|------------------|
| Prof. Dr. Fatma Silan | Medical School | |
| Members of Examination Jury (Titles and Names) | | |
| Prof. Dr. Oztürk Ozdemir | Medical School | |
| Assoc. Dr. Emine Cosar | Medical School | |
| Asist. Prof. Dr. Oztekin Cikman | Medical School | |
| Asist. Prof. Dr. Ahmet Uludag | Medical School | |

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated and numbered

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8’de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

Tarih: 29.05.2014

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Çisem AKURUT

İmza:

ÖZET

Rh uyuşmazlığı gebelik sürecinde ortaya çıkan ve annenin Rh (-) fetüsün Rh (+) olması sonucu görülen uyuşmazlığa verilen isimdir. Yeni doğanın hemolitik hastalığı RhD uyuşmazlığına bağlı olarak ortaya çıkan klinik bir tablodur. İzimmünizasyon sebebiyle anneden geçen antikolar fetal hemolize sebep olur. Bunun sonucunda fetüste anemi, fetal hidrops ve tedavi edilmemesi durumunda fetal ölüm gerçekleşebilir. Olası bir fetal kanama riskine karşı 28. haftada tüm gebelere anti-D IgG profilaksisi uygulanmaktadır. Rh (-) fetüs taşıyan gebeler gereksiz aşı ürününe maruz kalmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda Rh (-) gebelerin %40'nın Rh (-) fetüs taşıdıkları saptanmıştır. Bu sebeplerle fetüsün RhD genotipinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Günümüzde RhD genotipinin belirlenmesi amacıyla kullanılan spesifik yöntemler invaziv yöntemler olup, %0,5-2 oranında fetal kayıp riski taşımaktadır. İnvaziv olmayan diğer yöntemlerin spesifitesinin invaziv yöntemler kadar olmaması sebebiyle bu alanda yeni noninvaziv yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Çalışmamıza Rh uyuşmazlığı saptanan 12 gebe dahil edilmiştir. Maternal kandan cell free fetal DNA (cff DNA) izolasyonu sonrası, RhD geninin ekzon 7 ve ekzon 10 bölgelerine spesifik primerler ve TaqMan problemleri aracılığıyla RT-PCR işlemi gerçekleştirildi. Her örnek üç tekrarlı çalışılarak, fetüsün RhD genotipi belirlenmiştir. Buffy coat'dan elde edilen maternal DNA örnekleri ile RhD genotipleme yapılması sonucunda bir annenin kan grubunu yanlış bildiği saptanmıştır. Çalışmamıza dahil edilen 12 olgudan 6 olgunun fetal RhD genotipi Rh (+) diğer 6 olgunun fetal RhD genotipi Rh (-) olarak saptanmıştır. Doğum yapan gebelerin bebeklerinin Rh kan grupları serolojik yöntemlerle doğrulanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada laboratuvarımızda maternal kandan cell free fetal DNA elde edilebilmiş ve fetal RhD genotipi girişimsel bir yöntem olmaksızın başarıyla saptanabilmiştir.

Anahtar kelimeler: Cell free fetal DNA, Fetal RhD genotipleme, Maternal plazma, RT-PCR

ABSTRACT

Isolation of Fetal DNA from Maternal Blood and Analysis of Fetal RhD

Rh incompatibility is seen during pregnancy, if mother is Rh (-) and fetus is Rh (+). Hemolytic disease of the newborn is a clinical process due to Rh incompatibility. Isoimmunisation welded maternal antibodies cause fetal hemolysis. Because of this, fetal anemia, fetal hydrops, and fetal death can be seen if it is not treated. Anti-D IgG prophylaxis is done to all pregnant women against fetal bleeding in 28th week of pregnancy. The pregnant women who have Rh (-) fetus are being exposed to unnecessary vaccination. In different studies, it was detected as 40% Rh (-) pregnant women have Rh (-) fetuses. Because of this, it is important to determine RhD genotype of fetus. Currently used, specific methods which determine RhD genotype are invasive and have 0.5-2% fetal loss risk. New noninvasive specific methods are necessary because current noninvasive methods are not specific as invasive methods. Twelve pregnant women with Rh incompatibility were included in this study. After cell free fetal DNA isolation from maternal blood, RT-PCR was performed with specific primers and TaqMan probes for RhD gene exon 7 and exon 10. Each sample was studied for three times and fetal RhD genotype was determined. It was detected that a mother knew her blood type false with genotyping RhD with maternal DNA samples isolated with buffycoat. In all 12 cases, 6 cases were determined as fetal RhD genotype is Rh (+), other 6 cases were determined as fetal RhD genotype is Rh (-) in our study. After the birth Rh blood types of babies are verified with serological method. In this study, cell free fetal DNA could be isolated in our laboratory and fetal RhD genotype was detected with a noninvasive method successfully.

Keywords: Cell free fetal DNA, Fetal RhD genotyping, Maternal plasma, RT-PCR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süreci boyunca değerli fikirleriyle bana her konuda yol gösteren ve tezimin hazırlanmasında emeğini ve desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Fatma Sılan'a,

Eğitimimdeki emek ve katkıları ile tez çalışması sürecinde desteklerini her zaman hissettiğim Sayın Prof. Dr. Öztürk Özdemir, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Uludağ ve Sayın Doç. Dr. Nurettin Şahiner'e,

Çalışmalarım sırasında hiçbir zaman yardımını esirgemeyen değerli hocam ve dostum Uzman Dr. Sinem Yalçıntepe'ye,

Değerli çalışma arkadaşlarım Asistan Dr. Mine Urfalı, Biyolog Diğdem Uysal, Biyolog Özlem Albayrak Değirmencioğlu, Kimyager Duygu Kankaya, Kimyager Hülya Has ve Tekniker Şengül Türünz'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda ilgi ve alkalarını esirgemeyen Hatice Kamar, Özge Değirmencioğlu ve Sibel Erol'a

Dostluğu desteği ve sabrı ile her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Biyolog Buşra Çalık'a

Her durumda sonsuz desteğiyle yanımda duran Biyolog Hakan Mail'e,

Hayatımın en değerli varlıkları annem Zeliha Akurut ve babam Abdullah Akurut'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje No: TYL-2014/203

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| TEZ ONAY FORMU | i |
| THESIS APPROVAL FORM | ii |
| BEYAN FORMU | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| İÇİNDEKİLER..... | vii |
| KISALTMALAR VE SİMGELERİN LİSTESİ | ix |
| TABLO LİSTESİ..... | x |
| ŞEKİL LİSTESİ | xi |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. Kan Grupları..... | 2 |
| 2.1.1. ABO Kan Grubu Sistemi..... | 4 |
| 2.1.2. Rh Sistemi..... | 4 |
| 2.2. Rh Uyuşmazlığı..... | 5 |
| 2.3. Yeni Doğanın Hemolitik Hastalığı..... | 6 |
| 2.4. Cell free Fetal DNA..... | 7 |
| 2.5. Fetal RhD Genotiplemesi..... | 10 |
| 2.5.1. Girişimsel Prenatal Tanı Yöntemleri | 10 |
| 2.5.2. Girişimsel Olmayan Tanı Yöntemleri: | 10 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 13 |
| 3.1. Olguların Seçimi..... | 13 |
| 3.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Plazmanın Ayırıştırılması..... | 13 |
| 3.3. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Malzemeler | 13 |

| | |
|--|----|
| 3.3.1. Kullanılan Cihazlar | 13 |
| 3.3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler | 14 |
| 3.4. Plazmadan DNA İzolasyonu | 14 |
| 3.4.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Malzemeler | 14 |
| 3.4.2. Manuel DNA İzolasyonu | 14 |
| 3.4.3. Otomatik DNA İzolasyonu | 15 |
| 3.5. Örneklerin TaqMan Real-Time PCR Analizi | 15 |
| 3.5.1. TaqMan Real-Time PCR Analizi İçin Gerekli Malzemeler | 16 |
| 3.5.2. RhD Geni Ekzon 7 Primer ve TaqMan Probu | 16 |
| 3.5.3. RhD Geni Ekzon 10 Primer ve TaqMan Probu | 17 |
| 3.5.4. SRY ve GLO Geni Primer ve TaqMan Probu | 18 |
| 3.6. PCR Protokolü | 19 |
| 3.7. TaqMan Real-Time PCR Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi | 19 |
| 3.8. Antikontaminasyon Ölçütleri | 21 |
| 4. BULGULAR | 22 |
| 5. TARTIŞMA | 31 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 36 |
| 7. KAYNAKLAR | 37 |
| 8-EKLER | 42 |
| Ek-1 Spiralli Tez Kontrol Formu | 42 |
| Ek-2 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Spiralli/Ciltli Tez Yazım Kontrol Listesi | 43 |
| EK-3 Etik Kurul Onay Formu | 44 |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | 45 |

KISALTMALAR VE SİMGELERİN LİSTESİ

cff-DNA: Cell free fetal DNA

CVS: Koryonik Villus Biyopsisi

DCT: Direkt Coombs Testi

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

HbF: Fetal Hemoglobin

HDN: Yeni Doğanın Hemolit Hastalığı

ICT: İndirekt Coombs Testi

IgG: İmmüoglobulin G

Kb: Kilobaz

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonları

Rh: Rhesus

RT-PCR: Real Time PCR

USG: Ultrasonografi

♂: Erkek cinsiyeti simgeler

♀: Dişi cinsiyeti simgeler

TABLO LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1. Kan grupları | 3 |
| Tablo 2. RhD, SRY ve GLO genine ait primer prob dizileri..... | 16 |
| Tablo 3. RhD Geni Ekzon 7 PCR reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları | 17 |
| Tablo 4. RhD Geni Ekzon 10 PCR reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları..... | 18 |
| Tablo 5. SRY ve GLO Geni reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları..... | 19 |
| Tablo 6. Çalışmaya dahil edilen gebelerin gebelik haftası, yaş ve kilo parametreleri | 22 |
| Tablo 7. Çalışmaya dahil edilen gebelerin gebelik öyküsü, kan transfüzyonu, ilik nakli ve anti-D profilaksisi bilgileri..... | 23 |
| Tablo 8. Çalışmaya dahil edilen gebelerin maternal RhD RT-PCR analizi sonuçları | 24 |
| Tablo 9. CffDNA'dan fetal RhD analizi sonuçları | 25 |
| Tablo 10. Doğum sonrası RhD sonuçları | 27 |

ŞEKİL LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1. RH geninin genomik organizasyon şeması | 5 |
| Şekil 2. RhD (+) | 20 |
| Şekil 3. RhD (-) | 21 |
| Şekil 4. Annelerin RhD analizi görüntüsü | 25 |
| Şekil 5. İki numaralı olgunun amniyon sıvısından RT-PCR aracılığı ile fetal RhD genotipleri sonucu Rh (+) görüntüsü..... | 26 |
| Şekil 6. Dokuz numaralı olgunun maternal DNA örneğinin ekzon 7 ve ekzon 10 real time PCR Rh (-) görüntüsü..... | 27 |
| Şekil 7. Dokuz numaralı olgunun maternal plazmadan elde edilen cff DNA örneğinin ekzon 7 ve ekzon 10 real time PCR (Rh Pozitif) görüntüsü | 28 |
| Şekil 8. Rh (+) Ekzon 7 PCR ürününün kapiller elektroforez görüntüsü | 29 |
| Şekil 9. Rh (+) Ekzon 10 PCR ürününün kapiller elektroforez görüntüsü | 29 |
| Şekil 10. Rh (-) PCR ürününün kapiller elektroforez görüntüsü..... | 30 |

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yeni doğanın hemolitik hastalığı (HDN) annenin Rh (-), fetüsün Rh (+) olması durumunda RhD uyumsuzluğuna bağlı olarak hamilelik sürecinde ortaya çıkan klinik bir tablodur. Fetüste kansızlık, yeni doğanda sarılık ve fetal ölümlere sebebiyet vermektedir. Bu sebeple antenatal ve postnatal takibi önem taşımaktadır (Çetinkaya ve ark., 2010). Bunun önlenmesi amacıyla Rh (-) tüm gebeler 28. haftada anti-D IgG uygulanmaktadır. Bu uygulama sonucunda Rh (-) fetüsler gereksiz aşı ürününe maruz kalmaktadırlar. Yapılan araştırmalara göre Rh (-) kadınların gebeliklerin %40'nın Rh (-) fetüse sahip olduğu saptanmıştır (Günel ve ark., 2010).

Günümüzde fetüsün Rh profilini ortaya koymak için kullanılan yöntemler invazif yöntemler olup düşük riski taşımaktadır. İnvazif olmayan ultrasonografi (USG), indirekt coombs testi (ICT) ve direkt coombs testi (DCT) gibi yöntemleri kullanılmakla birlikte duyarlılığı invazif yöntemler kadar kesin olmaması sebebiyle yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Lo ve ark. (1997), yaptığı çalışmalar sonucunda hamile kadınların plazma ve serumunda cell free fetal DNA'nın (cffDNA) varlığını ortaya konulmuştur. Fetal DNA'nın maternal kandan eldesi ve PCR tekniği ile çoğaltılarak prenatal tanı amacı ile kullanılması yeni bir non invazif yöntem oluşturmaktadır. Bu yöntemle invazif tekniklerin getirdiği riskler olmaksızın prenatal tanı olanağı sağlanmaktadır.

Çalışmamızda Rh uyusmalığı olan gebelerde maternal kandan cell free fetal DNA eldesi sonra RhD genine ait ekzon 7 ve ekzon 10 bölgelerine spesifik primer ve probler aracılığıyla RT-PCR işlemi sonrası fetüsün RhD genotipini saptanmıştır. Elde edilen veriler doğum sonrası sonuçları ile karşılaştırılıp testin spesifitesi ve sensivitesi belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kan Grupları

Kan grupları yirminci yüzyılın başında Landsteiner tarafından plazmalar üzerinde yaptığı çalışmalar sırasında bazı bireylerin plazmalarının diğerinde eritrositleri aglütine ettiğini fark eder. 1945 yılında Coombs, Mourant ve Race tarafından antiglobulin testinin geliştirmesiyle antigule olmayan (non-antigulated) antikörlerin tespit edilebildiği seroloji bilimi doğmuştur. Günümüzde yaklaşık 270 kan grubu antijeni bilinmektedir. Bu kan grubu antijenlerinin büyük çoğunluğu 26 kan grubu sisteminden birine dâhildir. Tablo 1’de kan grupları belirtilmiştir (Daniels, 2002).

Genetik olarak belirlenen antijen grupları ya tek bir gen tarafından ya da iki ya da daha fazla bağlantılı homolog genlerden oluşan bir grup tarafından kontrol edilir. Bu sistemlerden özellikle Rh ve MNS sistemleri karmaşıktır

Kan grubu antijenlerinin çoğu eritrositler tarafından sentezlenir ancak Lewis ve Chido Rodgers sistemlerinin antijenleri eritrosit membranlarına plazmadan geçer. Bazı kan grubu antijenleri sadece eritrositlerde tespit edilirken bazıları diğer dokularda tespit edilebilir ve bunlara doku-kan grubu antijenleri adı verilir.

