



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER VE TIBBİ GENETİK DOKTORA PROGRAMI

HEMOFİLİ A GEN TEDAVİSİ İÇİN TRANSGENİK KÖK
HÜCRE PLATFORMUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE *İN VİTRO*
ETKİNLİĞİ

Cansu HEMŞİNLİOĞLU

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Elif Sibel ASLAN

İstanbul, 2022



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER VE TIBBİ GENETİK DOKTORA PROGRAMI

HEMOFİLİ A GEN TEDAVİSİ İÇİN TRANSGENİK KÖK
HÜCRE PLATFORMUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE *İN VİTRO*
ETKİNLİĞİ

Cansu HEMŞİNLİOĞLU

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Elif Sibel ASLAN

İstanbul, 2022

TEZ ONAY SAYFASI

BEYAN

Bu tezin bana ait olduğunu, tüm aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, içinde yer alan bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, kullanmış olduğum bütün bilgilere kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin yürütülmesi ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Cansu HEMŞİNLİOĞLU

İmza



TEŞEKKÜR

Akademik hayata attığım ilk adımlardan itibaren doktora sürem boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, kapısının her zaman açık olduğunu bildiğim, değerli hocam ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Elif Sibel Aslan’a,

Kendisiyle çalışmaktan onur duyduğum, tez çalışmam boyunca laboratuvar nosyonunu, bilgi birikimlerini ve tecrübelerini bana sabırla aktaran, hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, fikirleriyle hiç durmaksızın beni aydınlatan değerli hocam Prof. Dr. Ercüment Ovalı’ya,

Eğitim sürecimi çekilebilir ve keyifli kılan, ekibin bir parçası olmaktan son derece mutlu olduğum, çalışmalarımı gerçekleştirmeme imkan sağlayan ve destekleyen Sevgili LABCELL ailesine,

Tez sürecimin başından beri beni yüreklendiren Dr. Öğr. Üyesi Cihan Taştan’a,

En iyi şekilde yetişmem için ellerinden gelen her şeyi yapan, kararlarımda beni her zaman destekleyen, yaptıkları büyük fedakarlıklara son derece minnetar olduğum, hayatım boyunca ellerini omuzlarımda hissettiğim sevgili babam Can Hemşinlioğlu, annem Mine Hemşinlioğlu ve abim Çağdaş Hemşinlioğlu’na,

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, sevgisini, şevkatini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, hayattaki duruşunu örnek aldığım, zamanının ötesinde çağdaş bir Türk kadını olan, ışıkların aydınlattığı, sevgili anneannem Türkan Hemşinlioğlu’na, sonsuz teşekkürlerimi sunarım....

Dr. Cansu HEMŞİNLİOĞLU

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	Sayfa No
İÇ KAPAK.....	-
TEZ ONAYI.....	-
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGE, SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
TÜRKÇE ÖZET.....	xvi
İNGİLİZCE ÖZET.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hemofili A'nın Tarihi.....	4
2.1.1. Kraliyet Ailesi'nde Hemofili A.....	6
2.1.2. Son Yüzyıllarda Hemofili A.....	7
2.2. Hemofili A.....	10
2.3. Hemofili A Tanı ve Klinik Semptomlar.....	11
2.4. Hemofili A Laboratuvar Bulguları.....	14
2.5. Hemostaz.....	15
2.5.1. Primer Hemostaz.....	16
2.5.2. Sekonder Hemostaz.....	17
2.6. Faktör VIII Proteini ve Moleküler Yapısı.....	19
2.6.1. Faktör VIII Proteini.....	19
2.6.2. Faktör VIII Geni.....	21
2.7. Hemofili A Moleküler Patolojisi.....	22
2.7.1. Faktör VIII Geni Mutasyonları.....	23

2.7.1.1.	<i>Gen Düzenlemeleri</i>	23
2.7.1.2.	<i>Tek Baz Değişimleri</i>	25
2.7.1.3.	<i>İnseriyonlar veya Delesyonlar</i>	27
2.7.2.	<i>Etkileşen Proteinlerin Mutasyonu</i>	28
2.7.3.	<i>Bilinmeyen Mutasyonlar</i>	29
2.8.	<i>Hemofili A Hastalığında İnhibitör Varlığı</i>	29
2.8.1.	<i>Hemofili A' da İnhibitör Gelişimine Neden Olan Risk Faktörleri</i>	30
2.8.2.	<i>Hemofili A'da İnhibitör Gelişimi Tayini</i>	32
2.9.	<i>Günümüzde Hemofili A'nın Tedavisi</i>	32
2.9.1.	<i>Taze Donmuş Plazma (TDP) ve Kriyopresipitat</i>	36
2.9.2.	<i>Faktör Konsantreleri</i>	37
2.9.3.	<i>Emicizumab</i>	38
2.9.4.	<i>Desmopressin</i>	38
2.9.5.	<i>Antifibrinolitik Ajanlar</i>	39
2.9.6.	<i>Fibrin Yapıştırıcılar</i>	40
2.10.	<i>Hemofili A' da Gen Tedavisi</i>	40
2.10.1.	<i>Gen Aktarımında Kullanılan Vektörler</i>	41
2.10.2.	<i>Hemofili A Hastalığının Gen Tedavisinde Kullanılan Vektör Tasarımları</i>	44
3.	<i>GEREÇ VE YÖNTEM</i>	49
3.1.	<i>Gereç</i>	49
3.2.	<i>Yöntem</i>	53
3.2.1.	<i>HEK 293T Hücre Kültürü</i>	54
3.2.2.	<i>HEK 293T Hücrelerinin Saklanması</i>	54
3.2.3.	<i>Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Kültürü</i>	55
3.2.4.	<i>Agar Plate Hazırlama</i>	55
3.2.5.	<i>Plazmit Dizaynı</i>	56
3.2.6.	<i>Transformasyon</i>	62
3.2.7.	<i>Steril Gliserol Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması</i>	63
3.2.8.	<i>Transforme Bakterilerin Plakalara Ekimi</i>	63
3.2.9.	<i>Mini ve Maksi İnokülasyon</i>	63
3.2.10.	<i>Plazmit İzolasyonu</i>	64

3.2.11.	<i>Nanodrop Analizi</i>	65
3.2.12.	<i>Plazmit Jel Elektroforezi</i>	65
3.2.13.	<i>Lentivirüs Üretimi ve Plazmit Ekimi</i>	66
3.2.14.	<i>Kalite Kontrol Testleri</i>	68
3.2.15.	<i>Lentivirüs CD45R0t Ekspresyon Analizleri ve Infectious Unit (IFU) Hesaplanması</i>	68
3.2.16.	<i>Farklı Transdüksiyon Ajanları Kullanılarak Yapılan Virüs Transdüksiyon Analizleri</i>	69
3.2.17.	<i>Lentivirüs Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri</i>	71
3.2.18.	<i>Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Analizleri</i>	71
3.2.19.	<i>Faktör VIII Sekresyon Analizleri</i>	71
3.2.20.	<i>Koagülasyon, Tarama ve Karıştırma (Mixing Test) Analizleri</i> ..	72
3.2.21.	<i>Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı ve Faktör VIII Seviye Analizleri</i>	74
3.2.22.	<i>Western Blot Analizi</i>	74
3.2.23.	<i>İstatistiksel Analizler</i>	75
4.	BULGULAR	76
4.1.	<i>Faktör VIII Plazmiti Nanodrop Analizi</i>	76
4.2.	<i>Faktör VIII Plazmiti Jel Elektroforezi</i>	77
4.3.	<i>Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüs TEM Analizleri</i>	78
4.4.	<i>Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Varlığının Doğrulanması</i>	79
4.5.	<i>Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre</i>	80
4.6.	<i>Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Titrasyon ve Güvenlik Sonuçları</i>	80
4.7.	<i>Farklı Transdüksiyon Ajanları Kullanılarak Yapılan Virüs Ekspresyon Analizleri</i>	82
4.8.	<i>Faktör VIII Lentivirüs Kalıcılık ve Ekspresyon Analizleri</i>	87
4.9.	<i>Faktör VIII Lentivirüsünün Replikasyon Yetkin Lentivirüs (RCL) Analizleri</i>	89
4.10.	<i>Faktör VIII Antijeninin Kantitatif Ölçüm Analizleri</i>	91
4.11.	<i>Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı (aPTT) ve FVIII Seviye Analizleri (Mixing Test)</i>	93
4.12.	<i>Faktör VIII Western Blot Analizi</i>	97

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	98
5.1. Tartışma	98
5.1.1. <i>Hemofili A Hastalığının Tedavisinde FVIII İçeren Gen Tedavisinin</i> <i>Ulusal, Ticari ve Sosyal Kazanımları</i>	108
5.2. Sonuçlar	110
5.3. Öneriler	110
6. KAYNAKLAR.....	112
7. EKLER LİSTESİ.....	129
EK 1. Kurum İzin Yazısı.	129
EK 2. Etik kurul raporu.	130
8. ÖZGEÇMİŞ	131
9. İNTİHAL RAPORU	132

SİMGE, SEMBOL VE KISALTMA LİSTESİ

%	Yüzde
~	Yaklaşık
<	Küçüktür
>	Büyüktür
°	Derece
α	Alfa
μg	Mikrogram
AAV	Adeno-İlişkili Virüs
AHF	Antihemofilik Faktör
ALT	Alanine Aminotransferaz
Alu	Arthrobacter Luteus
aPTT	Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
bp	Baz Çifti
BU	Bethesda
CD45R0t	CD45 R0 Truncated
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
cm	Santimetre
CMV	Sitomegalovirüs
CpG	Sitozin Guanin
CTLA-4	Sitotoksik T-Lenfosit İlişkili Protein 4
DDAVP	1 - deamino - 8 - D - arginine vazopressin
dL	Desilitre
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
E.coli	Escherichia Coli
EACA	Epsilon Aminokaproik Asit
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
FIX	Faktör IX
FIXa	Faktör IXa

FVIIa	Faktör FVIIa
FVIII	Faktör VIII
FVIII:C	Faktör VIII Pıhtılaşma Aktivitesi
FVIIIa	Faktör FVIIIa
FVIII A	Faktör VIII A İntronik Bölgesi
FVIII B	Faktör VIII B İntronik Bölgesi
FXII	Faktör XII
gr	Gram
HAMSTeRS	Hemofili A Mutasyon Arama ve Kaynak Sitesi
HBV	Hepatit B Virüsü
HEK293T	İnsan Embriyonik Böbrek Hücresi 293T
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
IFU	Enfeksiyöz Birim
IL	İnterlökin
Int22h-1	Intron 22h'nin 1.Bölgesi
Int22h-2	Intron 22h'nin 2.Bölgesi
Int22h-3	Intron 22h'nin 3.Bölgesi
ITR	Ters Terminal Tekrarları
ITT	İmmün Tolerans Tedavisi
IU	Uluslararası Birim
Kat.	Katolog
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
LB Agar	Luria - Bertani Agar
LTR	Uzun Terminal Tekrarı
LV	Lentivirüs
mA	Miliamper
mg	Miligram
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MOI	Enfeksiyon Çeşitliliği
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit

nm	Nanometre
NSAİİ	Non-Steroid Anti-İnflamatuar İlaç
pCMV.VSVG	Zarf Plazmiti
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PsPAX2	Paketleme Plazmiti
PZ	Protrombin Zamanı
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RCL	Replikasyon Yetkin Lentivirüs
Rh	Rhesus Faktörü
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SIN	Kendi Kendini İnaktive Edebilen
sn	Saniye
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SOC	Süper Optimal Broth Besiyeri
TDP	Taze Donmuş Plazma
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TF	Doku Faktörü
THD	Türk Hematoloji Derneği
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
t-PA	Doku Plazminojen Aktivatörü
V	Voltaaj
v/v	Hacimce Yüzde
vg	Vektör Genom
vWD	von Willebrand Hastalığı
vWF	von Willebrand Faktörü
WHF	Dünya Hemofili Fedarasyonu
Xq28	X Kromozomunun Uzun Kolu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Koagülasyon Kaskadının Şematik Gösterimi.....	18
Şekil 2.2 Faktör VIII Proteinin Vücutta Salgılandığı Alanların Şematik Gösterimi..	19
Şekil 2.3 Prekürsör ve Aktif FVIII Proteininin Domain ve Subdomain Yapısının Şematik Gösterimi	20
Şekil 2.4 Faktör VIII Geninin Xq28’ deki Genomik Organizasyonu.....	22
Şekil 2.5 Şiddetli Hemofili A Vakalarında FVIII Geninin 1 ve 22 İtron Dizilerini İçeren Gen İnversiyon Mekanizmalarının Basitleştirilmiş Gösterimi.	24
Şekil 3.1 Deney Akışı	53
Şekil 3.2 EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t Plazmit Dizaynı	56
Şekil 3.3 5805 bazlık EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t Gen Dizisi	57
Şekil 3.4 EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t Amino Asit Dizisi.....	58
Şekil 3.5 VsVG Plazmiti Gen Dizisi	59
Şekil 3.6 Lentiviral Vektör İçine Klonlanmış VsVG Plazmiti	59
Şekil 3.7 Pspax Plazmiti Gen Dizisi	60
Şekil 3.8 Lentiviral Vektör İçine Klonlanmış psPAX2 Plazmiti	61
Şekil 3.9 Lentiviral Vektör İçine Klonlanmış FVIII Geni (Hemofili A Gen Tasarımı)	61
Şekil 3.10 Lentiviral Vektör.....	62
Şekil 3.11 Mezenkimal Kök Hücreler Kullanılarak Gerçekleştirilen Lentivirüs Titrasyon Deneyinin Kurulum Planı.....	69

Şekil 3.12 Farklı Transdüksiyon Ajanları Kullanılarak Gerçekleştirilen FVIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Mezenkimal Kök Hücre Transdüksiyon Deneyinin Kurulum Planı	70
Şekil 3.13 Faktör VIII İçermeyen İnsan Plazma Ürünü Karışım Testi (Mixing Test) Deneyinin Kurulum Planı	73
Şekil 4.1 Faktör VIII Plazmitinin Jel Elektroforez Görüntüsü	77
Şekil 4.2 Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüsün TEM Görüntüsü	78
Şekil 4.3 Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüs Varlığının Doğrulanması (Lenti - X GoStix)	79
Şekil 4.4 Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Morfolojisi (x40 Büyütmede)	80
Şekil 4.5 1 MOI FVIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Viral Titrasyon Analizi (Akım Sitometri)	81
Şekil 4.6 Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Titrasyon Analiz Sonucu (Akım Sitometri)	82
Şekil 4.7 Farklı MOI' lerde FVIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Protamin Sülfat Kullanılarak Gerçekleştirilen Transdüksiyon Analiz Sonucu (Akım Sitometri)	84
Şekil 4.8 Farklı MOI'lerde FVIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Vektofusin Kullanılarak Gerçekleştirilen Transdüksiyon Analiz Sonucu (Akım Sitometri)	85
Şekil 4.9 Farklı MOI'lerde FVIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Protamin Sülfat ve Vektofusin Kullanılarak Gerçekleştirilen Transdüksiyon Analizi Sonucu (Akım Sitometri)	86
Şekil 4.10 8 farklı MOI' de FVIII Geni Taşıyan Lentivirüs ile Transdükte Edilen Mezenkimal Kök Hücreler Kullanılarak Gerçekleştirilen 0. gün, 3. gün ve 10. gün CD45R0t Ekspresyon Analizi Sonuçları (Akım Sitometri)	88
Şekil 4.11 8 farklı MOI' de FVIII Geni Taşıyan Lentivirüs Kullanılarak Gerçekleştirilen 0. ve 10. Gün HIV RNA PCR Analiz Sonuçları (PCR Yöntemi)	90

Şekil 4.12 4 farklı MOI' de FVIII Geni Taşıyan Lentivirüs ile Transdükte Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Süpernatantları Kullanılarak Gerçekleştirilen FVIII Antijeni Analiz Sonuçları (ELISA Yöntemi).....92

Şekil 4.13 Mixing Test Sonrası, Gen Tedavisi Uygulanmış ve Gen Tedavisi Uygulanmamış İnsan Plazma Ürünlerinin aPTT Analiz Sonuçları94

Şekil 4.14 Mixing Test Sonrası, Gen Tedavisi Uygulanmış ve Gen Tedavisi Uygulanmamış İnsan Plazma Ürünlerinin FVIII Seviye Analiz Sonuçları96

Şekil 4.15 Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüs ile Transdükte Edilmiş Mezenkimal Kök Hücrelerde FVIII Protein Varlığı (Western Blot Analizi)97

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1 Hemofili A'nın Plazmadaki Rezidüel FVIII Aktivitesine Göre Sınıflaması ve Kanama Semptomları	11
Tablo 2.2 Hemofili A Hastalarında Görülen Kanama Semptomları ve Sıklıkları	13
Tablo 2.3 Hemofili A Hastalarında Görülen Kronik Komplikasyonlar	14
Tablo 2.4 Hemofili A Veritabanındaki 2853 Bireysel Raporun Analizinden Elde Edilen Mutasyon Verilerinin Özeti	26
Tablo 2.5 Hemofili A Hastalığında Kanama Yerine Göre Replasman Tedavisinin Dozları ve Süreleri	33
Tablo 2.6 Hemofili A Gen Tedavisi için Geliştirilen Klinik Çalışmalar ve Durumları	44
Tablo 3.1 Hücre Hatları ve Kullanım Alanları Listesi	49
Tablo 3.2 Kit, Solüsyon ve Antikorların Listesi	49
Tablo 3.3 Cihaz Listesi	51
Tablo 4.1 Faktör VIII Plazmit İzolasyonu Sonrası Nanodrop Analiz Sonuçları	76
Tablo 4.2 Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Titrasyon Analizi	81
Tablo 4.3 Farklı Transdüksiyon Ajanları Kullanılarak Yapılan Virüs Ekspresyon Analizleri	83
Tablo 4.4 Faktör VIII Lentivirüs Kalıcılık ve Ekspresyon Analizleri	87
Tablo 4.5 Faktör VIII Lentivirüsünün RCL Analizleri	89
Tablo 4.6 Faktör VIII Antijeninin Kantitatif Ölçüm Analizleri (3. ve 10. Gün)	91
Tablo 4.7 Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı Analizleri (Mixing Test)	93
Tablo 4.8 Faktör VIII Seviye Analizleri (Mixing Test)	95

TÜRKÇE ÖZET

Hemşinlioğlu C. (2022). Hemofili A Gen Tedavisi İçin Transgenik Kök Hücre Platformunun Geliştirilmesi ve *İn Vitro* Etkinliği, Doktora Tezi, Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.

Hemofili hastalarının yaklaşık %80' ini etkileyen Hemofili A, Faktör VIII (FVIII) eksikliği sonucu gelişen X' e bağlı resesif kalıtsal bir kanama bozukluğudur. Hastalar eklem içi ve kas içi kanamalarla ile karakterize olurken, faktör eksikliğinin derecesi, kanama sıklığını ve şiddetini belirlemektedir. Kanamanın kontrolü ve tedavisinde plazma türevli tedaviler ve rekombinant faktör konsantreleri kullanılmaktadır. Araştırmamızda Hemofili A hastalığından sorumlu olan FVIII eksikliğine yönelik gen tedavisi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda promotörü EF-1 alpha olan, B domaini silinmiş FVIII gen sekansı ile CD45 R0 truncated yüzey belirteci taşıyan (EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t) lentiviral vektör dizayn edilmiştir. Tasarladığımız lentiviral vektörün mezenkimal kök hücreleri transdükte etmesi sağlanarak immün cevaptan korunabilen, sahip olduğu yüzey belirteci (CD45R0t) sayesinde in vivo uygulamalarda takip edilebilen, toksik olmayan ve fonksiyonel FVIII sekresyonu sağlayabilen bir gen tedavisi hedeflenmiştir. Faktör VIII kodlayan lentivirüsün karakterizasyon ve kalite kontrol testlerinin ardından mezenkimal kök hücreler ile transdüksiyon verimliliği, FVIII kalıcılık ve ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Faktör VIII proteinin varlığı Western Blot yöntemiyle de doğrulanmıştır. Geliştirilen lentivirüsün (LTR sekansı) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri ile replikatif olmadığı, güvenliliği test edilmiştir. FVIII sekresyonunun zamana bağlı değişimi Elisa yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Faktör VIII proteinin fonksiyoneli ise karıştırma testi (mixing test) ile aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) ve FVIII düzeyleri üzerinden gösterilmiştir. Zamana bağlı gerçekleştirilen FVIII sekresyon analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmadığı, stabil seviyelerde FVIII varlığı saptanmıştır ($p > 0.05$). Karıştırma testi (mixing test) kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde ise gen tedavisi uygulanmış ve gen tedavisi uygulanmamış FVIII içermeyen insan plazma ürünleri aPTT ve FVIII seviyesi açısından karşılaştırılmıştır. aPTT seviyeleri değerlendirildiğinde; gen tedavisi uygulanmamış gruba ait ortalamanın 92.69 ± 11.38

sn olduğu ancak gen tedavisi uygulanan grupta ise bu ortalamanın 38.60 ± 13.38 sn' ye düştüğu görülmüştür ($p < 0.001$). Faktör VIII seviyeleri değerlendirildiğinde ise gen tedavisi uygulanmamış grubun FVIII seviye ortalamasının 0.41 ± 0.03 IU/dL olduğu, gen tedavisi uygulanmış grubun ise FVIII seviye ortalamasının 25.41 ± 33.38 IU/dL' ye yükseldiği saptanmıştır ($p < 0.01$). Bu araştırma ile literatürdeki çalışmalara alternatif olarak Hemofili A gen tedavisinde yeni bir yöntemin geliştirilmesi sağlanmış, *in vivo* hayvan modelleri ve klinik denemelere katkı sağlayacak bir çalışmanın ilk adımları atılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gen Tedavisi, Hemofili A, Lentivirüs, Mezenkimal Kök Hücre.

İNGİLİZCE ÖZET

Hemşinlioğlu C. (2022). Development and In Vitro Efficacy of Transgenic Stem Cell Platform for Hemophilia A Gene Therapy, Ph.D. Thesis, Biruni University Graduate School of Education, Istanbul.

Hemophilia A affecting approximately %80 of patients with hemophilia, is an X-linked recessive inherited bleeding disorder caused by deficiency of Factor VIII (FVIII) protein. While patients are presented with intra-articular and intramuscular bleeding, the degree of factor deficiency determines the frequency and severity of bleeding. Plasma- derived therapies and recombinant factor concentrates are used to control and treat the bleeding symptoms. The objective of this study is to design a gene therapy for FVIII deficiency, which is responsible for Hemophilia A. For this purpose, a lentiviral vector with EF-1 alpha promoter, B domain deleted Factor VIII gene sequence, and CD45 R0 truncated surface marker (EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t) was designed. The goal of the current study is to develop a gene therapy that can be secured from the immune response by transducing mesenchymal stem cells, can be tracked in vivo due to its surface marker (CD45R0t) and can provide non - toxic and functional FVIII secretion. After the characterization and quality control tests of FVIII encoding lentivirus, transduction efficiency with mesenchymal stem cells, FVIII persistence, and expression analyzes were performed. The presence of the FVIII protein was also confirmed by the Western Blot method. The lentivirus (LTR sequence) developed has been tested to be non-replicative, safe by polymerase chain reaction (PCR) analysis. Time-dependent alterations of FVIII secretion was evaluated using the Elisa method. The functionality of the factor VIII protein was demonstrated using mixing test through activated partial thromboplastin time (aPTT) and FVIII levels. There was no statistically significant difference in FVIII secretion over time, signifying that stable levels of FVIII were achieved ($p > 0.05$). In the mixing test analyses, FVIII deficient human plasma products with and without gene therapy were compared in terms of aPTT and FVIII levels. When aPTT levels were evaluated; it was observed that mean aPTT levels of the group that did not receive gene therapy was 92.69 ± 11.38 seconds, while the mean aPTT levels of the group that received the gene therapy were decreased to 38.60 ± 13.38 seconds ($p < 0.001$). When FVIII levels were evaluated, it was found

that the mean FVIII level of the group that did not receive gene therapy was 0.41 ± 0.03 IU/dL, while the mean FVIII levels of the group that received gene therapy increased to 25.41 ± 33.38 IU/dL ($p < 0.01$). As an alternative to previous studies, the current study introduces a new method in Hemophilia A gene therapy, the first steps to contribute to *in vivo* animal models and clinical trials have been taken.

Keywords: Gene Therapy, Hemophilia A, Lentivirus, Mesenchymal Stem Cell.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hemofili hastalığı, dünya çapında ~ 400.000 kişiyi etkileyen X' e bağlı geçiş gösteren kalıtsal bir hastalıktır (Viiala, Larsen and Rasko, 2009). Hemofili kanın pıhtılaşmasında, rol alan Faktör VIII' in (FVIII) veya Faktör IX' in (FIX) kalıtsal olarak eksikliği, yokluğu veya disfonksiyonuna bağlı ortaya çıkmaktadır. Hemofili hastalığı ikiye ayrılmaktadır. Hemofili A, FVIII' in eksikliği nedeniyle kaynaklanırken, Hemofili B ise Faktör IX' in (FIX) eksikliği veya fonksiyon bozukluğundan kaynaklanmaktadır. Hemofili A' nın, hemofili hastalarının yaklaşık % 80-85' ini, Hemofili B' nin ise popülasyonun kalan % 15' i etkilediği bilinmektedir (Chuah et al., 2013).

Hemofili A, hastalarının ortalama %70' i ailesel kalıtım gösterirken %30'u ise spontan de novo mutasyonlar ile karakterize olmaktadır (Türk Hematoloji Derneği, 2011). Genel olarak, kanamanın ciddiyeti, FVIII seviyesi ile doğru orantılıdır. Etkilenen bireyin kanında mevcut FVIII seviyesine bağlı olarak hafif, orta veya şiddetli Hemofili A hastası olarak sınıflandırılmaktadır. Hastaların %60' ı şiddetli vakalardan oluşmaktadır. Kanama belirtileri eklem ve kas kanamalarının yanı sıra ameliyat sonrası meydana gelen kanamalar, oral ve yumuşak doku kanamalarını içermektedir. En sık görülen morbidite nedeni, ise tekrarlayan kanamanın neden olduğu kronik kas-iskelet sistemi hasarlarıdır (THD, 2011). Kanamayı önlemek veya tedavi etmek amacıyla plazma türevli tedaviler ve rekombinant FVIII konsantreleri kullanılmaktadır. Rekombinant pıhtılaşma faktörlerinin uygulanması ağır hemofili A hastalığının modern tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Çocuklarda profilaksinin; primer veya sekonder profilaksi olarak erken başlaması, gelişmiş dünya ülkelerinde altın standart tedavi olarak kabul edilmektedir. Yetişkinlerde ise, eklem fonksiyonunu korumak için profilaksinin uygun şekilde sürdürülmesi gerekmektedir. Mevcut profilaktik rejimler, çok etkili olsalar da, FVIII' e karşı inhibe edici antikor varlığı, uzun vadede hastanın kanama eğiliminin önüne geçmekte yetersiz kalmaktadır (Oldenburg, 2015).

Son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik modifikasyon alanındaki gelişmeler ile tedavi seçenekleri sınırlı olan Hemofili A hastalığında, hastayı uzun ve yorucu infüzyon yükünden kurtarabilecek gen terapisi yöntemlerinin mümkün olabileceğine dair ipuçları bulunmaktadır. Bu noktada amaç, yenilikçi tedavi stratejileri kullanarak hastanın plazma türevli tedaviler ve rekombinant FVIII ihtiyacı olmadan yaşam kalitesini artırarak, genel sağkalım avantajı sağlamaktır.

Klinik deneme aşamasında olan Hemofili A gen tedavilerine bakıldığında bu gen tedavilerinde viral vektörlere sıklıkla da Adeno-İlişkili Virüs' lere (AAV) yer verildiği dikkat çekmektedir. Ancak AAV kullanılarak geliştirilen gen tedavilerinin birçok sorunu bulunmaktadır. Bu sorunlardan ilki, AAV ile gerçekleştirilen gen tedavilerinin immün reaksiyonlara neden olmasıdır (Ronzitti et al., 2020). Bir diğer sorun ise AAV'nin viral doğası gereği toplumda AAV' ye karşı antikor varlığı (Calcedo, et al., 2009) ve transdükte olduğu hücrede ekstrakromozomal kalmasıdır (Chuah et al., 2013). Bu sebeple AAV ile gerçekleştirilen gen tedavilerinde zamanla ekspresyon kaybı görülmekte veya gen aktarımının etkisiz olmasına neden olmaktadır.

Lentivirüsler kullanılarak gerçekleştirilen gen tedavileri ise HIV enfeksiyonunun toplumdaki düşük prevalansı, transdükte edildiği hücre DNA' sına istikrarlı bir şekilde entegre olması sebebiyle sürdürülebilir (çoğalan hücrelerde de gen ifadesinin devam etmesi) bir gen ekspresyonu sağlamaktadır (Vannucci et al., 2013). Bununla birlikte vektörün lentiviral kaynaklı kullanımı gen tedavisinin direkt viral uygulamaların haricinde transgenik hücreler ile de yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Literatürde yapılan son çalışmalar Hemofili A tedavisinde lentiviral vektör kullanımına yönelmiştir. Doering ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada hematopoetik kök hücreler transdükte edildikten sonra monositlere diferansiye edilerek hücresel olarak stabil gen aktarımı denenmiştir. Ancak, hematopoetik kök hücrelerin transdüksiyonu sonrası monositer diferansiyasyonundaki zorluklar bu uygulamanın henüz klinikte yer bulamamasına neden olmaktadır (Doering et al., 2018). Bu sorunlar; yeni nesil, güvenli, stabil, ve düşük antijenik özellik gösteren viral gen aktarımının geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

Bununla birlikte transdükte edilen hücreler ile gerçekleştirilen gen tedavileri yenilikçi tedavi stratejileri olup hematopoetik kök hücreler dışında daha kolay elde edilebilen hücre grupları ile de gen tedavisi yapılabilmesinin yolları aranmalıdır.

Bu nedenle çalışmamız kolay üretilen, vücutta yaygın olarak bulunan ve yüksek bölünme kapasitesine sahip mezenkimal kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sayede transgen stabilitesinin ve güvenliliğinin kontrol edilebileceği mezenkimal kök hücrelerde lentivirüs aracılı transgenik FVIII aktarımının *in vitro* ve *ex vivo* araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemofili A'nın Tarihi

Babil Talmudunun (2. yüzyıl), Yevamoth 64b dafında “Çünkü öğretili: Eğer kadın, ilk çocuğunu sünnet ettirirse ve o ölürse (ameliyattan kaynaklanan kanama sonucu) ve ikincisi de (benzer şekilde) ölürse, üçüncü çocuğunu sünnet ettirme yükümlülüğünden muaftır.” ibaresi yer almaktadır. Bu sözler Rabi (Haham Yehuda, Mişna'nın derlenmesini sağlayan kişi)' ye aittir (Aktaran: Rosner, 1969). Bu sözlerin yanında, Haham Simeon ben Gamliel şunları söylemiştir: “Üçüncü çocuğu sünnet edin ancak dördüncü çocuğu sünnet ettirmeyin.” (Aktaran: Rosner, 1969). Bu sözler değerlendirildiğinde, o dönemlerde her ne kadar din insanları hastalığın geçiş kaynağının maternal olduğu konusunda aynı fikirde olsalar da tekrarlayan olayların sayısı bakımından farklı görüşleri benimsedikleri görülmektedir. Talmud hukukunda tekrarlayan olayların spesifik bir nedene mi bağlı, yoksa şans eseri mi gerçekleştiği konusunun anlaşılabilmesi için bir model oluşturma gerekliliğinden bahsedilmektedir. Herhangi bir tanı formunun mümkün olmadığı zamanlarda; Haham Yehuda'nın görüşü esas alınmakta ve iki tekrarlayan olay sonrası üçüncü olayın gerçekleşmesini önlemek için üçüncü çocuk sünnet ettirilmemektedir (Aktaran: Rosner, 1969).

10. yüzyılda Arap - Müslüman hekim olan Ebu'l Kasım El-Zehravi ikinci tıp ansiklopedisi Kitab al-Tasrif' inde (936-1013) علة الدم veya kan hastalığı olarak adlandırdığı bir rahatsızlık göze çarpmaktadır (Aktaran: Asaad et al., 2019). Zamanının çok ilerisinde olan bu hastalık tanımı, Hemofili ile çok uyumlu gözükmektedir. Her ne kadar Ebu'l Kasım El-Zehravi' nin tanımı Hemofili hastalığı ile örtüşüyor olsa da kendisi de o zamanlar hastalığın neden kaynaklandığını bilmediğini itiraf etmiştir. Bununla birlikte, Ebu'l Kasım El-Zehravi bu hastalığın belirli bir köyden yayıldığını ve babadan oğula geçen genetik bir doğası olduğunu düşünmüştür (Aktaran: Ingram, 1976). Hastalığın minor travmalar sonrası kolay kanama semptomları ile karakterize olduğunu gözlemlemiş ve üç çocuğun minor travma sonrası kanama semptomları ile öldüğünü söylemiştir (Aktaran: Kaadan and Angrini, 2010).

Hastalığın tedavisinde kanayan damarın kanama durana kadar koterize edilmesinin gerekliliğine değinmiştir (Aktaran: Asaad et al., 2019). Bu yöntem günümüzde de Hemofili hastalığının en ideal tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadır.

12. yüzyıldaki İbni Meymun kurallarında da Babil Talmudu' ndakine (12. yüzyıl) benzer kurallar benimsenmiştir. Bu görüşü şu sözlerle açıklamaktadır: “Bir kadının ilk oğlu sünnet sonucunda zayıf düşüp ölürse, benzer şekilde ikinci oğlu da sünnet sonucu ölürse (kadının ilk kocası veya ikinci kocası olmasından bağımsız) üçüncü oğul sünnet için uygun görülen zaman olan doğumunun 8. gününde sünnet edilmemelidir. Sünnet operasyonu çocuk büyüyüp gücü yerinde olana kadar ertelenmelidir” (Aktaran: Eisenberg, 2016). İbni Meymun'un bu sözlerinde geçen “zayıf düşmek” deyimi kan kaybını ifade etmektedir (Aktaran: Eisenberg, 2016). Çocuğun ancak sağlıklı ise sünnet edilebileceğinin üzerinde dururken, Joseph Karo ise etkilenmiş aileleri “gevşek kanlı” olarak tasvir etmiş ve sünnetin yasaklanması üzerinde durmuştur (Aktaran: Rosner, 1969). İbni Meymun hastalığın erkekten bağımsız olduğunu, kadından geçtiğini saptamıştır. Haham Joseph Karo tarafından derlenen Yahudi hukukunu içeren Şulhan Aruh' ta, İbni Meymun' un görüşüne benzer olarak, etkilenen ailedeki ilk iki çocuk sünnet sonrası vefat etmiş ise 3. çocuk (anne ve babasından bağımsız olarak) tam sağlıklı olana kadar sünnet edilmemelidir ifadesi yer almaktadır (Aktaran: Eisenberg, 2016). Ayrıca etkilenen kadının, kız kardeşinin oğulları da aynı şekilde sünnet sonucunda vefat ederse; diğer kız kardeşinin oğulları da büyüyüp tamamen sağlıklı olduktan sonra sünnet edilmelidir sözleri dikkat çekmektedir (Aktaran: Eisenberg, 2016).

