

DENEY 3.4.: Kan Grupları Tayini

Teorik Bilgi: Kişiler arasında kan nakillerinin (kan transfüzyonu) uygun bir şekilde yapılabilmesi için verici ve alıcı kan gruplarının kan naklinden önce mutlaka bilinmesi gerekir.

Kan gruplarını belirleyen ana faktörler A ve B faktörleridir. AB ve O faktörleri bu ana faktörlere bağlı olarak belirlenir. Ana faktörlerin biyokimyasal yapısı glikoproteindir. Bu yapı A ve B kan gruplarında aynı olmasına rağmen fark glikoprotein yapısının sonuna bağlı şekerden kaynaklanır. A kan grubunda glikoprotein yapısının sonuna bağlı şeker N-asetil galaktozamin olduğu halde, B kan grubunda glikoprotein yapısının sonuna bağlı şeker galaktozdur. Bu iki şeker farklı tip enzimlerle glikoprotein zincirinin sonuna bağlanır. N-asetil galaktozamin şekerini bağlayan enzim, N-asetil galaktozaminil transferaz, galaktoz şekerini bağlayan enzim ise galaktozil transferazdır. Kanında N-asetil galaktozaminil transferaz enzimini taşıyan kişiler A kan grubundan, galaktozil transferaz enzimini taşıyanlar ise B kan grubundandır. Her iki enzimi de kanında bulunduranlar AB kan grubundan, iki enzimi de kanında taşımayanlar O kan grubundandırlar. O kan grubundan olanlarda glikoprotein molekülünün sonunda bulunan fukoz şekeri, fukozil transferazla bağlanmış olmasına rağmen, kan nakillerinde uyumsuzluk problemi yaratmadığından önem taşımaz.

Kan nakillerinin uygun bir şekilde yapılabilmesi için aynı gruptan antijen ve antikor yapısının karşı karşıya gelmemesi önemlidir. Aksi takdirde aglütinasyon(kümeleşme ve çökme) reaksiyonu meydana gelir ve bunu alyuvar hemolizi izler. Antijen(aglutinojen) özellik alyuvarların zar yüzeyinde bulunurken, antikor(aglutinin, antibadi, anti-faktör) özelliği plasmada bulunur.

Bu 4 temel kan grubundan farklı olarak insanlarda A1 ve A2 alt grupları vardır. Bunlara bağlı olarak A1 B, A2 B grupları oluşmuştur. A2 ve A2 B alt gruplarında alfa1 antikoru, A1 ve A1 B alt gruplarında ise alfa2 antikoru bulunur. Sonuncu antikorun en önemli özelliği A2 ve A2 B alt grupları ile reaksiyon vermediği halde, O grubu kanla çok şiddetli aklütinasyon yapmasıdır. Bu nedenle genel verici olan O grubundan bir kan A1 ya da A1 B grubundan bir kişiye kan verecek olursa ölüm meydana gelir. Bu bahsedilen alt gruplardan başka ayrıca M, N, MN, S, s, k, P gibi alt gruplar da vardır. İnsan plasmasında bu alt grupları çöktüren antikorlar olmadığından, kan nakillerinde bir uyumsuzluk yaratmazlar. Bu alt gruplar kalıtımla yavruya geçtiğinden, adli tıpta, genetikte ve babalık tayininde önemli kriterlerden birisi olarak göz önüne alınırlar. A ve B kan grupları belirleyen kalıtsal özellik O kan grubuna baskın durumdadır.

A, B, AB ve O kan gruplarının antijen ve antikor özelliklerini şu şekilde gösterebiliriz:

	Antijen(alyuvar zarında)	Antikor(plasmada)
A kan grubu	A	B
B kan grubu	B	A
AB kan grubu	A,B	—
O kan grubu	—	A,B

O kan grubunun alyuvar yüzeyinde H tipi bir antijen vardır. Fakat kan nakillerinde antikor karşılığı olmadığından bir uyumsuzluk yaratmaz. Buna göre kan alma ve kan verme kuralları şu şekilde gösterilebilir.

	Aldığı gruplar	Verdiği gruplar
A kan grubu	A,O	A,AB
B kan grubu	B,O	B,AB
AB kan grubu	A,B,AB,O	AB
O kan grubu	O	A,B,AB,O

Buna göre AB kan grubu genel alıcı, O kan grubu ise genel verici durumundadır.