Kan grubu antijenlerinin biyokimyasal analizi iki ana iki gruba ayrılmıştır. Bir protein determinantlar: kan grubu genlerinin primer ürünleridir ve iki glikolipit ve glikoproteinlerin karbonhidrat determinantları: antijen ekspresyonunu kontrol eden genlerin ürünü olan glikoziltransferaz enzimleri tarafından katalize edilir.

Bazı antijenler glikoprotein aminoasit dizisi tarafından belirlenir ancak serolojik olarak tespit edilebilmeleri için bir karbonhidrat grubu bulunmalıdır.

Moleküler genetik tekniklerin insan kan grubu çalışmalarına dahil olmasıyla günümüzde pek çok kan grubu sistemini sağlayan genlerin çoğu klonlanmış ve dizi analizleri yapılmıştır. Kan gruplarının analizindeki çeşitli serolojik problemler gen düzeyinde nokta mutasyonları eşit olmayan crossing over ve alternatif RNA splayingin tespiti yoluyla aydınlatılmıştır (Daniels, 2002).

ABO kan grubu sisteminin keşfi uygun kan transfüzyonlarının yapılabilmesini sağlamış ve Rh antijenlerinin tespitide; yeni doğanın hemolitik hastalığının anlaşılabilmesinin ve önlenbilmesinin yolunu açmıştır.

Diğer kan grubu sistemleri ender olarak klinik problemlere yol açmaktadır (Dilek ve ark., 2006). Bu sebeple rutin uygulamalarda öncelikle ABO ve Rh gruplarının incelenmesi sonrasında diğer kan gruplarının araştırılması gerekmektedir.

Tablo 1. Kan grupları

| Adı | Sembolü | Antijen Sayısı | İlişkili Membran yapısı | Gen | Kromozom |
|------------------------|---------|----------------|--------------------------------|--------------------|----------|
| ABO | ABO | 4 | Karbonhidrat | ABO | 9 |
| MNS | MNS | 43 | GPA(CD235A) GPB(CD235B) | GYPB, GYPB GYPE | 4 |
| P | P1 | 1 | Karbonhidrat | P1 | 22 |
| Rh | RH | 46 | RhD(CD240D) RhCcEe(CD240CE) | RHD, RHCE | 1 |
| Lutheran | LU | 18 | CD239,IgSF | LU | 19 |
| Kell | KEL | 24 | CD238, endopeptidaz | KEL | 7 |
| Lewis | LE | 6 | Karbonhidrat | FUT3 | 19 |
| Duffy | FY | 6 | CD234,kemokin reseptörü | FY | 1 |
| Kidd | JK | 3 | Üre taşıyıcı | SLC14A1 | 18 |
| Diego | DI | 21 | CD233, anyon değiştirici | SLC4AE1 | 17 |
| Yt | YT | 2 | Asetilkolinesteraz | ACHE | 7 |
| Xg | XG | 2 | Glikoprotein, CD99 | XG, MIC2 | X/Y |
| Scianna | SC | 3 | Glikoprotein | SC | 1 |
| Dombrock | DO | 5 | ADP-ribosiltransferaz | DO | 12 |
| Colton | CO | 3 | Aquaporin-1 | AQP1 | 7 |
| Landsteiner- Wiener | LW | 3 | ICAM-4, IgSF, CD242 | LW | 19 |
| Chido/Rodgers | CH/RG | 9 | C4A, C4B(C') | C4A, C4B | 6 |
| Hh | H | 1 | CD173 (tip2 H), karbonhidrat | FUT1 | 19 |
| Kx | XK | 1 | Protein | XK | X |
| Gerbich | GE | 7 | GPC, GPD (CD236) | GYPC | 2 |
| Cromer | CROM | 10 | CD55, DAF, C' regülatör | DAF | 1 |
| Knops | KN | 7 | CD35,CR1, C' regülatör | CR1 | 1 |
| Indian | IN | 2 | CD44 | CD44 | 11 |
| Ok | OK | 1 | CD147, EMMPRIN, IgSF | CD147 | 19 |
| Raph | RAPH | 1 | Glikoprotein | MER2 | 11 |
| JohnMilton Hagen | JMH | 1 | CDw108, semaforin | SEMA7A | 15 |

C', complement; IgSF, immunoglobulin superfamily.

2.1.1. ABO Kan Grubu Sistemi

Landsteiner farklı insanlardan alınan serum ve eritrositlerin karıştırılması sonucunda üç grubun varlığını saptamıştır (AB0). A grubundan olanların serumlarının B ile aglütine olduğunu fakat A grubunda olan başka bir serum ile aglütine olmadığını, B grubunun A ile aglütine olduğunu ama B ile aglütine olmadığını, 0 grubunun ne A ne de B ile aglütine olmadığını saptamıştır. Decastello ve Sturli bu guruplandırmaya dördüncü bir grup olarak AB eklemiştir. Epstein ve Ottenberg kan grup sistemlerinin kalıtılabilir olabileceğini önermiştir. 1910 yılında VonDungern ve Hirschfeld; A ve B antijenlerinin Mendel kurallarına göre kalıtım gösterdiğini kanıtlamıştır (Daniels, 2002).

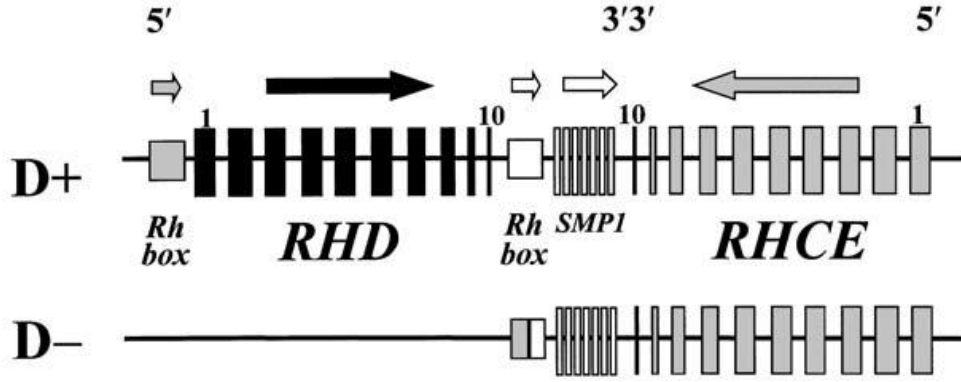
ABO grubu antijenleri glikolipit ve glikoproteinlerin üzerinde bulunan karbonhidrat determinantlar içerir. A ve B transferaz 9 nolu kromozom üzerinde yer alan ABO geni tarafından kodlanmaktadır. ABO geni 18-20 kb büyüklüğünde olup 7 ekzon içerir. Altıncı ve 7. ekzonlar en büyük ekzonlar olup genin %77'sini kodlar. A ve B ürünleri arasındaki fark 176., 235., 266. ve 268. kodonlardaki missense mutasyonlar sonucu oluşur. İki yüz altmış altıncı ve 268. aminoasitler en önemlileri olup hangi gen ürünün ağırlıklı olarak sentezleneceğini belirler. N-asetilgalaktosaminiltransferaz ağırlıklı olarak sentezlenir ise A, galaktosiltransferaz ağırlıklı olarak sentezlenir ise B grubu aktivitesinden söz edilir. En yaygın bulunan 0 alleli A dizisi ile büyük ölçüde aynı sekans dizisine sahip olup, aralarındaki tek fark 86. kodonda meydana gelen tek nükleotid delesyonu sonucu çerçeve kayması mutasyan oluşumu ve 117. kodonda erken stop kodon oluşumu sonucunda 0 alleli oluşumudur (Daniels, 2002). 0 allelinde hiç enzim sentezlenmez.

Bir kişi kendinde bulunmayan bir antijen ile karşılaşır ise bu antijene karşı antikor üretir. Bu antikorlar transfüzyon uyumsuzluğu, materno-fetal uyumsuzluk ve otoimmün hemolitik anemiye neden olabilir (Aykut ve ark., 2010).

2.1.2. Rh Sistemi

Rh kan grubu sistemi en kompleks kan grubu sistemidir. Kırk altı farklı antijeni tespit edilmiştir. Rh antijenleri lipoprotein yapılı moleküller olup eritrositlerin yüzeyinde yer alırlar. RH geni (MIM Number 111680) 1 nolu kromozomun p kolunda yer alır ve on ekzon içerir. Otozomal dominant kalıtım gösterir.

Rh geni RhD ve RHCE olmak üzere iki allelden oluşur. RhD alleli D antijenini kodlar, RHCE alleli Cc ve Ee antijenlerini kodlar. RhD alleli ile RHCE alleli arasındaki fark 3' ucunda yer alan 30 kb SMP1 geni ve 9 kb 'Rhesus box' içermesidir. Şekil 1'de şematize edilmiştir.



Şekil 1. RH geninin genomik organizasyon şeması (Daniels, 2002).

Rh (-) kişiler D antijenine sahip değildirler. Kafkas popülasyonunun %85'i RhD allelini taşır bu oran diğer popülasyonlar ile karşılaştırıldığında çok yüksektir (Grootkerk ve ark. 2006, Izetbegovic 2013). Birey D antijenine sahip olması durumunda Rh (+) olarak değerlendirilir. Fakat bazı durumlarda D antijeni düşük ekspresyon gösterir (Levine P ve ark., 1984). Böyle bir durumda birey genetik olarak Rh (+) olmasına rağmen düşük ekspresivite sebebiyle Rh (-) bir birey benzeri antikor üretebilir. Bu durum Afrika popülasyonunda yaygın olmakla birlikte Kafkas popülasyonunda nadirdir (Daniels, 2002).

2.2. Rh Uyuşmazlığı

Hamilelik sürecinde ortaya çıkan annenin Rh (-) bebeğin Rh (+) olması durumunda görülen uyuşmazlığa Rh uyuşmazlığı denir. Rh sisteminde yer alan en immünojenetik ve önemli antijen D antijendir (Daniels, 2002). C ve E antijenlerine oranla 50 kat daha fazla antikor oluşumuna sebep olur (Izetbegovic, 2013). Anti-D ilk olarak Levine ve Stetson tarafından 1939 yılında keşfedilmiştir (Daniels, 2002).

D antijeni fetal eritrosit membranında 11. gebelik haftasından itibaren oluşmaya başlar (Aykut ve ark., 2010). Fetüste meydana gelen D antijeninin annenin kanına karışması ile anne bu antijenlere karşı antikor üretir. Erken dönemde sentezlenen anti-D IgM plasentadan geçemedikleri için fetus için tehlike oluşturmazlar ancak yavaş bir şekilde oluşan anti-D IgD plasentadan geçebilen moleküller olduğundan

fetüs için tehlike oluştururlar. Rh immün cevabı yavaş oluştuğu için ilk gebelikte her hangi bir probleme sebep olmaz. Sonraki gebeliklerde fetüsün Rh (+) olması durumunda daha hızlı bir yanıt oluşur. Antikorlar bebeğin eritrositlerinde hemolize sebep olur. Bu durum da yeni doğan hemolitik hastalıkları olarak adlandırılan klinik tablolara sebep olur.

Çok nadir olmakla birlikte Rh uyuşmazlığına bağlı hemoliz ilk gebelikte de gelişebilir. Bunu büyükanne teorisi açıklar. Büyükanne teorisine göre Rh (-) kadının Rh (+) annesi vardır. Doğum sırasında ya da gebelik sürecinde Rh (-) kadın Rh (+) eritrositler ile karşılaşarak sensitize olmuştur (De Almedida ve Rosado, 1972).

Rh uyuşmazlığı gebelik dışında hatalı kan transfüzyonu, küretaj ve düşük sonucunda da meydana gelir.

2.3. Yeni Doğanın Hemolitik Hastalığı

Yeni doğanın hemolitik hastalığı; RhD uyuşmazlığına bağlı olarak yeni doğanda gözlenen klinik bir tablodur. İlk olarak 1609 yılında Fransız bir ev hanımında tespit edilip literatürde belirtilmiştir (Izetbegovic 2013). İzoimmünizasyon sebebiyle anneden geçen antikorlar fetal hemolize sebep olur ve bunun sonucunda fetüste anemi, fetal hidrops görülmektedir. Tedavi edilmemesi durumunda fetal ölümlere sebebiyet verebilen bir durumdur (Çetinkaya ve ark., 2010). 1932 yılında Diamond ve arkadaşları tarafından fetal hidrops, anemi, sarılık ve eritroblastozis arasında sebepsel bir bağlantı olduğu bildirilmişlerdir (Izetbegovic 2013). Landsteiner ve Weiner 1940'larda Rh faktörünü keşfetmiş ve 1953'de Chown hastalığın patogenezinde fetüsün Rh pozitif eritrositlerinin anne dolaşımındaki antikorlarla parçalanması olduğunu doğrulamıştır. Rh uygunsuzluğundan etkilenen bebeklerin %15'i doğumdan önce ölmektedir. Yaşayanlarda ise şiddetli sarılık ve buna bağlı olarak sağır dilsizlik, konuşma bozuklukları, serebral felç ve mental retardasyon gelişebilmektedir. Kafkas ırkındaki bireylerin %15 Rh (-) olup, gebeliklerin %9'unda Rh uyuşmazlığı vardır (Moise ve Argoti, 2008). Hastalık yenidoğanlardaki sarılığın en sık nedenlerindendir. Ülkemizde prelingual şiddetli sağırlığın en önemli çevresel nedenlerindendir.

Rh uyuşmazlığı saptanan gebelerin takibinde izoimmünizasyonun gerçekteşiş gerçekteşişmediğini, gerçekteşişmesi durumunda konsantrasyonun belirlenmesi

amacıyla ICT ve doopler ultrasonografi, doğum sonrası bebeğin kanından izoimmünizasyonun belirlenmesi amacıyla DCT testi yapılmaktadır.

Rh immünizasyonunda annede ilk olarak oluşan antikorlar anti-D IgM'dir ve bu antikorlar plasentadan geçemediği için fetüs için tehlike oluşturmazlar. İlk immünizasyondan sonra annenin ikinci kez Rh (+) antijenlerle karşılaşması sonucunda oluşan cevap ise hızlıdır ve oluşan antikorlar IgG anti-D yapısındadır. anti-D IgG varlığında ICT pozitif sonuç verir. Plasenta yoluyla fetüse geçen IgG antikorların Rh (+) eritrositlere bağlanması sonucu DCT pozitif sonuç verir. Antikorların miktarına göre fetüste değişik derecelerde hemoliz oluşur.

RhD uyumsuzluğu olan gebeliklerde HDN oluşumunu önlemek amacıyla 28. haftada anti-D profilaksisi uygulanarak doğuma kadarki 12 haftalık süre boyunca oluşabilecek kanamaların karşılanması amaçlanmaktadır. Doğumdan sonra bebeğin kan grubunun Rh (+) olduğunun saptanması durumunda doğumdan sonraki 72 saat içerisinde anneye yeniden anti-D enjeksiyonu yapılmalıdır. Anti-D immünoglobulinin koruyucu etkisi birkaç ay sürdüğünden gebelik sırasında ve her gebelikten sonra tekrarlanmalıdır. Doğum sonrası bebeğin Rh (-) olduğu saptanması durumunda doğum sonrası profiltik uygulamaya gerek duyulmamaktadır.