1803' te Philadelphia' lı bir doktor olan John Conrad Otto (1803), “New York Medical Repository” adlı dergide “An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families” isimli bir makale yayınlamıştır (Aktaran: Ingram, 1976). Bu makalede kanama bozukluğunun kalıtsal olduğunu ve etkilenmemiş anneden oğullarına geçtiğini ifade etmiştir. Erkekleri “kanayanlar” olarak adlandırmıştır. Otto (19. yüzyıl) , bu hastalığı 1720 yılında Plymouth, New Hampshire' de yaşayan bir kadın hastayı takibi sırasında tanımlamaya başlamış ve bu sayede 19. yüzyılda geniş bir literatüre sahip olacak olan bu hastalığa ait bilgilerin temelini atmıştır (Aktaran: Ingram, 1976).

Daha sonra 1828’ de, Z r h  niversitesi’ nde görev yapan Profesör Dr. Schonlein’ in  ğrencisi Friedrich Hopff (1828) " ber die H mophilie oder die erbliche Anlage zu t dtlichen Blutungen’’ (Hemofili veya kalıtsal ölümcül kanamaya yatkınlık) başlıklı tezini yayınlamıştır (Aktaran: Schramm, 2014). O zamanlar bu hastalığı tanımlamak için hemore, idiosyncrasia hemorajika, hematofili, kanama hastalığı, kalıtsal hemorajik diyatezi gibi birçok isim kullanılmıştır. Ancak, Hopff’un 1828 tarihinde kullandığı “hemofili, kan sevgisi” terimi bu hastalığı tanımlamak için geniş kesimlerce kabul edilmiştir (Aktaran: Schramm, 2014).

Hemofili hastalığının genetik olarak ilk açıklamaları 1820’ de Nasse (1820) tarafından yapılmıştır. Bu açıklamalar tarihe “Nasse Yasası” olarak geçmiştir (Aktaran: Schramm, 2014). Bu yasa ile hemofili hastalığının etkilenmemiş kadınlardan  ğullarına geçtiği ortaya koyulmuştur. Bu makale, daha ileri bilimsel tartışmalara yol açmış ve Grandidier (1855), Legg (1872) ve Immermann’ ın (1879) yayınları birbiri arkasını takip etmiştir (Aktaran: Schramm, 2014). 1890 yılında ise König (1890) ilk kez Hemofili hastalığının en karakteristik semptomunun eklem tutulumu olduğunu ayrıntılı olarak anlatmıştır (Aktaran: Schramm, 2014).

2.1.1. Kraliyet Ailesi’nde Hemofili A

Hemofili, 19. ve 20. yüzyıllarda Avrupa kraliyet tarihinde önemli bir yer tutmuştur. Kraliçe Victoria, beş kızından ikisi (Prenses Alice ve Prenses Beatrice) aracılığıyla mutasyonun  spanya, Almanya ve Rusya kraliyet aileleri de dahil olmak üzere kıtadaki çeşitli kraliyet ailelerine geçmesine yol açmıştır (Aktaran: Ingram, 1976). Bu nedenle, bir zamanlar hemofili “kraliyet hastalığı” olarak adlandırılmıştır. Hemofili hastalığının Avrupa kraliyet ailelerine yayılması, hastalık hakkında tıbbi bilginin gelişmesinde çok önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmıştır.

 ngiltere Kraliçesi Victoria’ nın 8.  ocuğu Albany D k  Leopold, hemofili hastası olarak dünyaya gelmiştir.  ki kızının da taşıyıcı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hastalık 3 torununa geçmiş ve torunlarının çocuklarında da aynı hastalık görülmüştür. Leopold birçok kez kanama semptomları göstermiş olup, 1868’de  ngiliz Tıp Dergi’ si Leopold’ un 15 yaşında ciddi bir kaza sonucu aşırı derecede kanamasının olduğu ve hayati tehlike arz ettiğini yazmıştır.

29 yaşında Helen ile evlenmiş ve iki yıl sonra kafa travması sonucu beyin kanamasından dolayı vefat etmiştir (Aktaran: Lannoy and Hermans, 2010). Ölümünden bir yıl önce kızı Alice dünyaya gelmiş ve onun da Rupert adında hemofili hastası bir oğlu olmuş ve Rupert' de 21 yaşında beyin kanamasından dolayı hayatını kaybetmiştir (Aktaran: Rushton, 2011).

Leopold'un taşıyıcı iki kız kardeşinden biri olan Alice, IV. Louis ile evlenmiş ve oğullarından biri (Frederick) 3 yaşında kanamadan vefat etmiştir, iki kızının ise hemofili hastası oğulları olmuştur (Aktaran: Rushton, 2011).

Alice'in taşıyıcı kızlarından biri olan Hesse Prensesi Irene, kuzeni Prusya Prensi Henry ile evlenmiş ve üç oğlundan ikisi bu hastalıktan etkilenmiştir (Aktaran: Lannoy and Hermans, 2010). Taşıyıcı kızlarından Hesse Prensesi Alix ise, daha iyi bilinen adıyla Alexandra, Rusya Çarı II. Nicholas ile evlenmiştir. Hastalığı oğlu Tsarevitch Alexei' ye geçirmiş ve 13 yaşında Bolşevikler tarafından öldürülmüştür. Alexei' in hastalığı, 1917 Rus Devrimi sırasında Rus İmparatorluğu' nun çöküşüne katkıda bulunan faktörlerden biri olarak gösterilmiştir (Aktaran: Lannoy and Hermans, 2010).

Leopold' un diğer taşıyıcı kızkardeşi olan Beatrice' in hastalığı Prenses Victoria Eugenie, Prens Leopold ve Prens Maurice' a geçirdiği düşünülmektedir. Prenses Victoria Eugenie mutasyonlu geni Infante Alfonso, Infante Gonzalo'ya geçirmiştir (Aktaran: Ingram, 1976). İspanya'nın Infante Alfonso' su 31 yaşında trafik kazası sonrası kanamadan vefat etmiştir. Infante Gonzalo ise 19 yaşında trafik kazası sonrası kanamadan vefat etmiştir. Prens Leopold ise diz ameliyatı sırasında 32 yaşında vefat etmiştir. Prens Maurice 1914 yılında 1. Dünya Savaşı'nda 23 yaşında öldürülmüştür (Aktaran: Ingram, 1976).

2.1.2. Son Yüzyıllarda Hemofili A

19. yüzyılın başında bazı araştırmacılar hemofili hastalığının bir vasküler problem olduğunu düşünmüşler ancak 1830' larda Wardrop (1835) ve Lane (1840) tarafından bunun bir kan pıhtılaşma problemi olduğu görülmüştür (Aktaran: Ingram, 1976).

Paul Morawitz (1905) 1905 yıllarında koagülasyon faktörlerini koagülasyon şemasına yerleştiren, kalsiyum (Faktör IV) ve doku tromboplastin (Faktör III) varlığında protrombinin (Faktör II) trombine dönüştüğünü gösteren kişi olmuştur (Aktaran: Boulton, 2006). Addis (1910, 1911) protrombinin trombine dönüşümünde bir gecikme olduğunu düşünürken o senelerde Howell (1914) protrombin proteinin kanda azaldığı üzerinde durmuştur (Aktaran: Macfarlane, 1948). Araştırmacılar bu sonuca o zamanlar protrombinin hazırlanmasında standart bir metot olan plazma fraksiyonu çalışması sırasında elde ettikleri veriler üzerinden varmışlardır.

1935 yılında A.J. Quick (1935) kandaki protrombin ölçümüne farklı bir bakış açısı getirmiştir. Quick, tromboplastin oranının fazla, kalsiyum iyonlarının optimum seviyede bulunduğu ortamda pıhtılaşma zamanını ölçülebileceğini ileri sürmüştür, halen kullandığımız “Protrombin Zamanı” ölçümünün temeli Quick’ın bu teorisi ile atılmıştır (Quick et al., 1935). Ancak yaptığı test ile protrombin zamanının Hemofili hastalığında normal olduğunu bulmuştur.

1941 yılında Hemofili’ de pıhtılaşmanın geciktiğini ve pıhtılaşma zamanının platelet sayısının azalmasından sonra uzadığını göstermiştir (Quick and Favre - Gilly, 1949). 1947 yılında Paul Owren, dört faktörlü pıhtılaşma kavramına meydan okuyan protrombinin trombine dönüşümünde rol oynayan bir kofaktör olan Faktör V’ i keşfetmiştir (Aktaran: Macfarlane, 1948) .

Faktör VIII 1937’ de A.J. Patek ve F.H.L. Taylor tarafından keşfedilmiş olup, intravenöz olarak plazma presipitatlarının verilmesinin kanama zamanını kısalttığını ortaya koymuşlardır. 1939’ da Amerikalı patoloğ Kenneth Brinkhous, hemofili hastalarının daha sonra anti-hemofilik faktör adını verdiği plazma faktöründe bir eksiklik olduğunu göstermiştir (Langdell et al., 1953). 1952’ de Loeliger, bu faktörü VII olarak adlandırmıştır (Loeliger and Koller, 1952).

Quick (1941), hemofili hastalığındaki temel kusurun hemofilik trombositlerin sertliği, trombositlerin parçalanması ve tromboplastinin serbestlenmesine ait olduğunu düşünmüştür ancak Patek ve Stetson (1936) normal trombositlerin hemofilik kana eklenmesi sonucu pıhtılaşma zamanının kısalmadığını, hemofilik trombositlerin normal kanda işlevlerinden bir şey kaybetmediğini göstermişlerdir (Aktaran: Ingram, 1976). Bu gösterim ile birlikte hemofili ve trombosit ilişkisi popülerliğini kaybetmiştir.

Addis 1911 yılında normal kanın protrombininden elde edilen küçük bir preparatın uzamış olan pıhtılaşma zamanını belirgin şekilde düzelttiğini göstermiştir. Bundan tam yirmi yıl sonra, Belçika'da Govaerts ve Gratia (1931), Addis'in gözlemlerini geliştirmiş ve normal plazma fraksiyonunun protrombin ile ilgili olamayacağını ortaya koymuştur (Aktaran: Ingram, 1976).

1950' lerin başında, Oxford'da Merskey ve Macfarlane hemofilik kanı seri seyreltme işlemine tabi tutarak kanın pıhtılaşma sürelerini test etmiştir (Merskey and Macfarlane, 1951). Graham ve arkadaşları kanın pıhtılaşma sürelerine bakarken protrombin dönüşümünü temel almışlardır (Graham et al., 1951). Daha sonra çok sayıda teknik önerilmiş ve en sonunda bilgisayarlı sistemler kullanılarak pıhtılaşma zamanı ölçülmeye başlanmıştır.

Tüm bu çalışmalar hemofili hastalığının antihemofilik globülinin azalması olarak yeniden tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Antihemofilik globülin 1962 yılında Wright tarafından Roman rakamı ile VIII olarak uluslararası antlaşma ile kabul edilmiştir (Wright, 1962). Bu sayede hemofili Merskey' in 1950 - 1951 tarihlerinde ortaya koyduğu gibi pıhtılaşma sürelerinin normal olabildiği ve farklı şiddetteki vakaların bulunabildiği, FVIII seviyelerine bakılarak teşhis koyulabilecek, X'e bağlı geçiş gösteren kalıtsal bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Merskey, 1950; Merskey and Macfarlane, 1951).

1971'de Ratnoff ve arkadaşları tavşandan, normal insan serum faktör VIII proteinine karşı bir antiserum üretmişlerdir ve ürettikleri bu antiserum/antikoru insan kanında bulunan Faktör VIII aktivitesini nötralize ettiğini (presipitin hattı oluşumu) göstermişlerdir.

Ancak Hemofili plazmasını test ettiklerinde Faktör VIII olmamasına rağmen presipin hattı oluşumunu gözlemlemişlerdir. Bu verilerle birlikte Hemofili hastalığı yeniden tanımlanmış, cinsiyete bağlı, resesif bir pıhtılaşma bozukluğu olup, biyolojik olarak Faktör VIII'in olduğu fakat işlevsel olarak bozulmuş olduğunun altı çizilmiştir. Bu çalışmasının devamı olarak etkilenmemiş ancak taşıyıcı kadınların kanlarında hem işlevsel olarak normal ve hem de bozuk Faktör VIII proteinine rastlanmıştır (Zimmerman et al., 1971).

2.2. Hemofili A

Hemofili, hemostaz sisteminde yer alan pıhtılaşma faktörleri olan FVIII ve FIX' un eksikliğine bağlı olarak kanamalarla seyreden kalıtsal bir hastalıktır. Faktör VIII eksikliği Hemofili A, Faktör IX eksikliği Hemofili B olarak tanımlanmaktadır. Hemofili A hastalığı Hemofili B hastalığına göre daha sık rastlanmaktadır. Hemofili A 5000 canlı erkek doğumda bir görülürken, Hemofili B ise 30000 canlı erkek doğumda bir görülmektedir (Carcao, 2012).

Her iki faktöründe genleri X kromozomunda yer almaktadır ve hastalık X' e bağlı resesif kalıtım göstermektedir (Berntorp et al., 2021). X' e bağlı resesif kalıtılan birçok hastalıkta olduğu gibi Hemofili hastalığında da etkilenmiş geni taşıyan, tek X kromozomuna sahip erkekler hastalanırken; iki X kromozomuna sahip kadınlar çoğunlukla taşıyıcı olmaktadır. Bununla beraber, Turner Sendromuna sahip kadınlarda (tek bir X kromozomuna sahip kadınlar) veya daha da nadir olmakla birlikte iki defektif X kromozomuna sahip kadınlarda da hastalık görülebilmektedir (Wadelius et al., 1993; THD, 2011).

Hemofili hastalarının en sık klinik semptomu kanamaya eğilimdir. Hastalığın sınıflandırılması hastaların kanlarında bulunan faktör seviyesine göre yapılmaktadır; faktör seviyesi $<1\%$ ise ağır hemofili olarak sınıflandırılmaktadır. Hemofili A hastalarının $2/3$ ' ü, Hemofili B hastalarının ise $1/2$ ' si ağır hastalık sınıflamasına girmektedir (White et al., 2001).

2.3. Hemofili A Tanı ve Klinik Semptomlar

Hemofili A' nın tanısı genellikle erken çocukluk döneminde konulmaktadır. Hemofili A hastalarında primer hemostaz mekanizması etkilenmediği için hastalarda ufak yaralanmalar sonrası kanama görülmemektedir. Hemofili A hastalarının ilk yıllarında kolay morarma, eklem içi ve kas içi kanamaları ve girişimsel uygulamalar sonrası normalden uzun süren kanama semptomları görülmektedir (Kulkarni et al., 2017). Semptomların derecesi kandaki Faktör seviyesi ile doğru orantılıdır. Faktör seviyesi çok düşük olan hastalarda semptomlar daha ağır ve erken yaşlarda görülmektedir (White et al., 2001).

Hemofili A hastalığının tanısını Hemofili A tanısı olan aile bireylerinin varlığı kolaylaştırmaktadır. Hemofili A tanısı genel olarak kanama öyküsü olan hastalarda koagülasyon testleri ile büyük ölçüde konulurken, faktör seviyelerinin ölçümü ve genetik testlerle bu tanı netleştirilmektedir (Bolton et al., 2003).

Tablo 2.1 Hemofili A'nın Plazmadaki Rezidüel FVIII Aktivitesine Göre Sınıflaması ve Kanama Semptomları

Faktör Seviyesi	Hastalık Şiddeti	Kanama Semptomları
<1 IU/dL(<0.01 IU/mL) ya da <%1 aktivite	Ağır	Spontan eklem ve kas kanamaları
1-5 IU/dL(0.01-0.05 IU/mL) ya da %1-5'i aktivite	Orta	Aralıklı spontan kanamalar Minör travma ve cerrahi sonrası uzamış kanama
5-40 IU/dL(0.05-0.40 IU/mL) ya da %5-40 aktivite	Hafif	Nadir spontan kanama Major travma ve cerrahileri takiben ciddi kanamalar

(White et al., 2001)

Hafif Hemofili A tanısı olan bireyler çoğunlukla nadir spontan kanama ve majör travma veya cerrahi sonrası ciddi kanama semptomları ile kliniğe başvurmaktadır. Bu nedenle hafif olgular daha geç yaşta tanı almaktadır (Chambost et al., 2002).

Oysa ki orta ve / veya daha ciddi faktör eksikliği olan bireyler daha erken yaşta spontan eklem ve kas içi kanamaları ya da minör travma, cerrahi sonrası şiddetli kanamalar ile kliniğe başvurmakta ve bu sebeple daha erken yaşta tanı almaktadır. Hemofili A hastalarının ortalama tanı yaşları, orta faktör eksikliği olan olgularda 22 ayken, ciddi faktör eksikliği olan olgularda 9 aya kadar düşmektedir (Chambost et al., 2002).

Hastaların en sık başvuru şikayeti kas, eklem içi kanamalardır. Ağır Hemofili A hastaları yenidoğan döneminde forceps ve vakum kullanımına bağlı olarak sefal hematoma, göbük kordonunda kanama ve enjeksiyon alanlarında kanama ile fark edilebilmektedir (Kulkarni et al., 2017). Yaşları ilerledikçe ve fiziksel aktiviteleri arttıkça bebeklerde eklem ve kas içi kanamaları gelişebilmektedir (Van den Berg et al., 2007). Hastaların yaklaşık %30'unda sünnet sonrası durdurulamayan kanama ilk başvuru semptomu olarak görülmektedir. Daha ileri yaşlarda ve erişkinlerde en sık görülen problem kas ve eklem içi kanamalarıdır ve çoğunlukla eklem, kas hasarı ile sonuçlanmaktadır (THD, 2011).

Hastaların klinik tablosunu kanama bulgularının yanı sıra, kanama komplikasyonları da belirlemektedir. Ağır Hemofili hastalarında kanama en sık eklem ve kas içinde görülmektedir. Kanamanın en sık görüldüğü eklemler; ayak bileği, diz, dirsek, kalça ve omuzdur (Stephensen et al., 2009). Tekrarlayan kanamalar sonrası gelişen tablo kronik hemofili artropatisi olarak tanımlanırken, ilerleyen dönemde eklem deformitesi, ağrı, hareket kısıtlılığı ve buna bağlı kas atrofisi gelişmektedir. Kas ve doku içi kanamaları ise sıklıkla alt ekstremitelerde, ilipsoas kası ve ön kolda görülmektedir (Valentino, 2010; THD, 2011; Carcao, 2012).

Kas içi kanamalar sonucunda duysal ve motor sinirler ile arteriyel dolaşım etkilenebilmektedir. İlerleyen dönemlerde etkilenen bölgede kalıcı sakatlık gelişebilmektedir (THD, 2011; Bolton-Maggs and Pasi, 2003). Hastalarda daha az

oranda ağız, diş eti ve burun kanamaları görülmektedir. Spontan diş ve diş eti kanamalarına karşın Hemofili A hastalarında ağız hijyeni özellikle önem taşımaktadır (Hitchings, 2011).

Tablo 2.2 Hemofili A Hastalarında Görülen Kanama Semptomları ve Sıklıkları

Kanama Yeri	Kanama Sıklığı
Hemartroz	%70-80
Kas/Yumuşak Doku Kanamaları	%10-20
Diğer Kanamalar	%5-10
Santral Sinir Sistemim Kanaması	<%5

(Srivastava et al., 2013)

Hemofili A hastalığında hayatı tehdit eden kanamalar, merkezi sinir sistemi kanamaları, baş-boyun ve gastrointestinal sistem kanamalarıdır. İntrakraniyal kanamalar mortalite ve morbidite nedeni olarak ilk sırada yer almaktadır. Hastalarda bu tür kanamalardan şüphelenildiğinde acil olarak tedaviye başlanması ve eksik faktörün yerine konulması gerekmektedir (Ljung, 2008; THD, 2011).

Tablo 2.3 Hemofili A Hastalarında Görülen Kronik Komplikasyonlar

Kronik Komplikasyonlar	
Kas İskelet Sistemi	Kronik hemofilik artropati Kronik Sinovit Kalıcı sakatlıklar Psödotümör Kırık ve çatlaklar
İnhibitör Gelişimi	Alloantikör
Transfüzyonla İlişkili Enfeksiyöz Hastalıklar	HIV HBV HCV Parvovirüs B19 Diğerleri

(THD, 2011)

2.4. Hemofili A Laboratuvar Bulguları

Hemofili A hastalığında aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) testi tarama amacıyla kullanılmaktadır. Hemofili A hastalığında aPTT uzamış olarak bulunmaktadır. Bununla birlikte, faktör seviyelerinin %15' in üzerinde olduğu vakalarda aPTT normal bulunmaktadır. Hastalarda protrombin zamanı (PZ), trombin zamanı, kanama zamanı, trombosit sayı ve fonksiyonlarında ise herhangi bir anormallik saptanmamaktadır (THD, 2011).

Hemofili hastalığı dışında aktive parsiyel tromboplastin zamanının uzun bulunduğu diğer durumlar, FVIII ve FIX' a karşı gelişen inhibitör varlığı, Faktör XII (FXII), prekallikrein ve yüksek molekül ağırlıklı kininojen eksikliğidir. Bu nedenle, hemofilinin ayırıcı tanısında von Willebrand hastalığı, FVIII veya FIX' a karşı inhibitör varlığı, herediter Faktör XI, FXII eksikliği, antifosfolipid antikör (lupus antikoagülan) varlığı, ağır moleküllü kininojenlerin ve prekallikreinlerin herediter eksikliği mutlaka düşünülmelidir (THD, 2011; Hoots and Shapiro, 2022).

Hemofili A hastalığının ön tanısında aPTT' si uzun olan hastada inhibitör varlığını saptamak için karışım testi uygulanmaktadır. Karışım testinde, 1:1 oranında Hemofili A hasta plazması ile sağlıklı olduğu bilinen kişinin plazması karıştırılmaktadır. Karışım testi sonrası aPTT testinde %50'den fazla düzelme görülüyorsa faktör eksikliği, %50' den fazla düzelme görülüyorsa inhibitör varlığı düşünülmelidir. İnhibitör varlığı söz konusu olduğunda transfüze edilen faktörün yarı ömrü kısalmakta ve tedaviye yanıtızık gerçekleşmektedir. İnhibitör varlığı 3 şekilde karışımıza çıkabilmektedir. Bunlardan ilki ilaçlar, ikinci FVIII' e karşı gelişmiş antikor varlığı, üçüncüsü ise non-spesifik antikorlardır (Kershaw et al., 2009; THD, 2011). İnhibitör varlığının kesin tanısı ve inhibitörün titresi modifiye Bethesda Testi ile saptanmaktadır (Peake et al., 1995; Verbruggen et al., 1995).

2.5. Hemostaz

Hemostaz, vasküler yaralanma sonrası aşırı kan kaybını önleyen fizyolojik bir mekanizmadır. Bu mekanizma birbirini aktive eden birçok basamaktan oluşmaktadır. Bu basamaklar kanamanın durması için gerekli olan fibrin tıkaçının oluşması ile son bulmaktadır. Bu süreç yaralanmanın ardından saniyeler içinde etkinleşecek şekilde düzenlenmekte ve yaralanma bölgesinde lokalize kalmaktadır (Gale, 2011).

Hemostaz iki bileşenden meydana gelmektedir: primer ve sekonder hemostaz. Primer hemostaz, aynı zamanda kanamaya trombosit cevabı olarak da bilinmektedir. Primer hemostaz; vazokonstriksiyon, trombosit adezyonu ve trombosit agregasyonunu yani trombosit tıkaçı oluşumunu ifade etmektedir (Periayah et al., 2017; LaPelusa and Dave, 2022). Sekonder hemostaz, proteolitik pıhtılaşma kaskadı tarafından üretilen çözünmeyen fibrin birikimini ifade etmektedir. Bu çözünmeyen fibrin, trombosit tıkaçını ve çevresini içine alan bir ağ oluşturarak kan pıhtısının güçlenmesini ve stabilizasyonunu sağlamaktadır. Bu iki süreç aynı anda gerçekleşmekte ve mekanik olarak birbirini kapsamaktadır (Gale, 2011).

Prokoagülan sistemler ile antikoagülan sistemler arasındaki denge, patolojik kanama veya trombozdan kaçınmak için kritik öneme sahiptir.

2.5.1. Primer Hemostaz

Sağlıklı damar yapısına sahip bir insanda damar endotel yapısından salgılanan nitrik oksit ve prostasiklin, damarın vazodilatasyon halinde kalmasını ve trombositlerin inaktive bir şekilde damar içinde akmasını sağlamaktadır. Sağlıklı kan damarlarında vazodilatasyon hep vazokonstriksiyona üstün gelmekte bu sayede kan, damar içinde herhangi bir engel olmadan akmaktadır.

Vazokonstriksiyon

Yaralanma halinde damarda ilk olarak vazokonstriksiyon cevabı gerçekleşmektedir (Periayah et al., 2017; LaPelusa and Dave, 2022). Bu, sadece ekstravasküler kan kaybının önüne geçmekle kalmaz, aynı zamanda lokal kan akışının yavaşlamasına da neden olmaktadır. Kan kaybını önlemek için gerçekleşen vazokonstriksiyon olayı, iki şekilde meydana gelmektedir. İlki yaralanma sonrası sinir refleksi ile damar düz kas hücrelerine kasılma uyarısı gönderilmektedir. İkinci ise endotelin adı verilen molekül damar duvarından salgılanarak damar düz kaslarının kasılmasını sağlaması sayesinde gerçekleşmektedir.

Trombosit Adezyonu

Yavaşlayan trombositlerin damarın subendotelyal yüzeyine maruz kalmaları sonucu damar duvarına yapışmakta ve pıhtılaşma süreci aktive olmaktadır. Bu süreç, damar hasarını izleyen ilk saniyelerde trombositlerin IIb / IIIa reseptörü ile subendotel kolajene direk olarak da bağlanmaları ile başlamaktadır (Varga-Szabo et al., 2008; Periayah et al., 2017). Bu sayede trombositlerin yaralanan damar bölgesine adezyonu yani yapışması sağlanmaktadır.

Damarın subendotelyal yüzeyinde bulunan von Willebrand Faktörü' n (vWF) yaralanma sonucu açığa çıkması ile vWF kollajene bağlanmaktadır. Trombositler ise üzerlerinde bulunan glikoprotein Ib - IX - V reseptörleriyle vWF' e bağlanmaktadır (Varga-Szabo et al., 2008). Bu sayede trombositler damar lumeni içinde var olan yüksek sürtünme kuvvetine rağmen damar duvarına yapışmış halde kalabilmektedir. Trombositler damar duvarına adezyonu sonrası aktive olmakta ve konformasyonel bir

değişikliğe uğramaktadır (Periyah et al., 2017). Aktive olan trombositler degranüle olmakta, ortama α ve dens granülleri salgılamaktadır (Ruggeri, 2007). Bu granüllerden salgılanan ADP, trombosit agregasyonunun uyarılmasını, kalsiyum ise FXII ile başlayan koagülasyon sisteminin aktifleştirilmesini; diğer bir deyişle sekonder hemostazda yer alan trombosit tıkaçının güçlenmesini sağlamaktadır. Serotonin, damar duvarındaki düz kasların kasılmasını, Tromboksan A2 ise prostasiklinler ile yarışarak damarın kasılmasını ve trombositlerin agregasyonunu kolaylaştırmaktadır.

Trombosit Agregasyonu

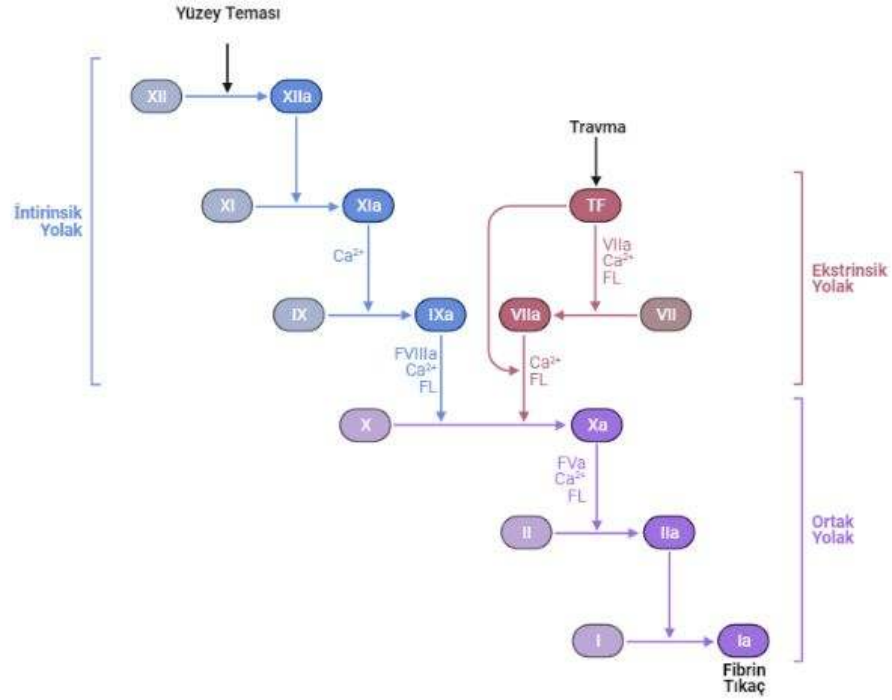
Trombositler aktive olduktan sonra salgılanan agonistlerin trombosit membranındaki ligandlarına bağlanmasıyla glikoprotein IIb / IIIa (GpIIb / GpIIIa) dinlenme halinden aktif hale geçmektedir. Aktive olan ve konformasyonel değişikliğe uğrayan GpIIb / GpIIIa kanda çözülmüş halde bulunan fibrinojen ve vWF' ye bağlanmaktadır (Fullard, 2004; Periyah et al., 2017). Bu sayede, trombositler ve fibrinojen arasında bir köprü oluşmaktadır. Sonuç olarak trombositler stabilize bir tıkaç oluşumuna neden olmaktadır.

2.5.2. Sekonder Hemostaz

Yaralanma bölgesinde primer hemostaz sırasında oluşan zayıf trombosit tıkaçı, sekonder hemostaz sırasında fibrin adı verilen proteinin ağ benzeri yapı oluşturmasıyla güçlenmektedir. Fibrin üretimi trombosit agregasyonu ile aynı anda gerçekleşmektedir (Falati et al., 2002; Furie, 2009).

Yaralanma halinde pıhtılaşmanın travmaya in vivo yanıtı olarak sekonder hemostazın başlatılması Doku Faktörü' nün (TF) kana maruz kalmasıyla tetiklenmektedir. Faktör VIIa (FVIIa) için bir kofaktör olan TF damar endotel hücreleri tarafından salgılanmaktadır (Kirchhofer and Nemerson, 1996). Bu faktör, FVIIa ile etkileşime girerek FIX ve Faktör X (FX)' i aktive etmektedir. Bu aktivasyon basamakları sekonder hemostazın ekstrinsik yolağı olarak adlandırılmaktadır. FIXa, kofaktör Faktör VIIIa (FVIIIa) 'nın varlığında FX de aktive etmektedir. Bu aktivasyon ile ekstrinsik yolak ve intrinsik yolağın ortak yolakta birleşmesi sağlanmaktadır (Dahlback, 2000). Ayrıca sekonder hemostazın ortak yolağında yer alan FXa, kofaktör

Faktör Va' nın varlığında protrombini aktive ederek trombine dönüşmesini sağlamaktadır (Dahlback, 2000).



Şekil 2.1 Koagülasyon Kaskadının Şematik Gösterimi (BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

Yaralanma sonrası ekstrinsik yolda pıhtılaşmanın tetiğini salgılayan TF, intrinsik yolda ise kontakt aktivasyonu çekmektedir. İntrinsik yolda, damar yaralanması sonucu subendotelyal dokudaki kollajen yüksek molekül ağırlıklı kalliklerin veya prekalliklerine bağlanmaktadır (Dahlback, 2000). Bu bağlanma ile prekalliklerin aktif olarak kalliklerine dönüşmektedir. Bu dönüşüm Hageman Faktör olarak bilinen FXII' yi aktive etmektedir (FXIIa) (Dahlback, 2000). FXIIa, Faktör XI' i aktive etmekte ve Faktör XIa ise FX' i aktive ederek ortak yolağa giriş yapmaktadır (Dahlback, 2000).

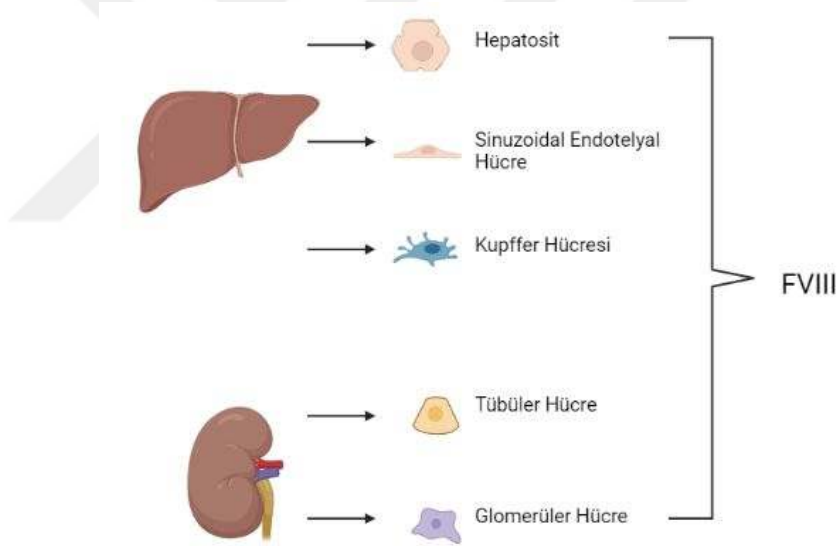
Ortak yolağın en önemli elemanı trombindir. Aktive olan FX, Faktör Va, fosfolipidler ve kalsiyum varlığıyla protrombin trombin dönüşümüne katkıda bulunmaktadır (Periayah et al., 2017). Trombin ise fibrinojenin fibrine aktive olmasını sağlamaktadır. Fibrinler bir araya gelerek fibrin ağ yapısını oluşturmaktadır. Bu

sayede trombosit tıkaçının güçlenmesi ve stabilizasyonu sağlanmaktadır (Periayah et al., 2017).

2.6. Faktör VIII Proteinini ve Moleküler Yapısı

2.6.1. Faktör VIII Proteinini

Faktör VIII proteini esas olarak sinüzoidal endotelial hücrelerden, Kupffer hücrelerinden ve daha az ölçüde de hepatositlerden salgılanmaktadır. Bazı araştırmacılar böbrekteki glomerüllerden ve tübüler epitel hücrelerden de salgılandığını belirtmişlerdir (Oldenburg and El-Maarri, 2006).