Yapılan istatistiklere göre insanların genellikle %40 A, %20 B,AB ve %40 O kan grubuna sahip oldukları saptanmıştır. Türkiye’de ise A kan grubu %44, O kan grubu %33, B kan grubu %16 ve AB kan grubu ise %7 oranında bulunmaktadır. Bu oranlar farklı ülkelere ve ırklara göre değişim göstermektedir.

Rh faktörü: Kan gruplarının antijen ve antikor özellikleri göz önüne alınarak yapılan kan nakillerinde de çoğu kez uyumsuzluk sorunları ortaya çıkmıştır. Bu problemler daha çok önceden kan nakli yapılmış kişilerde, hamilelerde ve yeni doğum yapmış kadınlarda görülmüştür. Bunun sonucu A, B, AB VE O kan grupları sistemi göz önüne alınarak yapılan kan nakillerinin yetersizliği saptanmıştır.

Rhesus cinsi maymunlar üzerinde yapılan araştırmalarda, meydana gelen bozuklukların Rh faktöründen ileri geldiği saptanmıştır. Rhesus maymunundan alınan kan birkaç kez kobay ya da tavşana verildiğinde, önceleri bir anormallik görülmemiştir. Sonraki kan nakillerinde kobay ve tavşan kanlarında oluşan antikorlar nedeniyle aglütinasyon meydana gelmiştir. Kobay ve tavşan kanında aglütinasyon yapan ve Rhesus maymununun kanında bulunan bu faktöre, Rhesus isminin ilk iki harfi alınarak “ Rh “ faktörü denilmiştir. Alyuvarları bu antijeni taşıyan kimseler Rh(+), taşımayanlar ise Rh(-) olarak belirlenmiştir. Beyaz ırktan olan insanların %85’i Rh(+), %15’i Rh(-) olarak saptanmıştır.

Rh(+) bir kan, Rh(-) bir insana verilirse, alıcının kanında Rh antikoru şekillenir. İkinci defa Rh(+) kan verilirse önceden oluşmuş olan Rh antikoru verilen kanın alyuvarlarını çöktürür(aglütinasyon)

Rh(-) bir kadının, Rh(+) bir çocuğu olursa annenin kanında Rh antikoru şekillenir. Böyle bir kadına Rh(+) bir kan nakli yapılırsa, verilen kanın alyuvarlarını aglütine eder. Anne kanındaki yavrunun alyuvarları gebeliğin son 3 ayında yavaş yavaş anne kanına karışmaya başlar. Bu esnada anne kanında da Rh antikoru şekillenmesi yavaş yavaş başlar. Anne ve yavru arasındaki kan karışımının maksimum olduğu an doğum andır. Bu esnada antikor oluşumu da fazladır. Aynı anne ikinci bir Rh(+) çocuğa gebe kalırsa, ilk çocuktan dolayı anne kanında şekillenmiş olan Rh antikorları yavruyu daha şiddetli etkiler ve tehlikeyi artırır. Annenin Rh(-), babanın Rh(+) olduğu bu tip Rh uyumsuzluklarında, annenin her çocuk için Anti-D gamma globulin iğnesi olması, anne kanında önceden şekillenmiş olabilecek Rh antikorlarını bloke ettiğinden, Rh uyumsuzluğuna bağlı rahatsızlıkları engelleyecektir.

Bu tip Rh uyumsuzluklarında önlem alınmazsa, anne kanında bulunabilecek Rh antikorları anne kanı ile yavruya(fötüs) geçer ve yavrunun alyuvarlarını önce aglütine edip sonra hemolize uğratarak tahrip eder. Bu hastalığa yeni doğanların hemolitik

hastalığı (erythroblastosis feotalis) adı verilir ve bunun nedeni olarak Rh faktörü gösterilmektedir. İleri derecede hemoliz ise anemi ve sarılığa neden olduğu gibi Kernicterus adı verilen sinirsel ve zihinsel bir bozukluğa da yol açabilir. Sarılık hastalığı bilirubinden ileri gelir. Alyuvar tahribi sonucu açığa çıkan bilirubin çok tehlikelidir. Bu tip rahatsızlıkların tedavisinde fototerapi ve bebek kanının yetişkin kanı ile değiştirilmesi şeklinde iki farklı tedavi yöntemi uygulanabilmekle beraber bunlar son derece riskli yöntemlerdir. En son teknoloji ile özellikle sarılığa neden olan bilirubin, bilirubin oksidaz enzimi kullanılarak kandan uzaklaştırılmaya çalışılmaktadır.