Rh (-) kan grubunda olan ve Rh (+) bir bebeğe gebe olan, ABO uyumsuzluğu bulunmayan kadınların %16'sında anti-D antikorları gelişir. Eğer anne ve fetüs arasında Rh uyumsuzluğu ile birlikte ABO uyumsuzluğu da bulunuyor ise annenin kanına geçen Rh (+) eritrositler, annenin doğal anti-A ve anti-B antikorları tarafından hızla dolaşımdan uzaklaştırılır (Aykut 2010, Cunningham ve ark. 2001). Bu iki uyumsuzluğun birlikte bulunması daha hafif bir klinik tabloya sebebiyet verir.

2.4. Cell free Fetal DNA

Lo ve arkadaşları hamile kadınların plazma ve serumunda cell-free fetal DNA'nın varlığını göstermiştir. Bunun sonucunda invaziv girişimlerin getirdiği riskler olmaksızın, prenatal tanı olanağı ortaya çıkmıştır (Lo ve ark. 1997, 1998, Lo 2000).

Fetüse ait kan hücrelerinin anne dolaşımına geçişinin fetüsten anneye kanamalar sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir.

Fetal DNA'nın kaynağı net olarak bilinmemekle birlikte çeşitli teoriler söz konusudur. Bunlar plasenta, fetal hematopoetik hücreler ve doğrudan fetal DNA

geçışı şeklindedir. Plasantanın hücre kaynağı açısından zengin olması plasenta kaynaklı bir fetal DNA geçışı olduğu hipotezini desteklemektedir. Fakat plasental sirkülasyon oluşmadan, çok erken haftalarda bile fetal DNA'nın saptandığı çalışmalar bulunması sebebiyle (Lo ve ark 1998, Grootkerk ve ark. 2006) trofoblastik hücre kökenli oldukları da öne sürülmüştür. Amniyon sıvısında da fetal DNA'nın yoğun miktarda bulunması fetal DNA'nın direkt geçiş yapabileceğini düşündürmektedir (Illanes ve ark., 2005).

Cell free fetal DNA'nın plazma ve serumda tespiti, sirkülasyona katılmış fetal hücrelerden salınmış olabileceği hipotezini doğurmuştur. Yapılan çalışmalarda fetal eritrositlerin %42,7'sinin apoptosize gittiği gösterilmiştir. Bu sebeple cell free fetal DNA'nın apoptotik hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Aykut ve ark., 2010).

İlk olarak Schmorl (1893) eklampsi nedeni ile ölmüş 17 gebe kadının 14'ünde akciğerde trofoblastlar gözlendiğini bildirilmiştir (Holzgreve ve ark., 2007). Sonrasında yapılan çalışmalar ile eklampsili gebelerin venöz kan örneklerinde trofoblastların varlığı gösterilmiştir (Douglas ve ark., 1959). Yapılan çalışmalar ile maternal sirkülasyonda fetal hemoglobin (HbF) içeren hücrelerin saptanmasıyla sitogenetik analiz süreci başlamıştır. İlk olarak 1969 yılında gebe kadınların kanında 46, XY karyotipine sahip fetal lenfositlerin varlığının gösterilmesiyle fetüse ait hücrelerin varlığı desteklenmiştir (Calyton ve ark 1964, Walknowska ve ark. 1969, Grosset ve ark. 1974, Schroder ve ark. 1977). Fakat sitogenetik yöntemlerle yapılan analizler sonucu görüş birliği elde edilememesi sitogenetik yöntemlerin yeterli olmadığını düşündürmüştür. Bu da araştırmacıları farklı yöntemler arayışına yönlendirmiştir. 1980'li yılların sonlarında mevcut moleküler yöntemlerin devreye girmesi ile Lo ve arkadaşlarının PCR tabanlı yaptıkları çalışmalar devrim niteliği taşımaktadır.

Cell free fetal DNA en erken gebeliğin 32. gününde tespit edilmiş ve gebeliğin ilk trimesterinde gebelik haftası başına %21 oranında arttığı saptanmıştır (Wataganara ve ark. 2004, Kıvançlı ve ark. 2012).

Normal bir gebelikte fetal DNA miktarı maternal plazmadaki hücre dışı (cell free) DNA'nın %3-6'sı kadardır (Chinnapapagari 2005, Norbury ve Norbury 2008). Gebelik ilerledikçe anne kanındaki fetal DNA miktarının arttığı saptanmıştır (Lo ve

ark. 1998, Bischoff ve ark. 2005, Norbury ve Norbury 2008). Çeşitli çalışmalarda doğum sonrası anne kanındaki fetal DNA'nın hızlı bir şekilde yok olduğu, abortus ve küretajdan 24 saat; doğumdan 2 saat kadar kısa sürede saptanamadığı bildirilmiştir (Lo ve ark. 1999, Bischoff ve ark. 2005, Norbury ve Norbury 2008).

Anne kanındaki cell free fetal DNA'nın fragmente olduğu; 300 bp ve daha küçük boyutlarda olduğu saptanmıştır. Chank ve ark. (2004) fetal DNA'nın %80'nin boyutunun 193 bp'den az ve %50'sinin 300bp'den daha küçük olduğunu yaptıkları çalışmalar sonucunda saptamışlardır (Bischoff ve ark. 2005, Hromadnikova ve ark. 2006, Norbury ve Norbury 2008).

Cell free DNA'nın prenatal tanı amacı ile kullanılabilmesinin saptanması sonrası birçok alanda prenatal tanı amaçlı kullanımı denenmiştir. Cff DNA'nın fetal kromozomal anöplodilerinin, cinsiyetle ilişkili hastalıkların ve RhD genotipinin prenatal tanısı için kullanılabilir olduğu gösterilmiştir (Lo ve ark. 1993, Zhang ve ark. 2000, Bartha ve ark 2003, Daniels ve ark. 2006, Norbury ve Norbury 2008, Hahn ve Zimmermann, 2010). Down Sendromu (Lin Y. ve ark. 2004, Norbury ve Norbury 2008, Dan ve ark. 2014), Antifosfolipid sendromu (Korabecna ve ark 2014). 13, 18, 21, X ve Y' e bağlı fetal trizomilerin ve ayrıca X monozomisinin non invaziv fetal trizomi testi (NIFT) ile belirlenmes mümkündür (Łaczmanńska ve Stembalska, 2014). Akondroplazi (Li ve ark. 2004), konjenital adrenal hiperplazi (Hyett ve ark. 2005, Norbury ve Norbury 2008) ve miyotonik distrofi de (Amucucci ve ark. 2000, Norbury ve Norbury 2008) maternal kandaki cffDNA'dan moleküler genetik analiz ile prenatal genetik tanı yapılabilmektedir. Preeklampside de cffDNA miktarının anlamlı olarak arttığı ve hatta bu artış preeklampsi gelişmeden önce başladığı için tanı amaçlı biyolojik belirteç olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (Li ve ark 2004). Sağırılıkta sıklıkla görülen mutant allellerin cffDNA aracılığıyla maternal plazmadan tespiti yapılabilmektedir (Meng ve ark 2014).

Cell free DNA prenatal tanının yanı sıra kanser (Check ve ark. 2013, Norbury ve Norbury 2008), travma, Huntington hastalığı (Gonza'lez-Gonza'lez ve ark. 2003a, 2003b, Norbury ve Norbury 2008) ve immünolojik hastalıklarda da anlamlı olarak arttığından plazmadan cell free DNA miktarının belirlenmesinin gelecekte önemli bir belirteç olabileceği bildirilmektedir.

2.5. Fetal RhD Genotiplenmesi

Rh uyuşmazlığı olan gebelerde fetal RhD profilinin belirlenmesi HDN'e karşı antenatal ve postnatal takipte önem taşımaktadır. Özellikle serolojik testler sonucunda saptanan bir immünizasyon durumunda fetal RhD profilinin belirlenmesi önem taşımaktadır (Grootkerk ve ark., 2006).

Fetal RhD genotiplenmesi için kullanılan yöntemler; girişimsel yöntemler ve girişimsel olmayan yöntemler olarak ikiye ayrılır. Günümüzde RhD genotiplenmesi amacıyla kullanılan girişimsel yöntemlerin (amniyosentez, kordosentez, CVS) daha kesin sonuçlar vermekle birlikte fetüs ve anne açısından riskler taşıması sebebiyle, girişimsel olmayan yöntemlerin RhD genotiplenmesinde kullanılması önem taşımaktadır.

Anne kanında cell free fetal DNA'nın saptanması ve TaqMan kimyası kullanılarak maternal kandan fetal allellerin tespitinin eş zamanlı olarak RT-PCR yöntemi ile analizi girişimsel olmayan prenatal tanı imkânı sağlamıştır. Bir çok laboratuarda rutin olarak maternal plazmadan cell free fetal DNA saptanmasında RT-PCR kullanılmaktadır (Müller ve ark., 2011).

2.5.1. Girişimsel Prenatal Tanı Yöntemleri

Fetal RhD genotiplenmesi amniyosentez, kordosentez veya CVS gibi invaziv yöntemler aracılığıyla yapılmaktadır. Fakat bu yöntemler %0,5-2 oranında fetal kayıp riski (Grootkerk ve ark., 2006) fetal enfeksiyon ve çok düşük de olsa maternal riskler taşımaktadır. Ayrıca işlem sürecinde ve sonrasında alloimmünizasyon riski söz konusudur (Zhou ve ark. 2005).

2.5.2. Girişimsel Olmayan Tanı Yöntemleri:

Rh uyuşmazlığı saptanan gebelerin takibinde kullanılan ICT, DCT, Doppler USG yöntemleri non invazif yöntemler olup, yaygın olarak kullanılmaktadır.

ICT gebelik sürecinde anne kanı, DCT gebelik sonrası bebeğin kanı kullanılarak yapılan serolojik testlerdir.

ICT eritrosit sensitizasyonun vücut dışında gerçekleştirilmesi ile serum/plazmada eritrosit antijenlerine karşı gelişen serbest antikorların saptanması amacıyla yapılan testtir. ICT ile ilgili bilgilere http://www.kmtd.org.tr/pdf/antiglobulin_testler.pdf adresinden ulaşılabilir. (Erişim tarihi: 13.06.2014).

ICT' de öncelikle olarak annenin serumu Rh (+) eritrositlerle inkübe edilir. Bu aşama immünizasyon sonucun oluşan IgG antikorları oluşmuş ise inkomplet şekilde eritrositlere bağlanacaktır. Sonraki aşamada ortama eklenen anti-D IgG antikorları, antijen antikor kompleksine bağlanarak eritrositlerin aglütine olmasına sebep olur. Test sonucunda aglütinasyon gerçekleşmemesi annenin plazmasında IgG antikorlarının oluşmadığını ve şuna kadar izoimmünizasyon gerçekleşmediğini gösterir. Test sonucunda aglütinasyon meydana gelmesi sonucu da izoimmünizasyonun gerçekleştiğini gösterir. Sık aralıklarla antikorların titrasyon takibi yapılmalıdır. İlgili bilgilere <http://www.guventip.com.tr/panel/rdosya/indirekt-coombs.pdf> adresinden ulaşılabilir. (Erişim tarihi: 13.06.2014).

ICT pozitif saptandığı durumlarda doppler USG ile takibi yapılması önem taşır.

Doppler ultrasonografi, fetal ve maternal fizyoloji ve patofizyolojiyi değerlendirmek için kullanılabilen, hızlı, güvenilir ve girişimsel olmayan bir inceleme yöntemidir (Kıvanç, 2012).

Doppler USG: Fetal orta serebral arterdeki tepe sistolik akım hızı ölçümü, fetal aneminin takibinde önem kazanmıştır. Yanlış pozitifliğin oranının %12 olduğu bildirilmiştir. Renkli doppler ultrason, doğru lokalizasyonda ölçüm imkanı sağladığı için tercih sebebidir (Kenneth ve ark 2002, Sağol ve ark.2005).

DCT testi eritrosit yüzeyinde yer alan antijenlerin kendine özgü antikorlarla sensitizasyonunu göstermek için yapılan testtir. DCT ile ilgili bilgilere http://www.kmtd.org.tr/pdf/antiglobulin_testler.pdf adresinden ulaşılabilir. (Erişim tarihi: 13.06.2014).

Bu testlere alternatif olarak Lo ve ark. (1997) cell free fetal DNA'nın maternal plazma ya da serumdan elde edilebilceğini kanıtlaması sonucundan invazif bir girişim olmaksızın spesifik prenatal tanı olanağı oluşmuştur.

Rh uyuşmazlığı saptanan gebelerde maternal kandan RhD genotipleme RT-PCR yöntemiyle gerçekleştirilip, fetal RhD genotipi saptanmaktadır. Zou ve ark. (2005) yılında yaptıkları çalışma sonucunda fetal RhD genotipleme başarıları %94 sensitivite ve spesifite olarak saptanmıştır. Müller ve ark (2008) yapmış oldukları çalışma sonucunda fetal RhD genotipini saptamada spin kolon yöntemiyle izole edilen DNA örneklerinden çalışıldığında %97,7, magnetik bilyeler ile yapılan izolasyon sonucu %99,8 oranında sensitivitesinin olduğunu bildirmişlerdir. Aynı

çalışmada spin kolon ile yapılan izolasyon sonucunun %99,2, magnetik bilyelerle izolasyon sonucu elde edilen DNA ürününün %98,1 spesifitesi olduğu saptanmıştır. Minon ve ark (2008) yılında yaptıkları çalışma sonucunda %100 spesifite ve sensivite bildirmişlerdir. Akolekar ve ark. (2011) da yaptıkları çalışma sonucunda %100 sensivite ve spesifite saptamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olguların Seçimi

Projemiz Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 05.09.2013 tarihinde alınan EK-2013-163 nolu izin ile başlatılmıştır ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TYL-2014-203 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Çalışmaya Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Gebe Polikliniğine başvuran ve Rh uyuşmazlığı olduğu saptanan veya bireysel başvuruda bulunarak Rh uyuşmazlığı olduğunu bildiren, çalışmaya katılmaya gönüllü olan 12-40 gebelik haftaları aralığında 12 gebe dahil edildi. Bu çalışmaya katılan tüm gebeler kan örnekleri alınmadan önce çalışma hakkında bilgilendirildiler ve çalışmaya gönüllü olarak katıldıklarına ve istediklerinde ayrılacaklarına dair onam formu imzalamalarının ardından çalışmaya dahil edildiler.

3.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Plazmanın Ayrıştırılması

Her bir olgudan ön koldan 10 ml venöz kan örneği Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA) içeren tüplere alındıktan sonra laboratuvarımıza getirilmiştir. Kan örnekleri bekletilme olmaksızın 2500 rpmde 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant yeni bir tüpe aktararak 3000 rpm de 10 dk santrifüjlendi. Sonrasında plazma örnekleri 1'er ml olmak üzere kryo tüplere dağıtılarak daha sonra kullanılmak üzere -20⁰Cde saklandı.