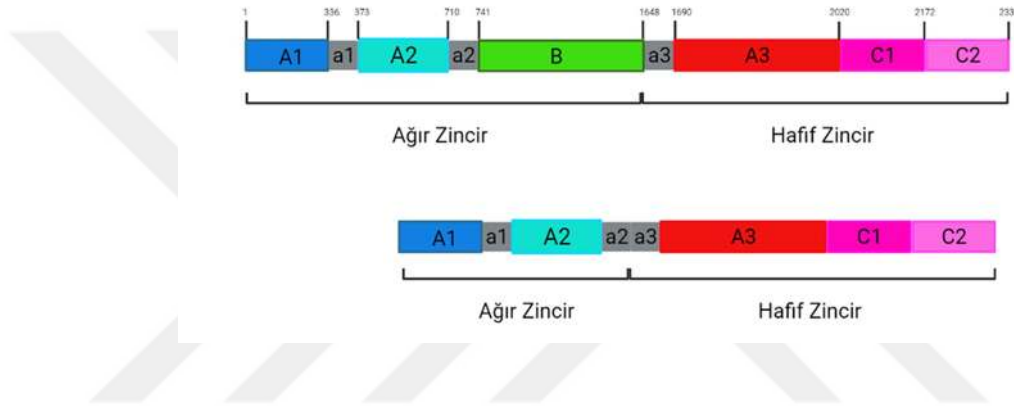


Şekil 2.2 Faktör VIII Proteinin Vücutta Salgılandığı Alanların Şematik Gösterimi (BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

Faktör VIII proteini, FX'in FIXa tarafından aktivasyonunda önemli rol oynayan bir kofaktördür. Pıhtılaşma yolağında yer alan bu plazma glikoproteini sentezlendikten sonra birçok pıhtılaşma faktörü gibi plazmada vWF' e bağlı olarak inaktif bir şekilde bulunmaktadır (Oldenburg and El-Maarri, 2006). vWF' nin görevi, hücreden salınımı sonrası FVIII' i stabilize etmek ve FVIII' in fosfolipidlere bağlanmasını engellemektedir. Bu sayede, FVIII' in proteolizinin önüne geçilmekte ve plazma yarı ömrünü uzatmaktadır (Handin and Wagner, 1989). Faktör VIII proteini,

trombin ya da aktive FX tarafından proteolize uğrayarak aktif hale geçmektedir. Faktör VIII aktif hale geçerken vWF' den ayrılarak negatif yüklü fosfolipidlere bağlanmaktadır (Oldenburg et al., 2004).

Aktive olmuş FVIII' in yapısında bulunan A1 - a1 zincirleri ile A3 - C1 - C2 zincirleri metal iyonu ve hidrofobik etkileşimlerle birbirine bağlanırken (Sudhakar and Fay, 1996), A2 - a2 zinciri ise daha zayıf elektrostatik etkileşimler sayesinde A1' e bağlanmaktadır.



Şekil 2.3 Prekürsör ve Aktif FVIII Proteininin Domain ve Subdomain Yapısının Şematik Gösterimi (BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

Faktör VIII proteinine daha yakından baktığımızda, 19 peptit içeren lider sekans çıkartıldığında, matür sekans 2332 amino asit ve A1 - A2 - B - A3 - C1 - C2 domain yapısından oluşmaktadır (Eaton et al., 1986). Üç asidik subdomain içeren ve A1(a1) - A2(a2) - B - (a3)A3 - C1 - C2 şeklinde gösterilen bu yapı, FVIII' in kendi içinde ve diğer proteinler ile olan etkileşiminde (özellikle trombin ile olan etkileşiminde) önemli bir rol oynamaktadır (Vehar et al., 1984).

Faktör VIII 80 kDa' dan oluşan hafif zincir ve 90- 210 kDa kadar uzayabilen bir ağır zincirden (HC) oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir (Eaton et al., 1986). Her iki zincir divant metal iyonu ile non kovalent bir bağ sayesinde bir arada bulunmaktadır. A1 - a1 - A2 - a2 - B ağır zincirde yer alan domainler iken, a3 - A3 - C1 - C2 hafif zincirde yer almaktadır (Wang et al., 2003).

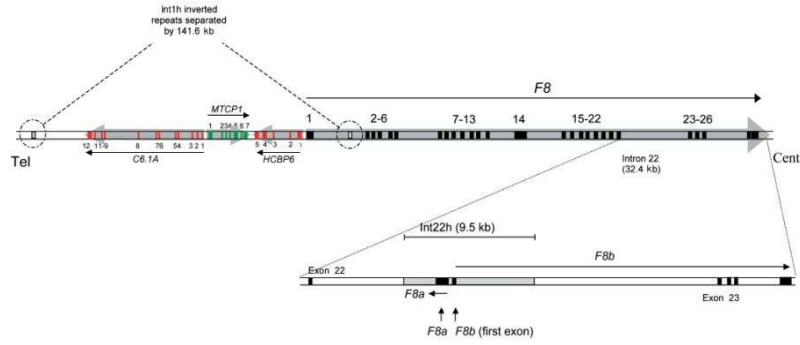
Faktör VIII'in A2 alanı FIXa' ya bağlanabilmek için özel alanlar içermektedir. FIX, bu alanda tam tenaz kompleksini oluşturmak için proteaz alanıyla FVIII' e

bağlanmaktadır. FIXa ayrıca A1 domain' inden A3 domainine kadar FVIII' e bağlanmaktadır. C2 domaini ise FVIII'in fosfolipidlere bağlanmasını sağlamakla birlikte FXa ve vWF' e bağlanmasını sağlayan önemli bölgeleri içermektedir (Saenko et al., 1999).

FVIII' in B domainine bakıldığında ise, büyüklük ve N-glikozile olması bakımından FV' in B domainine benzerlikler göstermektedir. B domainin görevi tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte FVIII'in aktive olması ile FVIIIa' nın yapısında bulunmadığı bilinmektedir. FV' de yer alan B domainin ise faktörün normal işlev görebilmesi için gerekli olduğu bilinmektedir (Pittman et al., 1994).

2.6.2. Faktör VIII Geni

Faktör VIII geni, 1982 - 1984 yılında iki grup tarafından klonlanmıştır (Gitschier, Wood, Goralka, Wion and Chen, 1984; Toole, Knopf, Wozney, Sultzman and Buecker, 1984). FVIII geni, X Kromozomunun Uzun Kolu (Xq28)' nda bulunmakta olup, 26 eksondan oluşan 186 kb (Kilobaz)' lı en uzun / büyük genler arasında yer almaktadır (Oldenburg and El - Maarri, 2006). Eksonların boyutu 69 ile 3106 baz çifti (bp) arasında iken intron bölgelerinin boyutları ise 207 bp ile 32,4 kb arasında değişmektedir (Oldenburg and El - Maarri, 2006). Ekson 14, en büyük ekson olup B domainini kodlamaktadır. FVIII' in Mesajcı Ribonükleik Asit (mRNA)' i ortalama 9,1 kb uzunluğunda ve 2351 amino asit içeren öncü proteinin habercisidir (Oldenburg and El - Maarri, 2006). FVIII geninin büyük intronik yapısı nedeniyle komplike bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.4 Faktör VIII Geninin Xq28’ deki Genomik Organizasyonu
(Oldenburg and El - Maarri, 2006)

İntron 22, FVIII üzerindeki en büyük intronik bölge olarak bilinmektedir. Bu intronik bölge FVIIIa ve FVIIIb adı verilen 2 adet gen lokusu içermektedir. FVIIIa intron içermemekte ve FVIII geniyle zıt yönde transkripte olmaktadır (Levinson et al., 1990). Faktör VIIIb ise FVIII geniyle aynı yönde transkripte olmakta ve son 4 ekzonunu paylaşmaktadır (Levinson et al., 1992). İki gen ortak sitozin guanin (CpG) adacıkları içermektedir ve bu adacıklar çift yönlü promotör görevi görmektedir (Oldenburg and El - Maarri, 2006). Faktör VIIIb gen lokusunun temel işlevi henüz anlaşılamamıştır. Faktör VIIIa ise; Huntingtin proteini ile etkileşime giren 40 kd büyüklüğünde olan bir protein (FVIIIa ayrıca Huntingtin ile ilişkili protein veya HAP40 olarak adlandırılır) (Peters and Ross, 2001) olmakla birlikte bu etkileşimin biyolojik önemi tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.7. Hemofili A Moleküler Patolojisi

Faktör VIII protein eksikliğine yol açan Hemofili A hastalığı FVIII geninde yer alan mutasyonlar sonucu gelişmekte ve FVIII proteininin niteleyici eksikliklerinden dolayı meydana gelmektedir. Bununla birlikte, yaralanma bölgesinde az miktarda FVIII varlığına yol açan nicel bir kusurun da, aynı klinik fenotipe yol açacağı bilinmektedir. İkinci nedene yol açacak kusur, FVIII’ in salgılanmasında veya doğru katlanmasında görev alan taşıyıcı proteinlerdeki mutasyonlardan veya vWF’ deki mutasyonlardan kaynaklanabilmektedir. Bu iki grup dışında klinikte tipik Hemofili A semptomları gösteren ancak mutasyonu belirlenememiş az sayıda hasta bulunmaktadır (Goodeve and Peake, 2003).

Hemofili A'nın değişken fenotiplerine yol açan FVIII genindeki mutasyonları içeren Hemofili A Mutasyon Arama ve Kaynak Sitesi (HAMSTeRS), isimli bir veri tabanında yer almaktadır (<http://europium.mrc.rpms.ac.uk>., Erişim tarihi: 15 Ocak 2021).

Faktör VIII geninde tanımlanan mutasyonlar heterojendir ve başlıca;

1. Gen Düzenlemeleri,
2. Tek Baz Değişimleri,
3. İnsersiyon veya Delesyonlar,

olarak sınıflandırılmaktadır.

Faktör VIII genindeki mutasyonların en sık rastlanılanı intron 22' yi içeren inversiyonlardır ve bu inversiyonlar FVIII genindeki mutasyonların %50' sini içermektedir (Lannoy et al., 2013). Intron 22 inversiyonları dışında, tekrarlayan mutasyon varlığı dikkat çekmektedir.

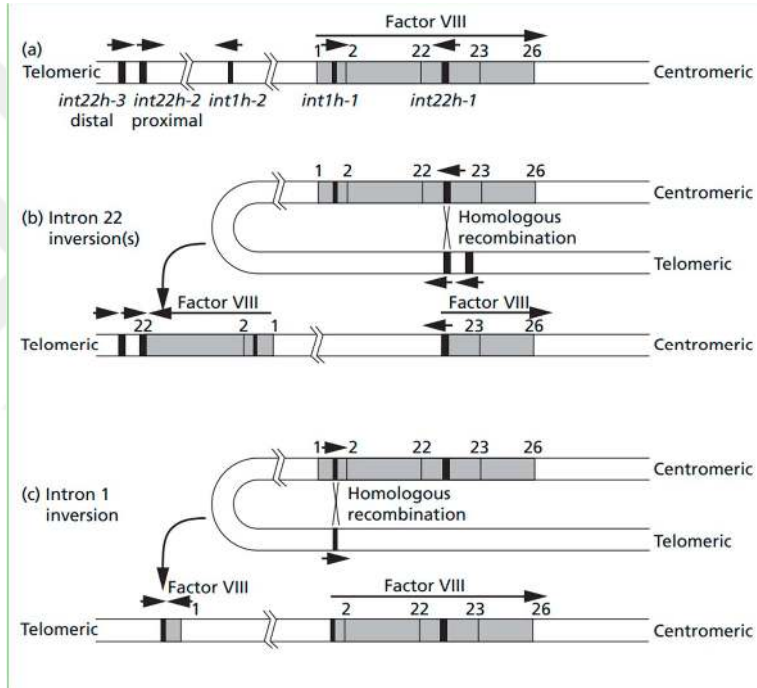
2.7.1. Faktör VIII Geni Mutasyonları

2.7.1.1. Gen Düzenlemeleri

İnsan Faktör VIII geni altı adet büyük intron bölgesine sahiptir. Bu intron bölgelerinden özellikle İtron 1 ve 22 gen düzenlemeleri açısından büyük öneme sahiptir. Çünkü bu iki bölgede meydana gelen patolojik inversiyonlar, Faktör VIII geni dışında yer alan bölgelerle homolog yeniden düzenlemelere neden olmaktadır. İtron 22 inversiyonun mekanizması 1993 tarihinde tanımlanmış olup, şiddetli Hemofili A hastalarının yaklaşık %50' sinden sorumlu olduğu düşünölmektedir (Lakich et al., 1993; Naylor et al., 1993). Faktör VIIIA ve FVIIIB intron sekansı (Int22h - 1) bölgesinde yer almakta olup, genin 3' ucundan yaklaşık 400 kb yukarısında iki homolog kopyaya sahiptir. İtron 22' de gerçekleşen intrakromozomal homolog düzenlemeler, 9.5 kb boyutundaki Int22h-1 ve bu sekansın extragenik homologları (inth22h-2, int22h-3) arasında gerçekleşmektedir (Naylor et al., 1995). Gen düzenlemeleri spermatogenezin mayotik bölünme aşamasında ortaya çıkmakta olup,

büyük bir inversiyon ve translokasyon ile sonuçlanmaktadır. Bu iki yaygın homolog yeniden düzenlemelerden intron 22' nin distal porsiyonunda gelişeni; çoğunlukla şiddetli Hemofili A vakalarında görülürken, proksimal porsiyonunda gelişeni daha hafif vakalarda görülmektedir (Antonarakis et al., 1995).

Günümüzde 22. intronda yer alan yeniden düzenlemeler PCR yönetimi ile tanımlanabiliyor olsa da Southern Blot tekniği ile standart olmayan ve araya giren sekansları içine alan düzenlemeler tespit edebilmektedir (Liu et al., 1998).



Şekil 2.5 Şiddetli Hemofili A Vakalarında FVIII Geninin 1 ve 22 İtron Dizilerini İçeren Gen İnversiyon Mekanizmalarının Basitleştirilmiş Gösterimi.

a-b) Intron 22 ve onun 400 kb uzagındaki telomerik homologue arasındaki rekombinasyon, ekson 1-22' nin ekson 23-26' dan ayrılması; eski sekansin ters çevrilmesi ve homolog sekans bölgesine yer değiştirmesi ile sonuçlanır. a-c). Intron 1 dizisi ve onun telomerik homologue arasındaki rekombinasyon, ekson 1'in yer değiştirmesi ve inversiyonu ile sonuçlanır (Lee et al., 2010).

İntron 22 bölgesinde araya giren sekanslar tanımlanmış olmasına rağmen, şiddetli Hemofili A vakalarının %5' inde genetik bir neden bildirilememektedir. Bu vakaların çoğuna intron 1'de (int1h-1 ile int1h-2 arasında) gerçekleşen rekombinasyonlardan kaynaklanan bir inversiyonun neden olduğu düşünülmektedir. İntron 1'de gerçekleşen yeniden düzenleme bölgesi genin yaklaşık 140 kb yukarısında

yer almakta ve bu düzenleme FVIII'in ekson 1'de yer alan promotörü ile geri kalan FVIII genini ayırıştırılmaktadır. Bu yeniden düzenleme Hemofili A vakalarının ortalama %5' ine denk gelmektedir (Bagnall et al., 2002).

2.7.1.2. Tek Baz Değişimleri

Faktör VIII eksonlarında tek bazın yer değiştirmesi, farklı amino asitlerin kodlanması (missense) veya peptit zincirinin kesilmesine neden olan stop kodonlarının eklenmesi ile sonuçlanabilmektedir. Ek olarak, mRNA kesim bölgelerinde tek baz değişimi, splice varyantların oluşmasına da neden olabilmektedir.

2007 yılına kadar Hemofili A veritabanında tek baz değişimini gösteren 1900 farklı raporda 800' ün üzerinde unique varyant bulunmaktadır. Faktör VIII' in pıhtılaşma aktivitesi, dolaşan antijen seviyesi, hastalığın şiddeti, anti-FVIII inhibitör seviyesi bu raporlarda görülmektedir. Bu raporlara ait bazı analizler aşağıdaki tabloda sunulmaktadır (Lee et al., 2010).

Tablo 2.4 Hemofili A Veritabanındaki 2853 Bireysel Raporun Analizinden Elde Edilen Mutasyon Verilerinin Özeti

		Ciddiyeti				İnhibitör Varlığı	
Hemofili A Mutasyonları		Ciddi (%)	Orta (%)	Hafif (%)	Değişken (%)	Positif (%)	Negatif (%)
Total Unique Mutasyonlar	1221	718 (67)	123 (11)	212 (20)	23 (2)	171 (19)	727 (81)
Unique Tek Baz Varyantlar	809	369 (52)	105 (15)	206 (40)	23 (3)	78 (13)	513 (87)
Missense	583	204 (40)	92 (18)	187 (97)	23 (5)	44 (10)	391 (90)
Stop	131	112 (97)	4 (3)	0 (0)	0 (0)	31 (31)	69 (69)
Splice	95	53 (66)	9 (11)	19 (23)	0 (0)	3 (5)	53 (95)
Unique İnsersiyonlar	80	67 (91)	5 (7)	2 (3)	0 (0)	16 (26)	46 (74)
Küçük (<50 bp)	75	63 (92)	5 (7)	1 (1)	0 (0)	15 (25)	45 (75)
Büyük (>50 bp)	5	4 (80)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	1 (50)	1 (50)
Unique Delesyonlar	332	282 (95)	13 (4)	4 (1)	0 (0)	77 (31)	168 (69)
Küçük (<50 bp)	197	157 (93)	9 (5)	4 (2)	0 (0)	31 (22)	113 (78)
Büyük (>50 bp)	135	125 (97)	4 (3)	0 (0)	0 (0)	46 (46)	55 (55)

(<http://europium.mrc.rpms.ac.uk>., Erişim tarihi: 15 Ocak 2021)

Unique tek baz varyantlardan, 583' ü özel missense mutasyonları (yani, bir amino asit ikamesiyle sonuçlanan), 131' i özel stop mutasyonları ve 95' i ise splice varyantlardan oluşmaktadır. Nokta mutasyonlarının ise yaklaşık yarısının FVIII geninin CpG bölgelerindeki mutasyonlardan meydana geldiği bilinmektedir (Oldenburg and El - Maarri 2006).

Missense mutasyonlardan kaynaklanan Hemofili A hastalığının şiddeti, evrimsel olarak kodlanan amino asidin korunmasına ve FVIII genindeki yerine bağlı olduğu bildirilmektedir. Missense mutasyonlar ve splice varyantlar Hemofili A hastalığının tüm şiddetleri ile ilişkilendirilebilmektedir. Bunun yanında stop mutasyona sahip Hemofili A vakalarının %97' si şiddetli seyretmektedir (Goodeve and Peake, 2003).

İnhibitör durumunun bilindiği 591 tek baz değişimine sahip vaka serisi incelendiğinde, vakaların %13' ünde inhibitör pozitifliği rapor edilmektedir (Lee et al., 2010). İnhibitör pozitif olguların yaklaşık %70' si ise şiddetli hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Lee et al., 2010). Stop mutasyonların varlığı en yüksek oranda inhibitör varlığına neden olmaktadır (Lee et al., 2010). Missense mutasyonlar, splice varyanlar ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek oranda inhibitör varlığı saptanmaktadır.

2.7.1.3. İnsersiyonlar veya Delesyonlar

Hemofili A mutasyonlarını gösteren veritabanı, FVIII' e sekans eklenmelerini ve daha sıklıkla silinmelerini listelemektedir. Faktör VIII geninde yer alan silinmeler büyük (>50 bp) ve küçük (<50 bp) silinmeler olarak ikiye ayrılmaktadır.

İnsersiyonlar

Hemofili A ile ilişkili 158 sekans eklenmesi raporu mevcuttur. Bu sekans eklenmeleri çoğunlukla kısa sekans eklenmeleri olup (10 bp' den daha az), çok daha az sayıda uzun serpiştirilmiş elemanlar (Kazazian et al., 1988) veya *Arthrobacter Luteus* (Alu) tekrarları (Sukarova et al., 2001) olarak bilinen daha büyük sekans eklenmelerini içermektedir.

Raporların çoğunda, tekrarlayan adenin bölgelerine, bir dizi adenin sekansının daha eklenmesinden bahsedilmektedir. Birbirinden farklı 20' den fazla raporda 1458 - 1460 kodonları arasında bulunan sekiz adenin bazına eklenen ekstra adenin bazı ve 12' den fazla raporda ise 1210 - 1213 kodonları arasında bulunan dokuz adenin bazına ek bir adenin bazının eklenmesinden söz edilmektedir (Lee et al., 2010). Faktör VIII cDNA' deki Adenin dizileri nispeten yaygın görülmekle birlikte bu eklemeler; replikasyon sırasında DNA polimeraz kaymasından kaynaklanmaktadır (Lee et al., 2010).

Eklemelerin büyük çoğunluğu çerçeve kaymaları ve şiddetli Hemofili vakaları ile sonuçlansa da, adenin baz eklemelerinin az bir kısmı düşük FVIII aktivitesi ve hafif Hemofili A vakaları ile ilişkilendirilmektedir (Lee et al., 2010).

Delesyonlar

Kısa Delesyonlar

Veritabanında 340 ayrı küçük delesyon raporu bulunmaktadır. Bu küçük delesyonların %55' i (108 / 197) tek bazı içeren 197 unique küçük delesyonları içermektedir (Lee et al., 2010). Adenine bağlı tek baz eklemelerinde olduğu gibi adenin tekrar dizisinde tek adenin delesyonu da meydana gelebilmektedir. Küçük delesyonlar genellikle çerçeve kaymalarına neden olmakta ve neredeyse tümü şiddetli hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Lee et al., 2010). Ancak, küçük eklemelerde olduğu gibi küçük delesyonlar da az oranda orta veya hafif şiddetteki hastalıkla bağdaştırılmaktadır.

Uzun Delesyonlar

Veritabanında muhtemelen 135 rapor bulunmaktadır ve bu sayı sadece birkaç yüz bazdan büyük olan delesyonları içermektedir. Büyük delesyonlar ciddi Hemofili A vakalarının %5' ini oluşturmaktadır (Lee et al., 2010). Büyük delesyonlarda küçük delesyonlara oranda çok daha sık inhibitör varlığı dikkat çekmektedir. Delesyonun büyüklüğünün inhibitör gelişimine katkısı açıkça gözükmemektedir.

2.7.2. Etkileşen Proteinlerin Mutasyonu

Dolaşımda FVIII proteini, hücre içi ve hücre dışı proteinlerle etkileşim halindedir. Bu proteinlerdeki mutasyonlar, Hemofili A benzeri fenotipe neden olabilmektedir. Kanda dolaşan FVIII proteini vWF ile etkileşime girmekte ve bu sayesinde FVIII' i trombinin veya C proteininin proteolitik etkilerine karşı korumaktadır (Handin and Wagner, 1989). vWF' ün FVIII ile etkileşim bölgelerinde meydana gelen bir mutasyon hemofili A benzeri fenotipe neden olabilmekte ve bu durum von Willebrand Hastalığı (vWD) olarak adlandırılmaktadır (Nishino et al., 1989).

Endoplazmik retikulumda bulunan LMAN1 ve golgi cisimciğinde bulunan MCFD2 FVIII' in üretimi sonrası transportunda görevli olan proteinlerdir. Bu

proteinler karaciğer hücrelerinde FVIII ile kompleks halinde bulunmaktır. LMAN1 ve MCFD2' in eksikliği FV ve FVIII' in kombine eksikliği ile sonuçlanmaktadır (Graw et al., 2005).

2.7.3. Bilinmeyen Mutasyonlar

Tüm Hemofili A hastaları incelendiğinde hastaların ortalama %2' sinde herhangi bir mutasyon saptanmamaktadır. Faktör VIII geninin büyük intronik bölgelerinin bazı mutasyonlar içerebileceği ve bu nedenle ekleme, delesyon, yeniden düzenlemelere veya splicing mutasyonlara neden olabileceği öne sürülmektedir (El - Maarri et al., 2006). Faktör VIII geninde bulunan Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) FVIII proteinini ve protein translasyon kinetiğini etkileyebilmektedir. Bu nedenle SNP varlığı da mutasyon saptanmayan vakalarda önem arz etmektedir (Komar, 2007).

2.8. Hemofili A Hastalığında İnhibitör Varlığı

Hemofili A hastalığındaki kalıtsal faktör eksikliği; plazma kaynaklı veya rekombinant FVIII replasman tedavileri ile yerine konmaktadır. Bu tedavilerdeki en büyük engel FVIII' e karşı oluşan antikor gelişimidir.

Ağır Hemofili A hastalarının %30' unda tedavi sonrası inhibitör gelişimi görülmekte ve FVIII aktivitesini bloke etmektedir (Wight and Paisley, 2003; Gouw et al., 2013). İnhibitör varlığı, hastaların tedavilerini zorlaştırmakta, semptomlarının artmasına ve hayat kalitelerinin düşmesine sebep olmaktadır. Literatür incelendiğinde, ağır Hemofili A hastalarında inhibitör gelişiminin genetik ve çevresel faktörler dahil olmak üzere birçok risk faktörü ile ilişkili olduğu görülmektedir.

İnhibitör gelişimi “tehlike teorisi” ismi ile bilinen karmaşık bir teoriye dayandırılmaktadır. Bu teorinin altında yatan patofizyolojik mekanizmaya göre, tedavi ve profilaksi sonrası gelişen inhibitör varlığı endojen (travma, cerrahi ve şiddetli kanamalar) ve ekzojen (enfeksiyonlar ve aşılar) tetikleyiciler nedeniyle meydana gelmektedir. Tüm bu tetikleyicilerin mikro çevrede oluşturduğu tehlike sinyali, bağışıklık reaktivasyonuna neden olmaktadır (Schep et al., 2019).

2.8.1. Hemofili A' da İnhibitör Gelişimine Neden Olan Risk Faktörleri

Genetik olarak inhibitör gelişimine neden olan etkenler arasında; mutasyon türü, HLA doku grubu, immün-regulator genlerin (IL-10, TNF-alfa, CTLA-4) polimorfizmi, ailede inhibitor varlığı gösterilmektedir (Gouw and van den Berg, 2009; Gouw et al., 2012).

Faktör VIII geninde meydana gelen null mutasyonlar (büyük delesyonlar, nonsense mutasyonlar) FVIII üretimine engel olurken aynı zamanda en sık inhibitor gelişimine sebep olan mutasyon olarak bildirilmektedir (Oldenburg et al., 2002). Faktör VIII geninde büyük delesyonlar saptanan hastaların yaklaşık %70' inde inhibitör gelişmekle birlikte hastalık şiddetli seyretmektedir (Oldenburg et al., 2002). İnhibitör gelişen hastaların çoğunda intron 22 inversiyonu saptanmaktadır (Coppola et al., 2009; Gouw and van den Berg, 2009).

Missense mutasyonlar, küçük delesyonlar / insersiyonlar ise FVIII proteinin tamamen yokluğuna neden olmadığı gibi inhibitor gelişimi bu grup hastalarda daha az görülmektedir. Bu tür mutasyonlara sahip hastalar orta veya hafif fenotip ile karakterize olmakta ve inhibitör gelişimi %10' dan daha az oranda görülmektedir (Oldenburg et al., 2002; Gouw et al., 2012).

Yapılan çalışmalarda Hemofili A' da FVIII' e karşı inhibitör geliştirme riski, HLA kompleksi içindeki bağışıklık tepkisini etkilediği bilinen genlere bağlı olabilmektedir. HLA sınıf I allelleri A3, B7 ve C7' nin yanı sıra sınıf II allelleri DQA0102, DQB0602 ve DR1015' in tümünün inhibitör gelişimi açısından riskli olabileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte HLA C2, DQA0103, DQB0603 ve DR13 alelleri koruyucu olabileceği gösterilmektedir (Oldenburg et al., 1997; Hay et al., 1997). Son yıllarda yapılan çalışmalar inhibitör gelişimi üzerine, immünregulator gen polimorfizmlerinin de etkilerinin olabileceği keşfedilmiştir. IL-4, IL-10, TNF- α , ve CTLA-4 gen polimorfizmlerinin inhibitör gelişimi ile ilişkili olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (Astermark et al., 2006; Astermark et al., 2007; Pavlova et al., 2009).

Çevresel risk faktörlerinin inhibitör gelişimi üzerindeki etkisi net olmamakla birlikte, monozigot ikizler ile yapılan çalışmalarda uyumsuz inhibitör varlığı tarif edilmektedir (Astermark et al., 2001). Bununla birlikte ailede inhibitör varlığının inhibitör gelişim riskini arttırdığını gösteren yayınlar da mevcuttur. Aile öyküsü olan hastaların inhibitör gelişme riski %48 olduğu, aile öyküsü olmayan hastalarda ise bu oranın %15' e kadar düştüğü bildirilmektedir (Astermark et al., 2001).

Kullanılan replasman tedavilerinin inhibitör gelişimini etkileyen bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir. Rekombinant FVIII konsantreleri kullanımının daha önce tedavi almamış hastalarda inhibitör gelişimini arttırdığı gösterilmektedir (Aledort, 2004).

Aynı zamanda plazma kaynaklı ürünlerde FVIII' in vWF ile kompleks halinde bulunmasının, antijenisiteyi azalttığı ve inhibitör gelişimi üzerinde olumlu rol oynadığı bilinmektedir (Dasgupta et al., 2007). Ancak kullanılan rekombinant veya plazma kaynaklı FVIII konsantrelerinin, inhibitör gelişimi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını gösteren yayınlar da mevcuttur (Gouw et al., 2007).

Tedavinin başlangıç yaşı ile FVIII' e karşı gelişen inhibitör varlığı arasında korelasyon olduğu öne sürülmektedir (Lorenzo et al., 2001; Van der Bom et al., 2003). Bu çalışmalarda genç yaşta replasman tedavilerine başlamanın inhibitör gelişimini sıklaştırdığı saptanmaktadır. Bunun yanında semptom gelişince alınan tedavinin, profilaksi tedavisine kıyasla daha sık inhibitör gelişime neden olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur (Santagostino et al., 2005; Morado et al., 2005). Annenin FVIII preperatlarına antenatal maruziyetinin inhibitör gelişimi açısından riskli olduğu gösterilmektedir (Santagostino et al., 2005).

Etnik kökenlerin inhibitör varlığını etkilendiğine dair yayınlar mevcuttur. Yapılan meta - analiz çalışmalarında Afrika - Amerika kökenli şiddetli Hemofili A hastalarında Kafkas kökenli hastalara kıyasla iki kat fazla oranda inhibitör varlığı gösterilmektedir (Leissinger et al., 2011).

2.8.2. Hemofili A'da İnhibitör Gelişimi Tayini

İnhibitör varlığı kanda Bethesda (BU) yöntemi ile ölçülmektedir. Bu yöntem sayesinde FVIII inhibitör konsantrasyonunu ölçmek mümkün olmaktadır. Uluslararası Hemostaz ve Tromboz Derneği tarafından belirlenen sınırlara göre; inhibitör seviyesi > 5 BU / ml olan hastalar düşük yanıt veren, ve <5 BU / ml olan hastalar ise yüksek yanıt veren hastalar olarak belirlenmiştir (Key, 2004). Ülkemizde bu ölçüm 2004 yılında yapılmaya başlanmıştır.

2.9. Günümüzde Hemofili A'nın Tedavisi

Hemofili A hastalığının günümüzde küratif bir tedavisi yoktur ancak gen tedavileri umut vadetmektedir. Tedavinin temel amacı spontan kanamayı durdurmak ve / veya kanamanın önüne geçmek adına eksik olan faktörü yerine koymaktır. Hastalığın profilaksi ve tedavisi planlanırken öncelikli olarak kanama odağı ve sıklıklarını bilmek önem taşımaktadır. En sık görülen kanamalar eklem kanamaları olup diğer bölgelerde olabilecek kanamalar da hastalığın ciddiyeti, mortalite ve morbidite ilişkisi açısından önem taşımaktadır. Hemofili A hastalığının tedavisine geçmeden önce hemofili hastasının izlem ve tedavisinin multidisipliner olması gerektiği bilinmelidir. Hematoloji Anabilim Dalı, Ortopedi, Fizik Tedavi, Genetik, Hepatoloji, Enfeksiyon Hastalıkları, Nükleer Tıp, İmmunoloji ve Diş Hekimliği gibi diğer birimler ile yakın işbirliği içinde çalışmalıdır (THD, 2011).

Her hemofili A hastası kendi içinde değerlendirilmeli ve hastalığın ciddiyeti, kullandığı tedavi ürünleri, yaş, kilo, ek hastalık, inhibitör varlığı gibi faktörler göz önüne alınarak tedavisi gerçekleştirilmelidir.

Ciddi kanamaların tedavisi mutlaka hastane ortamında yapılmalıdır. Hayatı tehdit eden kanaması olan hastada klinik ve laboratuvar sonuçları beklenmeden hemen tedaviye başlanmalıdır. Akut kanamalar 2 saat içinde tedavi edilmeli, yeterli replasman tedavisi verilmesine rağmen kanamanın kontrol altına alınamadığı durumlarda inhibitör varlığı akla gelmelidir. Herhangi bir cerrahi girişim öncesi faktör

düzeyine bakılmalı, uygun değilse mutlaka replasman tedavisi düşünülmedir (THD, 2011).

Tablo 2.5 Hemofili A Hastalığında Kanama Yerine Göre Replasman Tedavisinin Dozları ve Süreleri

Hemofili A Replasman Tedavisi Doz ve Süreleri		
Kanama Tipi	İstenilen Düzey	Gün Sayısı
Hemartroz	%40-60	1-2 gün, yanıt yeterli değilse daha uzun.
Kas içi kanaması	%40-60	2-3 gün, yanıt yeterli değilse daha uzun.
İliopsoas Kanaması		
Başlangıç	%80-100	1-2 gün
Devam	%30-60	7-10 gün, bazen sekonder profilaksi olarak fizyoterapi daha uzun.
MSS / Kafa Travması		
Başlangıç	%80-100	1-7 gün
Devam	%50	8-21 gün.
Boğaz / Burun		
Başlangıç	%80-100	1-7 gün
Devam	%50	8-14 gün.
Sindirim Sistemi		
Başlangıç	%80-100	1-7 gün
Devam	%50	7-14 gün.
Üriner Sistem	%50	3-5 gün.
Derin Laserasyon	%50	5-7 gün.
Cerrahi (Majör)		
İşlem Öncesi	%80-100	1-3 gün
İşlem Sonrası	%60-80	4-6 gün
	%40-60	7-14 gün.

(THD, 2011)

Hemofili A hastalarında ağrı yönetimi oldukça önem taşımaktadır. Bu hastalarda trombosit fonksiyonlarını bozabilecek analjezikler olan Non-Steroid Anti-İnflamatuvar İlaç (NSAİİ), aspirin gibi ilaçlardan kaçınılmalıdır. Analjezi için parasetamol güvenli bir seçenektir (THD, 2011). Hastalar aktif yaşamlarını engellemeyecek ancak travmadan uzak kalacak bir yaşam tarzı benimsemelidir. Hemofili A hastalarında tedavi seçenekleri birçok hastalığın tedavisinde olduğu gibi yıllar içerisinde gelişerek değişiklikler göstermiştir.