Kan nakillerinde uyumsuz kan verilirse alyuvarlar kümeleşir, akciğer ve beyin gibi önemli organlarda kılcak damarların tıkanmasına neden olur. Kümeleşen alyuvarlar sonradan hemolize uğrarlar, idrarda hemogloblin görülmeye başlar ve sonunda böbrek yetmezliği ve ölüme götürebilir.

Rh antijeninin en çok rastlanan tipi "D", antikorlu ise Anti-D dir. D antijenini meydana getiren genler kalıtsal olarak yeni nesillere aktarılır. Sperm ve ovumun heterozigot ve homozigot özellikleri Rh(+) ve Rh(-) liği belirler. Landsteiner ve Weiner 1940 yılında kanda 3 tip anti Rh antikorlu bulmuşlardır. Altı tip Rh faktörü vardır. Fisher ve Race' in ayırımına göre bunlar rh'(c), RH(D), Rh''(E), hr'(c), Hr(d), hr''(e) dir.

Soru: Sizce neden anne ve baba arasındaki Rh uyumsuzluğu yeni doğacak bebekte bir sorun yaratıyor da A, B, AB ve O kan grubu uyumsuzluğu bir sorun yaratmıyor?

Önemli Kriterler:1. Kan gruplarına bağlı antijen ve antikor özellikler kalıtsal olarak kazanılmış özelliklerdir. 2. Kan nakillerinde vericinin alyuvarları, alıcının plasması tarafından aglutine edilmemelidir. Alıcının alyuvarlarının, vericinin plasması tarafından aglutine edilmesi çok görülen bir olay değildir. 3. Test serumları ile kan grubu tayin edilebilmekle beraber, vericinin kanı alıcının kanı ile doğrudan doğruya karıştırılarak nakilden önce kontrol edilmeli ve böylece alt grup uyumsuzlukları da incelenmelidir.

Hayvanlarda Kan Grupları: Her hayvan türünde kan grupları farklı olduğu gibi, hayvanlarda kan grupları faktörlerinin sayısı da çok fazladır. Örneğin sığırlarda 11 kan grubu sistemi içinde 70 kan grubu faktörü bilinmektedir. Atlarda normal koşullarda 10 antikor saptanmıştır. Yine araştırma sonuçlarında, atlarda 19, koyunlarda 6 ve tavuklarda 7 kan grubu sisteminin bulunduğu bildirilmiştir. Sığırlarda kan grubu faktörlerini oluşturan çok sayıda gen bulunmuştur. Bu nedenle kan tipi yönünden çok fazla genotipik kombinasyon meydana gelmiştir.

İnsanlarda temel gruplar ve Rh faktörünün tayininde 3 tane anti test serumu kullanıldığı halde, sığırlarda kan gruplarının saptanması için özel antikorlu 51 test serumuna gerek vardır. Test serumları, kan grup faktörleri bilinen alyuvarlar birkaç kez diğer sığırlara verilerek elde edilir. Bu işlemin belli aşamalarında koyun, keçi ve tavşanlar da kullanılmaktadır. Bu anti serumlar içinde başlangıçta çok sayıda çeşitli kan grubu antikorları vardır. Sadece belirli bir antikor elde etmek için reseptörleri bilinen alyuvarlarla diğer antikorların arınması gereklidir.

Yukarıdaki nedenlerle hayvanlarda özellikle sığırlarda kan gruplarının tayini, gelişmiş modern bir laboratuvar ile çok sayıda deney hayvanı gerektiren zor bir iştir. Hayvanlarda kan naklinin gerekli olduğu durumlarda, alıcının ve vericinin kanlarının birbirine uygunluğunun saptanması çapraz karşılaştırma denemesi ile yapılır. Bu deneme

ile hemoliz ve aglütinasyon olayları, pratik olarak kontrol edilebilir. Özellikle köpek, kedi, sığır, at ve koyunlarda bu yöntem denenmiştir.