3.3. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.3.1. Kullanılan Cihazlar

- Real Time PCR (Light Cyclers 2.0-Roche)
- Otomatik İzolasyon Cihazı (MagNA Pure Compact-Roche)
- Santrifüj (Rotofix 32A- Hettich)
- Mikrosantrifüj (Mikro 120-Hettich)
- Isıtıcı blok (Eppendorf)
- Vorteks (IKA Vortex Genius 3)
- 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
- MagNA Pure Compact otomatik Nükleik Asit İzolasyon Kiti, Roche
- DyNAmo Flash Probe qPCR Kit (Thermo)
- Etanol (%96-100)
- TaqMan Primer (Thermo)
- TaqMan Probe (Thermo)
- Kapiller (Light Cyler Kapiller 20µl)
- EDTA'lı tüp
- 2 ml steril ependorf tüpleri
- Steril, filtreli 10 µl,100 µl,ve 1000 µl pipet uçları
- Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven

3.4. Plazmadan DNA İzolasyonu

3.4.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Malzemeler

- MagNA Pure Compact Roche Otomatik İzolasyon Cihazı
- Mikrosantrifüj
- Vorteks
- Isıtıcı blok
- Otomatik pipet seti (1-10 µl,10-100µl ve 100-1000µl)
- MagNA Pure Compact Nükleik Asit İzolasyon Kiti
- Manuel İzolasyon kiti: 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. Manuel DNA İzolasyonu

Qiagen QiAMP DNA Blood Mini Kiti, üreticinin kan ve vücut sıvılarından DNA eldesi protokolüne göre gerçekleştirilip, spin kolon yöntemi kullanılmıştır. Maternal plazmadan cell free fetal DNA eldesi amacıyla;

- 40 µl Qiagen Proteinaz K 2 ml'lik ependorf tüpe konuldu.
- Üzerine 400 µl maternal plazma örneği eklendi.

- Plazma örneğinin üzerine 400 µl AL buffer eklenilerek 15 sn vortekslendi.
- Örnek 56⁰Cde 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örneğe 400 µl etanol (%96-100) eklendi. 15 sn vortekslendi.
- Karışım spin kolona tüpün kenarlarını ıslatmadan aktarıldı. 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne alındı.
- Spin kolonun kapağı sarsmadan dikkatlice açıldı, üzerine 500 µl AW1 buffer eklendi. 8000 rpmde 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon 2 ml'lik temiz bir toplama tüpüne alındı.
- Spin kolonun kapağı dikkatlice açıldı, üzerine 500 µl AW2 buffer eklendi. 14000 rpmde 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon 2 ml'lik ependorf tüpe alındı.
- Spin kolonun kapağı dikkatlice açıldı. Üzerine 50 µl AE buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- Sonrasında 8000 rpmde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon atıldı.

3.4.3. Otomatik DNA İzolasyonu

Otomatik izolasyon MagNA pure nükleik asit izolasyon kiti ile total nükleik asit plazma protokolü doğrultusunda yapıldı. 400 µl plazma örneği kullanılarak, elution buffer miktarı 50 µl olarak belirlendi.

3.5. Örneklerin TaqMan Real-Time PCR Analizi

Bu çalışmada Real-Time PCR analizi için Roche LightCycler 2.0 cihazında TaqMan sistemini kullanarak RhD geni, SRY geni ve GLO genine ait primer ve prob kullanılarak gerçekleştirildi. SRY geni, GLO geni ve RhD genine özgül ekzon 7 ve ekzon 10 primer ve prob dizileri Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 2. RhD, SRY ve GLO genine ait primer prob dizileri

| Gen | Primer | Prob |
|-----------------|---|--|
| RhD Ekzon 7 | 5-CTC CAT CAT GGG CTA CAA-3 5-CCG GCT CCG ACG GTA TC-3 | 5-(FAM) AGC AGC ACA ATG TAG ATG ATCTCT CCA (TAMRA)-3 |
| RhD Ekzon 10 | 5-CCT CTC ACT GTT GCC TGC ATT-3 5-AGT GCC TGC GCG AAC ATT-3 | 5-(FAM) TAC GTG AGA AAC GCT CAT GACAGC AAA GTC T (TAMRA)-3 |
| SRY | 5-TGG CGA TTA AGT CAA ATT CGC- 3 5-CCC CCT AGT ACC CTG ACA ATG TAT T-3 | 5-(FAM) AGC AGT AGA GCA GTC AGG GAG GCA GA (TAMRA)-3 |
| GLO | 5-GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG-3 5-CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG- 3 | 5-(FAM) AAG GTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GG (TAMRA)-3 |

3.5.1. TaqMan Real-Time PCR Analizi İçin Gerekli Malzemeler

- Real-Time PCR (LightCycler 2.0 Roche)
- Vorteks
- Mikrosantrifüj
- Otomatik Pipet Seti(0,2-1 µl,1-10 µl ve10-100µl)(Eppendorf)
- Kapiller tüp, 20 µl (Roche)
- TaqMan Primer
- TaqMan Prob
- DyNAmo Flash Probe qPCR Kit (Thermo)
- 0,2'lik steril ependorf tüp
- Steril, filtreli 10 µl,100 µl,ve 1000 µl pipet uçları
- Tek kullanımlık pudrasız nitril eldiven
- PCR grade H₂O

3.5.2. RhD Geni Ekzon 7 Primer ve TaqMan Probu

Liyofilize halde ve 0,02 µmol sentez skalasında ticari olarak sentezlettirilen RhD geni ekzon 7 forward ve reverse primerleri (Tablo 2), 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde: RhD geni ekzon 7 forward primeri için 272,6 µl; RhD geni ekzon 7 reverse

primer için 289,4 µl steril saf su eklenerek çözüldü. 1:10 oranında çalışma solüsyonu hazırlanarak -20°C’de saklandı.

Liyofilize halde ve 0,02 µmol sentez skalasında ticari olarak sentezletirilen RhD geni ekzon 7 TaqMan probu (Tablo 2) ise 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde 49,7 µl steril saf su eklenerek çözüldü ve 1:10 oranında çalışma solüsyonu hazırlanarak -20°C’de saklandı.

RhD geni ekzon 7 için PCR reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde planlandı. RhD geni ekzon 7 için prob konsantrasyonu 200 nM, forward ve reverse primer konsantrasyonu 200 nM olarak belirlendi. 5 µl DNA kullanıldı. Tablo 3’de miktar ve konsantrasyonları ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

Tablo 3. RhD Geni Ekzon 7 PCR reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları

| PCR Bileşenleri | Miktar | Final Konsantrasyonu |
|-----------------|---------|----------------------|
| Forward Primer | 0,4 µl | 200 nm |
| Reverse Primer | 0,4 µl | 200 nm |
| Prob | 0,4 µl | 200 nm |
| Master Miks | 12,5 µl | 1X |
| ROX | 0,2 µl | 1X |
| Su | 1,1 µl | |
| DNA | 5 µl | |

3.5.3. RhD Geni Ekzon 10 Primer ve TaqMan Probu

Liyofilize halde ve 0,02 µmol sentez skalasında ticari olarak sentezletirilen RhD geni ekzon 10 forward ve reverse primerleri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde RhD geni ekzon 10 forward primeri için 205,3 µl; RhD geni ekzon 10 reverse primer için 264 µl PCR grade sterilsaf su eklenerek çözüldü. 1:10 oranında çalışma solüsyonu hazırlanarak -20°C’de saklandı.

Liyofilize halde ve 0,02 µmol sentez skalasında ticari olarak sentezletirilen RhD geni ekzon 10 TaqMan probu ise 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde 34,5 µl steril saf su eklenerek çözüldü ve 1:10 oranında çalışma solüsyonu hazırlanarak -20°C’de saklandı.

RhD geni ekzon 10 için PCR reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde planlandı. RhD geni Ekzon 10 için prob konsantrasyonu 100 nM, forward ve reverse primer

konsantrasyonu 200 nM kullanıldı. 5 µl DNA kullanıldı. Tablo 4 de miktar ve konsantrasyonlar ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

Tablo 4. RhD Geni Ekzon 10 PCR reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları

| PCR Bileşenleri | Miktar | Final Konsantrasyonu |
|-----------------|---------|----------------------|
| Forward Primer | 0,5 µl | 250 nm |
| Reverse Primer | 0,5 µl | 250 nm |
| Prob | 0,2 µl | 100 nm |
| Master Miks | 12,5 µl | 1X |
| ROX | 0,2 µl | 1X |
| Su | 1,1 µl | |
| DNA | 5 µl | |

3.5.4. SRY ve GLO Geni Primer ve TaqMan Probu

Liyofilize halde ve 0,02 µmol sentez skalasında ticari olarak sentezlettirilen SRY ve GLO genine ait forward ve reverse primerleri, 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde steril saf su eklenerek hazırlandı. Hazırlanan karışım 1:10 oranında dilüe edilerek çalışma solüsyonu hazırlanarak -20°C’de saklandı.

Liyofilize halde ve 0,02 µmol sentez skalasında ticari olarak sentezlettirilen SRY ve GLO genine ait TaqMan probu ise 100 pmol/µl hacimde olacak şekilde steril saf su eklenerek hazırlandı ve 1:10 oranında çalışma solüsyonu hazırlanarak -20°C’de saklandı.

SRY ve GLO geni için PCR reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde planlandı. SRY geni prob konsantrasyonu 100 nM, forward ve reverse primer konsantrasyonu 200 nM kullanıldı. 5 µl DNA kullanıldı. Tablo 5’de miktar ve konsantrasyonlar ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

Tablo 5. SRY ve GLO Geni reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları

| PCR Bileşenleri | Miktar | Final Konsantrasyonu |
|-----------------|---------|----------------------|
| Forward Primer | 0,4 µl | 200 nm |
| Reverse Primer | 0,4 µl | 200 nm |
| Prob | 0,2 µl | 100 nm |
| Master Miks | 12,5 µl | 1X |
| ROX | 0,2 µl | 1X |
| Su | 1,3 µl | |
| DNA | 5 µl | |

3.6. PCR Protokolü

TaqMan PCR protokolü; Rox içeren bir PCR reaksiyonu gerçekleştirilmesi sebebiyle bir preinkübasyon (UNG) basamağına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple ilk olarak 50°C’de 2 dakika ve tek döngüden oluşan UNG basamağı, sonrasında 95°C’de 10 dakikalık tek bir döngüden oluşan denatürasyon basamağı, ardından 95°’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakika olmak üzere 50 döngüden oluşan cycling basamağından oluşmaktadır. Döngü sonunda sonuçlar siklus sayısı ile birlikte artan floresan ışığa göre çizilen logaritmik eğriye göre değerlendirildi.

3.7. TaqMan Real-Time PCR Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Fetüsün fetal RhD genotipi şu şekilde değerlendirildi: Her bir örnek Real Time PCR yöntemi ile 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Çalışma sonrasında elde edilen logaritmik eğri Roche LightCycler 2.0 software versiyon 4.1 kullanılarak “absolute quantification” yöntemiyle analiz edildi. Ekzon 7 ve ekzon 10 için üç tekrarın ikisinde, iki ekzondan birinin amplifikasyon verdiği sonuç Rh (+) olarak değerlendirildi. 3 tekrar sonrasında amplifikasyon görülmeyen örnekler Rh (-) olarak değerlendirildi. Çalışılan örneklerde amplifikasyon 26-36. siklus aralığına başlayıp, 40’dan sonra başlayan pikler yanlış pozitiflik olarak değerlendirildi.

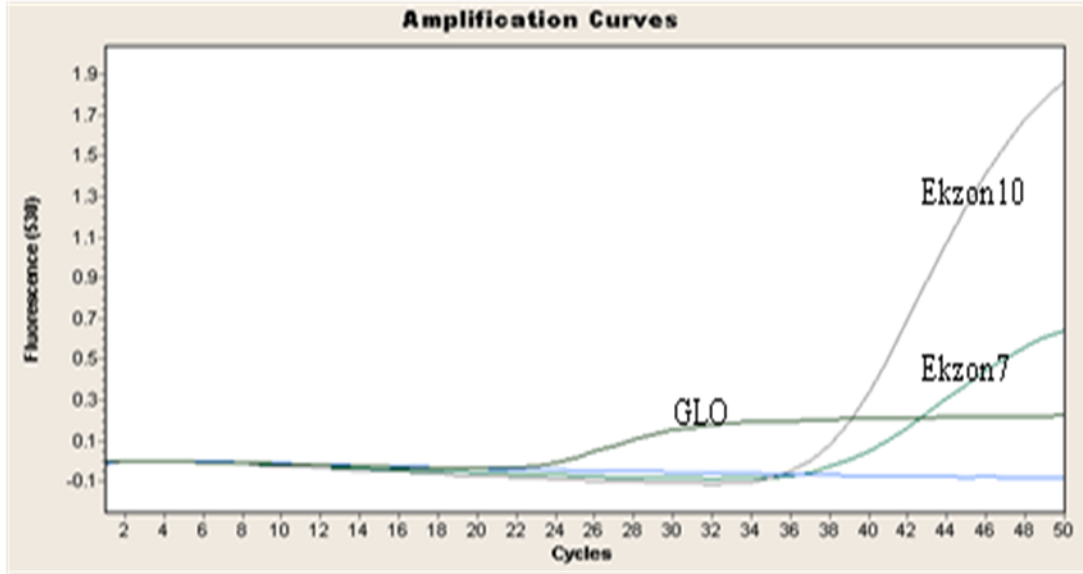
Alternatif bir analiz yöntemi olarak aynı primer-prob ve PCR bileşenleri ve programı kullanılarak ABI 9700 cihazı ile elde edilen PCR ürünleri kapiller elektroforezde (ABI 3100) 1 saat yürütülerek MLPA programında analiz edildi. Ekzon 7, 75’de ve ekzon 10 da 81’de pik verdi. Kapiller elektroforez ile

değerlendirme RT-PCR ile değerlendirmeye göre ek olarak polimer, formamide ve size standart maliyeti getirmekle birlikte sonuçlar net olduğu için RT-PCR cihazının olmadığı laboratuvarlar için kullanışlı bir alternatif yöntem olarak değerlendirildi. Bu yöntem ayrıca RT-PCR çalışmasında 40. Siklusa başlayan ve tam olmayan piklerin doğrulanması, yanlış pozitifliğin dışlanması için de kullanışlı bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

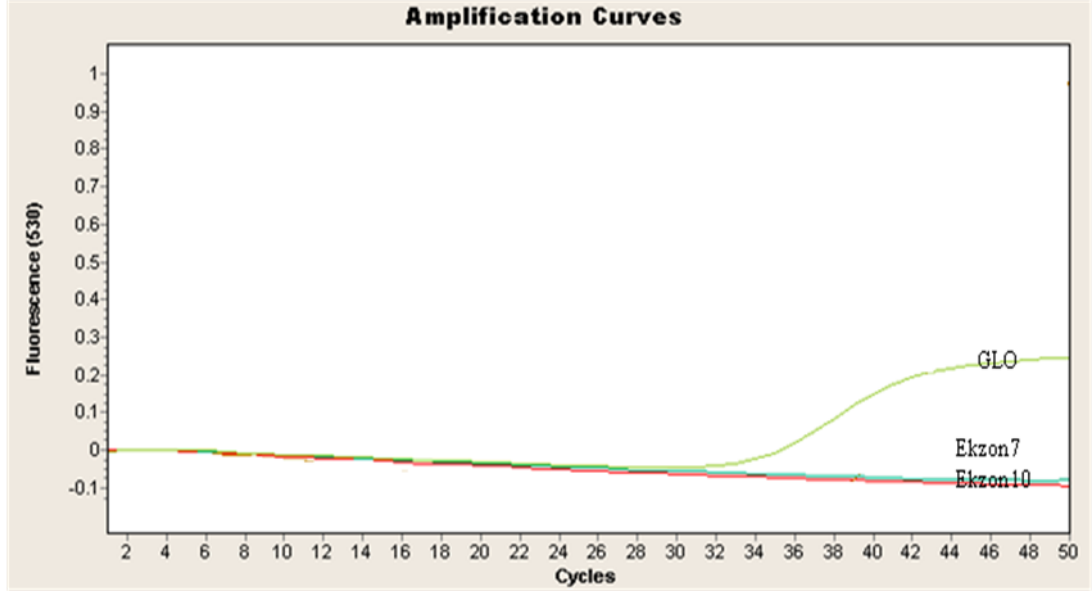
SRY geni için PCR reaksiyonları 3 tekrarlı kuruldu. Üç tekrardan ikisinde amplifikasyon görülen bireyler SRY (+) erkek fetüs olarak değerlendirildi. Üç tekrar neticesinde amplifikasyon saptanamayan örnekler SRY (-) dişi fetüs olarak değerlendirildi.