Hemofili tedavisi için farklı kan ürünlerinin geliştirilmesi, gelişmiş ülkelerde yaşayan ve güvenli ürünlere düzenli erişimi olan hastalar için prognozu önemli ölçüde değiştirmiştir. 1831 - 1920 yılları arasında şiddetli Hemofili A vakalarının ortalama yaşam beklentisi 20' li yaşları bulmazken, 1961 - 1980 yılları arasında ortalama yaşam beklentisi 5 kat artmıştır. İlerleyen yıllarda İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (HIV) ve Hepatit B Virüsü (HBV) gibi kan yoluyla bulaşan hastalıkların sıklığının artması ile plazma türevi kan ürünlerinin kullanılması popülerliğini kaybetmiştir (Schwartz et al., 1990). 1984 yılında FVIII geninin klonlanması ve hücre kültüründe eksprese edildiğinin gösterilmesinin ardından ilaç şirketleri tam uzunlukta rekombinant FVIII preparatları üretmeye başlamıştır. Bu preparatlar 1990' lı yıllarda ruhsatlandırılmıştır. Son yıllar da plazmanın rekombinant ürünlere kıyasla göreceli avantajları önemli bir tartışma konusu haline gelmektedir. Bu tartışmalar, hemofili tedavisinde tedavi ürünü seçerken patojen bulaşına izin vermeyecek güvenli ürünlerle yapılması gerekliliğine odaklanmaktadır. Bunun yanında hastalarda ürüne karşı gelişen immün cevap da farklı bir tartışma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü ve Dünya Hemofili Federasyonu Hemofili A hastalığı tedavisinde erken yaşta profilaktik tedavi başlatılmasının en uygun tedavi yaklaşımı olduğunu öne sürmektedir. Bunu sağlamanın ana koşulu da eksik faktörün kanama semptomu olmadan yerine konulması şeklindedir (Berntorp et al., 1995).

Primer profilaksi; fizik muayene ya da görüntüleme yöntemleri ile gösterilebilen bir eklem hastalığı olmaksızın, hastanın ilk büyük eklem kanamasından sonra ve / veya 2 yaşından önce başlayan, yılda en az 45 hafta sürdürülen uzun süreli faktör yerine koyma tedavisidir (Srivastava et al., 2013; Kavaklı, 2014). Sekonder profilaksi; bir ya da birden fazla geçirilmiş eklem kanaması öyküsü olan ancak fizik

muayene ya da görüntüleme yöntemleri ile gösterilebilen bir eklem hasarı olmaksızın başlanan ve yılda en az 45 hafta sürdürülen faktör yerine koyma tedavisidir (Srivastava et al., 2013; Kavaklı, 2014). Tersiyer profilaksi ise fizik muayene ya da görüntüleme yöntemleri ile tanısı konulmuş eklem hastalığı sonrası başlanan profilaksidir. Tersiyer profilaksiye kısa süreli profilaksi olarak da adlandırılmaktadır (Srivastava et al., 2013; Kavaklı, 2014).

Hemofili hastalarında profilaksi dozu, plazmada dolaşan antikor yokluğunda; aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır (Kavaklı, 2014):

$$(Hedef Faktör Düzeyi - Hastanın Faktör Düzeyi) \times Ağırlık / 2 = IU$$

Hastaya kilogram başına verilen her bir ünite FVIII tedavisi, plazma FVIII seviyesini yaklaşık olarak %2 oranında yükseltmektedir. Uygulanan FVIII preparatının yarılanma ömrü ortalama 8 - 12 saat olup, kanda hedef faktör düzeyinin korunabilmesi için verilen dozun yarısı her 8 - 12 saatte bir tekrarlanması gerekmektedir (Morfini et al., 2013).

Faktör VIII, yetişkinlerde dakika başına 3 ml' yi geçmeyen bir hızda bolus olarak uygulanmaktadır. Çocuklarda ise dakikada 100 ünite gibi yavaş intravenöz enjeksiyonla infüze edilmektedir. Faktör infüzyonları sırasında, infüze edilen faktör dozundan daha önemli olan bir nokta hastaların kişisel farmakokinetik farklılıklarından kaynaklanan faktör klirens düzeyleridir. Majör kanama ile gelen hastaya farmokinetik olarak önerilen yaklaşım, FVIII seviyesini %100' e çıkartacak doz uygulandıktan sonra 0 - 30 - 60. dakikalarda ve daha sonra 3 - 6 - 9 - 24 - 32 ve 48. saatlerde ölçüm alınarak değerlendirilmesi şeklindedir (THD, 2011).

İnhibitör varlığı olan hastalarda ise hedef FVIII seviyesine ulaşabilmek için daha yüksek doz FVIII infüzyonu gerekmektedir. Bu nedenle inhibitöre sahip hastalarda inhibitör eradikasyonu için haftada 3 gün; 50-200 IU / kg / gün yüksek dozda FVIII ile immün tolerans tedavisi (ITT) uygulanmaktadır (Hay and DiMichele, 2012). Arttırılmış faktör dozlarına veya ITT' ye yanıt vermeyen hastalarda bypass ajanları (rekombinant FVIIa ve aktive edilmiş protrombin kompleks konsantreleri) ve diğer uygun tedavi ürünleri kullanılmaktadır.

2.9.1. Taze Donmuş Plazma (TDP) ve Kriyopresipitat

Tam kan, aferez yöntemi ile elde edildikten sonra santrifüj kullanılarak şekilli elemanlarından uzaklaştırılmaktadır. Toplanan plazma 6 - 8 saat sonra dondurulmakta ve çözünebilen bütün koagulasyon faktörleri, globulin, albumin ve plazmayı içeren bu bileşene Taze Donmuş Plazma (TDP) adı verilmektedir (Srivastava et al., 2013). TDP' nin klinikte birçok kullanım endikasyonu bulunmaktadır.

Kriyopresipitat ise tek ünite TDP' nin +4 derecede eritilmesi ile elde edilen kriyoglobulin fraksiyonu olup içerisinde fibrinojen, vWF, FVIII ve FIX bulundurmaktadır. Kriyopresipitat çoğunlukla hipofibrinomeni de kullanılsa da klinikte başka kullanım alanları da vardır. Plazma ürünü transfüzyonu AB0 kan grubu uyumu gerektirmekte olup Crossmatch ve Rhesus Faktörü (Rh) uyumu gerektirmemektedir.

Plazma ürünü kullanımı hastalarda tedavi sonrası volüm yüklemelerine neden olabileceği için ağır hemofili hastalarında ve major cerrahi gibi çok miktarlarda plazma ürünü infüzyonu gerektiren durumlarda kullanılması uygun değildir. Günümüzde faktör konsantrelerine ulaşılamayan durumlarda ya da tanısı kesinleşmemiş hastalarda kullanılmasının uygun olduğu belirtilmektedir (Kavaklı, 2014).

Dünya Hemofili Fedarasyonu (WHF), kalite ve güvenliğinden dolayı (viral inaktivasyon prosedürlerine maruz kalmaması ve tekrarlayan infüzyonlarda viral patojen bulaş riskini artırması) taze donmuş plazma ve kriyopresipitat kullanımını arka plana atmış olsa da bu tedavilerin Hemofili hastalarında tek ve en uygun tedavi seçeneği olduğu gerçeğini kabul etmektedir (Farrugia, 2008).

TDP, 200 - 250 ml hacminde ve günlük uygulamada 15 - 20 ml / kg dozunda 24 saatlik infüzyonlar halinde verilmektedir (Srivastava et al., 2013). Tek bir donörden elde edilen kriyopresipitat 80 - 100 IU FVIII içermektedir. Bir ml kriyopresipitat 5 - 10 IU FVIII içerdiğinden TDP' ye oranla daha az volümde daha çok faktör desteği sağlayabilmektedir (Srivastava et al., 2013).

2.9.2. Faktör Konsantreleri

Dünyadaki hemofili hastalarının yaşam kalitesini önemli ölçüde arttıran konsantre kan pıhtılaşma faktörlerinin hazırlanma metodu olan kriyopresipitasyonun keşfi 1965 yılında Dr. Judith Graham Pool tarafından gerçekleştirilmiştir. Doktor hemofilide meydana gelen kanama kusurunu düzeltmek için kullanılan antihemofilik faktör (AHF) ve / veya FVIII' i kan plazmasından ayırmak için bir yöntem geliştirmiştir (Pool et al., 1964). Daha sonra, tam kan plazmasının soğukta çözünmeyen bir protein fraksiyonu olan kriyopresipitatu halkın kullanımına sunmuştur. Bu konsantre kan ürünü, hemofili hastaları tarafından nakledilebilir, uygulanabilir bir tedavinin öncüsü olmuştur. Bu sayede Hemofili hastalarının yaşam beklentilerinin yükselmesini sağlamıştır.

Kan ve kan ürünlerinden elde edilen FVIII konsantreleri viral tanı testlerinin geliştirilmesiyle 1980' lerin başında enfeksiyon bulaşına yol açtığı doğrulanmıştır. HIV / AIDs ve Hepatit gibi yaygın viral enfeksiyonlar nedeniyle Hemofili A hastası binlerce kişi ölmüştür (Evatt, 2007; Mannucci, 2003). Bu olumsuz gelişmeler ile FVIII tedavisinde kullanılan kan ürünlerine daha sıkı tarama yöntemleri uygulanmış ve daha ileri viral inaktivasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu sayede klinikte uygulanması daha güvenli hale gelmiştir. Ancak ilerleyen yıllarda, hemofili hastalarında önleyici tedavi olan profilaksi tedavisinin daha yaygın hale gelmesiyle, faktör ürünlerine karşı gelişen antikor sıklığı da artmıştır.

1992 yılında ilk rekombinant FVIII ürünü Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. DNA teknolojisi kullanılarak genetik olarak tasarlanmış olan bu ürün, plazma ve / veya albümin içermemesi nedeniyle kan yoluyla bulaşan hastalıkların önüne geçmiştir. Bu sayede daha az sıklıkla uygulanan, daha uzun yarı ömüre sahip, daha güvenli ürünler elde edilmiştir. Bugün piyasada kullanımda olan rekombinant FVIII preparatları: Bayer tarafından geliştirilen Kogenate-FS, Baxter tarafından geliştirilen Advate ve Pfizer tarafından geliştirilen Refacto' dur. Plazma kaynaklı FVIII preparatları ise Hemofil-M (Baxter), Hemate-P (CSLBehring), Fandhi (Grifols), Beriate-P (CSL Behring) ve Octanate (Octapharma) olarak sayılabilmektedir (Swiech et al., 2017).

Günümüzde WHF, hemofili ve diğer kalıtsal kanama bozukluklarının tedavisi için kriyopresipitat veya taze donmuş plazmadan önce viral inaktivasyona uğramış güvenli plazma türevi veya rekombinant faktör konsantrelerinin kullanılmasını tavsiye etmektedir.

2.9.3. Emicizumab

Emicizumab, Hemofili A' nın yönetimi ve tedavisinde kullanılan bispesifik monoklonal antikor ilaç sınıfına ait, yeni geliştirilen bir tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadır (Parisi and Kumar, 2020).

Faktör IXa (FIXa) ve FX arasında köprü kurarak Faktör VIII seviyelerinden bağımsız olarak aktive edilmiş Faktör VIII' i taklit etmektedir. Emicizumab, eksik olan aktif FVIII' in işlevini yüklenen bispesifik bir monoklonal antikordur. Böylece Hemofili A hastalarında etkili hemostaz sağlamaktadır (Barg et al., 2019).

Emicizumab, trombin oluşumunu doza bağımlı bir şekilde artırmakla birlikte diğer tedavilere kıyasla uzun bir yarı ömre sahip olmasıyla dikkat çekmektedir. Ortalama olarak vücutta 4 - 5 hafta kalmaktadır (Yoneyama et al., 2018).

Birçok ülkede subkutan Emicizumab uygulamasının Hemofili A tanılı bireylerde FVIII inhibitör durumundan bağımsız olarak profilaktik olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (Giuffrida et al., 2021). Faz III klinik çalışmalarda Emicizumab profilaksisi, FVIII inhibitörüne sahip bireyler de dahil olmak üzere Hemofili A tanılı ergen ve yetişkinlerde yıllık kanama oranlarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmektedir. Aynı klinik tanıya sahip çocuklarda da kanama epizodlarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmektedir (Young et al., 2019; Franchini et al., 2019).

2.9.4. Desmopressin

Desmopressin, DDAVP olarak da bilinen (1 - deamino - 8 - D - arginine vazopressin) bir vazopresin analogudur. Desmopressinin etki mekanizması tam olarak

aydınlatılamamış olsa da plazma vWF, FVIII: C ve doku plazminojen aktivatörü (t-PA) düzeylerinde dikkate değer bir artış sağlamaktadır (Mannucci, 1997).

Desmopressin içinde FIX bulunmaması sebebiyle Hemofili B hastalarında ve ayrıca ağır Hemofili A hastalarında uygulanma endikasyonu yoktur. Desmopressin Hemofili A taşıyıcılarında ve hafif dereceli Hemofili A hastalarında, faktör konsantrelerinin getirdiği masraf ve enfeksiyon bulaş riski gibi dezavantajlara sahip olmaması sebebiyle tercih edilebilmektedir. Desmopressin asıl olarak Diyabet, Bedwetting, vWD tedavisinde kullanılıyor olsa da hemostaz bozuklukları ile ilişkili kanama zamanının uzaması tedavisinde de etkilidir.

Desmopressin intravenöz, intranazal ve subkutan uygulamaları mevcuttur. En fazla etki subkutan ve intravenöz uygulama sonrası saptanabilmekte olup uygulama tez doz 0.3 µg / kg şeklinde yapılmaktadır (Mannucci, 1997; Castaman, 2008). Intranazal olarak 150 µg'lık tek bir preperat; 40 kg üstü bireylerde 2 doz, 40 kg' den düşük bireylerde tek doz kullanımı önerilmektedir (Khair et al., 2007; Srivastava et al., 2013).

2.9.5. Antifibrinolitik Ajanlar

Traneksamik asit ve epsilon - aminokaproik asit isimli iki adet antifibrinolitik ajan bulunmakta ve bu ajanlar çoğunlukla mukozal kanamalarda kullanılmaktadır (Mannucci, 1998; Coetzee, 2007). Traneksamik asit, plazminojende lizin bağlanacak yerlere bağlanarak plazmin aktivasyonunu yarışmalı olarak inhibe etmektedir (Hoylaerts et al., 1981). Plazmin pıhtının çözülmesine yardımcı olurken, inhibe olması da pıhtının parçalanmasını engellemektedir.

Traneksamik asidin tablet kullanımı, bölünmüş dozlarda, 15 - 25 mg / kg / doz, 8 saat arayla, 5 - 10 gün süreyle önerilmektedir (THD, 2011). İntravenöz kullanımı ise 10 mg / kg / doz (maksimum 500 mg), 8 saat arayla yavaş infüzyon olarak tercih edilmektedir (THD, 2011). Hızlı infüzyon hipotansiyona neden olmakla birlikte böbrek fonksiyon bozukluklarında doz ayarlamasına ihtiyaç duyulmaktadır. Traneksamik asit, postoperatif kanamayı önlemek için diş çekimlerini takip eden 7 gün boyunca reçete edilebilmektedir (Srivastava et al., 2013).

Epsilon aminokaproik asit (EACA), Traneksamik asit ile benzer etkiye sahip olmakla birlikte daha kısa etkilidir (Mannucci, 1998). Bu sebeple çok fazla tercih edilmemektedir. Gastrointestinal yan etkileri bulunduğundan doz ayarlaması yapılması öngörülmektedir. Myopati (kas ağrısı) yüksek doz aminokaproik asitle kombine traneksamik asit kullanan olgularda görülebilmektedir. İlaç bırakıldığında bu semptomun gerilediği görülmektedir.

2.9.6. Fibrin Yapıştırıcılar

Fibrin yapıştırıcılar, doku yapıştırıcıları olarak da bilinen thrombin, fibrinojen, antifibrinolitik veya Faktör XIII' den oluşmaktadır. Türkiye'de de Beriplast - P (Behring - Almanya) ve Tisseel - Kit (Baxter - Amerika) olmak üzere iki fibrin yapıştırıcı ajan bulunmaktadır. Fibrin yapıştırıcılar major kanamalarda kullanım için yetersizdir. Sürekli veya bolus faktör konsantresi infüzyonlarıyla beraber kullanıldığında etkinliği mevcuttur.

Oral cerrahi girişim öncesi tek doz faktör konsantresi infüzyonu yerine cerrahi girişim bölgesine topikal fibrin yapıştırıcı uygulandıktan sonra 2 hafta süreyle traneksamik asitle ağızda gargara yapıp yutularak kullanılabilir (Açıkgöz ve ark., 2013). Hemofili hastalarında oral cerrahi operasyon uygulamaları dışında birçok cerrahi operasyonda kanamayı azaltmada da başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Rakocz et al., 1993; Hermans et al., 2009; Serban et al., 2009).

2.10. Hemofili A' da Gen Tedavisi

Gen tedavisi; bir genin ifadesini değiştirmeyi, manipüle etmeyi veya terapötik kullanım için canlı hücrelerin biyolojik özelliklerini değiştirmeyi amaçlamaktadır (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy>, Erişim tarihi: 25 Aralık 2021). Gen tedavisi, genetik kökenli hastalıkları tedavi etmeyi veya durdurmayı hedefleyen bir tedavi şeklidir. Son yıllarda; kanser, genetik hastalıklar ve bulaşıcı hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde umut vaat etmektedir.

Gen tedavileri birkaç mekanizmayla çalışabilmektedir, bunlar;

- Hastalığa neden olan geni, sağlıklı bir gen kopyasıyla değiştirmek,
- Düzgün çalışmayan hastalığa neden olan bir geni etkisiz hale getirmek,
- Hastalığın tedavisine yardımcı olmak için vücuda yeni veya değiştirilmiş bir gen yerleştirmektir.

Gen tedavileri, somatik ve germline gen tedavileri olarak ikiye ayrılmaktadır. Somatik gen tedavilerinde amaç terapötik genlerin gamet dışında, hastalığa neden olan hedef dokuya veya hücre grubuna aktarılmasıdır. Bu tip gen tedavisinde düzeltilen genetik materyal ileriki kuşaklara aktarılamamaktadır. Tek gen hastalıkları somatik gen tedavileri için ideal aday hastalıklardır. Germline gen tedavilerinde ise değiştirilen genetik materyal soylar boyunca aktarılabilmektedir. Bu sayede de daha kalıcı sonuçlar elde edilebilmektedir.

Gamet, zigot ve hatta erken dönem embriyolarda yapılan genetik değişiklikler bu sınıfta yer almaktadır. Günümüz genetik tedavi seçeneklerine baktığımızda etik açıdan kabul edilebilir tedavi seçeneği somatik gen tedavileridir.

Gen tedavilerinde kullanılan tedavi protokolleri *ex vivo* gen tedavileri ve *in vivo* gen tedavileri olarak ikiye ayrılmaktadır (High and Roncarolo, 2019). Hastadan toplanan bir dizi hücre, ilgili gen ile transdükte edildikten sonra çoğaltılıp yeniden hastaya implante edilmesi işlemine *ex vivo*, düzeltilen genetik materyalin bir organ veya vücuda direkt verilmesine ise *in vivo* gen tedavi denmektedir. Bu iki genetik tedavi metotunda da gen aktarımı vektör aracılığı ile gerçekleştirilmektedir (High and Roncarolo, 2019; Anguela and High, 2019).

2.10.1. Gen Aktarımında Kullanılan Vektörler

Gen tedavilerinde istenilen genetik materyalin aktarımı amacıyla kullanılan vektörler, viral ve viral olmayan vektörler olarak ikiye ayrılmaktadır. Viral vektörlerin viral olmayan vektörlere kıyasla daha yüksek transdüksiyon etkinliğine sahip olması, onları klinik uygulamalar için daha avantajlı kılmaktadır. Bu avantaj, virüslerin hücrelere bağlanma ve hücreleri enfekte edebilme yetenekleri göz önünde

bulundurulduğunda; genetik bilginin hedeflenen hücreye iletilmesi ve ifade edilebilmesi için iyi birer taşıyıcı olmalarından kaynaklanmaktadır (Vannucci et al., 2013).

1980' lerin başından beri virüslerin doğal hücre hedefini değiştirmek veya yeni hedef oluşturmak için viral reseptörlerin manipülasyonu üzerine çalışılmaktadır. Bu çalışmalar ile virüslerin replikasyon ve bulaştırıcı virion oluşturma yeteneğinin önüne geçilmesi ancak nükleik asit dizisinin etkin bir şekilde aktarımının korunması amaçlanmaktadır (Vannucci et al., 2013).

Gen tedavilerinde en çok tercih edilen viral vektörlerin kökenleri; Adenovirüs, AAV, Retrovirüs ve Herpesvirüs' lerdir. Son 20 yılda Hemofili A hastalığının tedavisini konu alan prelinik ve klinik çalışmalarda bir gen tedavisi vektörü olarak AAV tercih edilmektedir.

Adeno-ilişkili virüsler, Parvoviridae ailesi Dependovirüs cinsine ait küçük, ikosahedral zarfsız virüslerdir. Replikasyon döngüsünü tamamlamak için yardımcı bir virüsle eş zamanlı enfekte olmaya ihtiyaç duymaktadır. AAV' nin genomu oldukça küçüktür (5 kb' den az) ve sadece iki gen içermektedir: Rep ve cap. Rep geni replikaz enzimi içermektedir ve viral genomun replikasyonu için gereklidir. Cap geni ise yapısal proteinleri kodlamaktadır. Rep ve cap genleri, ters dönmüş uç tekrarlar (ITR) ile çevrelenmektedir. Vektör parçacıkları oluşturmak için AAV' den rep ve cap genleri çıkartılmakta ve bu genler transgen kaseti ile değiştirilmektedir (Vannucci et al., 2013).

Adeno-ilişkili virüs genomu kromozoma entegre olamamakta ve çoğunlukla epizomal olarak kalmaktadır. Ekstrakromozal olarak hücre içinde bulunan AAV genomlarının insersiyona bağlı onkojenite riski oldukça düşüktür (Chuah et al., 2013). Ancak bu durum AAV' nin vektör olarak kullanıldığı gen tedavilerinde, AAV' nin transdükte ettiği hücre ile beraber çoğalamayacağı ve uzun süreli ekspresyon sağlayamayacağı anlamına da gelmektedir. Düşük onkojenite riski, genomda hedefe yönelik entegrasyon yeteneği ile bölünen ve bölünmeyen hücreleri enfekte edebilme özellikleri AAV' yi in vitro ve in vivo gen aktarımı için cazip bir aday haline getirmektedir (Kay et al., 2001; Giacca and Zacchigna, 2012).

Adeno-ilişkili virüs vektörlerinin birtakım dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan ilki AAV vektörlerinin klonlama kapasitesinin sınırlı olması ve aktarıldığı hücrelere maksimum 5 kb' a kadar terapötik bir transgen kaseti entegre edebiliyor olmasıdır (Wu et al., 2010). Bu nedenle AAV vektörleri büyük transgen kaseti içeren tedaviler için uygun bulunmamaktadır.

Adeno-ilişkili virüs vektörlerinin bir başka dezavantajı ise, gen ekspresyonu başlamadan önce tek sarmallı yapıya sahip olan genomunu çift sarmallı DNA yapısına dönüştürme gerekliliğidir (Fisher et al., 1996; Ferrari et al., 1996). Bunun sonucu olarak, *in vivo* uygulamalarda tek başına AAV vektörü yetersiz kalmakta ve hibrit vektör gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Glauser et al., 2006). Bu nedenle, yüksek viral titrelere ulaşmakta zorluklar yaşanmaktadır (Vannucci et al., 2013).

Bunun yanında çoğu insan bebeklik döneminde doğal olarak vahşi tip AAV ile enfekte olmaktadır. Farklı etnik grup ve coğrafi bölgeler incelendiğinde genel popülasyonun %30 - 80' inde AAV' ye karşı nötralize edici antikor varlığından bahsedilmektir (Calcedo et al., 2009; Boutin et al., 2010). Benzer şekilde nötralize edici antikor varlığında AAV' ye karşı gelişen hücresel immün cevap AAV antijenini ortadan kaldırmakta uzun vadede AAV ile gerçekleştirilen gen aktarımının verimsiz olmasına neden olmaktadır. Bu sebeple antikor varlığı, vektörün intravenöz olarak uygulandığı hayvan modellerinde transdüksiyonun inhibe olması ve klinik deneylerde sınırlı etkinlikle ilişkilendirilmektedir (Louis Jeune et al., 2013). Bununla birlikte, AAV aracılıklı terapötik gen tedavisinin tekrarlı uygulamalarını da engellemektedir (Batty et al., 2022). Bu sebeple, AAV vektörü ile gerçekleştirilen *in vivo* ve klinik gen tedavilerinde hücresel immün cevabı ortadan kaldırabilmek için sıklıkla immüsupresif ilaçların (kortikosteroid) kullanılması gerekmektedir (Nathwani et al., 2018; High et al., 2018).

Hemofili A hastalığının tedavisinde kullanılan diğer bir viral vektör ise lentivirüslerdir. HIV kaynaklı lentiviral vektörler, insanlarda HIV enfeksiyonunun düşük prevalansı ve vektörün daha büyük transgen kaseti barındırma kapasitesi nedeniyle AAV vektörlerine üstünlük sağlamaktadır. Lentiviral vektörler, AAV vektörlerine kıyasla hedef hücreye daha uzun; 9 kb' a kadar transgen kaseti entegre edebilmektedir (Vannucci et al., 2013). Bunun yanında, lentiviral vektörler uygun

modifikasyonlarla hemapoetik hücreler, makrofajlar, nöronlar gibi çok çeşitli (bölünen ve bölünmeyen hücreler) hücrelerin genomunu enfekte edebilmektedir (Naldini et al., 1996; Naldini, 1998; Mátrai et al., 2010; Dropulić, 2011). Lentiviral vektörler için genomik entegrasyon, transgenin konakçı genomunda ekspresyonu için esastır. Bu sayede, terapötik genin daha uzun süreli ekspresyonuna olanak sağlamaktadır.

Genomik entegrasyon aynı zamanda mutageneze, ve / veya onkogenlerin (tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu) aktivasyonuna neden olabilmektedir (Fischer et al., 2005; Howe et al., 2008). Lentiviral vektörlerin onkojeniteye neden olduğuna dair çok az sayıda çalışma olmasına rağmen yine de risk teşkil ettiği yadsınamaz bir gerçektir (Themis et al., 2005).

2.10.2. Hemofili A Hastalığının Gen Tedavisinde Kullanılan Vektör Tasarımları

2022 yılına gelindiğinde kliniğe ulaşan yaklaşık 10 adet Hemofili A gen tedavisi çalışması bulunmaktadır. Bu klinik çalışmaların bir kısmı çalışmalarına hasta almaya devam ederken, bir kısmı durdurulmuş olarak clinicaltrials.gov internet sitesinde yer almaktadır. Hemofili A hastalığında lisans almış bir gen tedavisi bulunmamasına rağmen birçok ülkede umut vaat eden farklı gen tasarımları geliştirilmektedir.

Aşağıda Hemofili A gen tedavisi klinik çalışmaları, klinik çalışmaların durumları, klinik çalışmalarda kullanılan gen dizaynları gösterilmiştir.

Tablo 2.6 Hemofili A Gen Tedavisi için Geliştirilen Klinik Çalışmalar ve Durumları

NCT Numarası	Durum	Gen Müdahalesi	Sponsor / Ortak
NCT03370172	Devam ediyor.	BAX 888, AAV8-co-BDD-F8	Baxalta now part of Shire/Shire
NCT02576795	Aktif, devam etmiyor.	BMN 270, AAV5-co-BDD-F8	BioMarin Pharmaceutical

Tablo 2.6 Hemofili A Gen Tedavisi için Geliştirilen Klinik Çalışmalar ve Durumları
(Devamı)

NCT Numarası	Durum	Gen Müdahalesi	Sponsor / Ortak
NCT03370913	Devam ediyor.	Valoctocogene Roxaparvovec (BMN 270)- AAV5	BioMarin Pharmaceutical
NCT03392974	Devam ediyor.	Valoctocogene Roxaparvovec (BMN 270) –AAV5	BioMarin Pharmaceutical
NCT03520712	Davet ile hasta kayıdı alınıyor.	Valoctocogene Roxaparvovec (BMN 270) –AAV5	BioMarin Pharmaceutical
NCT03061201	Devam ediyor.	SB-525, AAV6-co-BDD- F8	Sangamo Therapeutics
NCT03003533	Devam ediyor.	SPK-8011, AAV3/ LK03- co-BDD-F8	Spark Therapeutics
NCT03432520	Henüz başlamadı.	SPK-8011, AAV3/ LK03- co-BDD-F8	Spark Therapeutics
NCT03001830	Devam ediyor.	AAV2/8-HLP-FVIII-V3	University College, London / Medical Research Council
NCT03217032	Henüz başlamadı.	YUVA-GT-F801- Lentiviral vector F8 HSC	Shenzhen Geno- Immune Medical Institute

Hemofili A tedavisinde klinikte yer alan en önemli gen dizaynları Sangamo Therapeutics tarafından geliştirilen SB-525 (Konkle et al., 2019), Biomarin İlaç A.Ş. tarafından geliştirilen BMN270 (Rangarajan et al., 2017), Sparks Therapeutics

tarafından geliştirilen SPK-8011 (High et al., 2018; George et al., 2020), Shenzhen Geno-Immune Medical Institute tarafından geliştirilen YUVA - GT - F801 (Wang et al., 2020) ve Expression Therapeutics tarafından geliştirilen CD68 - ET3 - LV CD34+’ dir (Doering et al., 2018). Bu tedavilere bakıldığında sadece YUVA - GT - F801 ve CD68 - ET3 - LV CD34+’ nin lentiviral kaynaklı vektör tasarımları olduğu dikkat çekmektedir.

Diğer üç gen tedavisi ise vektör tasarımı olarak AAV’ nin farklı serotiplerini içermektedir. Bununla birlikte, geliştirilen bu gen dizaynlarında aktif FVIII’ in yapısında bulunmayan B domaini, silinmiş olarak bulunmaktadır. Bu sayede AAV vektörünün paketlenme kapasitesine uygun olarak 5 kb’ dan küçük bir gen büyüklüğüne ulaşılmaktadır. AAV kaynaklı vektör tasarımlarının promoter yapıları incelendiğinde karaciğere spesifik promotörlerin tasarıma dahil edildiği görülmektedir.

Biomarin İlaç A.Ş ve Sparks Therapeutics tarafından geliştirilen FVIII gen dizaynlarında genin ekspresyonunu arttırabilmek için FVIII geninde yer alan A2 ve A3 domainleri, B domaininden kalan furin içeren 14 amino asitli (SQ) bir dizi ile bağlanmaktadır (Rangarajan et al., 2017; George et al., 2021). Sangamo Therapeutics tarafından geliştirilen SB - 525’ de ise SQ dizisi yer almamakta, ancak B domainin silinmiş FVIII dizisinin arkasına sentetik bir poliadenilasyon sinyali içermektedir. Bu sayede ekspresyon verimliliğinden ödün verilmeden daha büyük transgen kasetinin paketlenmesine olanak sağlamaktadır (https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/sangamo_and_pfizer_announce_phase_1_2_interim_data_for_investigational_hemophilia_a_gene_therapy, Erişim tarihi: 20 Ocak 2022).

Expression Therapeutics tarafından FVIII geninin biyosentezini ve salgılanmasını önemli ölçüde iyileştiren bir aminoasit sekansı içeren FVIII geni dizayn edilmiştir. Ortaya çıkan transgen ürünü, ET3 (önceden HP47) olarak adlandırılmış ve gen ekspresyonunu 10 - 100 kat arttırdığı ve immün yanıt oluşturmadığı preklinik çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Brown et al., 2014; Brown, et al., 2018; Doering et al., 2018). Bu tasarım CD68 monosit spesifik, kendi kendini inaktive edebilen (SIN) lentiviral vektör (LV) ile transdüksiyona tabi tutulan otolog CD34+ hücrelerinden oluşmaktadır (Doering et al., 2018).

Faz III klinik çalışmaları bulunan AAV kaynaklı üç gen tasarımının klinik verilerini sırasıyla incelediğimizde; Sangama Therapeutics tarafından Faz 1 / 2 açık etiketli, randomize olmayan çalışmada Hemofili A tanısı olan 11 kişiye 4 farklı dozda (9×10^{11} , 2×10^{12} , 1×10^{13} , 3×10^{13} vektör genom (vg) / kg; Her kohort için n= 2, yüksek doz kohort için n= 5) SB-525 gen tedavisi uygulanmıştır. İnfüzyondan 6 hafta sonra, yüksek doz (3×10^{13} vg / kg) uygulanan 2 katılımcının FVIII seviyelerinin normalin %94 ile %140 ulaştığı rapor edilmiştir. Ancak yüksek doz ile tedavi edilen 5 katılımcının dördünde, tedavi gerektirecek bir yan etki, alanine aminotransferaz (ALT) yükselmesine rastlanmıştır (Konkle et al., 2019).

Biomarin tarafından geliştirilen BMN 270'nin ilk klinik çalışmasında 3 farklı doz grubu (düşük doz 6×10^{12} vg / kg n=1, orta doz 2×10^{13} vg / kg n= 1 ve yüksek doz 6×10^{13} vg / kg n= 7) denenmiştir. Düşük ve orta doz uygulanan gruplarda FVIII seviyeleri < %3 olarak bulunmuştur. Yüksek doz BMN 270 uygulanan 7 hastadan 6'sının FVIII seviyesi 20. haftadan sonra stabil kalmış (medyan FVIII seviyesi 77 IU / dL, FVIII seviyesi 19 - 164 IU/dL) ve 1 yıl kadar devam etmiştir. Yüksek doz uygulanan (6×10^{13} vg / kg n= 7) katılımcıların, 2 - 9. haftalarda FVIII seviyesinin > 5 IU / dL' ye yükseldiği, 6. haftada ise normal seviyelere (FVIII > 50 IU / dL) ulaştığı görülmüştür. Yüksek doz uygulanan katılımcıların çoğu, katılımcıların birinde gözlenen hafif ALT yüksekliği nedeniyle profilaktik prednizolon tedavisi almıştır. Yüksek doz uygulanan katılımcılardan birinde ise profilaktik prednizolon tedavisine rağmen transaminitis gelişmiş ve ek doz prednizolon tedavisine ihtiyaç duymuştur (Rangarajan et al., 2017).

Biomarin tarafından geliştirilen BMN 270'nin ikinci klinik çalışmasında 4 farklı doz grubu denenmiştir. Gruplar; 6×10^{12} vg / kg uygulanan 1 katılımcı, 2×10^{13} vg / kg uygulanan 1 katılımcı, 6×10^{13} vg / kg uygulanan 7 katılımcı, 4×10^{13} vg / kg uygulanan 6 katılımcıdan oluşmuştur. 15 katılımcının 11' inde ALT yüksekliği saptanmıştır. Katılımcılardaki ALT yükseklikleri kortikosteroid kullanımı ile kontrol altına alınmıştır. 3. grupta yer alan katılımcıların 3 yıl boyunca yapılan takiplerinde, 1. yılda medyan FVIII seviyesi 64 IU / dL, 2. yılda medyan FVIII seviyesi 36 IU / dL, 3. yıl medyan FVIII seviyesi ise 33 IU / dL olarak saptanmıştır. Ortalama FVIII seviyelerine bakıldığında ise, bu seviyesinin 2. yılda %43 ve 3. yılda ise %10 azaldığı gözlemlenmiştir.