Amaç: A, B, AB ve O kan grupları ile Rh(+) ve Rh(-) faktörlerinin lam yöntemiyle belirlenmesi.

Materyal: Anti-A, Anti-B ve Anti-D serumları, alkol, pamuk, lanset, kan, lam, kürdan.

Metot: Lam yöntemi ile kan grubu tayini, A, B ve D antikorları kullanılarak, çalıştığımız kanda antijen aranması sonucu, aglütinasyon reaksiyonu meydana getirilmesi prensibine dayanır. Aglütinasyonun görüldüğü kan damlaları pozitif sonucu, görülmeyenler ise negatif sonucu gösterir.

1. Bir parmağınızı alkollü pamukla iyice siliniz
2. Steril bir lansetle ucundan dikkatli bir şekilde deliniz.
3. Temiz bir lam üzerine aralıklı olarak A, B ve D harflerini yazarak, parmak ucunda toplanan kandan her harfin altına 1 damla damlatınız.
4. Parmağınızı alkollü pamukla silip, kuru pamukla kapatınız.
5. Lam üzerindeki ilk kan damlasına Anti-A, diğerine Anti-B ve sonuncusuna da Anti-D serumlarından kana değdirmeden 1 damla damlatınız.
6. Her birini farklı bir kürdanın veya benzeri bir cismin ucuyla homojen olarak 15-20 saniye karıştırınız. Bu esnada kan damlalarını birbirine karıştırmayınız.
7. Lamı avucunuzun içine alıp, öne arkaya sağa sola hafifçe hareket ettirerek kanın test serumları ile iyice karışmasını sağlayınız. Bu esnada kanın lam üzerinden akmasına ve birbirleriyle karışmamasına dikkat ediniz. Gerekliyse daha iyi bir gözlem için lamı beyaz bir zeminin üzerine koyunuz.
8. Anti-A ve Anti-B serumları ilk 3 dakika içinde sonuç verirken, Anti-D serumu yaklaşık 1.5 dakika içinde reaksiyon verecektir.
9. Kümeleşmelerin görüldüğü damlaları pozitif, görülmediği damlaları da negatif olarak belirtiniz (Şekil:3.4.1.).

Hatalı Sonuçlar: Pozitif ve negatif hatalı sonuçlar olarak iki gruba ayrılır.

Pozitif hatalı sonuçlar:

1. **Soğuk aglütinasyon:** Bazı kan serumlarında 1-5 C° ler arasında kendi alyuvarlarını çöktüren soğuk antikorlar bulunur. Böyle antiserumlarla yapılan testlerde kan hangi gruptan olursa olsun sonuç AB grubu çıkar. Lamın 37 C° lik etüve konmasıyla çöküntü dağılır.
2. **Yalancı aglütinasyon:** Temizlik kurallarına uyulmadan yapılan testlerde ve bekletilmiş kan kullanıldığında, bakteri bulaşması sonucu meydana gelir.
3. **Oto aglütinasyon:** Bazı kan serumları kendi alyuvarlarını ve diğer gruptan tüm kanların alyuvarlarını çökertir. Bu antikorlar sıcak ve soğuk ortamlarda etkili olabilirler. Siroz, ateşli tüberküloz gibi vakalarda laboratuvar ısısında bile oto aglütinasyon olabilir. Kanın oto antikorlardan arınması için önce 1-5 C°ler arasında santrifüj edilip, 37C°de fizyolojik serumla yıkanması gerekir.

Negatif hatalı sonuçlar:

1. Testin uygun ısıda yapılmaması.
2. Sonucun değerlendirilebilmesi için yeterli süre beklenmemesi.

3. Alyuvar yoęunluęunun ya da anti serum kalitesinin zayıf oluđu.
4. Hemoliz meydana gelmesi.
5. Çok az serum ya da kanla çalışıldığında damlanın kuruması
6. Test kanlarının ve anti serumların birbirine karışması

Test Serümleri		Kan Grubu	Anti-D (Rho)	Sonuç
Anti-A (α agglutinin)	Anti-B (β agglutinin)			
		A		Rh -
				Rh +
		B		Rh -
				Rh +
		AB		Rh -
				Rh +
		0		Rh -
				Rh +

Şekil:3.4.1

Kan gruplarının tayininde elde edilen sonuçlar.(Konuk'dan)