GLO geni total DNA varlığının kanıtlanması ve PCR reaksiyonun gerçekleştiğinin gösterilmesi amacıyla kullanılmıştır. Amplifikasyon saptanan reaksiyonlarda total DNA varlığı ve PCR reaksiyonun çalıştığı kanıtlanmıştır.

Şekil 2’de Rh (+) ve Şekil 3’de Rh (-) bir RT-PCR sonuçları gösterilmektedir.



Şekil 2. RhD (+)



Şekil 3. RhD (-)

3.8. Antikontaminasyon Ölçütleri

DNA izolasyonu, PCR reaksiyonu ve amplifikasyon işlemi sırasındaki olası kontaminasyonu önlemek için: tüm sıvılar için aerosol resistant, steril pipetler ve tek kullanımlık steril, düşük su tutuşlu filtreli pipet uçları kullanıldı. DNA izolasyonu, PCR reaksiyonunun hazırlanması ve amplifikasyon işlemi ayrı alanlarda yapıldı. PCR reaksiyonu için hazırlık steril, UV lambalı PCR kabini içinde yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamız kapsamında cell free fetal DNA'nın maternal kandan izole edilebileceği ve RT-PCR aracılığıyla fetüse ait RhD genotipinin başarıyla analiz edilebileceği gösterildi.

Çalışmamıza Rh uyuşmazlığı sebebiyle kadın hastalıkları ve doğum polikliniğinden yönlendirilen 12-40 gebelik haftaları arasında 11 gebe ve doğrudan başvuran 1 gebe gönüllü olarak dahil edildi. Gebelerin anamnezleri alınıp, çalışma hakkında bilgilendirildiler ve onam formunu imzaladılar. Çalışmaya dahil edilen gebelerin gebelik haftası, yaş ve kilo parametreleri Tablo 6'da belirtilmiştir.

Tablo 6. Çalışmaya dahil edilen gebelerin gebelik haftası, yaş ve kilo parametreleri

| Olgu No | Gebelik Haftası | Yaş (Yıl) | Ağırlık (kg) |
|---------|-----------------|-----------|--------------|
| 1 | 12 | 29 | 50 |
| 2 | 16 | 37 | - |
| 3 | 12 | 36 | 64 |
| 4 | 12 | 25 | 51 |
| 5 | 13 | 27 | 60 |
| 6 | 23 | 40 | - |
| 7 | 20 | 20 | - |
| 8 | 12 | 41 | 81 |
| 9 | 35 | 26 | 87 |
| 10 | 12 | - | - |
| 11 | 20 | - | - |
| 12 | 40 | 40 | 91,4 |

Bazı olgulara ait kilo değerleri bulunmamaktadır. Bunun sebebi gebenin kilosunu bilmemesidir. Çalışmaya katılan gebelerin yaşları 20-41 (ortalaması 32,1), kiloları 50-92 (ortalaması 69,2)'dir. On iki gebe arasında, birinci trimesterde 6, ikinci trimesterde 4 ve üçüncü trimesterde 2 gebe bulunmaktadır.

Çalışmaya katılan gebelerin önceki gebelik öyküleri, kan transfüzyonu ya da ilik nakli ve anti-D profilaksisi ile ilgili bilgileri alındı. Bu bilgiler Tablo 7'de belirtilmiştir.

Tablo 7. Çalışmaya dahil edilen gebelerin gebelik öyküsü, kan transfüzyonu, ilik nakli ve anti-D profilaksisi bilgileri

| Olgu No | Gebelik Sayısı | Kan Transfüzyonu yada İlik nakli | Anti-D profilaksisi |
|----------------|-----------------------|---|--------------------------------|
| 1 | G1P0A0 | - | - |
| 2 | G6P2A3 | - | - |
| 3 | G4P1A2 | - | . |
| 4 | G1P0A0 | - | - |
| 5 | G1P0A0 | - | + |
| 6 | G6P2A3 | - | + |
| 7 | G1P0A0 | - | - |
| 8 | G2P1A0 | - | - |
| 9 | G2P1A0 | - | - |
| 10 | G2P1A0 | - | - |
| 11 | - | - | - |
| 12 | G2P0A1 | - | + |

*G: Toplam Gebelik Sayısı P:Yapılan Doğum Sayısı A: Abortus Sayısı

Beş numaralı olguda normal gebelik ile birlikte eşzamanlı ektopik gebelikgerçekleşmiştir. Ektopik gebeliğin tahliye ile sonlandırılması sonrası gebeye anti-D profilaksisi uygulanmıştır.

Altı ve 12 numaralı olgularda yapılan ICT sonucunun pozitif olması sebebiyle hastaya anti-D profilaksisi uygulanmıştır.

İki ve 3 numaralı olgularda abortus, gebelik süreci ve gebelik sonrasında anti-D profilaksisi uygulanmıştır.

Sekiz ve 9 numaralı olgularda gebelik ve gebelik sonrasında anti-D profilaksisi uygulanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen gebeler ve eşleri arasında hiçbir olguda akrabalık yoktur.

Alınan kan örneklerinden plazmanın ayrılması sonrasında buffy coatdan yapılan DNA izolasyonu ile elde edilen maternal DNA örnekleride testin optimizasyonu ve

gebelerin RhD profillerinin doğrulanması amacıyla RT-PCR yöntemi ile çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 8’de belirtilmiştir.

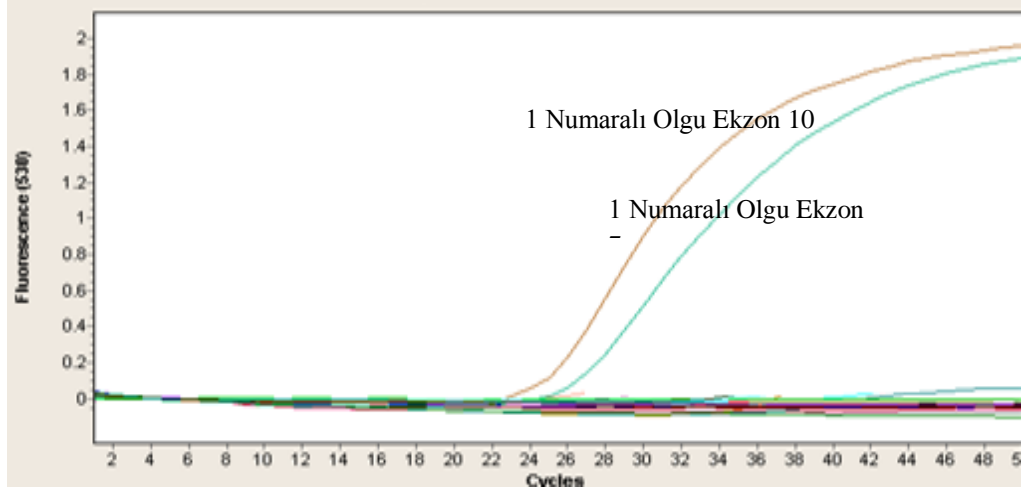
Tablo 8. Çalışmaya dahil edilen gebelerin maternal RhD RT-PCR analizi sonuçları

| Olgu No | RhD Geni Ekzon 7 | RhD Geni Ekzon 10 | GLO |
|----------------|-----------------------------|------------------------------|------------|
| 1 | + | + | + |
| 2 | - | - | + |
| 3 | - | - | + |
| 4 | - | - | + |
| 5 | - | - | + |
| 6 | - | - | + |
| 7 | - | - | + |
| 8 | - | - | + |
| 9 | - | - | + |
| 10 | - | - | + |
| 11 | - | - | + |
| 12 | - | - | + |

GLO geni tüm olgularda plazmadan elde edilen cell free DNA’dan yapılan çalışmalarda ilk PCR reaksiyonundan itibaren net amplifikasyon göstermiştir. Bu da cfDNA varlığını ve PCR reaksiyonlarının çalışır olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Bir numaralı olgunun Rh pozitif olarak saptanması hastanın RhD geninde düşük ekspresiviteye sahip olduğunu düşündürmüştür. Fakat sonrasında yapılan görüşmeler sonucunda olgunun kan grubunu yanlış bildiği saptanmıştır. Bir numaralı olgu Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğinin değerlendirmesi sonucunda değil, direkt olarak kendisinin başvurması sonucunda çalışmaya dahil edilmiştir.

Gebelere ait buffy coat DNA örneklerinin RT-PCR yöntemiyle amplifikasyonu sonrası “absolute quantification” ile analiz görüntüleri Şekil 6’da gösterilmiştir.



Şekil 4. Annelerin RhD analizi görüntüsü

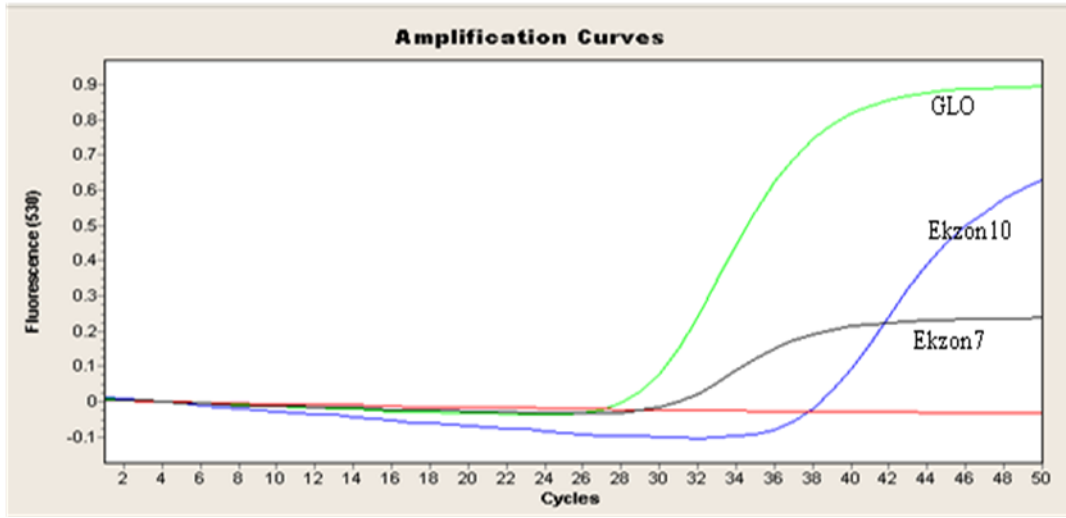
Maternal plazmadan cell free DNA izolasyonu ile elde edilen fetal DNA örneklerinin RT-PCR yöntemiyle RhD genine ait ekzon 7, ekzon 10, SRY ve GLO geninin amplifikasyonu sonrası “absolute quantification” yöntemiyle analiz edildi. Analiz sonuçları Tablo 9’da belirtilmiştir.

Tablo 9. CffDNA’den fetal RhD analizi sonuçları

| Olgu No | RhD Geni | | GLO |
|---------|----------|----------|-----|
| | Ekzon 7 | Ekzon 10 | |
| 1 | + | + | + |
| 2 | + | + | + |
| 3 | - | - | + |
| 4 | - | - | + |
| 5 | + | + | + |
| 6 | - | - | + |
| 7 | + | + | + |
| 8 | - | - | + |
| 9 | - | + | + |
| 10 | - | - | + |
| 11 | - | - | + |
| 12 | + | + | + |

Yapılan fetal RhD analizi sonucunda 6 olgunun Rh (+), 6 olgununda Rh (-) olduğu saptanmıştır.

İki ve 6 numaralı olgular Rh uyuşmazlığından bağımsız olarak; 2 numaralı olgu ileri anne yaşı, 6 numaralı olgu üçlü tarama testi sonucunda down sendromu riskinin 1/250 saptanması ve ileri anne yaşı sebebiyle amniyosentez yaptırmışlardır. Bu olguların amniyosentez sonrası yapılan QF-PCR analizinden arta kalan DNA örnekleri kullanılarak RT-PCR aracılığı ile fetal RhD genotiplemesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar cell free fetal DNA eldesi sonrası yaptığımız fetal RhD genotiplemesi ile %100 oranında uyum sağlamaktadır. 2 numaralı olgunun amniyon sıvısından yapılan fetal RhD genotiplemesinin RT-PCR sonucu Şekil 5’de gösterilmiştir.



Şekil 5. İki numaralı olgunun amniyon sıvısından RT-PCR aracılığı ile fetal RhD genotipleme sonucu Rh (+) görüntüsü

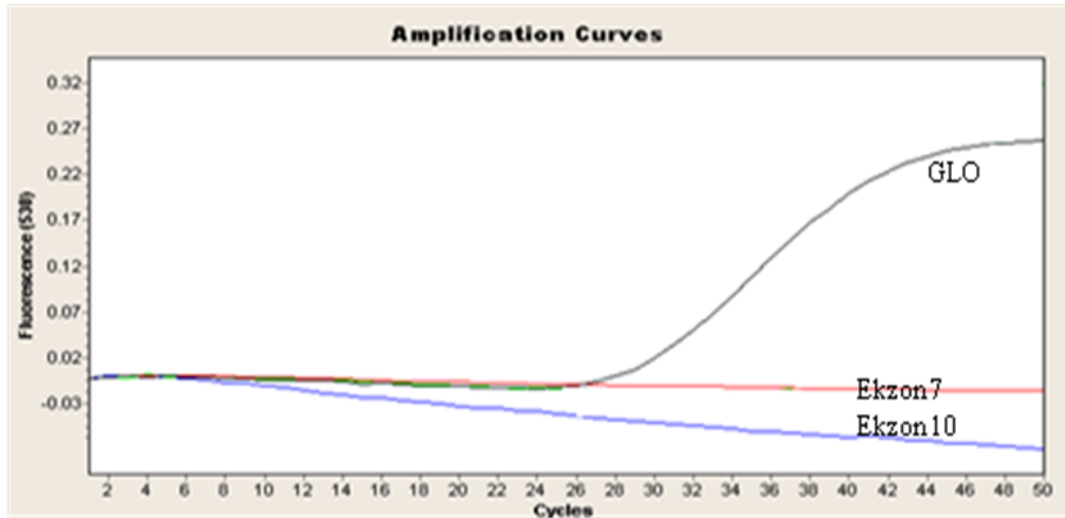
Doğum sonrasında elde edilen RhD geni genotipleri Tablo 10’da belirtilmiştir.