Grup 4' te yer alan altı katılımcının izlemlerine iki sene süreyle devam edilmiştir. Ortalama faktör VIII aktivite seviyesi 1. yılın sonunda 21 IU / dL (medyan, 23 IU / dL), 2. yılın sonunda ise 15 IU / dL (medyan, 13 IU / dL) olarak bulunmuştur. 4. grupta yer alan katılımcıların FVIII seviyeleri 3. gruptakine benzer bir şekilde 2. yılın sonunda %30 oranında azalmıştır (Pasi et al., 2020).

SPK-8011, faz 1 / 2 Hemofili A gen tedavisi çalışmasında 18 hastaya 5×10^{11} vg / kg, 1×10^{12} vg / kg, 1×10^{13} vg / kg ve son olarak 2×10^{12} vg / kg dozlarında tedavi verilmiştir. 8 katılımcıda tedaviyle ilişkili toplam 33 advers olay meydana gelmiştir. 33 advers olayın 17' si AAV kapsidine karşı immün yanıt ile ilişkili olup, 1 advers olay ciddi olarak tanımlanmıştır. Diğer advers olaylar kortikosteroid kullanımı ile alakalı olarak kaydedilmiştir. İki katılımcı, immün baskılanmaya duyarlı olmayan bir anti-AAV kapsid hücrel immün tepkisi nedeniyle tüm faktör VIII ekspresyonunu kaybetmiştir. 16 katılımcının FVIII seviyeleri korunmuş, 12 katılımcı ise 2 yıl süreyle takip edilmiştir. Takiplerinde ortalama FVIII seviyesinin %12.9 olduğu saptanmıştır (George et al., 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Tablo 3.1 Hücre Hatları ve Kullanım Alanları Listesi

Hücre Hattı	Kat. No, Marka	Kullanım Alanı
HEK293T- İnsan Embriyonik Böbrek Hücreleri	CRL-3216, ATCC	Lentivirüs Üretimi
MKH- İnsan Mezenkimal Kök Hücresi	Umbilikal Kord Kaynaklı MKH	Viral Titrasyon

Tablo 3.2 Kit, Solüsyon ve Antikorların Listesi

Malzeme	Kat. No, Marka
RPMI 1640 Medium	01-101-1A, Biological Industries
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Yüksek Glukoz	11965084, Gibco
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Düşük Glukoz	01-050-1A, Gibco
MSC NutriStem® XF Medium	05-200-1A, Biological Industries
OPTIMEM	31985070, Gibco
Ringer Lactate	PPB-2001252, Polypharma
Fetal Bovine Serum	10500064, Gibco
Penicillin- Streptomisin	03-031-5b, Biological Industries
Trypsin EDTA Solution C	03-053-1B. Biological Industries

Tablo 3.2 Kit, Solüsyon ve Antikorların Listesi (Devamı)

Malzeme	Kat. No, Marka
Dulbecco's phosphate-buffered saline	02-023-1A, Biological Industries
Tripan Mavisi	T8154, Sigma Aldrich
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	C6164, Sigma Aldrich
Dekstran	PPC-1802140, Polifarma
SOC Besiyeri	B9020, New England Biolabs
Gliserol	G5516, Sigma Aldrich
Glisin	G8898, Sigma Aldrich
Methanol	34860, Sigma Aldrich
SDS	L3771, Sigma Aldrich
TexMACS Medium	130-097-196, Miltenyi
TIBA Gold	NS02
Orange G	O3756-25G, Sigma Aldrich
50X Tris/Asetik Asit/EDTA (TAE)	1610773, Biorad
DNA Ladder	10787018, Thermo Fisher Scientific
Vectofusin - 1	130-111-163, Miltenyi Biotech
Protamin Sülfat	SLBS5411, Sigma
QIAfilter Plasmid Giga Kit	12291, QIAgen
Lenti-X Concentrator	PT4421-2, Takara
Fugene HD Transfection Reagent	E2312, Promega
LB Agar	110283.0500, Merck
LB Broth	110285.0500, Merck
Ampicilin 100 mg/ml	A5354, Sigma Aldrich

Tablo 3.2 Kit, Solüsyon ve Antikorların Listesi (Devamı)

Malzeme	Kat. No, Marka
Deiyonize Su	A0223044, Osel
Apirojenik Distile Su	Koçak Farma
Agaroz	800-015, Wisent Bio Product
Protein İmmunoblot	SC-73597, SantaCruz
FVIII Protein Tayini	CB-P005-K, Biorad
CD45R0 Antikoru	130-113-558, Miltenyi Biotech
FVIII İçermeyen İnsan Plasma Ürünü	23-044-689, Siemens Healthineers
İnsan Faktör VIII ELISA Kit	ab272771, Abcam
aPTT/ Dade Actin FS	B4218-20, Siemens
HIV PCR Kit	4513363, QIAgen
FVIII Deficient Kit	OTXW17E, Siemens Healthineers
Western Blot Kit	T7115A, Takara

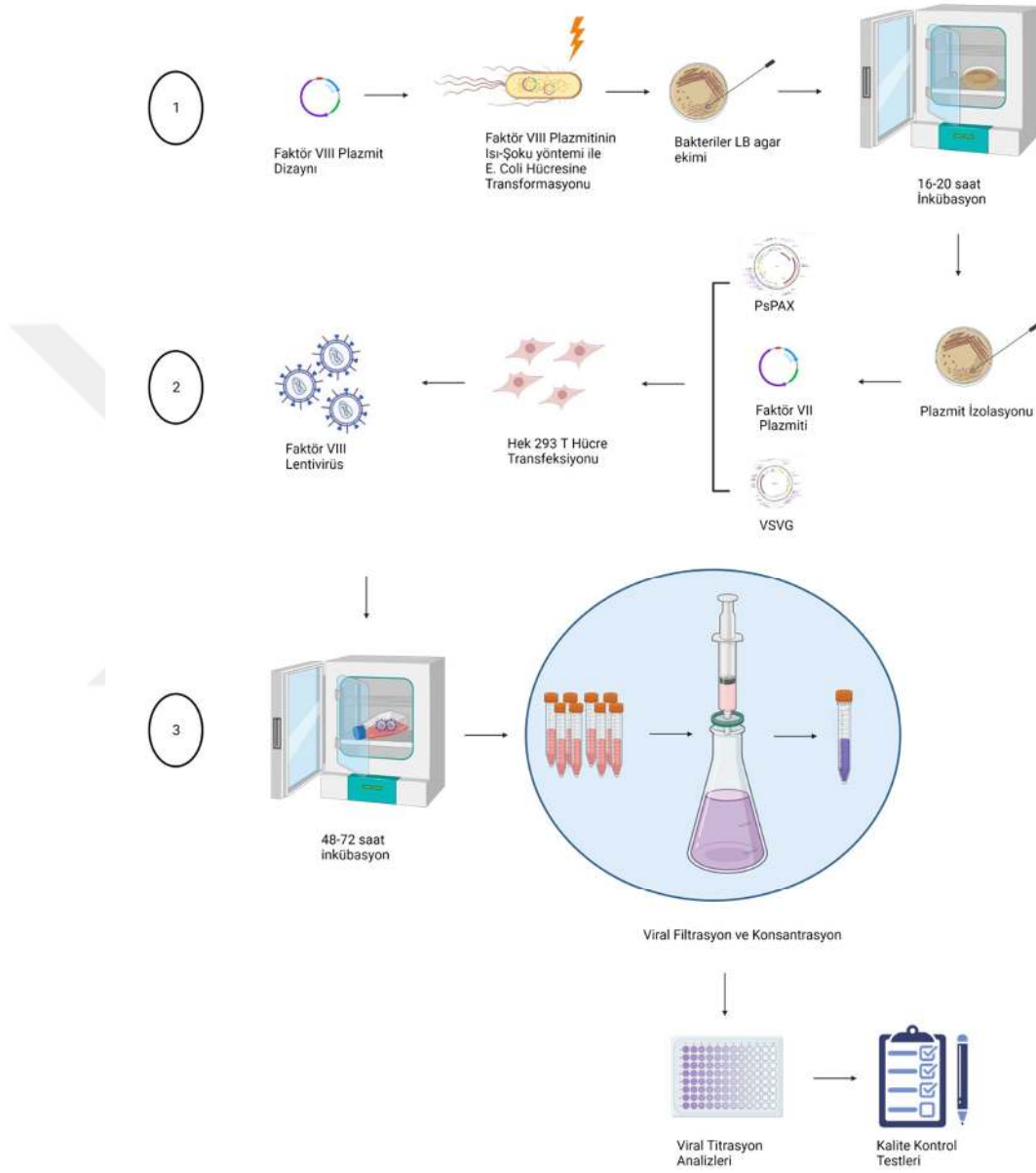
Tablo 3.3 Cihaz Listesi

Cihaz	Kat. No, Marka
Sınıf II Biyo-güvenlik kabini	MN120, Nüve
Buzdolabı (+4)	1060 TY, Arçelik
Buzdolabı (-20)	1060 TY, Arçelik
Buzdolabı (-80)	DW-86L628, Haier
İnkübatör	IC0150med, Memmert
Çalkalayıcı İnkübatör	H100SH, Termal

Tablo 3.3 Cihaz Listesi (Devamı)

Cihaz	Kat. No, Marka
Hücre Sayma Cihazı	T20, Biorad
Pipet Kontrolörü	Pipetus, Hirschmann
Pipet (5,10,25,50,100 µl)	Axygen
Su Banyosu	NB20, Nüve
Santrifüj	Allegra X-30R, Beckman Coulter
Vortex	Neuaton iSwix VT
pH Metre	WTW pH 3110 (pH315i)
Hassas Terazî	Precise LS220A
Hücre Sayıcı	T20, Biorad
Magnetik Karıştırıcı	Heidoph MR 3001 K
Nanodrop	NanoDrop one, Thermo
Işık Mikroskobu	Leica
Flow Cihazı	Cytoflex, Beckman Coulter
ELISA Okuyucu	Omega, BMG
PCR Cihazı	Biorad, T100 Thermal Cycler
CS-5100 Hemostasis System	The Sysmex, Siemens
Rotor Gene Q	Qiagen
Jel Görüntüleme	Geldoc Ez, Biorad
Western Blot Protein Tespit Cihazı	Millipore, Merck
Vakum	Rocker 300
Bullet Blender	Next Advance

3.2. Yöntem



Şekil 3.1 Deney Akışı

1. Plazmit Tasarımı ve Transformasyonu. 2. Lentivirüs Üretimi. 3. Lentivirüs Miktar Tayini ve Kalite Kontrol Testleri. (BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

3.2.1. HEK 293T Hücre Kültürü

HEK 293T hücreleri (CRL-3216, ATCC), HEK besiyeri (500 ml DMEM (#02-023-1A, Biological Industries), %10 ml FBS (#10500064, Gibco), %1 ml penisilin-streptomisin (#03-031-5b, Biological Industries) kullanılarak kültüre edilmiştir. Hücre kültürü işleminde, hücreler %80 konfluense ulaşana kadar taze besiyeri her 2-3 günde bir değiştirilmiştir. Hücreleri toplamak amacıyla besiyeri uzaklaştırılmış ve %0.05 1X Trypsin EDTA (#25300054, Gibco) eklenerek 37 °C’ deki inkübatöre 2 dakika süreyle kaldırılmıştır (Hücrelerin mikroskop altında flask yüzeyinden ayrıldığı teyit edilmiştir). Trypsin aktivitesini nötralize etmek için 1:1 oranında HEK besiyeri eklenmiştir.

Falkonlara alınan hücreler 5 dakika boyunca 1500 rpm’ de santrifüj edilmiştir. Pelet, hücre sayımı tayini için HEK besiyeri ile yeniden süspanse edilmiştir. Süspanse edilen hücre karışımından 100µl alınıp, 1:1 oranında tripan mavisi (#T8154, Sigma Aldrich) eklenerek hücre sayımı alınmıştır. 50 ml HEK besiyeri içinde toplam 4 - 6 x 10⁶ canlı hücre olacak şekilde T300 flasklara ekilmiştir. T300 flasklara ekilen hücreler 37 °C’ deki inkübatöre kaldırılmıştır.

3.2.2. HEK 293T Hücrelerinin Saklanması

%8 DMSO (#C6164, Sigma Aldrich) ve %12 Dextran 40 (#PPC-1802140, Polifarma) karışımı kriyoprezervasyon solüsyonu olarak hazırlanmıştır. Hücreler, HEK besiyeri ile süspanse edilmiş ve 1:4 oranında kriyoprezervasyon solüsyonu kullanılarak dondurulmak üzere kriyoviyallere aktarılmıştır. Kriyoviyaller -80 °C’ de 48 saat saklanmış ve daha sonra uzun süreli depolama için sıvı nitrojen tankına aktarılmıştır. Hücreler kriyoprezervasyon işleminden sonra kullanılması gerektiğinde, kriyoprezervasyon solüsyonunun kalıntılarını uzaklaştırmak için 1 X DPBS (#02-023-1A, Biological Industries) ile 1500 rpm’ de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek 2 kez yıkanmıştır.

3.2.3. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Kültürü

Araştırma çalışmalarında kullanılmak üzere bağışlanan kordon dokusundan elde edilen MKH' lar kullanılmıştır. Nitrojen tankından alınan donmuş kordon dokusundan elde edilen MKH, DPBS w/o (#02-023-1A, Biological Industries) ile 400 G' de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkanmıştır. Pelet MKH besiyeri (500 ml MKH besiyeri (#02-023-1A, Biological Industries), %10 FBS (#10500064, Gibco), %1 penisilin-streptomisin (#03-031-5B, Biological Industries) kullanılarak süspanse edilmiştir. Süspanse edilen MKH karışımından 100 µl alınıp 1:1 oranında tripan mavisi (#T8154, Sigma Aldrich) ile karıştırılarak hücre sayımı alınmıştır.

50 ml MKH besiyeri içinde toplam $4 - 6 \times 10^6$ canlı hücre T300 flasklara ekilmiştir. T300 flask içerisindeki hücreler 37 °C' deki inkübatöre kaldırılmıştır. Hücreler $\geq 80\%$ konfluense ulaştıklarında pasaj gerçekleştirilerek hücre canlılığının korunması sağlanmıştır. Mezenkimal kök hücreler, bu çalışmada somatik hücrelerdeki sitopatik etkinin görülmesi amacıyla kullanılmıştır.

3.2.4. Agar Plate Hazırlama

Bakteri kolonisi seçimi yapılması amacıyla hazırlanan Luria - Bertani Agar (LB Agar) plakaları aşağıdaki protokole uygun olarak hazırlanmıştır.

12 gr LB toz agarı (#110283.0500, Merck) tartılmış ve 500 ml' lik erlenmeyer flaska aktarılmıştır. Daha sonra LB toz agarın (#110283.0500, Merck) üzerine 300 ml deiyonize su (#A0223044, Osel) eklenmiş ve karışması için çalkalanmıştır. Şişenin üstü alüminyum folyo ile kapatılmış, otoklav bandı ile etiketlenmiştir. Otoklav cihazının sıvı ayarında 20 dakika boyunca sterilize edilmiştir. Agar çözeltisi otoklavdan çıkartıldıktan sonra, soğuması beklenmiştir. Solüsyona yavaşça 300 µl Ampisilin (#A5354, Sigma Aldrich) eklenmiş ve karışması için çalkalanmıştır. Son olarak 10 cm polistiren petri kabının ortasına gelecek şekilde ~ 20 ml hazırlanan LB agar karışımı dökülmüştür. Agar, petrinin yaklaşık 2 / 3' ünü kaplayacak şekilde yayıldığında dökme işlemi sona erdirilmiştir.

Daha sonra petriler 30 - 60 dakika soğumaya bırakılmıştır (katılaşana kadar). Etiketlenen petriler 4 °C’ de parafilm ile ağzı kapalı olarak muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Plazmit Dizaynı

Promotörü EF-1 alpha olan (NCBI: EF1A1) , B domaini silinmiş FVIII sekansı (GenBank: ABV90867.1) ile CD45R0t yüzey belirteci (Uniprot: P08575) taşıyan bir FVIII geni dizayn edilmiştir. Bu gen dizisi 5805 bazdan ve 1928 amino asitten meydana gelmektedir. Bu gen EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t lentiviral vektörün içerisine klonlanarak GenScript tarafından sentez edilmiştir.



Şekil 3.2 EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t Plazmit Dizaynı

(BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

5805 bazlık EF1 α -FVIII.CC-CD45R0t gen dizisi aşağıda verilmiştir.

ATGCAGATTGACGTGCACCTGTTCTTCTGTGCTGTCTGAGATTCTGTTTTCGCCACTAGGAGATAC TACCTGGGAGCCGTCGAGCTGTCTTGGGATTACATGCAGTCCGATCTGGG
CGAGCTGCCGTGGATGCCCGGTTCCTCCCGGGTGCCTCAAGTCTTCTCCCTTCAATACCAGCGTGGTGATAAGAAAACACTGTCTGGGAGGTTTACCGACCCACTGTCTCAACATCGCC
AAGCCAAGACCACCTGGATGGGCTCTGTGGACCCACAATCCAGGCCGAGGTGTATGATACCGTGGTAATCACACTGGAAGATATGGCTCCACCCAGTGTCTCTGCACCGCTGGGC
GTGCTCTATTGGAAGGCCCTCTGAGGGCCGCGAGTACGACGATCAGACATCTCAAGAGGGAGAAGGAGGACGACAAAGGTGTCTCCAGCGCGCTCTCACACATACGTGTGGCAGGTGCTGAA
GGAGAAGCGGCCAATGGCTCTCGATCCACTGTGCTGACTTATCTTACCTGTCTCCACGTGGATCTGGTGAAGGATCTGGAATCCGGCTGTATCGCGCTCTGTCAGAGAGGG
CTCCTTGGCAAGGAGAAAACCAAGACTGTGCACAAAGTTATCTGTCTGTGCGCTGTCTGATGAGGGCAAGTCTTGGCACTCTGAGACAAAGAAATAGCTGTATGACAGGATCGGACG
CGCTCTTGCACAGAGCTTGGCTTAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAATGCTCTCTTGCAGGCCGTATCGGCTGTGACCCGGAAGTCCGTGTATGGCACTGTATGCTGGCATGGGAC
CACACTGAGGTGCATCTCATCTTCTTGGAGGGCCACACTTCTTGGTGGGAACACCGGCCAGGCTCTCTGGAGATTCTCTTATCACTCTCTGACCGCCAGACACTGCTGTATGGAT
CTGGGCCAGTTCTGTCTGTTTGTCTACATCAGCTCCACACGACGACGAGGATGGAGGCTTACGTGAAGGTGGATTCTTGCCAGAGGAGCCACAGCTGCGGATGAAGAATAACGAGGA
GGCCGAGGATACGACGATGACCTGACCGATTCCGAGATGGAGCTGGTGTAGATTGACGACGACAATCTCTCTTCTTTATCCAGATCCGCTCCGTGGCCAAAGAAGCACCTAAGACCTG
GGTGACATATATCGCCGCCGAGGAGGAGGATGGGATTATGCCCCACGTGGTGTCTGGGCCAGATGATCGCTCTATAAGAGGCCAGTACCTGAACAAATGGCCACAGAGGATCTGGCAGGAA
GTACAAAGAAGGTGGCTTCTATGGCTACACAGATGAGACATTCAGAGACCGGAGGACATCCAGCACGAGAGCGGACATCTGGGGCTCTGCTGTATGGAGGAGTGGGGGATACACTGCT
GATCATCTTAAGAATACAGGCTCTCTGGCCCTACAATATCTACCTCTACGGCATCCACGACGTGGGCCCTCTGTATTCTCAGAGCCCTGCCAAAGGCCGTGAAGCACTGAAGGACTTCCA
ATCTGCTGGCGAGATATCAAGTACAAGTGGACAGTGACCTGGAGGACGGCCCAACAAAGTCCGATCCACGGTGTCTGACCAGATATATAGCTCTTTGTGAATATGGAGCGGGATC
TGGCCAGCGGCTGTATCGGCCACTGCTGATCTGTATAGGAGTCTCGTGGATCAGCGGGCAACCGATATGTCTGATAAGCGGAACGTGATCTGTTCTCGGTGTTGTATGAGAACCG
GTCTTGTGATCTGACAGAGAATATCCAGAGATTCTTGCCAAACCCAGCCGGCGTGCAGCTGGAGGACCTGTAGTTCAGGCCCTCAACATCATCTCACTCAACCGGCTAGCTGTGTGAT
TCTCTGCACTCTCATGCTGTCTGACGAGTGGCTATGTGTACATCGACGATCGGCCGACAGAGATCTCTGCTGTGCTTTTCGGCTATACCTCAAGCACAAAGATGGTGTGA
CGAGGATACACTGACCCCTGTCTTTTCCGGCGAGGACGTGTATGAGCATGGAGAATCCCGGCTGTGATATCGGCCGTGTCACAAATCCGACTTTCGCAATCGGGCGATGACCGCC
CTGTGTAAGGTGAGCAGCTGTGACAAGAATACGGCGATTACTACGAGGACTCTTACGAGGACATCTCTGCCCTACTGCTGTCTAAGAACAACGCCATCGAGGCCAAGGTCTTACGCCAG
AACCACCTGTGCTGAAGAGACACAGCGGGAGATCACAAGAACCCTCTGCACTGATCCAGGAGGAGATCGACTATGATGATACCATCTCTCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTGA
CATCTATGACGAGGATGAGAACCAGTCTCTCTGGAGCTTCCAGAAGAAAACAAGACACTTTTATCGCCGCCGTGGAGAGACTGTGGGACTATGGCATGTCCAGCAGCCACACGTGCT
GAGAAATAGGGCGCAGTCTGGCTGTGCTGACAGTCTAAGAAGGTGGGTCTCAGGAGTTTACCGAGGCTCTTTTACCCAGGCTCTGTATCGGGCGAGCTGAAGAGACACTTGGGCT
CTGTGGGCCATATCTAGAGCCGAGGTGGAGACAATATCTATGGTACCTTTGGAATACAGGCCAGCAGACCTTCTCTTTATAGCTCTCTGATCTCTTACGAGGAGATCAGAGACAG
GGCCGCCGAGCCCGCAAGAATTCTGTGAAGCCAAATAGAGACAAGACATATCTTGAAGGTGCAGCACCATAGGCCCCCAACAAAGGACGAGTGTGACTGTGAAGGCTGGGGCTTATT
CTCTGATGTGGACTGTGAAGAAGGATGTGACTCTGGCTGTATCGGCCCTCTGCTGGTGTGCCACCAATACCTGAATCTGCTCCACGGCAGACAGGTGACATGTCAGGAATCTGCCCT
GTCTTTTACATCTTTCGACGAGACAAGTCTCTGTATTCTACCGAGAACATGGAGCGGAACTGTCTGGCCCTTGTCAATATCCAGATGGAGGACCCACCTTAAAGGAGAATATATAGGTTT
CACGCCATCAATGGCTTACATATGGATACCTGCGAGGCTGTGTATGGCCAGGACAGAGATCCGGTGTATCTGCTGTCTATGGCGAGCAATGAGAATATCTCACTTCACTCACTTTTCT
CGGCCAGGTGTCTACCGTGAGAAGAAGAAGGAGGATCAAGATGGCCCTGTATAATCTGTATCTCTGGCTGTGTGAGACAGTGGAGATCTGCTCACTAAGGCCGCTCACTTGGCGAGTGA
GTGCCGTATCTGGCGAGCACTGACAGCCGGCATGTCTACATGTTCTGGTGTACTCCAATAAGGTGTCAGACCCACTGGGCCATGGCTCTCGGCCACATCAGAGATTCTTCTAGATCACCGCC
TCCGCCAGTATGGCCAGTGGGCCAGTGGGCCGCAAGCTGGCGTGCATATCTTGGCTGTCTATCAATGCTCTGCTTACCAAGGAGCCATCTCTTGGATCAAGGTGATCTGCTGGCCCAATGA
TCACTACCGGCATCAAGACCCAGGGGCCCGGCAGAAAGTTTCTCTCTGTATATCTCTCAAGTTTATCATCATGATTTCTTGGACGGCAAGAAGTGGCGAGACCTACAGGGGCAATCTTACA
GGCACACTGATGTGTGTTTTTGGCACTGTGGATTCTAGCGGCATCAAGCAATATCTTCAACCCCTTATCATCGCCAGGTATATCGGCTGCAACCCCACTACTCTATCAGATCCACA
CTGAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACTGAACAGTGTCTTATGCTCTGGGCTATGGAGTCAAGGCCATCTCGATGCTCAGATCACCGCTCCAGCTATCTCAAAACAGTTTGGCCA
CATGGAGCCCTCTAAGGCCCGGCTGCACTGCGAGGCGAGTCTTATGCTTGAAGACCCAGGTGAAATAACCCCAAGGAGTGGCTGCAAGTGGGCTCTCAGAAAACATGAAGGTGACA
GGCTGATGTGGACTGTGAAGAAGGATGTGACTCTGCTGACCTCAATGTATGTGAAGGAGTTCTTGTATGACTCTTCCAGGACGGCCACAGTGGACCTGTCTTCAAGAACCGCAAGGTGAAG
GTGTTCCAGGGCAACAGGACAGTCTACCTCTGTGTGTAACCTCTGGACCCACCACTGTGACCTGGTATCTGCGATCCACCCACAGTCTGGGTGACACAGATCGCCCTGAGATG
GAGGTGCTGGGCTGCGAGGCCAGGATCTGACGGCTCTGGGCCCAACCAATTCTCTCTGCTGTAAGCAAGGCCGGCGATGTGGAGGAGAACCCTGGCCCTATGACAATGATCTGTGGCTG
AAGCTGTCTGGCTCTGGCTCTGCTGTGATACAGAGGTGTCTGTGACCGGCCAGAGCCCCACCCCTTCCCCCAAGATGCCATCTGAAATGCCCTGTGAGACAACCACTGTCTTCACT
CCGGCTCTGCTGTGATCTTACCAACCACTGCTGCAACACCTAGCAAGCCACCTGTGTATGAGAAGTATGCAATATACCTGTGATATACAGGAGACAAAGCTGTCTAC
AGCCATACCAAGTATGTGCTGCTTCCGACGCCATCATCTGCCAAGGTGCAAGGAAACGGCTCTGCGCCATGTGCACTTTTACAAACCAAGAGCGCCCACTTCTCAAGGTGTGGA
ACATGACAGTGAATGATCATCTGATAATGACATGCACTGAAGTGGCGGCCACCTCGGGATCGGAATGGCCACACAGAGCGGTATCTACCTGAGGAGTGGAGGCCGCGCAATCCCTGGTGA
GGATGAGTGTCCCAAGAAGACTGTGACTTTCGCTGTGAAGGACCTGACGATCTTCAAGAGACTATCTTAAAGGCCCTACTTCCACACCGGCGATTATCTTGGCGAGCTTCTATCTGCAACCA
CTCCACCTCTCAAAATCAAGGCCCTGATGCTTCTTGGCTTCTGTATCATCTGAGCTCTCATTTGCTCTGCTGTGCTCTGTATAAAATCTATGATCTGCAACAAGAAGCGGTCTGC

Şekil 3.3 5805 bazlık EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t Gen Dizisi

MQIELSTCFFLCLLRFCFS

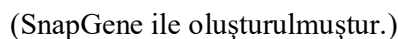
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRPVKSFPFNTSVVYKCTL
FVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAENVYDVTVITLKNMASHPVSLHA
VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPM
ASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILL
FAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLI
GCHRSVYVHVGMTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIFLTAQ
TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDY
DDDLDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDY
APLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHE
SGILGPLLYGEVGDTLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKH
LKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLI
GPLLICYESVDQGRNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPA
GVQLEDPEFQASNMHSINGYVFDLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMVYEDTLTFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNR
GMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPPLVLR
HQREITRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTR
HYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPPQKKVVFQEFTDGSFTQP
LYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQR
QGAEPKRNFKPNETKYTFWKVQHMAPTKDEFDCAWAYFSDVDLEK
DVHSLGIGPLLCHTNILNPAHGRQVIVQEFALFFTIFDETKSWYFTENME
RNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLS
MGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIW
RVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQGW
APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYI
SQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNFNPPIARYIR
LHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASFYTNMFA
TWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGV
KSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLD
PPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

GS GATNFSLLKQAGDVEENPGP

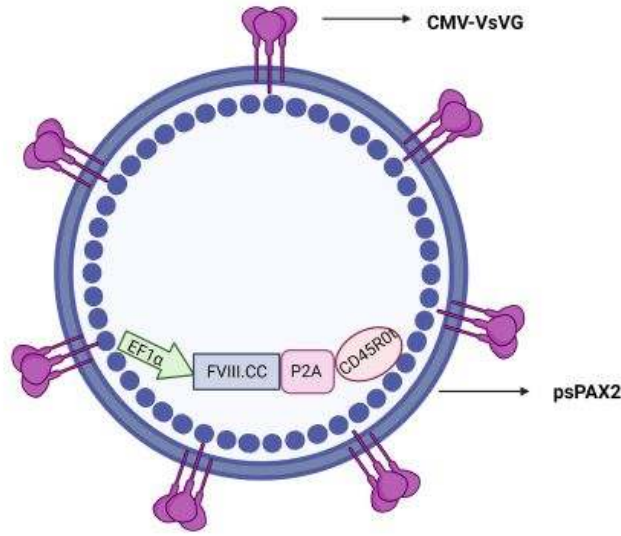
MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTSPPTDAYLNASETTTLSPSGSAVIST
TTIATTPSKPTCDEK YANITVDYLYNKETKLF TAKLVNENVECGNNTCTNNEV
HNLTECKNASVSISHNSCTAPDK TLILDVPPGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLK
WKNIEFTCTDQNTITYRFQCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKF
TNASKIITDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDC
LNL DKNLIK YDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKSAPPSQ
VWNMTVSMTSDNSMHVKCRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCD
FRVKDLQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSIAL
LVVLYKIYDLHKKRSC

Şekil 3.4 EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t Amino Asit Dizisi
(BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

Şekil 3.5 VsVG Plazmiti Gen Dizisi



Şekil 3.7 Pspax Plazmiti Gen Dizisi



Şekil 3.10 Lentiviral Vektör
(BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

3.2.6. Transformasyon

Escherichia coli (E.coli) hücreleri -80 °C' deki buzdolabından alınmış ve buz bloklar üzerinde çözünmeye bırakılmıştır. Çözünme işlemi gerçekleştikten sonra 25 µl kompetan E. coli hücresi 1.5 ml' lik ependorf tüpün içine aktarılmıştır. Eş zamanlı FVIII plazmitleri -20 °C' deki buzdolabından çıkartılarak oda sıcaklığına ulaşınca kadar çözünmesini beklenmiştir. E.coli hücresi içeren ependorf tüpüne 1 µl FVIII plazmiti eklenmiş ve karıştırılmıştır. Negatif kontrol olarak 25 µl kompetan E. coli hücresi 1.5 ml' lik ependorf tüp içerisine aktarılmıştır (FVIII plazmiti eklenmemiştir). Tüplerden biri DNA pozitif (kompetan E.coli hücresi + plazmit karışımı), diğeri ise DNA negatif (kompetan E.coli hücresi / kontrol) olarak işaretlenmiştir.

Tüpler 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildikten sonra 20 sn 42 °C' deki ısı bloğunda bekletilmiş ve ardından tekrar 5 dakika buz üzerine alınarak ısı şokuna maruz bırakılmıştır.

Kompetan E.coli hücresi + plazmit karışımı ve sadece kompetan E.coli hücresi içeren kontrol tüpü, iki ayrı 15 ml' lik falkon tüpe aktarılmış ve üzerlerine 600 µl SOC

besiyeri (#B9020, New England Biolabs) eklenmiştir. Falconlar 60 dakika boyunca 37 °C, 200 rpm’de 45 °C’ lik açılı ile çalkalanarak inkübe edilmiştir.

3.2.7. Steril Gliserol Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması

Otoklavlanabilir cam şişeye %100 gliserol stoktan (#G5516, Sigma Aldrich) 25 ml eklenmiştir. Üzerine 25 ml steril deiyonize su (#A0223044, Osel) ilave edilerek son gliserol konsantrasyonunun %50 olması sağlanmıştır. Cam şişe otoklava yerleştirilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Sterilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra oda ısısında soğumaya bırakılmış ve 4 °C’ deki buzdolabına kaldırılmıştır. Oluşan bakteri kültüründen 500 µl kriyovialle alınmış ve üzerine 500 µl steril gliserol dondurma solüsyonundan (%50 konsantrasyonlu) eklenmiştir (böylelikle son karışımdaki gliserol konsantrasyonunun %25 olması sağlanmıştır). Kriyovialler uygun şekilde etiketlendikten sonra, ileride planlanan bakteri inokülasyonu için -80 °C’ deki derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.2.8. Transforme Bakterilerin Plakalara Ekimi

Bakteri inokülasyonu için plazmit ile transforme edilmiş E.coli stoğundan 300 µl alınmış ve LB agar plate üzerine damlatılmıştır. Bakterilerin agar plate üzerine steril öze yardımı ile ekimi (çizgi) yapılmıştır. Ekimi gerçekleşen bakteriler 37 °C’ de 16 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra +4 °C’ deki buzdolabına kaldırılmıştır.

3.2.9. Mini ve Maksi İnokülasyon

Giga prep mini inokülasyon işlemi için 15 ml’ lik 8 adet falkon tüp hazırlanmıştır. Her bir falkon tüp içerisine 5 ml LB broth (#110285.0500, Merck), 5 µl ampisilin (#A5354, Sigma Aldrich) ilave edilmiş ve agar plate üzerinde oluşan bakteri kolonilerinden 2 tanesi seçilerek steril öze yardımıyla tüp içerisine eklenmiştir. Hazırlanan falkon tüpler 5 - 8 saat boyunca 200 rpm hızlı çalkalayıcı üzerinde 37 °C’ de kültüre edilmiştir.

Maksi inokülasyon işlemi için 4 adet 1000 ml' lik beher hazırlanmıştır. 15 ml' lik falkon tüpler içerisinde 5 - 8 saat inkübe edilen sıvı bakteri kültürlerinden iki tanesi bir erlenmayer flask içerisine ilave edilecek şekilde hazırlanmıştır.

Her bir erlenmayer flask içerisine 600 ml LB broth (#110285.0500, Merck) ve 600 µl ampicilin (#A5354, Sigma Aldrich) eklenmiştir. 16 - 20 saat boyunca 200 rpm hızlı çalkalayıcı üzerinde 37 °C' de kültüre edilmiştir.

3.2.10. Plazmit İzolasyonu

QIAfilter Plasmid Giga Kit' inde (#12291, QIAgen) yer alan solüsyonlar üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır.

Maksi inokülasyon sonrası sıvı kültürde çoğaltılan bakteriler 400 ml' lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve 4 °C, 4200 G' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Peletin üzerine kalan sıvı kültürleri eklenmiş ve 4 °C, 4200 G' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant tekrar uzaklaştırılmıştır.

Elde edilen peletin üzerine QIAfilter Plasmid Giga Kit' inde (#12291, QIAgen) yer alan buffer P1' den 125 ml eklenmiş ve çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra aynı kit içerisinde yer alan buffer P2' den 125 ml eklenmiş ve 400 ml' lik santrifüj tüpü 4 - 5 kez sertçe çevrilerek karışması sağlanmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiş olan karışımın mavi renge döndüğü gözlemlenmiştir. Son olarak kit içerisinde yer alan buffer P3, karışıma eklenmiş ve karıştırılmıştır.

Karışımın yeniden renksiz / şeffaf olduğu gözlemlenmiştir. 400 ml' lik santrifüj tüpü içerisinde yer alan bu karışım 4 °C, 4200 G' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Son ürünün süpernatantı QIAfilter Cartridge' a yüklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 10 dakika dolduğunda tüm sıvı vakum uygulanarak filtre edilmiştir.

Vakum işleminden sonra QIAfilter Cartridge' a 50 ml buffer FWB2 eklemiş ve steril hücre yayıcısı kullanarak çökelti hafifçe karıştırılmıştır. Karışım süzülene kadar tekrar vakum işlemi uygulanmıştır. Filtre edilen lizat daha sonra QIAGEN - tip

kolonuna yüklenmiştir. QIAGEN - tip kolonundan geçen lizata 100 ml bufferQT eklenmiş ve plazmitin ayrışması sağlanmıştır. Daha sonra 70 ml izopropanol ile karıştırılmış ve 50 ml' lik falkonlara dağıtılarak, ağzı parafilm ile kapatılmıştır.

Falkonlar 4 °C, 13500 G' de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrası tabanda beyaz renkli plazmit çökeltisi gözlemlenmiş ve 10 ml %70 etanol çözeltisi eklenerek plazmit DNA peleti yikanmıştır. Tekrar parafilm ile kapatılan flakonlar 4 °C, 13500 G' de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra plazmit peletinin kuruması beklenmiş ve saflaştırılmış plazmitin üzerine 3 ml deiyonize su (#A0223044, Osel) eklenerek tamamen çözünene kadar pipetaj işlemi uygulanmıştır. Son ürün plazmit DNA' sı 15 ml' lik falkon tüp içerisine alınarak, lentivirüs üretimi gerçekleşene kadar -20 °C' deki buzdolabında saklanmıştır.

3.2.11. Nanodrop Analizi

Transforme edilen Hemofili plazmitine ait DNA ve proteinin saflığı Nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Plazmit örneğinden 1 µl alınarak Nanodrop cihazına yüklenmiştir ve ölçüm alınmıştır. Nanodrop ölçümlerinde 260 nm ve 280 nm'deki absorbans oranı, DNA ve RNA saflığını değerlendirmek için kullanılmaktadır. DNA için yaklaşık 1.8 oranı genellikle "saf" olarak kabul edilmektedir. 260 nm ve 230 nm'deki absorbans oranı nükleik asit saflığının ikincil bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Bu oranın 2.0 - 2.2 olması beklenmektedir.

3.2.12. Plazmit Jel Elektrophorezi

İzole edilen FVIII plazmit DNA'sının saflık analizi için jel elektrophorez yönteminden yararlanılmıştır. 25 gr agaroz (#800-015, Wisent Bio Product) tartılmış ve 500 ml beher içerisinde 250 ml 1 x TAE (#1610773, Biorad) ile karıştırılmıştır. Daha sonra mikrodalga fırın içerisinde aralıklı olarak çıkartılıp karıştırılarak kaynaması sağlanmıştır. %1' lik agaroz jel ılımaya başlayınca kaset içerisine yavaşça dökülmüş ve ince uçlu bir tip yardımıyla jel üzerinde oluşan hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. Comb yardımıyla agaroz jel üzerinde kuyucuklar oluşturulmuş,

20 - 30 dakika beklenerek jelin donması sağlanmıştır. Jel donduktan sonra Comb dikkatlice jelden çıkartılmıştır. Ependorf tüp içerisinde 9 µl apirojenik su (Koçak Farma), 1 µl FVIII plazmit örneği ile karıştırılmış ve plazmit örneği 200 nanograma seyreltilmiştir.

Ladder için; 1 µl DNA ladder (#10787018, Thermo Fisher Scientific) ile aynı oranlarda Orange G (#O3756-25G, Sigma Aldrich), Tibo Gold (NS02) karıştırılmıştır. Örnek için; 2 µl Orange G (#O3756-25G, Sigma Aldrich), 1 µl Tibo Gold (NS02) ve apirojenik su (Koçak Farma) ile daha önce dilüe edilen FVIII plazmitinden 1 µl alınmış, parafilm üzerinde pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.

Hazırlanmış olan DNA ladder ve örnek, agaroz jel üzerinde Comb ile oluşturulan kuyucukların içerisine yüklenmiştir. Agoroz jel elektroforez çemberinin kapağı kapatılmış ve daha sonra güç ünitesi bağlanarak (V: 120, mA: 90, Süre: 90 dk) agaroz jele yüklenen seyreltilmiş örneklerin yürümesi beklenmiştir.

3.2.13. Lentivirüs Üretimi ve Plazmit Ekimi

Faktör VIII lentivirüsün üretimine 21 adet beş katlı flasklarla başlanmıştır. HEK293T hücreleri, 100 ml' lik HEK besiyeri (500 ml DMEM (#02-023-1A, Biological Industries), %10 ml FBS (#10500064, Gibco), %1 ml penisilin-streptomisin (#03-031-5b, Biological Industries)) içerisinde, flask başı ortalama 60×10^6 hücre içerecek şekilde beş katlı flasklara ekilmiştir. Hücreler 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ konsantrasyonunda 16 - 20 saat inkübe edilmiştir.

Hücreler $\geq$ %80 konfluense ulaştığında; flask içeriği uzaklaştırılmış ve %1 pensilin-streptomisin (#03-031-5B, Biological Industries) içeren 75 ml OPTIMEM (#31985070, Gibco) eklenmiştir. Hücreler transfeksiyon işlemi öncesi 37 °C' de en az 2 saat inkübe edilmiştir.

Her bir 5 katlı flaskta yapılacak transfeksiyon işlemi için FVIII geni taşıyan Hemofili A plazmiti, zarf plazmiti pCMV.VSVG ve paketleme plazmiti psPAX2 belirli oranlarda karıştırılmıştır. Bu oranlar FVIII geni taşıyan Hemofili A plazmiti için x 2 (105 µg), zarf plazmiti pCMV.VSVG ve paketleme plazmiti psPAX2 için x 1 (52.5

µg) şeklindedir. Her bir flask içeriği OPTIMEM (#31985070, Gibco) ile birlikte 7.5 ml olacak şekilde hesaplanmıştır. Sonrasında flask içerisine damla damla 120µl Fugene (# E2312, Promega) eklenmiştir.

Bu hesaplama ya bağlı kalınarak toplam 7 adet 5 katlı flask elde edilmiştir. Flasklar hafifçe çalkalanarak flask içeriğinin homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Flasklar 10 - 14 saat boyunca 37 °C’ deki inkübatöre kaldırılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra 5 katlı flask içeriği pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra flaskların içerisine %10 FBS (#10500064, Gibco), içeren 75 ml DMEM - HG (#11965084, Gibco) solüsyonu eklenmiştir. 5 katlı flasklar 37 °C’ de en az 48 en fazla 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası flasklardan toplanan süpernatantlar 50 ml’ lik falkon tüplere alınmıştır. Falkon tüpler 21 °C, 1000 G’ de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant pipet yardımıyla toplanarak 0.45 µm 1000 ml filtre sisteminden vakum yardımıyla geçirilmiştir. Bu sayede plazmit atıkları ve hücre kalıntıları uzaklaştırılmıştır.

Faktör VIII içeren lentivirüsü konsantre etmek için 1:3 oranında Lenti - X - Concentrator (#PT4421-2, Takara) eklenmiştir. Lenti - X - Concentrator (#PT4421-2, Takara) eklenmesinin ardından 4 - 16 saat 4 °C’ deki buzdolabında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 50 ml’ lik falkon tüplere dağıtılan virüsler 4 °C, 1500G’ de 45 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış kalan pelet başlangıç hacminin en fazla 1:100’ üne denk gelecek miktarda OPTIMEM (#31985070, Gibco) eklenerek çözünmüştür. Çözünme işlemi sonrası virüsler 5 ml’ lik kriyoviallere (buz aküsü üzerinde) dağıtılmıştır. Etiketlenen kriyovialler -80 °C’ deki buzdolabına kaldırılmıştır.

Lentivirüs varlığının tayini için etkili bir test olan Lenti-X testi ile lentivirüs varlığı doğrulanmıştır. 10 µl virüs, 10 µl OPTIMEM (#31985070, Gibco) karışımı test kitinin haznesine damlatılmış ve üzerine 3 damla Lenti - X solüsyonu eklenerek p24 bantlarının belirginleşmesi beklenmiştir.

3.2.14. Kalite Kontrol Testleri

Acıbadem Labmed Laboratuvar' ı tarafından mikoplazma, endotoksin, mantar, aerobik-anaerobik bakteri kültürü kalite kontrol testleri gerçekleştirilmiştir.

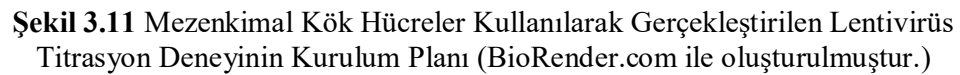
3.2.15. Lentivirüs CD45R0t Ekspresyon Analizleri ve Infectious Unit (IFU) Hesaplanması

Infectious Unit' in belirlenmesi amacıyla mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Duplike olarak çalışılan analizlerde, ilk aşamada mezenkimal kök hücreler Şekil 3.11' de gösterildiği üzere 96 kuyucuklu plakanın belirlenen kuyucuklarına (A7 - G7 ve A8 - G8), her bir kuyucuğa 10.000 MKH gelecek şekilde dağıtılmıştır. A7 ve A8 numaralı kuyucuklara 10 µl virüs eklenmiştir. İkinci aşamada ise Şekil 3.11' de gösterildiği üzere plakanın sol tarafında yer alan, ilk iki kuyucuğa (B4 ve B5 kuyucukları) 6µl virüs eklenmiştir. Bu iki kuyucuktan (B4 ve B5 kuyucukları) başlayarak aşağısında yer alan 4 kuyucuğa 100' er µl MSC NutriStem® XF Suppl. karışımı (#05-201-1U, Biological Industries) ilave edilmiştir. Seri dilüsyon işlemi ilk iki kuyucuktan (B4 ve B5 kuyucukları) 50 µl çekilip bir sonraki kuyucuklara aktarılarak gerçekleştirilmiştir. Son olarak seri olarak dilüe edilen her bir kuyucuktan 50 µl çekilerek o dilüsyona karşılık gelen mezenkimal kök hücre kuyucuğuna aktarılmıştır.

Titre edilen hücreler, 37 °C' de 4 gün süreyle inkübe edilmiştir. 4 günlük inkübasyondan sonra, her bir kuyucuk pipetaj yardımıyla karıştırılmış ve 50 µl' lik cam tüplere aktarılmıştır. Işık almayan ortamda 2.5 µl FVIII geni taşıyan plazminin CD45 R0 yüzey reseptörüne karşılık gelen CD45R0 antikoru (#130-113-558, Miltenyi Biotech) eklenmiştir.

Hazırlanan cam tüpler +4 °C' de 30 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra her numuneye 1 ml DPBS (#02-023-1A, Biological Industries) eklenmiştir. 1500 rpm' de 5 dakika santrifüj edilen örneklerden süpernatant uzaklaştırılmış ve peletlerin 150 µl DPBS' de (#02-023-1A, Biological Industries) pipetaj yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Tüm viral dilüsyonlar akım sitometri cihazı yardımıyla ölçülmüştür.

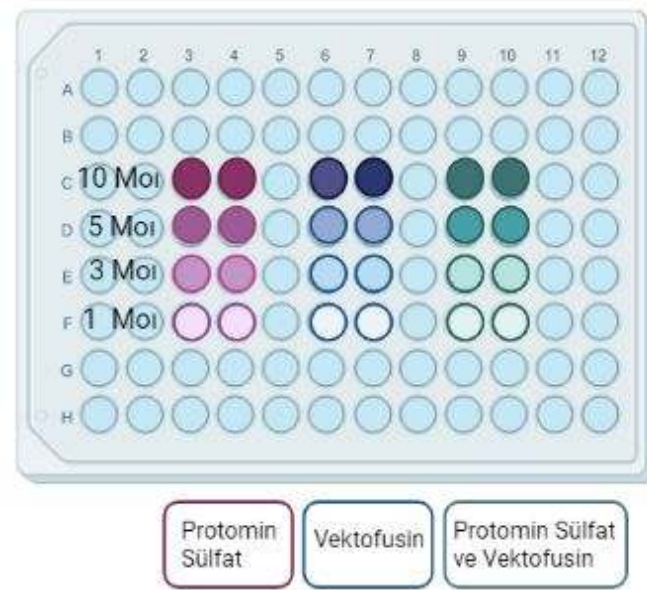
Faktör VIII lentivirüsün viral titrasyon analizleri sonrası akım sitometrisi ile ölçülen CD45R0t ifadesinin >%10' ununa karşılık gelen en düşük dilüsyon kat sayısı olarak hesaplanmaktadır.



Faktör VIII lentivirüsün mezenkimal kök hücreleri transdükte edebilme kapasitesini belirlemek amacıyla protamin sülfat (#SLBS5411, Sigma), vektofusin (#130-111-163, Miltenyi) ve protamin sülfat - vektofusin kullanılmıştır. Bu ölçümlerde 4 farklı virüs dilüsyonu (10, 5, 3 ve 1) çalışılmış olup, ölçümler iki farklı günde duplike olarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada mezenkimal kök hücreler Şekil 3.12’ de gösterildiği üzere 96 kuyucuklu plakanın belirlenen kuyucuklarına, her bir kuyucuğa 10.000 MKH gelecek şekilde dağıtılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin plaka tabanına tutunması için plaka, 24 saat süreyle 37 °C’ deki inkübatöre kaldırılmıştır. 24 saat sonra inkübatörden alınan plakanın her bir kuyucuğuna 4 farklı

dilüsyonda virüs eklenmiştir. Son olarak protamin sülfat, vektofusin ve protamin sülfat - vektofusin karışımı da plakanın Şekil 3.12’de gösterilen kuyucuklarına ilave edilmiştir.

Hazırlanan plaka 37 °C’ de 4 gün süreyle inkübe edilmiştir. 4 günlük inkübasyondan sonra, her bir kuyucuk pipetaj yapılarak karıştırılmış ve 50 µl’ lik cam tüplere aktarılmıştır. Daha sonra hazırlanan cam tüplere FVIII geni taşıyan plazmitin CD45 R0 yüzey reseptörüne karşılık gelen CD45 R0 antikoru (#130-113-558, Miltenyi Biotech) eklenmiştir. +4 °C’ de 30 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyondan hemen sonra her numuneye 1 ml DPBS (#02-023-1A, Biological Industries) eklenmiştir. 1500 rpm’ de 5 dakika santrifüj edilen örneklerden süpernatant uzaklaştırılmış ve peletlerin 150 µl DPBS’ de (#02-023-1A, Biological Industries) pipetaj yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Tüm viral dilüsyonlar akım sitometri cihazı yardımıyla ölçülmüştür.



Şekil 3.12 Farklı Transdüksiyon Ajanları Kullanılarak Gerçekleştirilen FVIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Mezenkimal Kök Hücre Transdüksiyon Deneyinin Kurulum Planı (BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

3.2.17. Lentivirüs Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Analizleri

Kantitatif PCR (qPCR) olarak da bilinen gerçek zamanlı PCR, transdüksiyondan sonra genoma kararlı bir şekilde entegre olan lentivirüs kopya sayısını ölçmek için kullanılmıştır.

96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 10.000 mezenkimal kök hücre gelecek şekilde dağıtılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin plaka tabanına tutunması için plaka 24 saat süreyle 37 °C’ deki inkübatöre kaldırılmıştır. İnkübatörden alınan hücrelere 0,8 µl protamin sülfat (# SLBS5411, Sigma) eklenmiştir. Son olarak 8 farklı dilüsyonda (10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0) FVIII geni taşıyan lentivirüs ilave edilmiş ve mezenkimal kök hücrelerin transdükte edilmesi sağlanmıştır. 0. Gün ve 10. günlerde farklı viral dilüsyonlardaki mezenkimal kök hücre süpernatantları toplanmıştır. Toplanan hücre süpernatantlardan Artus HI Virus-1 QS-RGQ Kit 24 CE (#4513363, QIAGEN) kiti kullanılarak lentivirüs (LTR sekansı) PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm reaktifler, numuneler ve standartlar üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır. Analizler Rotor - Gene Q cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.18. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Analizleri

TEM analizleri Acıbadem Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2.19. Faktör VIII Sekresyon Analizleri

Faktör VIII’ in hassas nicel ölçümü, İnsan FVIII Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kiti (#ab272771, Abcam) ile gerçekleştirilmiştir. Faktör VIII sekresyon analizleri yapılırken mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Faktör VIII sekresyon analizleri 3. gün ve 10. gün olmak üzere 2 farklı günde ve 4 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Bu ölçümler sırasında 4 farklı virüs dilüsyonu ile transdükte edilmiş MKH’ ların FVIII seviyeleri karşılaştırılmıştır.

Daha önce virüs titrasyon analizleri alt başlığında anlatıldığı üzere 4 farklı dilüsyonda FVIII lentivirüs (10, 3, 1, ve 0.1) ile transdükte edilmiş mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Tüm reaktifler, numuneler ve standartlar üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır (#ab272771, Abcam). Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay kitinde yer alan plakanın kuyucuklarına 100 µL FVIII ile transdükte edilmiş MKH süpernatantı eklenmiş ve plakanın 30 dakika boyunca 300 rpm’ de hafifçe çalkalanması sağlanmıştır. Daha sonra kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu eklenmiş ve fazla yıkama tamponu plakanın arkasına hafifçe vurularak uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa 100 µL birincil antikor eklenmiş ve plakanın 30 dakika boyunca 300 rpm’ de hafifçe çalkalanması sağlanmıştır. Daha sonra kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu eklenmiş ve fazla yıkama tamponu plakanın arkasına hafifçe vurularak uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa 100 µl Streptavidin - HRP eklenmiştir. Plaka 30 dakika boyunca 300 rpm’ de çalkalanmıştır. Daha sonra kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu eklenmiş ve fazla yıkama tamponu plakanın arkasına hafifçe vurularak uzaklaştırılmıştır. Her kuyucuğa 100 µl TMB Substrat Solüsyonu eklenmiş ve plaka 2 - 10 dakika çalkalanmıştır. Son olarak 50 µl HCl durdurma solüsyonu ile reaksiyonu durdurulmuştur. Tüm kuyucuklar 450 nm absorbans değerinde Omega, BMG ELISA cihazı ile ölçülmüştür.

3.2.20. Koagülasyon, Tarama ve Karıştırma (Mixing Test) Analizleri

Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı (aPTT); intrinsik ve ortak pıhtılaşma yolağının genel bütünlüğünü değerlendirmek ve heparin tedavisi gören hastaları izlemek için kullanılan bir tarama testidir. Genellikle pıhtılaşma faktörlerinin düzeylerinin belirlenmesinde rol oynayan diğer testlerle birlikte değerlendirilmesi uygundur. Bu test, intrinsik ve ortak prokoagülan yolaktaki pıhtılaşma faktörlerinin çoğunun aktivitelerini yansıtmaktadır, ancak faktör VII ve doku faktörünü içeren ekstrinsik prokoagülan yolak veya FXIII’ in (fibrin stabilize edici faktör) aktivitesi hakkında bilgi vermemektedir. Pıhtılaşma faktör düzeyleri normalin %15 - 30 altına düşene kadar aPTT uzaması görülmemektedir.

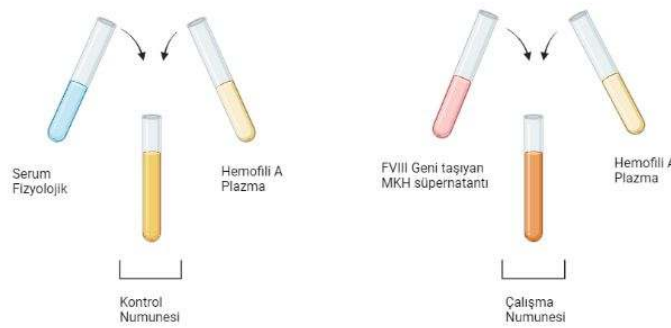
Protrombin zamanı ve aPTT testleri koagülometrik (türbidimetrik) pıhtı tespiti tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu test fibrinojenin fibrine dönüştürüldüğü bir

ortamdan geçen ışığın fibrin şeritleri tarafından emilmesi prensibine dayanmaktadır. Fibrin pıhtı oluşumu ilerledikçe ışık Emilimi artmaktadır. Sonuç olarak, numuneden geçen ışık geçirgenliği sürekli olarak azalmakta ve fotodedektör tarafından saptanmaktadır. Bu test ile, plazma örneğinden pıhtı oluşumu için geçen süre ölçülmektedir.

1:1 Karışım Testi (Mixing Test):

Mezenkimal kök hücreler 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 10.000 hücre gelecek şekilde dağıtılmıştır. Hücreler 37 °C’ de sıcaklık ve %5 CO₂ konsantrasyonunda 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. 24 saat sonra inkübatörden çıkartılan hücrelere protamin sülfat (#SLBS5411, Sigma) ve 1 MOI FVIII geni taşıyan lentivirüs ilave edilmiştir. Transdükte edilen hücreler 7 gün süreyle 37 °C’ de inkübe edilmiştir. İnkübe edilen hücrelerin süpernatantları toplanarak 2 ml’ lik cam tüplere aktarılmıştır. Faktör VIII içermeyen insan plazma ürünü (#5154004, Diapharma) ile serum fizyolojik 1:1 oranında karıştırılmıştır.

Faktör VIII içermeyen insan plazma ürünü (#23-044-689, Siemens Healthineers) daha sonra 1:1 oranında FVIII geni taşıyan lentivirüs ile transdükte edilen mezenkimal kök hücre süpernatantı ile karıştırılarak ölçümler alınmıştır.



Şekil 3.13 Faktör VIII İçermeyen İnsan Plazma Ürünü Karışım Testi (Mixing Test) Deneyinin Kurulum Planı (BioRender.com ile oluşturulmuştur.)

3.2.21. Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı ve Faktör VIII Seviye Analizleri

Dade® Actin® FS Activated PTT Reagent kiti (#B4218-20, Siemens) , koagülasyon FVIII yönünden eksik plazma kiti (#OTXW17E, Siemens Healthineers) karışım testi sonucu elde edilen örneklerde aPTT ve FVIII seviye analizlerini gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Tüm reaktifler, numuneler ve standartlar üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır. Bu iki analiz koagulametri yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.22. Western Blot Analizi

Daha önce virüs titrasyon analizleri alt başlığında anlatıldığı üzere 100.000 mezenkimal kök hücre 24 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Ekilen mezenkimal kök hücreler 24 saat sonra protamin sülfat (# SLBS5411, Sigma) kullanılarak transdükte edilmiştir.

Transdüksiyon işlemi sonrası hücreler 1 saat 32 °C, 400G’ de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden 24 saat sonra plaka dibine değdirmeden süpernatant toplanarak uzaklaştırılmış ve 1.5 ml MSC NutriStem® XF Suppl. karışımı (#05-201-1U, Biological Industries) ilave edilmiştir. Mezenkimal kök hücreler 7 gün süreyle 37 °C’ deki inkübatöre kaldırılmıştır. 7. gün inkübatörden alınan hücreler medium kalıntılarından uzaklaştırmak için soğuk PBS (#02-023-1A, Biological Industries) ile yıkanmıştır. pH 8.8 olan bir Lysis tamponundan 50 µl, 0.2 mm paslanmaz hareketsiz boncuk ile birlikte hücrelerin üstüne ilave edilmiştir. Hücreler daha sonra bir boncuk çırpıcı yardımıyla parçalanmıştır. Hücre içermeyen bu kısım 15000G’ de 30 dakika santrifüj edildikten sonra toplanmış ve protein konsantrasyonu, modifiye Bradford Assay (#CB-P005-K, Biorad) ile ölçülmüştür. Proteinler daha sonra %12 akrilamid jelle (8 cm x 10 cm) yüklenerek Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS - PAGE) yardımıyla ayrılmıştır. Proteinlerin pozitif yüklü nitroselüloz membranlar üzerine elektroforetik transferi, 39 mM glisin (#G8898, Sigma Aldrich), %20 (v / v) metanol (#34860, Sigma Aldrich) ve 0.0375 g/l SDS (#L3771, Sigma Aldrich) içeren yarı kuru bir elektroforetik transfer hücresinde 20 dakikada ve 15 V’ de gerçekleştirilmiştir. Blotlar daha sonra Takara Immune Booster sistemi (#T7115A,

Takara) ile bir FVIII antikoru (#Sc-73597, SantaCruz) ve bir HRP - konjuge anti fare ikincil antikoru (1:1000 seyreltme oranı) kullanılarak problanmıştır. Sinyal üretimi için bir kemilüminesan algılama sistemi kullanılmıştır.

3.2.23. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS 20.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programından yararlanılmıştır. Çalışmanın verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotlar yapılmıştır. Dataların normalliği Kolmogorov Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım göstermeyen transdüksiyon ajanlarının birbirleri ile olan etkinlik karşılaştırılması Kruskal Wallis-H testi ile gerçekleştirilmiştir. Her bir transdüksiyon ajanının kendi içindeki duplike ölçümleri Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılmıştır. 0. gün, 3. gün ve 10. gün gerçekleştirilen FVIII lentivirüs kalıcılık ve ekspresyon analizleri Friedman Testi ile değerlendirilmiştir.

Üçüncü (3.) gün ve 10. gün yapılan FVIII ELISA testlerinde, her bir gün için FVIII lentivirüs MOI' leri arasında fark olup olmadığı Kruskal Wallis-H ile ölçülmüş olup, ikili karşılaştırmaları Mann Whitney-U ile değerlendirilmiştir. Her bir MOI'de 3. ve 10. günlerde ELISA ile gerçekleştirilen FVIII protein seviyesi farkı Wilcoxon testi ile değerlendirilmiştir. Karışım testi (Mixing Test) kullanılarak gerçekleştirilen aPTT ve FVIII seviye analizleri Wilcoxon testi ile değerlendirilmiştir. Tüm testler için anlamlılık düzeyi * $p < 0.05$ olarak ayarlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Faktör VIII Plazmiti Nanodrop Analizi

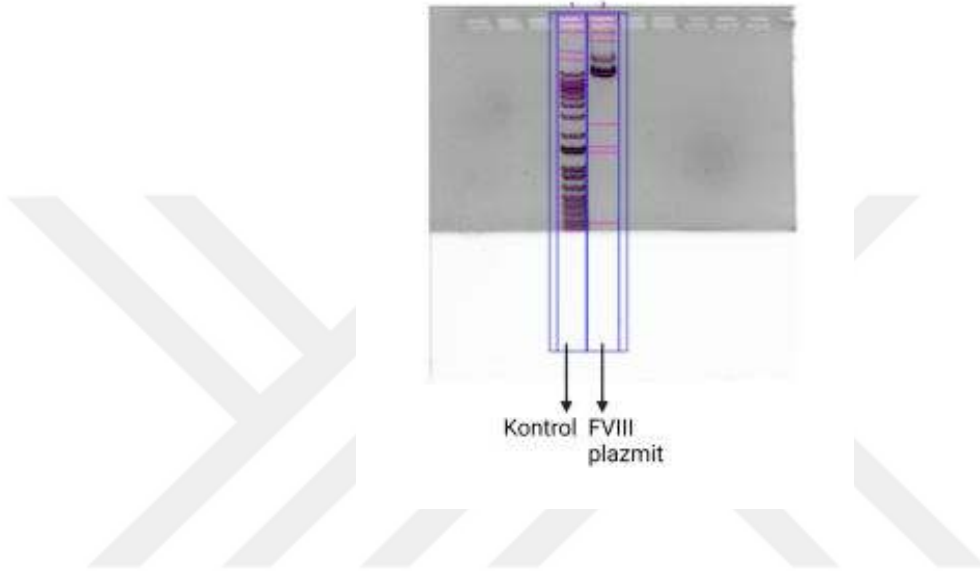
Transformasyon sonrası izole edilen FVIII plazmitinin miktarı ve saflığı nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. FVIII plazmitinin nükleik asit miktarı 2.016.998 ng / µl olarak saptanmıştır. Yapılan nanodrop ölçümünde FVIII plazmitinin A260 / A280 değeri 1.929 ve A260 / A230 değeri ise 2.288 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.1 Faktör VIII Plazmit İzolasyonu Sonrası Nanodrop Analiz Sonuçları

Nükleik Asit Miktarı (ng/µl)	A260 / A280	A260 / A230
2.016.998	1.929	2.288

4.2. Faktör VIII Plazmiti Jel Elektroforezi

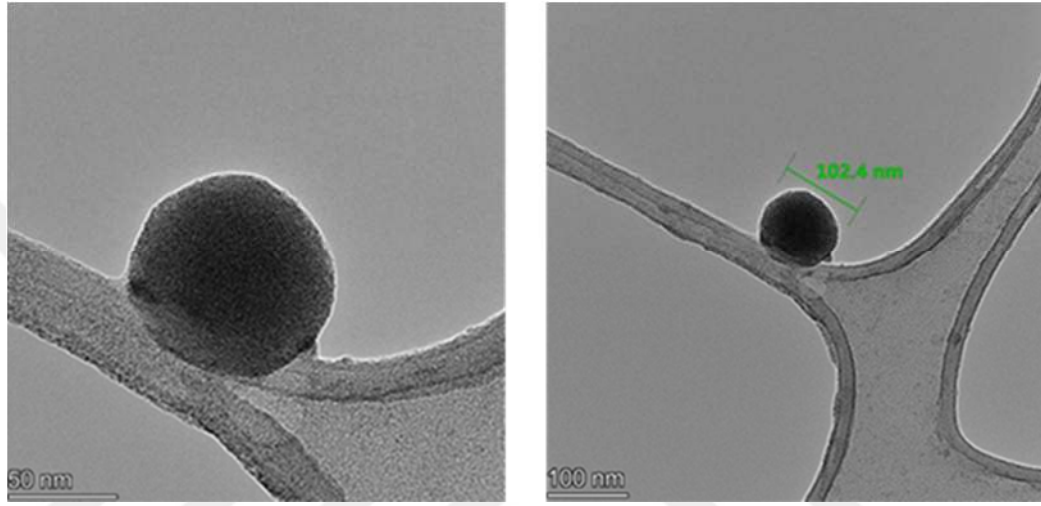
Faktör VIII plazmitinin izolasyonu sonrası DNA saflığının değerlendirilmesi için jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 4.1 Faktör VIII Plazmitinin Jel Elektroforez Görüntüsü

4.3. Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüs TEM Analizleri

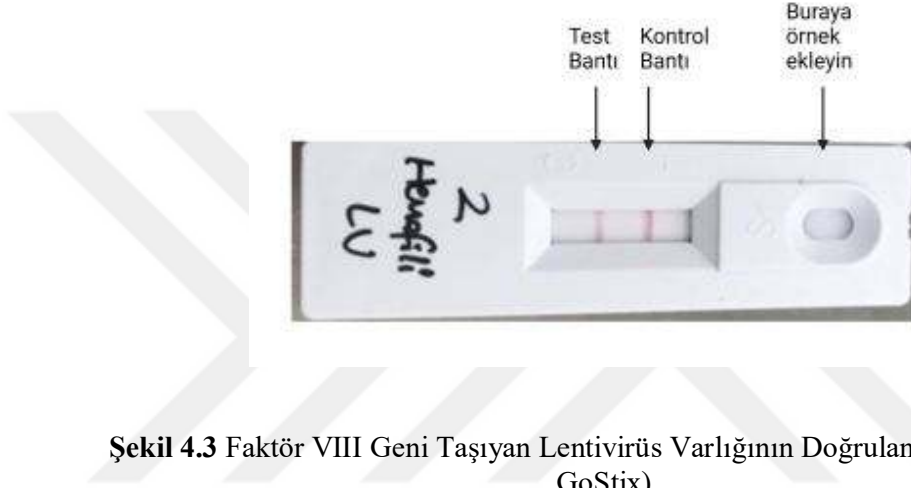
Faktör VIII geni taşıyan lentivirüsün genel morfolojisi, partikül bütünlüğü, boyut dağılımı, gibi özelliklerinin karakterizasyonu için yapılan analizlerde, ortalama viral boyutun 102.4 nm olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2 Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüsün TEM Görüntüsü

4.4. Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Varlığının Doğrulanması

Lenti-X GoStix testi, lentivirüsün erken evrede ifade ettiği viral çekirdek proteini olan p24' ün tespit edilmesi prensibine dayanarak çalışmaktadır. Lenti - X GoStix çubuğu üzerinde oluşan çift bant, virüs varlığının $> 5 \times 10^5$ IFU / ml olduğunu ifade etmiştir.



4.5. Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre

Faktör VIII geni taşıyan lentivirüsün güvenlik ve etkinlik analizlerinde kullanılan umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin mikroskopik görüntüsü aşağıda verilmiştir.



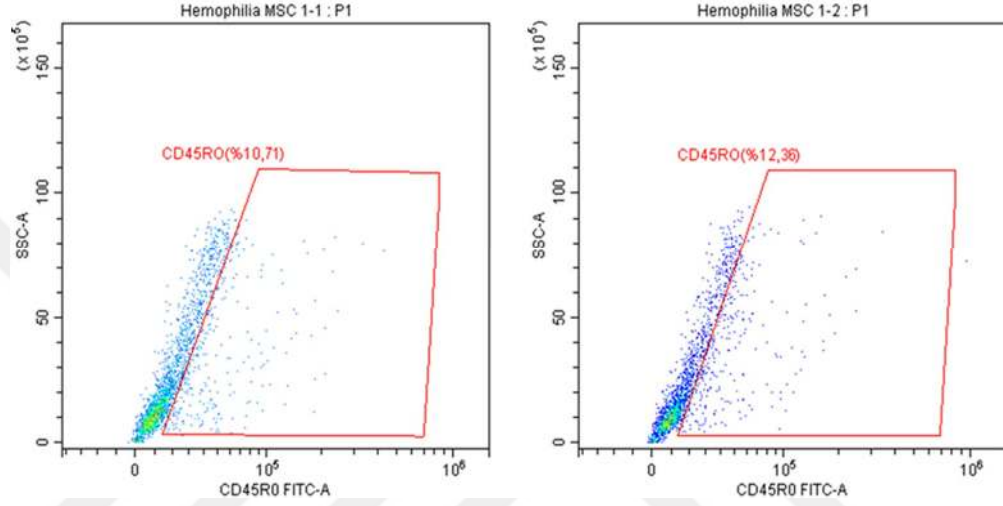
Şekil 4.4 Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Morfolojisi (x40 Büyütmede)

4.6. Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Titrasyon ve Güvenlik Sonuçları

Akım sitometrisi yardımıyla gerçekleştirilen viral titrasyon analizlerinde 8 farklı viral konsantrasyonda CD45R0t ekspresyon analizleri çalışılmıştır. 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0 MOI FVIII geni taşıyan lentivirüs varlığında CD45R0t ekspresyonları sırasıyla, %61.11, %33.59, %11.54, % 9.41, %6.87, % 5.48, % 5.03 ve %3.91 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.6).