Tablo 10. Doğum sonrası RhD sonuçları

| Olgu No | Rh Profili | Cinsiyeti |
|---------|------------|-----------|
| 1 | + | ♂ |
| 2 | * | * |
| 3 | * | * |
| 4 | * | * |
| 5 | * | * |
| 6 | - | ♂ |
| 7 | * | * |
| 8 | * | * |
| 9 | + | ♂ |
| 10 | * | * |
| 11 | * | * |
| 12 | + | ♀ |

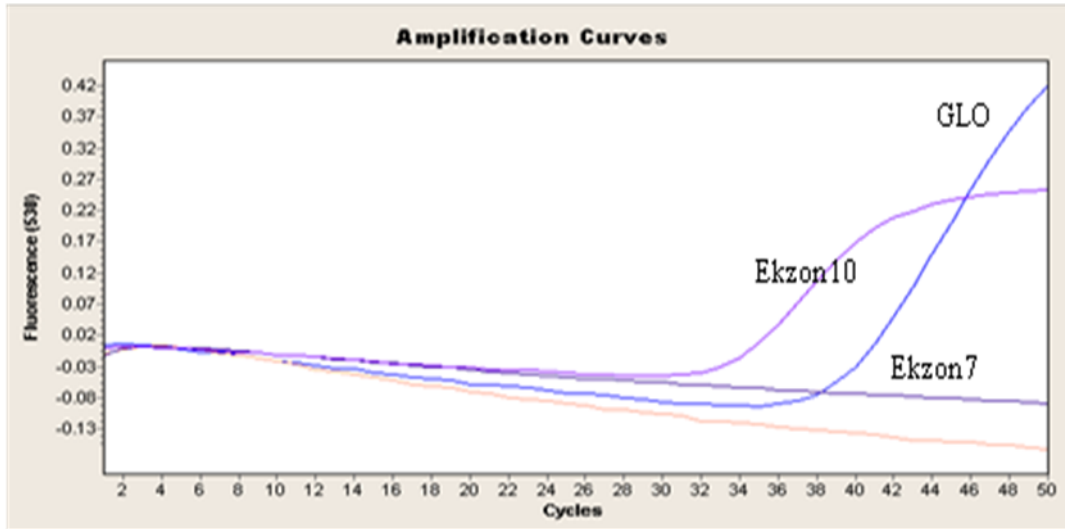
*Gebelik devam ediyor.

Dokuz numaralı olguda bufy coat'dan maternal DNA eldesi sonrası RT-PCR yöntemiyle RhD genine ait ekzon 7, ekzon 10 bölgelerinin amplifikasyonu sonucu, annenin RhD profili Rh (-) olarak saptanmıştır. Şekil 7'de gösterilmiştir.



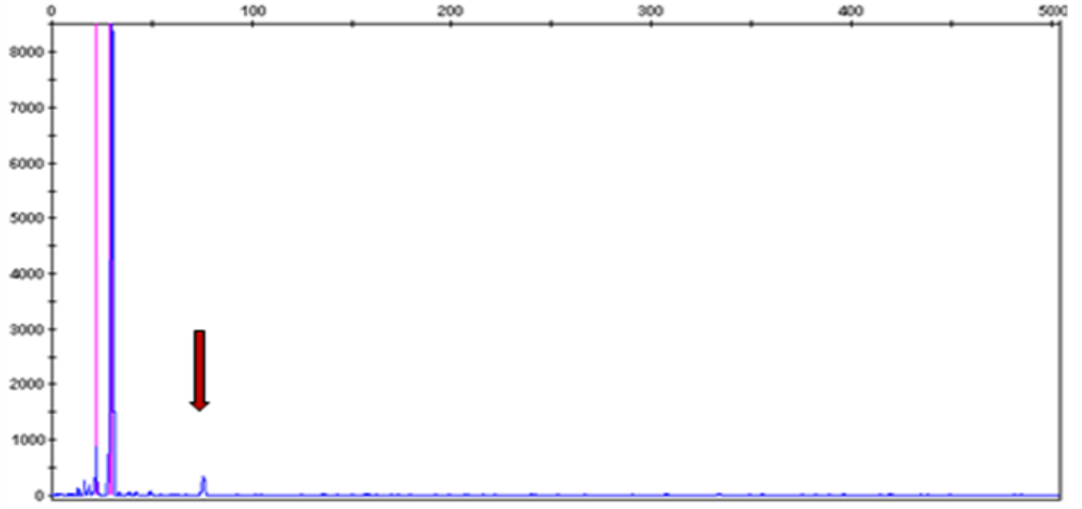
Şekil 6. Dokuz numaralı olgunun maternal DNA örneğinin ekzon 7 ve ekzon 10 real time PCR Rh (-) görüntüsü

Dokuz numaralı olguda plazmadan izolasyon sonrası elde edilen cell free DNA örneğinin RT-PCR yöntemiyle RhD genine ait ekzon 7 ve ekzon 10 bölgelerinin amplifikasyonu yapılmıştır. Ekzon 10'da amplifikasyon gözlenmiştir fakat ekzon 7'de amplifikasyon saptanmamıştır. Şekil 8'de RT-PCR görüntüsü gösterilmiştir. 3 tekrar sonucunda da aynı sonuç elde edilmesi sebebiyle fetal RhD genotipi Rh (+) olarak değerlendirilmiştir. Doğum sonrası bebeğin kan gurubu kan merkezinde serolojik yöntemlerle test edilmiş ve AB Rh (+) olarak doğrulanmıştır.

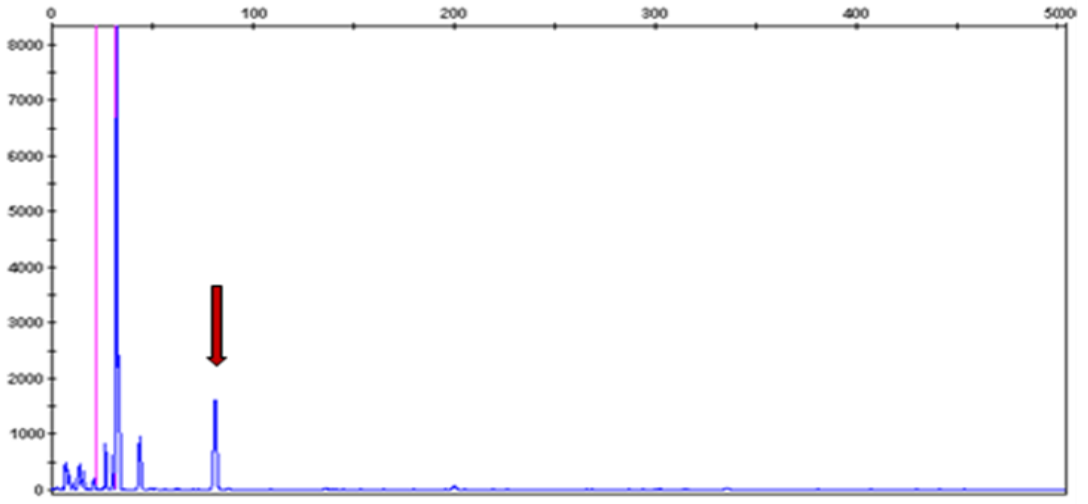


Şekil 7. Dokuz numaralı olgunun maternal plazmadan elde edilen cff DNA örneğinin ekzon 7 ve ekzon 10 real time PCR (Rh Pozitif) görüntüsü

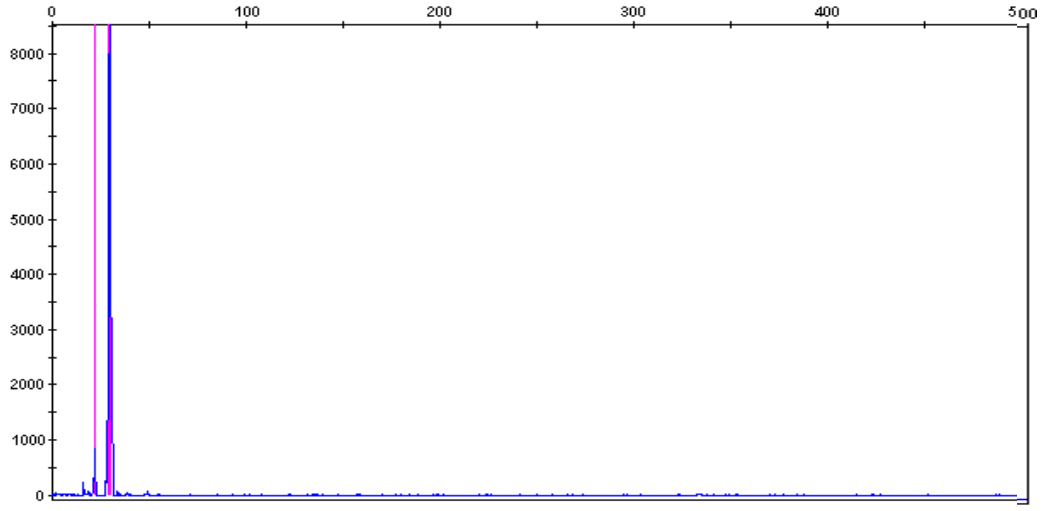
Maternal plazmadan cell free DNA izolasyonu ile elde edilen fetal DNA örnekleri ayrıca PCR ve kapiller elektroforez yöntemiyle analiz edilmiştir. Fetal RhD ekzon 7 ve ekzon 10 kapiller elektroforez sonuçları Şekil 8'de (ekzon 7 pozitif numune), Şekil 9'da (ekzon 10 pozitif numune) ve Şekil 10'da (Rh negatif numune) gösterilmiştir. Kapiller elektroforez sonuçları ile Real time PCR sonuçları (40 tan önce başlayan pikler) %100 uyum göstermiştir. Real time PCR da 40 tan sonra başlayan şüpheli pikleri olan olgularda kapiller elektroforezde negatif sonuç alınmıştır.



Şekil 8. Rh (+) Ekzon 7 PCR ürününün kapiller elektroforez görüntüsü



Şekil 9. Rh (+) Ekzon 10 PCR ürününün kapiller elektroforez görüntüsü



Şekil 10. Rh (-) PCR ürününün kapiller elektroforez görüntüsü

5. TARTIŞMA

Eşler arasında Rh uygunsuzluğu ve buna bağlı fetal kayıp yada yenidoğanın hemolitik hastalığı önemli bir obstetrik/pediyatrik sağlık sorunudur. Kafkas ırkının %15'inin Rh negatif ve bu ırktaki gebeliklerin %9'unun ise Rh uyumsuzluğu olduğu bildirilmektedir. Yenidoğanın hemolitik hastalığı erken tanı konup hızlı tedavi edilmezse şiddetli yenidoğan sarılığına, prelingual şiddetli sağırlık ve buna bağlı konuşamamaya, serebral felç ve mental retardasyona sebep olabilmektedir (Daniels, 2002). Kafkas ırkı dışındaki populasyonlarda Rh negatifliğin daha yüksek oranda olduğu ve komplikasyonlarının ciddiliği de göz önüne alınırsa Rh uyumsuzluğu ve buna bağlı yenidoğanın hemolitik hastalığının tüm Dünya'da önemli bir sağlık sorunu olduğu açıktır.

Rh (-) gebelerin gebelik sırasındaki uygun takipleri, gerekli olduğunda Anti-D uygulanması fetal kayıpların ve yeni doğanın hemolitik hastalığının önlenmesinde büyük önem arzetmektedir (Çetinkaya ve ark., 2010). Bu takipte fetal Rh genotipinin doğru saptanması büyük önem arzetmektedir. Bu amaçla çeşitli prenatal tanı yöntemleri kullanılmakta olup hem invaziv olmayan hem de yüksek sensitivite ve spesiviteye sahip yöntemlerin geliştirilmesine çalışılmaktadır.

Lo ve arkadaşlarının (1998) yılında cell free DNA'yı keşfetmesi hem Tıbbi Genetikte hem de Obstetride yeni bir dönemi başlatmıştır. Uzun yıllar anne kanından fetal hücrelerin izolasyonu ve bunlardan fetal genotipleme yönünde süren ancak çok başarılı olamayan çalışmaların yerini anne plazmasından cell free fetal DNA'nın analizine dayanan fetal genotipleme çalışmaları almıştır. Maternal plazmadaki cell free DNA'nın büyük kısmı maternal kökenli olmakla birlikte; gebelik haftasına göre ve çeşitli faktörlerle değişmek üzere genellikle %3-6'sı, bazı durumlarda %20'si fetal kaynaklıdır (Chinnapapagari, 2005). Bu durum maternal plazmadan elde edilen cell free DNA'nın gerek fetal anöploidilerin tespitinde, gerekse annenin negatif olduğu genotipler için fetüsün pozitif olup olmadığının tespitinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Lo ve ark. 1993, Zhang ve ark. 2000, Bartha ve ark 2003, Hahn ve Zimmermann, 2010).

Maternal plazma cffDNA analizinde en çok uygulama alanı bulan fetal genotiplemeler RhD genotiplemesi, X'e bağlı hastalıklar açısından SRY genotiplemesi, beta talasemi ve kistik fibroz gibi tek gen hastalıklarında fetüsün

annede olmayıp babada olan mutasyonları taşıyıp taşımadığının tespitidir (Chiu ve ark. 2002, Gonza'lez-Gonza'lez ve ark. 2002, Ding ve ark. 2004, Li ve ark. 2005, Norbury ve Norbury 2008). Bu yolla mümkün olduğunca prenatal tanıda noninvaziv yöntemlere yönelinmekte, ancak bu şekilde tanı konamayan durumlarda (örneğin anne ve babanın aynı mutasyonu taşıdığı durumlarda) invaziv yöntemlerin kullanılması yoluna gidilmektedir.

Lo ve arkadaşların (1998) cell- free DNA'ı keşfetmesiyle birlikte cell free DNA ve maternal kandan fetal DNA eldesine yönelik birçok yöntem literatürde bulunmaktadır. Literatürde belirtilen yöntemler arasında farklılıklar ve modifikasyonlar mevcuttur. Bu farklılıklardan biri olarak kan alımında kullanılan tüplerden söz edilebilir. Plazmanın kolay ayrılmasını sağlamak amacıyla kullanılan ve içerisinde jel bulunan tüpler ile sadece EDTA içeren tüplerin karşılaştırıldığı, Brojer ve ark. (2005) yaptıkları çalışmalar sonucunda bu iki tüp arasında fetal DNA miktarı açısından bir farklılık saptamadıklarını bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda aralarında bir fark bulunmadığının bildirilmesi ve birçok çalışmada kullanılması sebebiyle EDTA içeren tüpleri tercih ettik (Macher ve ark. 2011, Hromadnikova ve ark. 2005a, 2005b).

Cell free fetal DNA eldesi için alınan kan ürünleri santrifüjlenerek plazmaları ayrılmaktadır. Literatürde buna yönelik de farklılıklar gözlenmektedir. Bazı araştırmacılar plazmayı ayırmada iki basamaklı hızı artan bir santrifüj işlemi uygularken, bazıları da tek basamakta plazmayı ayırıp çalışılacağı süreye kadar -20⁰C'de yada -80⁰C'de dondurup, çalışma zamanı geldiğinde plazma çözüldükten sonra bir santrifüj işlemi daha uygulayıp sonrasında süpernatantı izolasyon için kullanmaktadır (Günel ve ark. 2010, Legler ve ark. 2007).

Biz çalışmamızın optimizasyon aşamasında hem artan hızlarda ardarda iki basamaklı santrifüj işlemi hem de çözünme sonrası 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulayarak sonuçları karşılaştırdık. Yapmış olduğumuz ön çalışmalar sonucunda bu iki farklı santrifüj işleminin karşılaştırılması sonucunda anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu sebeple çalışmamızda 2500 rpm'de 10 dk santrifüj sonrası süpernatantın yeni bir tüpe aktarılarak 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmesi sonrası ara stoklara ayrılarak -20⁰C'de saklanmış ve çözdürüldükten sonra tekrar santrifüj işlemi uygulanmadan DNA izolasyonu işlemlerine geçilmiştir.

Plazmadan fetal DNA ve cell-free DNA eldesine yönelik birçok kit literatürde belirtilmiştir. Bunlardan manuel izolasyon yöntemi için QIAamp DNA Blood Mini Kit (Zhou ve ark, 2005), QIAamp DSP virus kit (Müller ve ark., 2011) ve otomatik izolasyon yöntemi için MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I öne çıkan izolasyon kitleridir (Macher ve ark. 2011, Hromadnikova ve ark. 2005a).

Biz çalışmamızda hem manuel hem otomatik olarak çeşitli izolasyon kitleri kullanarak bunlardan elde ettiğimiz DNA örnekleri ile RT-PCR işlemi gerçekleştirdik. RT-PCR işlemi sonrası elde ettiğimiz sonuçların verimliliğini karşılaştırarak araların bir fark olup olmadığını gözlemledik.

Bu amaçla manuel izolasyon yöntemleri için QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany), Roche manuel izolasyon kiti, viral izolasyon kiti (RTA, Türkiye), otomatik izolasyon yöntemi için MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I kullanılmıştır. Her bir izolasyon yöntemi için 400 µl plazma kullanılıp dilüsyon için 50 µl elution buffer eklenmiştir.

Bu karşılaştırma sonucunda RT-PCR başarısı açısından QIAamp DNA Blood Mini Kiti ve otomatik izolasyon kiti MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I ile elde edilen DNA örneklerinin diğerlerine oranla daha güvenilir sonuç verdiği saptanmıştır.

Biz çalışmamızda hem QIAamp DNA Blood Mini Kiti hem de MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I kullandık. Her gebe için iki izolasyon yöntemiyle de DNA elde edilip üç tekrarlı olarak RT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda fetal RhD genotipine karar verilmiştir.

Ayrıca literatürde kitlerin yanı sıra farklı miktarlarda plazma örneği kullanılarak izolasyon metodları modifiye edilmiştir (Wang ve ark.2009, Hromadnikova ve ark. 2005c, Finning ve ark. 2004).

Biz ön çalışmamızda farklı miktarlarda (200 µl, 400 µl ve 800 µl) plazma örnekleri ile QIAamp DNA Blood Mini Kiti kullanarak DNA izolasyonu yaptık. DNA izolasyonu sonrası elde edilen DNA örnekleri RT-PCR işlemine tabi tutuldu. Elde edilen sonuçlar neticesinde aralarında büyük bir farklılık saptanmamıştır. İzolasyon işleminin kolaylaştırılması ve olası kontaminasyonu önlemek amacıyla 400 µl plazma örneği kullanımına karar verilmiştir.

Maternal plazmadan elde edilen cell free fetal DNA' dan fetal Rh genotiplenmesi yaptığımız 12 gebeden 4 tanesinin sonuçları doğum sonrası bebeğin kan gurubunun tespiti ile, 1 tanesinin sonucu amniyon sıvısından elde edilen DNA ile fetal RhD genotiplenmesi yapılarak, 1 tanesinin sonucu da hem amniyon sıvısından elde edilen DNA ile fetal RhD genotiplenmesi yapılarak hem de doğum sonrası bebeğin kan gurubunun tespiti ile kontrol edilmiştir. Doğum ve amniyosentez sonrası sonuçlar maternal kandan yaptığımız fetal DNA analizi ile %100 uyumlu bulunmuştur.

Gerek çalışılan gerekse sonucu doğrulanabilen olgu sayımız oldukça az olmakla birlikte doğum sonrası test edilenlerin tümünde sonuçlarımızın doğrulanması bu yöntemle yapılan analizin yüksek sensitivite ve spesifitede olduğuna işaret etmektedir.

Çalışmaya katılırken Rh (-) olduğunu bildiren 1 numaralı gebeden hem plazmadan hem de buffy coat' tan yaptığımız analizde ekzon 7 ve ekzon 10 pozitif bulunmuştur. Bu durum RhD ekspresivitesinde düşüklüğe bağlı olabileceği gibi daha önce yapılan testin hatalı olmasına da bağlı olabilir. RhD ekspresivitesinde düşüklük (Levine ve ark., 1984) Kafkas ırkında %0,3 olarak bildirilmekle birlikte ülkemizde bu konuda yapılmış çalışma bulunmamaktadır. RhD ekspresivitesinde düşüklüğün özellikle Afrika popülasyonlarında anlamlı olarak yüksek sıklıklarda olduğu, bu durum ekzonik delesyonlara bağlı olabildiğinden genotiplenmede intronik bölgelerin de analiz edilmesi önerilmektedir. Olgumuzda maternal kan gurubunun serolojik olarak analizi tekrarlandığında gebenin aslında Rh (+) olduğu anlaşılmıştır. Bu durum Rh kan gurubu tespitinde RT-PCR yöntemi ile genotiplenmenin başarılı ve güvenilir bir yöntem olduğuna işaret etmektedir. Optimizasyon sonrası toplam analiz maliyeti numune başına yaklaşık 10 lira olduğundan RT-PCR aynı zamanda ucuz bir yöntem olarak da kabul edilebilir (Müller ve ark., 2011). Ayrıca bu olgudan edindiğimiz tecrübe, gelecekte maternal plazmadan fetal Rh genotiplenmesi diagnostik olarak çalışılırken mutlaka anne genotipinin de buffy coat'dan DNA izolasyonu yapılarak doğrulanması gerekeceğini düşündürmektedir.

Dokuz numaralı olguda maternal plazmadan RhD genotiplenmesi sırasında sadece ekzon 10 pozitif sonuç vermiş, ekzon 7 ise negatif sonuç vermiştir. Buffy coat çalışması annenin hem ekzon 7 hem de ekzon 10 için negatif olduğunu gösterdiğinden bu sonucun Rh (+) fetal genotipi gösterdiği düşünülmüş ve doğum

sonrası serolojik analizle de bebeğin Rh (+) olduğu doğrulanmıştır. Bu durum bebekte ve babasında ekzon 7 delesyonuna bağlı olabileceği gibi ekzon 7'nin RT-PCR reaksiyonun sensitivitesinin ekzon 10'a göre daha düşük olmasına bağlı olabilir. Genotipik doğrulama için baba ve bebek numune vermek üzere davet edildi ancak numune vermediler. Analiz sonuçları yorumlanırken sadece ekzon 7 analizi ile Rh (-) sonuç alınacak olursa yanlış negatiflik olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışılan örneklerde Real Time PCR ile ekzon 7 ve ekzon 10 için amplifikasyonu gösteren pikler genellikle 26.-36. siklularda başladı, 40'dan sonra başlayan pikler yanlış pozitif olarak değerlendirildi. Tereddüt yaratabilen bu durumun netleştirilebilmesi için alternatif bir analiz yöntemi olarak aynı primer-prob, PCR bileşenleri ve PCR protokolü kullanılarak ABI 9700 cihazı ile elde edilen PCR ürünleri kapiller elektroforezde (ABI 3100) 1 saat yürütülerek MLPA programında analiz edildi. MLPA programının seçilme nedeni fragman analizine dayanıyor olmasıydı. Ekzon 7 PCR ürünü 75'de ve ekzon 10 PCR ürünü de 81'de pik verdi. Kimura ve ark. (2008) RhD genotiplemesinde kapiller elektroforez yönteminin güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Onların analizinde ekzon 10, 72'de pik vermiştir ancak kullandıkları primerler ve PCR koşulları ile kapiller elektroforez cihazının modeli bizimkinden farklıdır, bu durum analiz sırasında gözönüne alınmalıdır. Bizim çalışmamızda RT-PCR'da 40'dan sonra başlayan şüpheli piklerin hiçbiri kapiller elektroforezde pik vermedi. Kapiller elektroforez ile değerlendirme RT-PCR ile değerlendirmeye göre ek olarak polimer, formamide ve size standart maliyeti getirmekle birlikte sonuçlar net olduğu için RT-PCR cihazının olmadığı laboratuvarlar için kullanışlı bir alternatif yöntem olarak değerlendirildi. Bu yöntem ayrıca RT-PCR çalışmasında 40. siklusta başlayan ve tam olmayan piklerin doğrulanması, yanlış pozitifliğin dışlanması için de kullanışlı bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada laboratuvarımızda maternal kandan cell free fetal DNA elde edilebilmiş ve fetal RhD genotipi girişimsel bir yöntem olmaksızın başarıyla saptanabilmiştir. Avrupada birçok ülkede rutin bir uygulama olan, Rh (-) gebelerde maternal plazmadan fetal RhD genotiplemesi (Bianci ve ark. 2005, Lo 2006, Van der Schoot ve ark. 2006, Finning ve ark. 2008, Müller ve ark. 2008, Daniels ve ark 2009, Müller ve ark. 2011) ülkemizde de yapılabilir. Bu sayede eğer fetus Rh (-) ise 28. haftada gereksiz yere anneye Anti-D immunglobulin uygulanmasının maliyetinin, stresinin ve olası komplikasyonlarının önüne geçilebilir (Zhou ve ark. 2005). Anti-D immunglobulinin temininde dönemsel güçlükler de gözönüne alındığında, özellikle böyle dönemlerde temin edilebilen az sayıdaki Anti-D IgG'nin sadece fetüsün Rh (+) olduğu gerçek endikasyonlu gebelere uygulanması da uygun bir prosedür olacaktır.

Maternal plazmadan fetal RhD genotiplemesi diagnostik olarak çalışılırken anne genotipinin de buffy coat'dan DNA izolasyonu yapılarak doğrulanması; fetal RhD hakkında yorum yapmadan önce anne kan gurubunun Rh (-) olduğundan emin olunması gerekir.

RhD genotiplemesi en az 2 ekzondan yapılmalı, sadece ekzon 10 çalışılması sensitiviteyi düşürebileceğinden Kafkas popülasyonu için hem ekzon 7, hem de ekzon 10 analizi yapılmalıdır.

Çalışmamızda RhD genotiplemesinde hiç “run to run” farkı saptanmamıştır. Özellikle Rh (+) sonuçlara tek bir PCR reaksiyonu sonrası karar verilebilir, Rh (-) sonuçlarda tekrar çalışılarak doğrulanması uygun olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Akolekar R, Finning K, Kuppusamy R, Daniels G, Nicolaides KH. Fetal RhD genotyping in maternal plasma at 11–13 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther.* 2011; 29:301-306
- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem.* 2000 Feb; 46(2):301-2.
- Aykut A. Maternal plazmadan fetal DNA analizi ile fetal RhD'nin saptanması. 2010, Ege Üniversitesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Genetik ve Teratoloji Bilim Dalı, Doktora Tezi, 115 sayfa, İzmir, (Doç. Dr.Özgür Çoğulu)
- Bartha JL, Finning K, Soothill P.W. Fetal sex determination from maternal blood at 6 weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency. *Obstet Gynecol.* 2003; 101:1135-6.
- Bianchi D, Avent N, Costa J, van der Schoot C. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal rhesus D: Ready for prime(r) time. *Obstet Gynecol.* 2005; 106:841-844.
- Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: Kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* 2005; 11(1):59-67.
- Brojer E, Z'upanska B, Guz K, Orzińska A, Kalińska A. Noninvasive determination of fetal *RHD* status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005; 45:1473-1480.
- Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW, Lo YM. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem.* 2004 Jan; 50(1):88-92.
- Chen K, Zhang H, Zhang LN, Ju SQ, Qi J, Huang DF, Li F, Wei Q, Zhang J. Value of circulating cell-free DNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2013 May 28; 19(20):3143-9.
- Chinnapapagari SK, Holzgreve W, Lapaire O, Zimmermann B, Hahn S. Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma. *Clinical Chemistry.* 2005; (51)3:652-655.
- Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet.* 2002 Sep 28; 360 (9338) :998-1000.
- Clayton EM Jr., Feldhaus WD, Whitacre F.E. Fetal erythrocytes in the maternal circulation of pregnant women. *Obstet Gynecol.* 1964; 23:915-9.
- Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Diseases and injuries of the fetus and newborn. *Williams Obstetrics.* 2001; (21) New York: McGraw-Hill Company.
- Çetinkaya M, Özkan H, Köksal N, Akkuş H, Kimya Y. Rh hemolitik hastalığında intrauterin transfüzyonun neonatal sonuçlara etkisi. *Güncel Pediatri Dergisi.* 2010; 8:1-6.
- Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: Current practice and future prospects. *Prenat Diagn.* 2009; 29:101-107.
- Daniels G, Finning K, Martin P, Summers J. Fetal blood group genotyping: Present and future. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Sep; 1075:88-95.

- De Almeida JM, Rosado L. Rh blood group of grandmother and incidence of erythroblastosis. *Archives of Disease in Childhood*. 1972; 47:609-6012.
- Dilek I, Demir C, Bay A, Akdeniz H, Öner A.F. ABO and Rh blood groups frequency in men and women living in eastern Turkey. *International Journal of Hematology and Oncology*. 2006; (1)16:23-26.
- Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY, Charoenkwan P, Ng IS, Law HY, Ma ES, Xu X, Wanapirak C, Sanguanserm Sri T, Liao C, Ai MA, Chui DH, Cantor CR, Lo YM. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 Jul 20; 101(29):10762-7.
- Douglas GW, Thomas L, Carr M, Cullen NM, Morris R. Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1959; 78:960-73.
- Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: Prospective feasibility study. *BMJ*. 2008; 336:816-818.
- Finning K, Martin P, Daniels G. A clinical service in the UK to predict fetal Rh (Rhesus) D blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann NY Acad Sci*. 2004 Jun; 1022:119-23.
- Geoff Daniels. *Human Blood Groups*. 2nd ed. Blackwell Science. 2002.
- González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Ramos C. Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semiquantitative fluorescent-PCR. *Neurology*. 2003 Apr 8; 60(7):1214-5.
- González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Gallardo E, Ayuso C, Ramos C. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2002 Oct; 22(10):946-8.
- González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, García-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn*. 2003 Mar; 23(3):232-4.
- Grootkerk-Tax MG, Soussan AA, de Haas M, Maaskant-van Wijk PA, van der Schoot CE. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*. 2006; 46:2142-2148.
- Grosset L, Barrelet V, Odartchenko N. Antenatal fetal sex determination from maternal blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1974; 120(1):60-3.
- Günel T, Kalelioğlu I, Ermiş H, Aydın K. Detection of fetal RhD gene from maternal blood. *J Turkish-German Gynecol Assoc*. 2010; 11:82-5.
- Hromadnikova I, Zejskova L, Doucha J, and Codl D. Quantification of fetal and total circulatory DNA in maternal plasma samples before and after size fractionation by agarose gel electrophoresis. *DNA and cell biology*. 2006; (25)11:635-640.
- 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 testin of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther*. 2005 Jul-Aug; 20(4):275-80.