Bu analizlerde %10' un üzerinde CD45R0t ekspresyonuna karşılık gelen en düşük konsantrasyon saptanmıştır (Şekil 4.5). 1 MOI FVIII geni taşıyan lentivirüs varlığında CD45R0t akım sitometri sonucu %11.54 olarak ölçülmüş ve bu konsantrasyon temel olarak alınmıştır.

Virüsün IFU / ml cinsinden değeri bu konsantrasyona göre hesaplanmıştır. Bu konsantrasyona göre FVIII geni taşıyan lentivirüsün titrasyonu sonrası değeri 1.159×10^6 IFU / ml olarak ölçülmüştür.

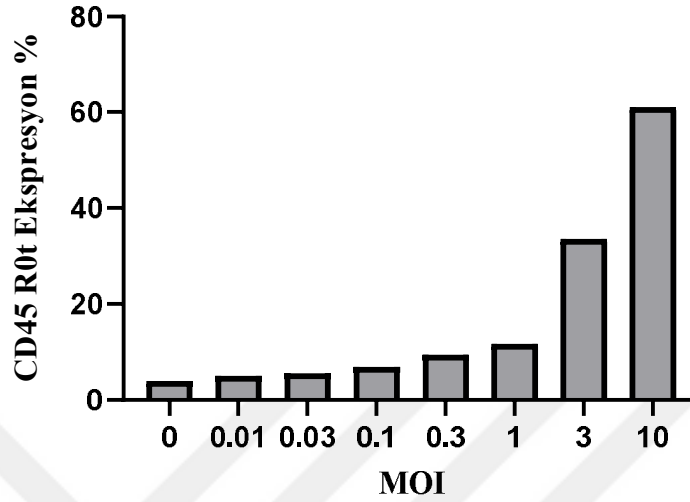


Şekil 4.5 1 MOI FVIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Viral Titrasyon Analizi (Akım Sitometri)

Tablo 4.2 Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Titrasyon Analizi

MOI	CD45R0t Ekspresyon %
0.00	3.91
0.01	5.03
0.03	5.48
0.10	6.87
0.30	9.41
1.00	11.54
3.00	33.59
10.00	61.11

FVIII Lentivirüs Titrasyon Analizleri



Şekil 4.6 Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Titrasyon Analiz Sonucu (Akım Sitometri)

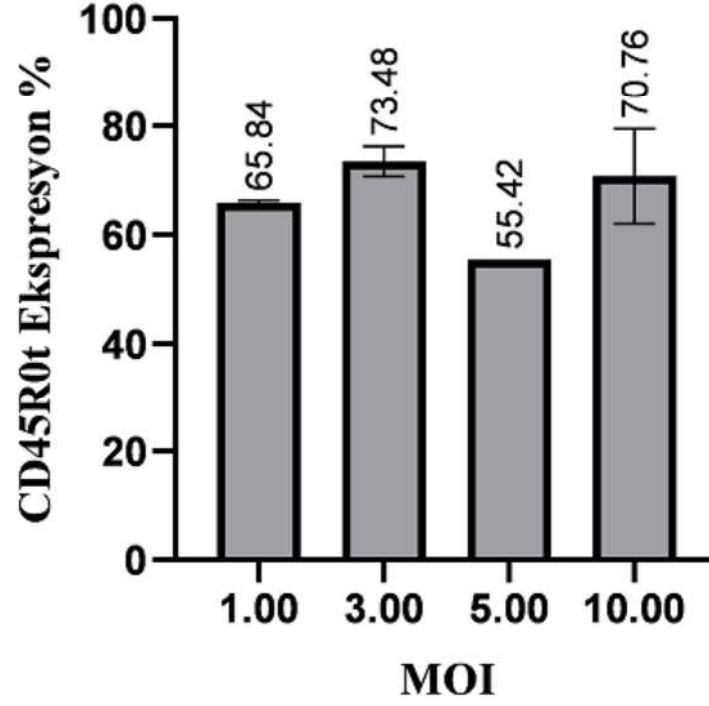
4.7. Farklı Transdüksiyon Ajanları Kullanılarak Yapılan Virüs Ekspresyon Analizleri

Üç farklı transdüksiyon ajanı kullanılarak tekrarlanan FVIII geni taşıyan lentivirüsün ekspresyon analizleri akım sitometrisi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Farklı MOI'lerde FVIII geni taşıyan lentivirüs kullanılarak yapılan analizlerde protamin sülfat, vektofusin ve protamin sülfat - vektofusin ile transdükte edilen mezenkimal kök hücrelerin CD45R0t ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p=0.181$).

Tablo 4.3 Farklı Transdüksiyon Ajanları Kullanılarak Yapılan Virüs Ekspresyon Analizleri (p=0.181)

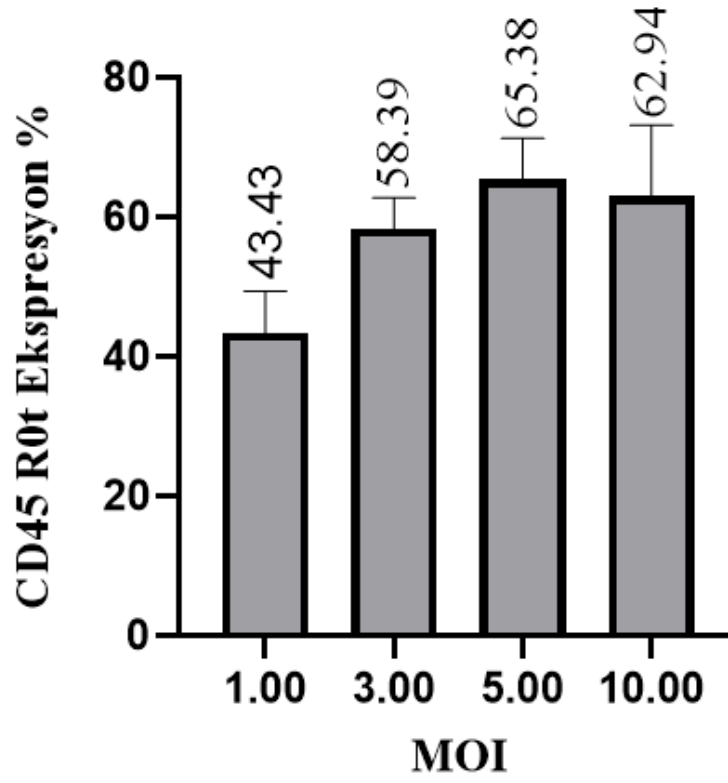
MOI	Protamin Sülfat		Vektofusin		Protamin Sülfat + Vektofusin	
	1. Ölçüm	2. Ölçüm	1. Ölçüm	2. Ölçüm	1. Ölçüm	2. Ölçüm
1.00	66.14	65.53	47.63	39.23	62.70	53.81
3.00	71.54	75.41	61.49	55.29	65.56	68.91
5.00	55.42	55.42	61.20	69.56	74.10	55.31
10.00	76.92	64.60	70.16	55.72	77.85	69.68

Protamin Sülfat Transdüksiyon Analizi



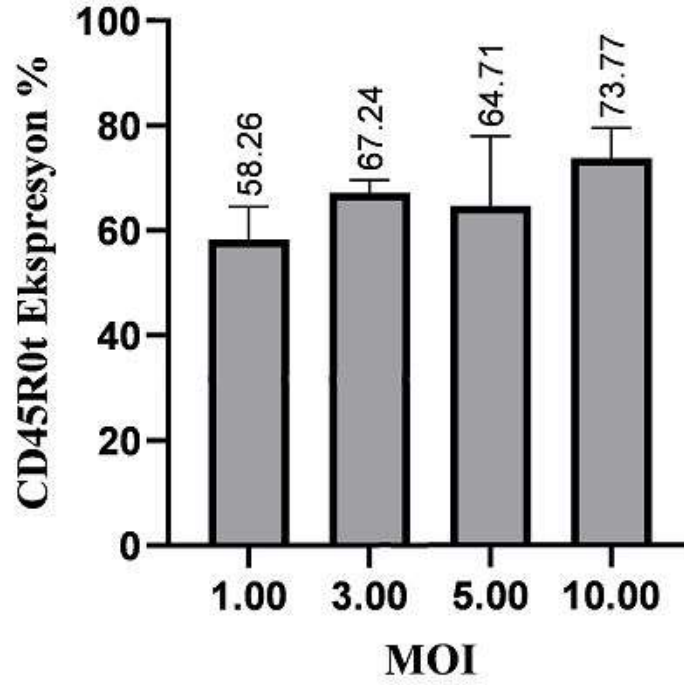
Şekil 4.7 Farklı MOI' lerde FVIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Protamin Sülfat Kullanılarak Gerçekleştirilen Transdüksiyon Analiz Sonucu (Akım Sitometri)

Vektofusin Transdüksiyon Analizi



Şekil 4.8 Farklı MOI'lerde FVIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Vektofusin Kullanılarak Gerçekleştirilen Transdüksiyon Analiz Sonucu (Akım Sitometri)

Protamin Sülfat ve Vektofusin Kombinasyonu Transdüksiyon Analizi



Şekil 4.9 Farklı MOI'lerde FVIII Geni Taşıyan Lentivirüsün Protamin Sülfat ve Vektofusin Kullanılarak Gerçekleştirilen Transdüksiyon Analizi Sonucu (Akım Sitometri)

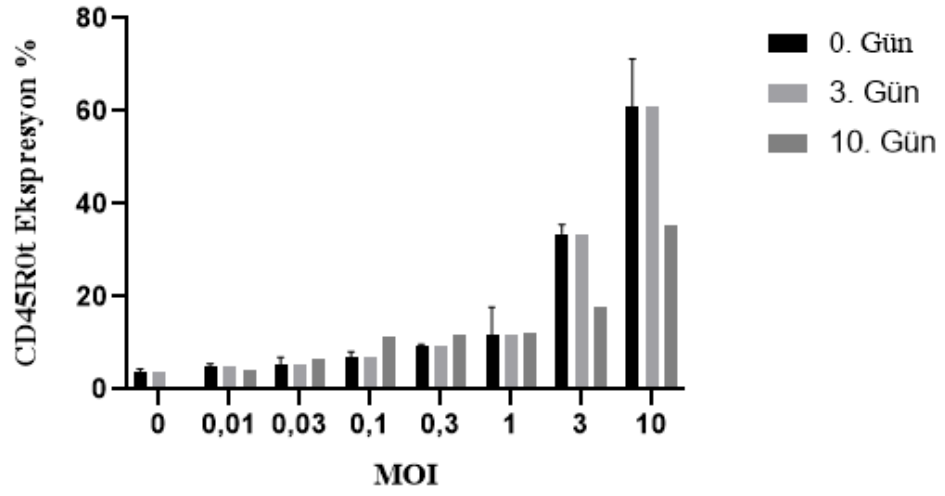
4.8. Faktör VIII Lentivirüs Kalıcılık ve Ekspresyon Analizleri

Faktör VIII geni taşıyan lentivirüsün mezenkimal kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilen kalıcılık ve ekspresyon analizleri 3 farklı günde gerçekleştirilmiştir. 0. gün, 3. gün ve 10. gün yapılan FVIII geni taşıyan lentivirüs ekspresyon analizleri akım sitometrisi ile ölçülmüş ve veriler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p = 0.779$).

Tablo 4.4 Faktör VIII Lentivirüs Kalıcılık ve Ekspresyon Analizleri ($p=0.779$)

MOI	0. Gün		3. Gün		10. Gün	
	1. Ölçüm	2. Ölçüm	1. Ölçüm	2. Ölçüm	1. Ölçüm	2. Ölçüm
0.00	3.56	4.26	3.91	3.91	1.09	0.41
0.01	4.65	5.41	5.03	5.03	7.59	0.70
0.03	6.53	4.43	3.77	7.18	6.58	6.60
0.10	7.79	5.95	7.62	6.12	11.54	11.10
0.30	9.61	9.21	13.99	4.82	13.67	10.05
1.00	7.33	15.97	5.26	18.04	12.32	12.30
3.00	35.00	32.18	36.83	30.34	18.03	17.20
10.00	68.27	53.95	65.76	56.45	32.6	37.99

FVIII Lentivirüs Ekspresyon Analizi -0. Gün, 3. Gün ve 10. Gün



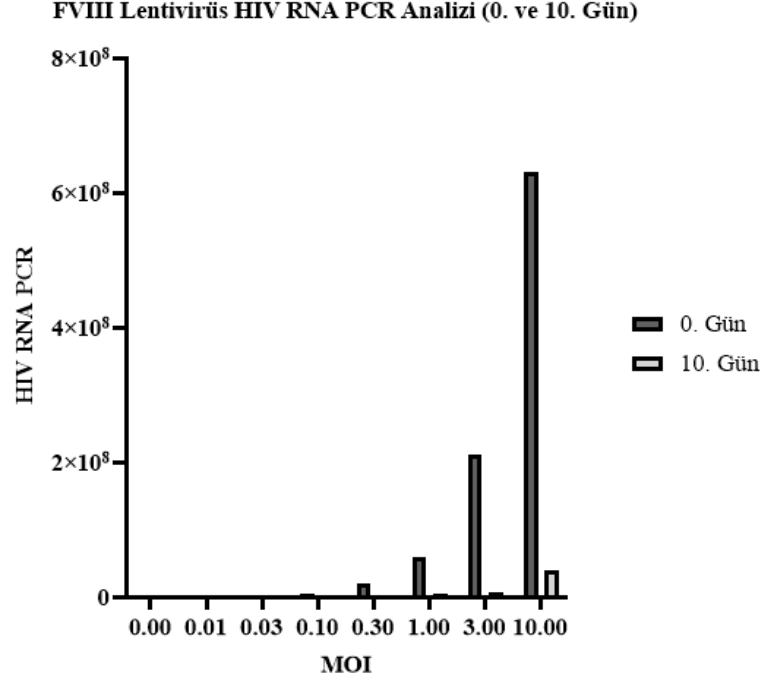
Şekil 4.10 8 farklı MOI' de FVIII Geni Taşıyan Lentivirüs ile Transdükte Edilen Mezenkimal Kök Hücreler Kullanılarak Gerçekleştirilen 0. gün, 3. gün ve 10. gün CD45R0t Ekspresyon Analizi Sonuçları (Akım Sitometri)

4.9. Faktör VIII Lentivirüsünün Replikasyon Yetkin Lentivirüs (RCL) Analizleri

Sekiz farklı MOI' de FVIII geni taşıyan lentivirüsün transdükte ettiği mezenkimal kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilen HIV RNA PCR testleri iki farklı günde (0. gün ve 10. gün) duplike olarak çalışılmıştır. Bu deney lentivirüsün güvenliğini ve replikatif olmadığını kanıtlamak için kurulmuştur. 0. Gün FVIII geni taşıyan lentivirüsün en yüksek oranda olduğu 10 MOI'de HIV RNA PCR sonucu 632322472 olarak bulunmuştur. 10. gün FVIII geni taşıyan lentivirüsün en yüksek oranda olduğu 10 MOI' de HIV RNA PCR sonucu ise 39253395 olarak bulunmuştur. Bu sayede FVIII geni taşıyan lentivirüsün 0. günden 10. güne gelindiğinde replikatif özellik taşımadığı saptanmıştır.

Tablo 4.5 Faktör VIII Lentivirüsünün RCL Analizleri

MOI	0. Gün	10. Gün
0.00	0	0
0.01	1335885	0
0.03	2751709	230589
0.10	6387664	383564
0.30	20290505	650872
1.00	58977271	5855119
3.00	212517013	7026349
10.00	632322472	39253395



Şekil 4.11 8 farklı MOI' de FVIII Geni Taşıyan Lentivirüs Kullanılarak Gerçekleştirilen 0. ve 10. Gün HIV RNA PCR Analiz Sonuçları (PCR Yöntemi)

4.10. Faktör VIII Antijeninin Kantitatif Ölçüm Analizleri

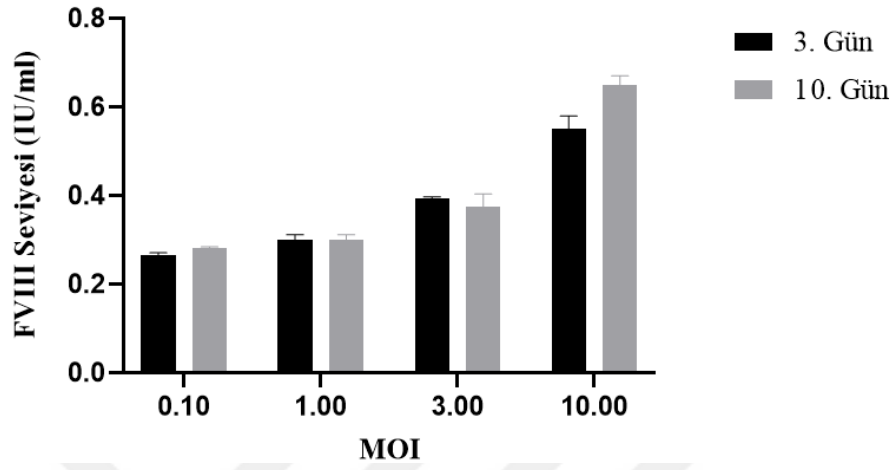
Dört farklı MOI' de FVIII geni taşıyan lentivirüs kullanılarak gerçekleştirilen FVIII antijen ölçümlerinde protamin sülfat ile transdükte edilen MKH' lar kullanılmıştır. Bu ölçümler 2 farklı günde 4 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Kullanılan ELISA testi normal FVIII seviye aralığını 0.4 - 1.8 IU / ml olarak belirtmiştir. 3. ve 10. günlerde FVIII geni taşıyan lentivirüs konsantrasyonunun artması ile FVIII protein seviyesinin de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir ($p < 0.001$).

Üçüncü (3.) ve 10. günlerde farklı MOI'ler kullanılarak ölçülen FVIII protein seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0.05$). 3. ve 10. gün 0.1 MOI kullanılarak yapılan ölçümlerde $p = 0.068$, 1 MOI kullanılarak yapılan ölçümlerde $p = 0.414$, 3 MOI kullanılarak yapılan ölçümlerde $p = 0.465$, 10 MOI kullanılarak yapılan ölçümlerde ise $p = 0.068$ olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.6 Faktör VIII Antijeninin Kantitatif Ölçüm Analizleri (3. ve 10. Gün)

MOI	3. Gün						10. Gün					
	1. Ö	2. Ö	3. Ö	4. Ö	O	SS	1. Ö	2. Ö	3. Ö	4. Ö	O	SS
0.10	0.272	0.257	0.264	0.266	0.265	0.061	0.285	0.278	0.282	0.281	0.282	0.003
1.00	0.314	0.284	0.304	0.294	0.299	0.013	0.314	0.286	0.302	0.298	0.300	0.012
3.00	0.388	0.397	0.390	0.396	0.393	0.004	0.405	0.344	0.393	0.356	0.375	0.029
10.00	0.570	0.530	0.520	0.580	0.550	0.029	0.630	0.670	0.635	0.665	0.650	0.020
Ö: Ölçüm, O: Ortalama, SS: Standart Sapma												

Faktör VIII Elisa Analizi -3. Gün ve 10. Gün



Şekil 4.12 4 farklı MOI' de FVIII Geni Taşıyan Lentivirüs ile Transdükte Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Süpernatantları Kullanılarak Gerçekleştirilen FVIII Antijeni Analiz Sonuçları (ELISA Yöntemi)

4.11. Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı (aPTT) ve FVIII Seviye Analizleri (Mixing Test)

Mezenkimal kök hücreler protamin sülfat yardımıyla FVIII geni taşıyan lentivirüs ile transdükte edilmiş ve 7 gün süreyle kültüre edilmiştir. 7. gün sonunda FVIII geni taşıyan lentivirüs ile transdükte edilmiş mezenkimal kök hücre süpernatantları 1:1 oranında FVIII içermeyen insan plazma ürünü ile karıştırılmıştır. Gen tedavisi uygulanmamış karşılaştırma grubunda FVIII içermeyen insan plazma ürünü 1:1 oranında serum fizyolojik ile karıştırılmıştır. Bu iki gruba ait örneklerden aPTT ve FVIII ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

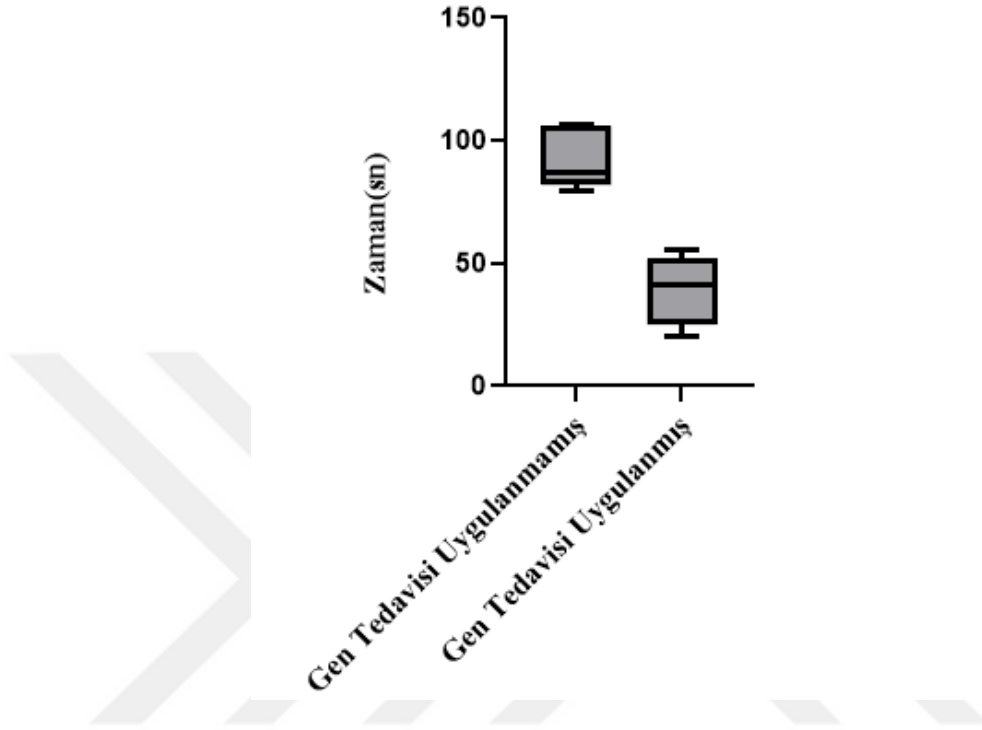
Gen tedavisi uygulanmamış, kontrol grubuna ait aPTT analizleri ortalaması 92.69 ± 11.38 sn olarak ölçülmüştür. FVIII gen tedavisi uygulanmış gruba ait aPTT analizleri ortalaması 38.60 ± 13.38 sn olarak bulunmuştur.

Bu analizler sonucu gen tedavisi uygulanmış ve gen tedavisi uygulanmamış grup arasında aPTT analizleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0.001$). Gen tedavisi uygulanmış olan grupta aPTT seviyeleri anlamlı olarak azalmıştır.

Tablo 4.7 Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı Analizleri (Mixing Test) ($p < 0.001$)

aPTT Ölçümleri	Gen Tedavisi Uygulanmamış aPTT Seviyesi (sn)	Gen Tedavisi Uygulanmış aPTT Seviyesi (sn)
1. Ölçüm	81.8	25.1
2. Ölçüm	79.7	20.3
3. Ölçüm	87.2	41.0
4. Ölçüm	106.7	55.5
5. Ölçüm	87.2	45.0
6. Ölçüm	106.0	51.8
7. Ölçüm	100.2	31.5
Ortalama	92.7	38.6
Standart Sapma	11.4	13.4

Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı Analizleri



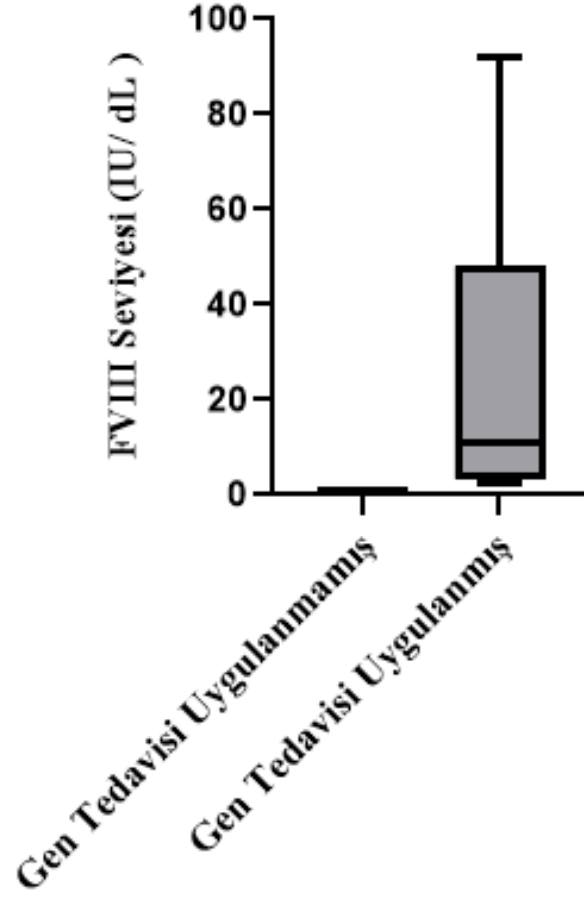
Şekil 4.13 Mixing Test Sonrası, Gen Tedavisi Uygulanmış ve Gen Tedavisi Uygulanmamış İnsan Plazma Ürünlerinin aPTT Analiz Sonuçları

Faktör VIII seviyeleri değerlendirildiğinde ise, gen tedavisi uygulanmamış grubun FVIII seviye ortalamasının 0.41 ± 0.03 IU/ dL olduğu saptanmıştır. Gen tedavisi uygulanmış olan grubun FVIII seviyesinin ortalaması ise 25.41 ± 33.38 IU/ dL olarak ölçülmüştür. Bu analizler sonucu gen tedavisi uygulanmış ve gen tedavisi uygulanmamış grup arasında FVIII seviyeleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0.01$). Gen tedavisi uygulanmış olan grubun FVIII seviyesi anlamlı olarak artmıştır.

Tablo 4.8 Faktör VIII Seviye Analizleri (Mixing Test) ($p<0.01$)

FVIII Ölçümleri	Gen Tedavisi Uygulanmamış FVIII Seviyesi	Gen Tedavisi Uygulanmış FVIII Seviyesi
1. Ölçüm	0.4	48.0
2. Ölçüm	0.4	91.9
3. Ölçüm	0.4	3.4
4. Ölçüm	0.5	10.8
5. Ölçüm	0.4	2.5
6. Ölçüm	0.4	3.8
7. Ölçüm	0.4	17.5
Ortalama	0.4	25.4
Standart Sapma	0.0	33.4

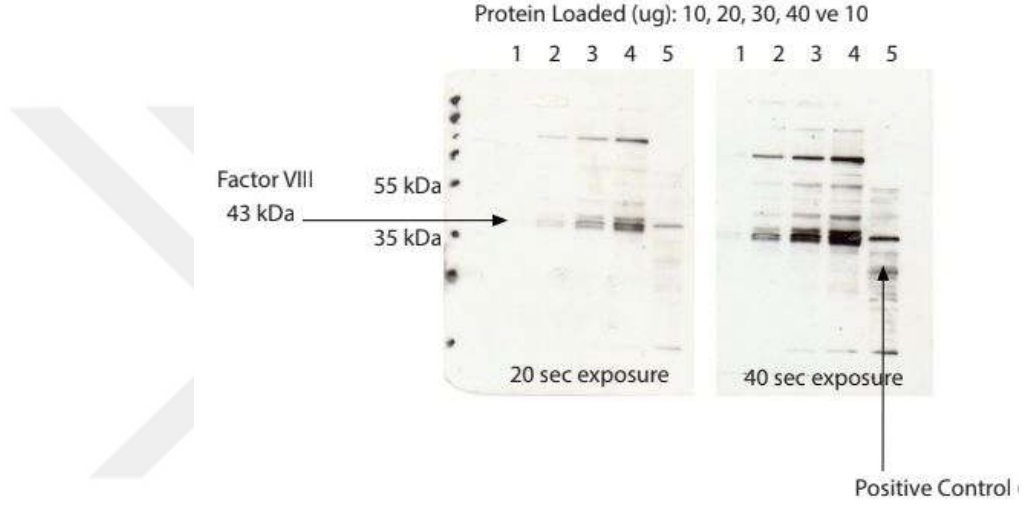
FVIII Seviye Analizleri



Şekil 4.14 Mixing Test Sonrası, Gen Tedavisi Uygulanmış ve Gen Tedavisi Uygulanmamış İnsan Plasma Ürünlerinin FVIII Seviye Analiz Sonuçları

4.12. FAKTÖR VIII WESTERN BLOT ANALIZI

Mezenkimal kök hücreler protamin sülfat yardımıyla FVIII geni taşıyan lentivirüs ile transdükte edilmiş ve 7. gün FVIII protein tayini gerçekleştirilmiştir. 4 farklı FVIII protein miktarı (10 μ g, 20 μ g, 30 μ g ve 40 μ g) ile çalışılan analizlerde 20 sn sonrasında tüm örneklerde FVIII protein varlığı saptanmıştır.



Şekil 4.15 Faktör VIII Geni Taşıyan Lentivirüs ile Transdükte Edilmiş Mezenkimal Kök Hücrelerde FVIII Protein Varlığı (Western Blot Analizi)

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Tartışma

Hemofili A, kalıtsal olabilen veya spontan mutasyonlardan kaynaklanabilen fonksiyonel plazma pıhtılaşma faktörü FVIII eksikliğinin neden olduğu X' e bağlı, resesif bir hastalıktır. Günümüzde, Hemofili A hastalığının ana tedavisi faktör replasman tedavisidir. Bu tedavi ile eksik veya düşük olan pıhtılaşma faktörünün yerine konulması amaçlanmaktadır.

Hemofili A hastalığı tedavisinin yıllar içerisindeki evrimine bakıldığında, son 50 yılda büyük ilerlemeler kat edildiği görülmektedir. Bu gelişmelerle birlikte Hemofili A ile ilişkili mortalite ve morbiditede dramatik bir azalma olduğu görülmektedir. Tedavideki bu ilerlemelere rağmen bazı zorlukların halen devam ettiği bilinmektedir.

Gelişmiş dünya ülkelerinde bile faktör yerine koyma tedavilerine erişimin sınırlı olması ve tedavilerin getirdiği yüksek maliyetler bu hastalığın tedavisindeki sorunlardan yalnızca bir kaçıdır. Bununla birlikte, sık vasküler girişim gereksinimi ve tedaviye karşı gelişen antikor varlığı da tedavide karşılaşılan zorluklar arasında yer almaktadır. Faktör VIII' in pıhtılaşma fonksiyonunu ve antitrombin gibi antikoagülasyon proteinlerinin inhibisyonunu taklit eden antikorlar, aptamerler ve yenilikçi RNA teknolojileri ile Hemofili A hastalığının tedavisindeki sorunların üstesinden gelinmeye çalışılmıştır (Balkaransingh and Young, 2018). Bunun yanında, Hemofili A hastalığı için geliştirilen gen tedavileri hastalığın tamamen ortadan kaldırılabilmesi adına umut vaat etmektedir. Bu gen tedavileri klinik uygulama için henüz onay almamış olsa da Hemofili A hastalığının tedavisinde “Game Changer” olarak tanımlanmaktadır.

Hemofili A gen tedavilerinde birçok farklı gen dizaynı ve viral vektör kullanıldığı bilinmektedir. Hemofili A gen tedavileri için yapılan Faz III çalışmalarda; Sangamo Therapeutics tarafından geliştirilen SB-525 (Konkle et al., 2019), Biomarin İlaç A.Ş. tarafından geliştirilen BMN270 (Rangarajan et al., 2017) ve Sparks Therapeutics tarafından geliştirilen SPK-8011 (High et al., 2018; George et al., 2020) gen tedavilerinin hepsinde AAV vektörlerinin kullanılması dikkat çekmektedir. AAV vektörü kullanılarak geliştirilen genetik tedavilerin viral vektör seçimi açısından bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlardan en önemlisi, AAV' ye karşı önceden var olan hücresel immün bağışıklıktır. Bebeklik döneminden itibaren toplumun büyük bir kısmı AAV ile enfekte olmaktadır. AAV enfeksiyonu sonrasında gelişen antikor varlığı, AAV' nin vektör olarak kullanıldığı gen tedavilerinde AAV antijenini ortadan kaldırarak uzun vadede AAV ile gerçekleştirilen gen aktarımının verimsiz olmasına neden olmaktadır (Calcedo et al., 2009; Boutin et al., 2010). Bu da klinik uygulamalarda tedavi etkinliğinin sınırlı olması ve tekrarlı gen tedavi uygulamalarının yapılamaması ile sonuçlanmaktadır. Bunun yanında klinik uygulamalarda oluşan bu hücresel cevabın önüne geçilebilmesi için uygulama öncesi immünsüpresif ilaç kullanım gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Nathwani et al., 2018; High et al., 2018). İmmünsüpresif ilaç kullanımı klinikte hem enfeksiyon riskini arttırabilmekte hem de yan etki oluşmasına neden olabilmektedir. AAV' nin vektör olarak kullanılmasının bir diğer dezavantajı ise AAV transdükte edildiği hücrede ekstrakromozal kalmaktadır. Bu sebeple de zamanla ekspresyon kaybı görülebilmektedir. Bunun yanında, AAV' nin tek sarmallı DNA yapısı tek başına *in vivo* uygulamalarda yetersiz kalmakta ve hibrit vektör gerekliliği doğmaktadır (Fisher et al., 1996; Ferrari et al., 1996). Bu da AAV vektörü kullanılarak yapılan viral üretimlerde yüksek titrelere ulaşılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenler, vektörün *in vivo* uygulamalarda kullanım açısından yetersiz kaldığını göstermektedir.

Literatürdeki bilgiler doğrultusunda; lentivirüsler, AAV kaynaklı vektör kullanılarak geliştirilen gen tasarımlarının sahip olduğu bu sorunların üstesinden gelmekte ve *in vivo* uygulamalarda tercih edilmektedir. Geliştirdiğimiz Hemofili A gen tedavisinde vektörün lentiviral kökenli kullanılmasının nedenleri, HIV enfeksiyonunun toplumdaki düşük prevalansı sebebiyle gen aktarımının AAV kaynaklı vektörlere kıyasla daha verimli olmasına olanak sağlaması, uygun viral modifikasyonlarla hematopoetik hücreler, makrofajlar, nöronlar gibi bölünen ve bölünmeyen hücre genomlarına istikrarlı bir şekilde entegre olması (Naldini et al., 1996; Naldini et al., 1998; Mátrai et al., 2010; Dropulić et al., 2011) dolayısıyla gen ekspresyonunun uzun süreli korunması ve aynı zamanda yüksek viral titrelerde üretim yapılabilmesi olmasıdır.