- Hromadnikova I, Vesela K, Benesova B, Nekovarova K, Duskova D, Vlk R, Spalova I, Gerychova R, Hakenova A, Rosenbaumova Z, Vlasin P, Vlachova A, Palasek V, Roznakova E, Calda P. Noninvasive fetal RHD and RHCE genotyping from maternal plasma in alloimmunized pregnancies. *Prenat Diagn.* 2005 Dec; 25(12):1079-83.
- Hyett JA, Gardener G, Stojilkovic-Mikic T, Finning KM, Martin PG, Rodeck CH, Chitty LS. Reduction in diagnostic and therapeutic interventions by non-invasive determination of fetal sex in early pregnancy. *Prenat Diagn.* 2005;25: 1111-6.
- Izetbegovic S. Occurrence of ABO And RhD Incompatibility with Rh negative mothers. *Mater sociomed.* 2013 Dec; 25(4):255-258.
- Jean-Marc Minon, Christiane Gerard, Jean-Marc Senterre, Jean-Pierre Schaaps, and Jean-Michel Foidart. Routine fetal *RHD* genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion.* 2008; 48:373-381.
- Kenneth J, Moise Jr. Management of Rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2002; 100:600-11.
- Kıvançlı İ. 24-28.gebelik haftalarında doppler akım değişiklikleri ile maternal kanda fetal DNA değerleri arasındaki ilişki. 2012, Ankara Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 48 sayfa, Ankara, (Prof. Dr. Acar Koç)
- Kimura M, Sato C, Hara M, Ishihara O, Ikebuchi K. Noninvasive fetal RHD genotyping by maternal plasma with capillary electrophoresis. *Transfusion.* 2008 Jun; 48(6):1156-63.
- Korabecna M, Ulcova-Gallova Z, Horinek A, Pazourková E, Calda P. Quantification of circulating fetal DNA as a tool for potential monitoring of pregnant patients with antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity.* 2014; May15:1-5.
- Łaczmńska I ve Stembalska A. Non-invasive fetal trisomy (NIFTY) test in prenatal diagnosis. *Ginekol Pol.* 2014 Apr; 85(4):300-3.
- Lapaire O, Holzgreve W, Oosterwijk JC, Brinkhaus R, and Bianchi D.W. Georg Schmorl on trophoblasts in the maternal circulation. *Placenta.* 2007; 28(1):1-5.
- Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S, Meaney C, Hultén MA, Crea F, Olsson ML, Maddocks DG, Huang D, Fisher SA, Sprenger-Haussels M, Soussan AA, van der Schoot CE. Workshop report on the extraction of fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn.* 2007 Sep; 27(9):824-9.
- Levine P, Katzin E. M, Burnham L. Isoimmunization in pregnancy: Its possible bearing on the etiology of erythroblastosis foetalis. *JAMA.* 1984; 116:825-827.
- Li M, Then WL, Li L, Shen W. Can the quantity of cell-free fetal DNA predict preeclampsia: a systematic review. *Prenat Diagn.* 2014; May:22. doi:10.1002/pd.4416.
- Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA.* 2005 Feb 16; 293(7):843-9.

- Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Hahn S. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma-case report. *Prenat Diagn.* 2004; 24:896-8.
- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem.* 2004 Jun; 50(6):1002-11.
- Lo Y. Recent developments in fetal nucleic acids in maternal plasma: Implications to noninvasive prenatal fetal blood group genotyping. *Transfus Clin Biol.* 2006; 13:50-52.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:768-75.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997; 350:485-7.
- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med.* 1998; 339:1734-1738.
- Lo, YM, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, Littlewood TJ, Fleming, K.A, and Wainscoat J.S. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet.* 1993; 341(8853):1147-8.
- Lo, YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang A.M, and Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999; 64(1):218-24.
- Lo, YM. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications, *Clin Chem.* 2000; 46(12):1903-6.
- Macher HC, Noguerol P, Medrano-Campillo P, Garrido-Márquez MR, Rubio-Calvo A, Carmona-González M, Martín-Sánchez J, Pérez-Simón JA, Guerrero J.M. Standardization noninvasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell free fetal DNA in pregnant women plasma: Results in clinical benefits and cost saving. *Clinica Chimica Acta.* 2011; 413(2012):490-494.
- Meng M, Huo R, Han MY, Chi FL, Dai P, He L, Qin SY, Duan T. Detection of common deafness mutation by maternal plasma cell-free DNA. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014 May; 18(10):1544-8.
- Moise KJ. Jr., Argoti PS. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2008; 112(1):164-76.
- Müller S, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K ve Legler T.J. Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days. *Prenat Diagn* 2011; 31:1300-1304.
- Müller SP1, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Köhler M, Legler TJ. The determination of the fetal D status from maternal plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion.* 2008; 48:533-537.
- Norbury G, Norbury C.J. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: How close are we? *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine.* 2008; 13:76-83

- S. Illanes, n. Avent and p. W. Soothill. Cell-free fetal DNA in maternal plasma: An important advance to link fetal genetics to obstetric ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; 25:317-322.
- Sağol S, Akercan F, Yıldız P, Kazandı M, Çırpan T. Rhesus alloimmunizasyonu olan gebeliklere Yaklaşım: Olgu sunumu *Ege Tıp Dergisi*. 2005; 44 (2) :119-122.
- Schroder J, Schroder E, and Cann HM. Fetal cells in the maternal blood. Lack of response of fetal cells in maternal blood to mitogens and mixed leukocyte culture. *Hum Genet*. 1977; 38(1):91-7.
- Walknowska J, Conte FA, and Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfe. *Lancet*. 1969; 1(7606):1119-22.
- Wang XD, Wang BL, Ye SL, Liao YQ, Wang LF, He ZM. Noninvasive fetal RHD genotyping via real-time PCR of foetal DNA from Chinese RhD-negative maternal plasma. *Eur J Clin Invest*. 2009 Jul; 39(7):607-17.
- Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW, Johnson KL. Cell free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril*. 2004; 81:638-644.
- Wu D, Chi H, Shao M, Wu Y, Jin H, Wu B, Qiao J. Prenatal diagnosis of Down syndrome using cell-free fetal DNA in amniotic fluid by quantitative fluorescent polymersase chain reaction. *Chinese Medical Journal*. 2014; 127(10):1897-901.
- Zhang J, Fidler C, Murphy MF, Chamberlain PF, Sargent, IL, Redman CW, Hjelm NM, Wainscoat, J.S., and Lo, Y.M. Determination of fetal RhD status by maternal plasma DNA analysis. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 906:153-5.
- Zhou L, Thorson JA, Nugent C, Davenport RD, Butch SH, Judd WJ. Noninvasive prenatal RHD genotyping by real-time polymerase chain reaction using plasma from D-negative pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005; 193:1966–71.

8-EKLER

EK-1

SPİRALLİ TEZ KONTROL FORMU

| | Evet | Hayır |
|---|-------------|--------------|
| 1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır. | | |
| 2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır. | | |
| 3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır. | | |
| 4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır. | | |
| 5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır. | | |
| 6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa) | | |
| 7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır. | | |
| 8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır. | | |
| 9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır. | | |
| 10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman" kullanılmalıdır. | | |
| 11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlenin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir. | | |
| 12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır. | | |

| | |
|--|--|
| Tarih: 29/05 / 2014 Öğrenci Çisem AKURUT İmza | Tarih: 29/05 / 2014 Danışman Prof. Dr. Fatma Sılan İmza |
|--|--|

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALLI/CİTLİ TEZ YAZIM
KONTROL LİSTESİ

| KONTROL BAŞLIĞI | ÖĞRENCİ | DANIŞMAN |
|--|--|--------------------------------|
| Tez yazımında kullanılan yazı tipi | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Sayfa kenar boşlukları | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Kapak sayfası düzeni | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| İç kapak sayfası düzeni | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Onay sayfası düzeni | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Beyan sayfası içeriği ve düzeni | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| İçindekiler sayfası düzeni | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Teşekkür sayfası | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Türkçe özet | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| İngilizce özet | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Simgeler ve kısaltmalar dizini | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Şekiller dizini | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Tablolar dizini | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Tezin ön sayfalarının sıralaması | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Ön sayfaların numaralandırılması | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Sayfalarının numaralandırılması | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Başlıklarının numaralandırılması | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Şekil, resim ve tablo numaralandırması | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Yöntem ve Gereç | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Bulgular | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Tartışma | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Sonuç ve Öneriler | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Kaynaklar | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Atıflar (alıntı ve göndermeler) | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Ekler (etik kurul onayı, vs) | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Tez planı | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Dil (anlatım, yazım –imla) | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Kâğıt ve baskı özelliği | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Tezin son şeklinin elektronik kopyası | <input type="checkbox"/> UYGUN | <input type="checkbox"/> UYGUN |
| Tarih: 29/05 / 2014 Öğrenci Çisem AKURUT İmza | Tarih: 29/05 / 2014 Danışman Prof. Dr. Fatma Sılan İmza | |

EK-3 Etik Kurul Onay Formu

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

| | | | |
|-------------------|-------------------------|---------------------|-------------|
| Adı | ÇİSEM | Soyadı | AKURUT |
| Doğum Yeri | EDİRNE | Doğum Tarihi | 13.10.1990 |
| Uyruğu | T.C | TC Kimlik No | 35998298924 |
| E-mail | cisemakurut@hotmail.com | Tel | 05413238294 |

Eğitim Düzeyi

| | Mezun Olduğu Kurumun Adı | Mezuniyet Yılı |
|----------------------|---|-----------------------|
| Yüksek Lisans | Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü | 2012-... |
| Lisans | Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi | 2012 |

Yabancı Dil Sınav Notu

| KPDS | ÜDS | YDS | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE |
|------|-----|------|-------|--------------|--------------|--------------|-----|-----|
| | | 42,5 | | | | | | |

A-Uluslararası Yayınları:

- Uludag A, Silan C, Atik S, **Akurut C**, Uludag A, Silan F, Ozdemir O. Relationship Between Response to Colchicine Treatment and MDR1 Polymorphism in Familial Mediterranean Fever Patients. Genet Test Mol Biomarkers.2014;18(2):73-76.
- Topaloglu N, Oguz S, Silan F, Uludag A, Isik S, **AkurutC**. Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Children With Atopic Diseases.Gene Ther Mol Biol.2014;16: 55-60.

B- Uluslararası Bildirileri/Diğer

- S. Yalcintepe, O. Ozdemir, S. O. Hacivelioglu, **C. Akurut**, T. Kumcular, D. Uysal, K. Yucesoy, A. Uludag, E. Cosar, F. Silan. The association between endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism and spontaneous pregnancy loss. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J01.20.
- S. Yalcintepe, S. O. Hacivelioglu, C. Silan, **C. Akurut**, E. Koc, F. Silan, E. Cosar, A. Uludag, O. Ozdemir. Is apolipoprotein E polymorphisms associated with spontaneous pregnancy loss. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J01.64
- F. Silan, A. Uludag, **C. Akurut**, D. Kankaya, M. GENCER, M. Urfali, S. Yalcintepe, O. Ozdemir. Parental identification of aborted materials for chimerism and other molecular etiological parameters by microsatellite STR profiling. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J01.65.
- S. Oguz, F. Silan, **C. Akurut**, N. Topaloglu, S. Isik, E. Sik, A. Uludag, Z. Ogretmen, O. Ozdemir. Correlation between vitamin D receptor gene polymorphisms and atopic dermatitis in Canakkale population: a study based on, FokI and TaqI RFLP technique. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J04.06.
- J. Djurovic, O. Stojkovic1, **C. Akurut**, F. Silan, J. Todorovic, G. Stamenkovic, O. Ozdemir. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and Hashimoto's thyroiditis in Serbian population: a pilot study based on FokI, ApaI and TaqI RFLP technique. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J07.07.
- F. Silan, N. Topaloglu, M. Urfali, **C. Akurut**, M. G. K. KOCAK, D. Kankaya, E. ARI, O. Ozdemir. Common MEFV gene mutation profiles in Familial Mediterranean Fever patients in Canakkale Population. European Human Genetics Conference (ESHG) 31 May- 3 June 2014, Milan/ITALY. J17.22.
- Uludag A, Silan C, Yalcintepe SA, **Akurut C**, Uludag A, Silan F, Ozdemir O. Relationship between response to colchicine treatment and MDR1 polymorphism in

FMF patients. ESHG Conference, June 8-11 2013, Paris. European Journal of Human Genetics, 41(suplement 2), P04.57

C- Ulusal Bildirileri/Diğer

- Yalçın-tepe A.S., Özdemir Ö., Hacıveliolu Ö.S., **Akurut C.**, Koc E., Cosar E, Uludağ A., Ozdemir O. Apo E Polimorfizmi: Fetal Genotipler Anne Genotiplerine Karşı? Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, s.14, 6-7 Aralık 2013, İstanbul
- Yalçın-tepe A.S., Özdemir Ö., Hacıveliolu Ö.S., **Akurut C.**, Kumcular T. Maternal-Fetal eNOS Genotipleri ile Spontan Abortus İlişkisi. Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, s.14, 6-7 Aralık 2013, İstanbul.
- Silan F., Urfalı M., Sık E., **Akurut C.**, Özdemir Ö. Kliniğimizde Herediter Trombofili Saptanan 5 Olgu. Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, s.29, 6-7 Aralık 2013, İstanbul.
- **Akurut C.**, Silan F., Yalçın-tepe S., Coşar E., Gencer M., Özdemir Ö. Abortus Etiyolojisinde Sayısal Kromozom Anomalilerinin ve Uniparental Disomi Olgularının Mikrosatellit Markerlarla Analizi. Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, s.19, 6-7 Aralık 2013, İstanbul.
- Uludağ A., Silan C., Yalçın-tepe S., **Akurut C.**, Uludağ A., Silan F., Ozdemir O. FMF hastalarının kolşisine yanıtında MDR1C3435T polimorfizmi etkili mi ? 10. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s. 243, 19-23 Aralık 2012, Bursa

D-Katıldığı Uluslararası ve ulusal konferans ve kongreler:

- Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık 2012, Bursa
- Klinik Uygulamalarda Dizi Analizi Kursu 1-2 Haziran 2012, İstanbul
- Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalıklar Sempozyumu 06-07 Aralık 2013, İstanbul

E-Sertifikalar:

- Sanger Sekans Dizi Analizi Sertifikası
- C1 seviye İngilizce Dil Sertifikası