Literatürde yer alan ancak henüz Faz I çalışmalarına başlanmamış Shenzhen Geno - Immune Medical Institute (YUVA - GT - F801) ve Expression Therapeutics' in (CD68 - ET3 - LV) FVIII gen tasarımlarında da lentiviral vektörlerden yararlanılmaktadır (Doering et al., 2018; <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study?term=hemophilia-a-shenzhen-yuva-gt-f801&rank=1>; Erişim tarihi: 04 Şubat 2022).

Faz çalışmaları devam eden birçok gen tasarımında olduğu gibi geliştirdiğimiz FVIII gen tasarımımızda da FVIII geninde yer alan ancak aktif FVIII geninin yapısında yer almayan ve fonksiyonallitesi tam olarak anlaşılamamış B domain yapısı silinmiş olarak bulunmaktadır. B domain yapısının gen tasarımımızda yer almıyor olması transgen boyutunu düşürmekte ve hedef hücreyi enfekte edebilme yeteneğini arttırmaktadır. Sonuç olarak daha stabil bir gen ekspresyonuna olanak sağlamaktadır. *In vitro* şartlarda mezenkimal kök hücreler kullanılarak 3. ve 10. günlerde FVIII antijenin kantitatif ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.12' de de gösterildiği üzere 3. ve 10. günlerde ölçülen FVIII protein seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Bu da dizayn etmiş olduğumuz gen tasarımının 10 gün boyunca ekspresyonunun stabil olarak devam ettiğinin kanıtı niteliğindedir.

Faz III klinik deneme kapsamında, farklı serotiplerde AAV vektörü kullanılarak gerçekleştirilen gen tasarımlarında promotör olarak sadece karaciğer spesifik promotörlerin dahil edilmesi dikkat çekmektedir. Karaciğer spesifik promotör kullanımı vektörün farklı hücre gruplarını enfekte edebilme yeteneğinin ve böylece

yüksek seviyelerde FVIII ekspresyonu sağlanmasının önüne geçmektedir. Bunun yanında, yapılan klinik çalışmalarda karaciğere spesifik promotör kullanımının karaciğer enzimlerinin yükselmesine ve organ toksisitesine neden olduğu gösterilmektedir (Rangarajan et al., 2017; George et al., 2021). Lentiviral vektör kullanan, Expression Therapeutics (CD68 - ET3 - LV FVIII) gen tasarımı promotör olarak monosit spesifik promotör kullanılmakta olup, Shenzhen Geno-Immune Medical Institute (YUVA - GT - F80) tarafından geliştirilen gen dizaynına ait promotör yapısı hakkında literatür bilgisi bulunmamaktadır. Picanço ve ark. tarafından lentiviral vektörlerde viral ve non-viral promotör kullanımının protein ekspresyon seviyelerine etkisinin karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmada, viral sitomegalovirüs (CMV) promotörü ve non viral EF1 α promotörünün suprafizyolojik seviyelerde FVIII ekspresyonu sağladığı, ancak CMV promotörünün viral kaynaklı olması sebebiyle güvenlik açısından dikkatli olunması gerektiğine işaret edilmektedir (Picanço et al., 2007). Bu sebepler göz önünde bulundurularak geliştirdiğimiz Hemofili A gen dizaynında EF1 α promotörü tasarımıma dahil edilmiştir. Bu sayede, geliştirilen diğer FVIII gen dizaynlarından farklı olarak sadece karaciğer hücrelerini değil, endotel ve hematopoetik hücreler haricinde tüm hücreleri transdükte edilebilen ve yüksek seviyelerde FVIII ekspresyonu sağlayabilen bir vektör tasarlanmıştır. Bununla birlikte *in vivo* ve klinik uygulamalarda karaciğere spesifik promotörlerin oluşturmuş olduğu organ toksisitesinin de önüne geçileceği düşünülmüştür.

Geliştirdiğimiz genetik dizaynda yüzey belirteci olarak kullanılan CD45R0t sekansı önüne P2A sekansı ilave edilmiştir. Bu sayede FVIII sekansı eksprese olurken aynı zamanda CD45R0t yüzey belirtecinin de eksprese olması sağlanmaktadır.

Bu yüzey belirtecinin hematopoetik ve endotel hücre grupları dışında hiçbir hücre grubunda bulunmaması nedeniyle CD45R0t taşıyan lentivirüsün *in vivo* uygulaması sonrası hücresel takibinde bir belirteç olarak kullanımına olanak sağlamaktadır. Bunun yanında CD45R0t yüzey belirteci sayesinde hastaya genetiği değiştirilmiş aktif virüs vermek yerine genetiği değiştirilmiş hücre transferi yapılabilmesinin mümkün olacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla daha güvenli ve *in vivo* uygulamalarda takip edilebilir bir gen tedavisinin ilk adımları bu çalışma ile atılmıştır. Bir sonraki çalışmanın ilk basamağı lentiviral transdüksiyon ile genetiği

değiştirilmiş mezenkimal kök hücre infüzyonunun Hemofili A tedavisinde etkinliğinin ve güvenliliğinin test edilmesi üzerine planlanmaktadır.

Genetik dizaynımızda tercih ettiğimiz CD45R0t yüzey belirtecinin bir başka özelliği ise kesilmiş yani hücre içi domain kısmının gen dizaynına dahil edilmemiş olmasıdır. Bu sayede, CD45R0 antikoru vektörün yüzeyinde bulunan CD45R0t reseptörüne bağlandıktan sonra hücre içi sinyal yolağının aktifleşmesi engellenmektedir. Böylelikle, daha güvenli bir gen tasarımı mümkün olmaktadır. Bu yüzey belirteci aynı zamanda transdükte edilen hücrelerin selekte edilmesine de olanak sağlayarak daha saf bir gen tedavi uygulamasını mümkün kılmaktadır. Ancak çalışmamızda transdükte edilen mezenkimal hücrelerin selekte edilmesi işlemi uygulanmamıştır.

Araştırmamızda FVIII proteinin in vitro ekspresyon analizleri vücutta yaygın olarak bulunan mezenkimal kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mezenkimal kök hücreler kullanılarak FVIII geni taşıyan lentivirüsün 0. gün, 3. gün ve 10. günlerde kalıcılık ve ekspresyon analizleri, CD45R0t takibi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.10'da da gösterildiği üzere 0., 3. ve 10. günlerde yapılan FVIII geni taşıyan lentivirüsün ekspresyon analizlerine ait veriler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p = 0.779$). Bu veriler ışığında zamana bağlı gerçekleştirilen analizlerde gen dizaynımızda tercih etmiş olduğumuz EF1 α promotörünün mezenkimal kök hücreleri etkin ve stabil bir şekilde transdükte ettiği görülmüştür.

FVIII gen dizisini kodlayacak lentivirüsün üretimi için birçok geleneksel metot kullanılmakta ve bu metotlar farklı birçok değişken içermektedir. Bu sebeple, vektör üretiminde kullanılacak olan hücre hatlarından başlayarak transfeksiyon metodunun ve konsantrasyon işlemlerinin optimize olması gerekmektedir. Bu amaçla çalışmamızda, lentiviral vektör üretiminde sıklıkla kullanılan HEK293T hücreleriyle üretime başlanmıştır. İkinci nesil lentivirüsün oluşturulması için esansiyel elementlerin 3 farklı plazmid aracılığıyla (EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t, CMV VsVg, Pspax) hücrelere kotransfekte edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, kullanılan plazmit oranları ve transfeksiyon metodu lentiviral vektör üretimin başarısına doğrudan etki etmektedir.

Geliştirilen plazmit dizaynının öncelikle nükleik asit miktarı ve DNA saflığının teyit edilmesi gerekmektedir. Literatürde nükleik asitlerin saflık değerini A260 / A230, A260 / A280 oranlarının gösterdiği ve beklenen saflık değerinin DNA ölçümleri için ~ 1.8 RNA ölçümleri için ~ 2.0 olduğu belirtilmiştir. Bu ölçümlerde A260 / A280 >1.8 olduğu durumlarda RNA kontaminasyonu, A260 / A230 <1.8 durumlarda ise protein kontaminasyonu olduğu ifade edilmiştir (Desjardins and Conklin, 2010). EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t plazmitinin nükleik asit miktarı 2.016.998 ng / μ l, A260 / A280 ölçümleri 1.929, A260 / A230 ölçümleri 2.288 bulunmuştur (Tablo 4.1). Bu sonuçlar, geliştirmiş olduğumuz plazmitin nükleik asit miktarının ve saflığının plazmit üretimi için yeterli olduğunu ortaya koymuştur. Nanodrop ölçümlerini doğrulamak için EF1 α - FVIII.CC - CD45R0t plazmiti aynı zamanda jel elektroforezinde yürütülmüş ve plazmit DNA'sının saflığı bu test ile tekrar teyit edilmiştir (Şekil 4.1).

Plazmit üretiminin doğrulama verileri test edildikten sonra, ikinci jenerasyon FVIII geni taşıyan lentivirüsün 3 farklı plazmid aracılığıyla HEK293T hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon metodunda ise Eugene bir transfeksiyon ajanı olarak kullanılmıştır. Eugene kullanılarak gerçekleştirilen transfeksiyon işlemlerinde plazmit atıklarının uzaklaştırılması için filtre edilmesi ve yoğunlaştırılmasından sonra 3 farklı plazmitin bir araya gelerek oluşturduğu lentivirüsün varlığı iki farklı metot ile değerlendirilmiştir. FVIII geni taşıyan lentivirüsün varlığı ilk olarak TEM analizleri ile saptanmıştır.

TEM analizlerinde lentivirüsün genel morfolojisi, partikül bütünlüğü ve boyut dağılımı değerlendirilmiştir. Literatürde lentivirüsün viral boyut aralığının 80 - 120 nm olduğu gösterilmiş olup, çalışmamızda Şekil 4.2' de de gösterildiği gibi FVIII lentivirüsün viral boyutu 102.4 olarak ölçülmüştür (Sastry et al., 2005). İkinci olarak FVIII geni taşıyan lentivirüsün süpernatantında bulunan P24 kapsid protein miktarı Lenti - X GoStix testi ile ölçülmüştür (Resim 4.3). Lenti - X GoStix çubuğu üzerinde oluşan çift bant, FVIII lentivirüs varlığının $> 5 \times 10^5$ IFU / ml olduğunu saptamıştır. Bu test ile üretmiş olduğumuz lentivirüsün varlığı tekrar doğrulanmıştır.

Virüs pelletleri elde edildikten sonra viral etkinliğin belirlenmesi için ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere virüs titrasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Literatüre bakıldığında lentivirüslerin titre ölçümleri yapılırken kolay transdükte

edilen Jurkat benzeri hücre line' larının tercih edildiği görülmektedir. Ancak çalışmamızda lentiviral titrenin hesaplanması için transdükte edilmesi daha zor olan mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır (Kalidasan et al., 2021). Öncelikle lentiviral stok dilüe edilmiş (10^{-1} - 10^{-10}) ve mezenkimal kök hücrelerde $> \%10$ transdüksiyon verimliliği gösteren dilüsyon, IFU / ml hesaplanmak için kullanılmıştır. Sonuçta mezenkimal kök hücreler kullanılarak lentiviral ana stoğun 1.159×10^6 IFU / ml olduğu saptanmıştır. Jurkat hücre hattı kullanılarak yapılan IFU hesaplanmalarında ideal lentiviral üretimin 10^7 - 10^9 IFU / ml arasında değiştiği ancak mezenkimal kök hücreler gibi zor transdükte edilen hücreler kullanıldığında ise lentiviral üretiminin ortalama 10^5 IFU / ml olduğu gösterilmiştir (<https://www.genecopoeia.com/resource/lentivirus-thats-my-moi-and-im-sticking-to-it-lentivirus-moi-cell-lines>., Erişim tarihi: 16 Aralık 2021). Çünkü mezenkimal kök hücrelerin diğer hücre line' ları ile karşılaştırıldığında viral transdüksiyona daha dirençli olduğu bilinmektedir. Bu veriler incelendiğinde lentiviral üretim metodumuzun literatüre uygun standartlarda olduğu saptanmıştır.

Infectious Unit / ml' den MOI' ye dönüşümde 1 hücre başına düşen 1 IFU / ml, 1 MOI olarak tanımlanmaktadır. Bu kapsamda lentivirüsün mezenkimal kök hücreleri transdükte edebilme yeteneği; 1 hücre başına 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, ve 0 MOI düşecek şekilde analiz edilmiştir. Tablo 4.2' de de gösterildiği gibi 8 farklı MOI kullanılarak yapılan titrasyon analizlerinde 10 MOI'de $\%61.11$, 3 MOI'de $\%33.59$, 1 MOI'de $\%11.54$, 0.3 MOI'de $\%9.41$, 0.1 MOI'de $\%6.87$, 0.03 MOI'de $\%5.48$, 0.01 MOI'de $\%5.03$ 'lük transdüksiyon verimliliği gösterilmiştir. Transdüksiyon oranlarına bakılarak $> \%10$ ' un üzerinde CD45R0t ekspresyonuna karşılık gelen en düşük konsantrasyon temel alınmıştır (1 MOI). Bu nedenle, tüm deneyler $\%11.54$ 'lık bir transdüksiyon verimliliği gösteren 1 MOI lentivirüs kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda 1 MOI lentivirüs kullanımının tercih edilme nedeni transdüksiyon verimliliğinin $\%10$ 'un üzerindeki en düşük MOI varlığında yapılmak istenmesidir. Aynı zamanda etkin olan en düşük MOI hücre viyabilitesi açısından da önem taşımaktadır. Bu sayede, transdüksiyon için kullanılan daha az toksik lentiviral konsantrasyonun, gen aktarımına bağlı uzun süreli ekspresyon devamlılığı sağlaması beklenmektedir. Sonuç olarak literatür ile karşılaştırıldığında lentiviral vektörün varlığının doğrulanması ve virüs titrasyon analizleri dikkate alındığında üretim metodumuzun standartlara uygun bir şekilde gerçekleştiği kanıtlanmıştır.

Transdüksiyon ajanının optimize edilmesi amacıyla üç farklı transdüksiyon ajanı (protamin sülfat, vektofusin, protamin sülfat- vektofusin) seçilmiş ve seçilen bu üç ajanın transdüksiyon verimliliği karşılaştırılmıştır. Transdüksiyon verimliliği akım sitometrisi yardımıyla CD45R0t takibi yapılarak belirlenmiştir. Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9’da gösterildiği üzere protamin sülfat, vektofusin ve protamin sülfat - vektofusin ile transdükte edilen mezenkimal kök hücrelerin CD45R0t seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p=0.181$). Ancak protamin sülfatın diğer transdüksiyon ajanlarına göre maliyet etkin olması sebebiyle çalışmamızda transdüksiyon ajanı olarak protamin sülfat tercih edilmiştir. Bu doğrultuda viral güvenlik ve FVIII fonksiyon analizleri için yapılacak tüm transdüksiyon işlemleri protamin sülfat varlığında gerçekleştirilmiştir. Literatürde de protamin sülfat kullanılarak lentivirüsün mezenkimal kök hücreleri verimli bir şekilde transdükte ettiği çalışmalar bulunmaktadır (Lin et al., 2012).

Faktör VIII lentivirüsün mezenkimal kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilen FVIII kalıcılık ve ekspresyon analizleri 0., 3. ve 10. günlerde yapılmış olup bu üç günün verileri karşılaştırıldığında FVIII seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p = 0.779$). Bu verilere dayanarak zamana bağlı gerçekleştirilen analizlerde FVIII ekspresyonunda kayıp gözlenmediği ve lentiviral transdüksiyonun etkin bir şekilde gerçekleştiği ortaya konulmuştur.

Faktör VIII geni taşıyan lentivirüsün kalıcılık ve ekspresyon analizleri değerlendirildikten sonra lentivirüsün güvenlik analizleri gerçekleştirilmiştir. Faktör VIII geni taşıyan lentivirüsün protamin sülfat yardımıyla mezenkimal kök hücreleri transdükte etmesi sağlanmış, 0. ve 10. günlerde lentivirüs (LTR sekansı) PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu sayede mezenkimal kök hücreleri transdükte eden lentivirüsün ikinci jenerasyon olmasına rağmen non-replikatif yani güvenli olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11).

Son olarak üretilmiş olan lentivirüsün, FVIII fonksiyonallite analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde FVIII geni ile transdükte edilmiş mezenkimal kök hücre süpernatantı ve FVIII içermeyen plazma ürünü Mixing Test sonrası FVIII seviyesi ve aPTT açısından değerlendirilmiştir. FVIII içermeyen plazma ürünü (0.5 ml), aynı oranda serum fizyolojik (0.5 ml) ile karıştırıldığında FVIII seviyesi $0.41 \pm$

0.03 IU / dL bulunmuştur. FVIII geni ile transdükte edilmiş mezenkimal kök hücre süpernatantı (0.5 ml), aynı oranda FVIII içermeyen plazma ürünü (0.5 ml) ile karıştırıldığında FVIII seviyelerini 25.41 ± 33.38 IU / dL' ya yükseltmeyi başarmıştır (Şekil 4.14). Bu analizler sonucu gen tedavisi uygulanmış ve gen tedavisi uygulanmamış gruplar FVIII seviyeleri açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0.01$). Normal FVIII seviyelerinin 50 - 150 IU / dL arasında olduğu göz önünde bulundurulduğunda, geliştirilen gen dizaynı ile istenilen FVIII seviyelerine ulaşamadığı sorusu akla gelebilir. Ancak, Hemofili A hastalığının şiddeti dikkate alındığında; şiddetli Hemofili A olarak sınıflandırılan hastaların, faktör seviyelerindeki artış sebebiyle hafif Hemofili A olarak sınıflandırılmasına olanak sağladığı görülmektedir. Bu sayede minör travmalar sonrası hayatı tehdit eden kanamalar ile hastaneye başvuran hastaların yaşam kalitesi artarak bu tür travmalardan etkilenmeyen hastalara dönüşmesinin önü açılmaktadır. Bu nedenle Mixing Test sonuçları mevcut FVIII sekresyonunun istenilen düzeyde etkin olduğunu göstermektedir.

Gerçekleştirilen Mixing Test sonrası FVIII seviyelerinin yanı sıra aktive tromboplastin zamanı (aPTT) da analiz edilmiştir. FVIII içermeyen plazma ürünü (0.5 ml), aynı oranda serum fizyolojik (0.5 ml) ile karıştırıldığında ortalama aPTT seviyesi 92.69 ± 11.38 sn olarak saptanmıştır. FVIII geni ile transdükte edilmiş mezenkimal kök hücre süpernatantı (0.5 ml), aynı oranda FVIII içermeyen plazma ürünü (0.5 ml) ile karıştırıldığında ortalama aPTT düzeyinin 38.60 ± 13.38 sn' ye kadar gerilediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). Ulaşılan aPTT düzeyi, sağlıklı bireylerde aPTT'nin referans aralığı olan 25 - 35 sn' ye oldukça yakındır. Yapılan analizler sonucu gen tedavisi uygulanmış ve gen tedavisi uygulanmamış gruplar arasında aPTT analizleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0.001$). Bu veriler ışığında geliştirmiş olduğumuz FVIII geni taşıyan lentivirüsün sadece FVIII ekspresyonuna neden olmadığı aynı zamanda fonksiyonel olduğu, FVIII seviyelerinde önemli bir artış ve aPTT' de ise %58 oranında bir düzelme sağladığı gözlemlenmiştir.

Şekil 4.16'da da gösterildiği gibi FVIII proteinin bir başka fonksiyonelite analizi olan Western Blot analizi gerçekleştirilmiş ve yapılan analizde FVIII protein varlığı doğrulanmıştır.

Literatürde, klinik araştırmalarda AAV ve / veya LV vektör kullanılarak geliştirilen gen dizaynlarına ait *in vitro* verilere erişilememesi nedeniyle sonuçlarımız klinik araştırmalarda kullanılmakta olan gen dizaynlarına ait *in vitro* veriler ile karşılaştırılamamıştır.

Faz III klinik çalışmalar incelendiğinde ise Sangama Therapeutics tarafından Faz 1 / 2 açık etiketli, randomize olmayan çalışmada yüksek doz SB - 252 (3×10^{13} vg / kg) uygulanan 2 katılımcının FVIII seviyelerinin %94 ile %140' a ulaştığı rapor edilmiştir (Konkle et al., 2019). Çalışmamızda ise 1 MOI FVIII geni taşıyan lentivirüs kullanılarak elde edilen FVIII seviyelerinin %2.5 ile % 91.9 arasında olduğu ölçülmüştür.

Bu bilgiden hareketle mevcut vektör dizaynımız ile yapılacak bir klinik çalışmada benzer FVIII seviyelerine ulaşabilmenin mümkün olabileceği düşünülmektedir. Çünkü çalışmamız $> \%10$ CD45R0t ekspresyonuna karşılık gelen en düşük MOI (1 MOI) lentivirüs kullanılarak tasarlanmıştır. Klinik olarak güvenli olan <10 MOI' ye çıkıldığında gen dizaynımıza ait FVIII seviyelerinin de Sangama Therapeutics tarafından geliştirilen SB - 525 kadar etkin olacağı kanısı yanlış olmayacaktır.

Biomarin tarafından geliştirilen BMN 270' in ilk klinik çalışmasında ise üç farklı doz uygulanmıştır. Ancak düşük ve orta doz uygulanan gruplarda FVIII seviyeleri $< \%3$ bulunmuştur. Yüksek doz BMN 270 uygulanan 7 hastanın medyan FVIII seviyesi 77 IU / dL, FVIII seviyelerinin ise 19 - 164 IU / dL arasında olduğu ve bu faktör seviyelerinin 1 yıl kadar korunduğu gözlemlenmiştir (Rangarajan et al., 2017). Çalışmamızda medyan FVIII seviyesi 10.80 IU / dL olarak ölçülmüştür. Ancak bu seviyenin $> \%10$ transdüksiyon etkinliğine sahip en düşük MOI' de çalışıldığı unutulmamalıdır. Bu nedenle yüksek MOI' lerde daha yüksek seviyelerde FVIII sekresyonunun mümkün olacağı ve daha etkili sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir. Gen dizaynımıza ait doz çalışmasının ise klinik çalışma öncesi testler kapsamında yapılması planlanmaktadır.

Biomarin ikinci bir klinik çalışma başlatmış ve bu çalışmada dört farklı doz grubu denemiştir. Gruplar, 6×10^{12} vg / kg uygulanan 1 katılımcı, 2×10^{13} vg / kg

uygulanan 1 katılımcı, 6×10^{13} vg / kg uygulanan 7 katılımcı, 4×10^{13} vg / kg uygulanan 6 katılımcıdan oluşmuştur. 3. grupta yer alan katılımcıların 3 yıl boyunca yapılan takiplerinde, 1. yıl medyan FVIII seviyesinin 64 IU / dL, 2. yıl medyan FVIII seviyesinin 36 IU / dL, 3. yıl medyan FVIII seviyesinin ise 33 IU / dL olduğu saptanmıştır. Ortalama FVIII seviyelerine bakıldığında ise, ortalama faktör VIII seviyesinin 2. yılda %43 ve 3. yılda ise %10 azaldığı gözlemlenmiştir. Grup 4' te yer alan altı katılımcıların izlemlerine iki sene süreyle devam edilmiştir. Ortalama faktör VIII seviyesi 1. yılın sonunda 21.0 IU / dL (medyan, 23 IU / dL), 2. yılın sonunda ise 15 IU / dL (medyan, 13 IU / dL) olarak bulunmuştur.

4. grupta yer alan katılımcıların FVIII seviyeleri 3. gruptakine benzer bir şekilde 2. yılın sonunda %30 oranında azalmıştır (Pasi et al., 2020). Bu çalışmada da FVIII seviyelerinin ortalaması yerine medyan değerlerin paylaşılıyor olması dikkat çekmektedir. Bununla birlikte 4×10^{13} vg / kg BMN 270 uygulanan 6 katılımcıdan oluşan Grup 4' de 1. yıl FVIII seviyelerinin ortalaması, geliştirdiğimiz gen dizaynı sonrası ulaşılan FVIII seviyelerinin ortalamasından 3 IU / dL düşük bulunmuştur. Bu açıdan bakıldığında *in vitro* veriler ile *in vivo* verilerin karşılaştırılması doğru olmasa da bulgular gen dizaynımızın ümit verici olduğuna işaret etmektedir.

Son olarak SPK - 8011, faz 1 / 2 Hemofili A gen tedavisi çalışmasında 18 hastaya 5×10^{11} vg / kg, 1×10^{12} vg / kg, 1×10^{13} vg / kg ve son olarak 2×10^{12} vg / kg dozlarında tedavi verilmiştir. Bu katılımcıların 2 yıllık takiplerinde ortalama FVIII seviyesinin %12.9 olduğu saptanmıştır. Bu FVIII seviyesi geliştirdiğimiz gen dizaynı sonrası ulaşılan FVIII seviyelerinin ortalamasının neredeyse yarısına denk gelmektedir (George et al., 2021). Ancak unutulmamalıdır ki çalışmamızda sunmuş olduğumuz veriler *in vitro* veriler olup, *in vivo* verileri temsil etmemektedir. Bu sebeple çalışmamıza ait çıkarabileceğimiz tek sonuç gen dizaynımızın umut vaat ettiği yönündedir.

5.1.1. Hemofili A Hastalığının Tedavisinde FVIII İçeren Gen Tedavisinin Ulusal, Ticari ve Sosyal Kazanımları

Gen tedavilerindeki ilerlemeler sayesinde, Hemofili A hastalığının yakın gelecekte tedavisinin mümkün olacağı öngörülmektedir. Henüz klinik olarak onaylı

bir gen tedavinin mevcut olmamasına rağmen, bu tür bir tedavinin potansiyel maaliyeti hakkında önemli endişe ve tartışmalar vardır. Gen tedavisinin maliyet etkinliğini uygun şekilde değerlendirmek için, hastalığın doğal seyri, mevcut standartlar ve bakım maliyetinin dikkate alınması gerekmektedir. Hemofili A hastalığının, 2018 yılında yayınlanan bir makaleye göre dünya genelinde 400.000, ülkemizde ise Türk Pediatrik Hematoloji Derneği verilerine göre yaklaşık 5.000 kişiyi etkilediği düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda hastanın fayda görebilmesi için gerekli minimum tedavi maliyeti en yüksek olan hastalık Hemofili A olarak saptanmıştır (Machin et al., 2018).

2018 yılında Machin ve ark. yaptığı çalışmada bir Hemofili A hastasının hiçbir komplikasyon gelişmediği takdirde ülkeye maliyeti yıllık 140.000 dolar; Faktör VIII inhibitör oluşumu gibi komplikasyonların geliştiği Hemofili A hastalarının ülkeye maliyetinin ise yıllık 1 milyon dolardan fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu, dünyadaki hemofili hastalarının çoğunluğu tarafından karşılanması mümkün olmayan bir maaliyet olarak karşımıza çıkmaktadır.

Chen'in 2016 yılında yapmış olduğu başka bir çalışmada ise Hemofili A hastalığına bağlı iş gücü kaybının yıllık 4 milyon dolar olduğu saptanmıştır (Chen, 2016).

Hemofili A hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere sadece ithal olarak temin edilebilen Faktör VIII konsantresinin ülkemize maliyeti 600 milyon Türk Lirası'ndan fazladır. Ayrıca bu tedavi yöntemleri ile Hemofili A hastalığına etkin ve kalıcı fayda sağlanamamakta, hastalar sık sık hastaneye başvurmak zorunda kalmakta, ülkemiz sosyal ve işgücü anlamında kayba uğramaktadır.

Geliştirdiğimiz yerli ve milli Hemofili A gen tedavisi ile hayatı tehdit eden kanamaları ortadan kaldırmak, böylece komorbiditeleri, sık tıbbi müdahale ihtiyacını azaltmak, yaşam kalitesini iyileştirmek, tek seferde (single - shut cure) hastalığın tedavisini sağlamak ve son olarak sağlık alanında önemli bir maliyet kalemini ortadan kaldırmak amaçlanmaktadır. İn vitro çalışmalarını tamamladığımız Hemofili A gen tedavisinin özgün tasarımı ve uygulanacak tedavi yaklaşımları ile patent başvurusu yapılmıştır. Bu sayede ülkemizde yeni gen tedavilerinin geliştirilmesinde önemli bir adım olduğu düşünülmektedir.

5.2. Sonuçlar

Hemofili A hastalığı monogenik bir hastalık olması sebebiyle gen transferi gerçekleştirilerek geliştirilen tedaviler için mkemmek bir aday hastalık olarak görülmektedir.

Araştırmanızda da Hemofili A gen tedavisi amacıyla promotörü EF - 1 alpha olan, B domaini silinmiş Faktör VIII gen sekansı ile CD45R0t yüzey belirteci taşıyan bir Faktör VIII geni dizayn edilmiştir. Bu gen dizaynı *in vitro* ve *ex vivo* olarak test edilmiştir. Dizayn sonucunda yeterli ve stabil gen aktarımı sağladığı, *in vitro* ve *ex vivo* etkinlik ve güvenlik testlerini başarı ile tamamladığı gösterilmiştir.

Bir sonraki basamakta ise direkt lentiviral vektör uygulaması ve / veya transgenik mezenkimal kök hücre uygulaması ile gen aktarımının preklinik *in vivo* etkinliği ve güvenliği test edilerek Hemofili A tedavisinde virus / hücre aracılıklı gen tedavisinin nnn açılması amaçlanmıştır.

5.3. neriler

Bu araştırmanın sonuçları değerlendirilirken *in vitro* yöntemlerle yapılmış bir araştırma olduğu unutulmamalıdır. *In vitro* alışmaların doğası gereği bir takım eksiklikleri bulunmaktadır. *In vitro* analizleri tamamlanmış olan bu çalışmasının bir sonraki amaı, farklı MOI' lerde etkinlik ve güvenlik analizlerinin test edilmesidir. Bu verilerden hareketle preklinik *in vivo* analizler ile *in vivo* toksikoloji çalışmalarının yapılması ve randomize kontrollü çalışmalar ile etkinliğinin değerlendirilmesi yönünde olmalıdır.

Geliştirmiş olduğumuz FVIII gen dizaynının uygulama yollarını içeren bir başka çalışmanın daha yapılması uygun olabilir. Bu alışmada FVIII geni içeren lentivirslerin uygulanmasının dışında FVIII geni içeren lentivirslerin mezenkimal kök hücreleri transdükte etmesi sağlanarak, transgenik mezenkimal kök hücrelerin uygulanması önem taşımaktadır.

Bu sayede, geliştirilen gen tedavisinin, lentiviral kaynaklı oluşabilecek herhangi bir immün cevaptan korunulabileceği, immünite oluşturmaması sayesinde tekrarlı uygulamalar yapılabileceği ve ayrıca lentiviral partikül vermek yerine güvenliği önceden test edilmiş mezenkimal hücre infüzyonu yapılabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte transgenik MKH kullanımının güvenli doz ayarlaması yapılabilmesine de olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Diğer bir öneri ise gen tasarımında kullanılan vektör jenerasyonunun iyileştirilmesi yönünde olmalıdır. Üçüncü jenerasyon vektör tasarımı tercih edildiğinde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda vektör titresinde herhangi bir azalma ve genin ifadesinde bir bozulma olmadan daha güvenli bir gen aktarımı gerçekleştirilebileceği iddia edilmektedir (Zufferey et al., 1998). Gelecek çalışmalarda kullanılacak üçüncü jenerasyon vektör tasarımı Hemofili A gen tedavisine de ışık tutabilir. Bunun yanında, üçüncü jenerasyon vektör tasarımının güvenliliği ve etkinliği de ileride yapılacak olan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara konu olabilecek niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

1. Açıkgöz M., Güven G., Zülfikar B., Ak G., (2013). Oral Cerrahide Hemofili Hastalarına Güncel Yaklaşımlar-Current Surgical Procedures For Hemophilic Patients İn Oral Surgery. Journal Of Istanbul University Faculty Of Dentistry, 47(3), 33-40.
2. Aledort, L. M. (2004). Comparative thrombotic event incidence after infusion of recombinant factor VIIa versus factor VIII inhibitor bypass activity. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2(10), 1700-1708.
3. Anguela, X. M., & High, K. A. (2019). Entering the modern era of gene therapy. Annual review of medicine, 70, 273-288.
4. Antonarakis, S. E., Rossiter, J. P., Young, M., Horst, J., De Moerloose, P., Sommer, S. S., ... & Vinciguerra, C. (1995). Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: results of an international consortium study.
5. Asaad, M., Rajesh, A., Zazo, A., Banuelos, J., & Kaadan, A. (2019). Albucasis: a pioneer plastic surgeon. Annals of Plastic Surgery, 83(6), 611-617.
6. Astermark, J., Berntorp, E., White, G. C., Kroner, B. L., & MIBS Study Group. (2001). The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development. Haemophilia, 7(3), 267-272.
7. Astermark, J., Oldenburg, J., Carlson, J., Pavlova, A., Kavakli, K., Berntorp, E., ... & MIBS Study Group. (2006). Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. Blood, 108(12), 3739-3745.
8. Astermark, J., Wang, X., Oldenburg, J., Berntorp, E., Lefvert, A. K., & MIBS Study Group. (2007). Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 5(2), 263-265.
9. Bagnall, R. D., Waseem, N., Green, P. M., & Giannelli, F. (2002). Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 99(1), 168-174.
10. Balkaransingh, P., & Young, G. (2018). Novel therapies and current clinical progress in hemophilia A. Therapeutic advances in hematology, 9(2), 49-61.

11. Barg, A. A., Avishai, E., Budnik, I., Levy-Mendelovich, S., Barazani, T. B., Kenet, G., & Livnat, T. (2019). Emicizumab prophylaxis among infants and toddlers with severe hemophilia A and inhibitors—a single-center cohort. *Pediatric blood & cancer*, 66(11), e27886.
12. Batty, P., Sihn, C. R., Ishida, J., Mo, A. M., Yates, B., Brown, C., Harpell, L., Pender, A., Russell, C., Sardo Infirri, S., Torres, R., Winterborn, A., Fong, S., Lillicrap, D., (2020). Long-term vector genome outcomes and immunogenicity of AAV FVIII gene transfer in the hemophilia A dog model. *Res Pract Thromb Haemost*, 4(Suppl 1), PB1087.
13. Berntorp, E., Boulyjenkov, V., Brettler, D., Chandy, M., Jones, P., Lee, C., ... & Rickard, K. (1995). Modern treatment of haemophilia. *Bulletin of the World Health Organization*, 73(5), 691.
14. Berntorp, E., Fischer, K., Hart, D. P., Mancuso, M. E., Stephensen, D., Shapiro, A. D., & Blanchette, V. (2021). Haemophilia. *Nature reviews. Disease primers*, 7(1), 45.
15. Bolton-Maggs, P. H., & Pasi, K. J. (2003). Haemophilias a and b. *The Lancet*, 361(9371), 1801-1809.
16. Boulton, F. (2006). A hundred years of cascading—started by Paul Morawitz (1879–1936), a pioneer of haemostasis and of transfusion. *Transfusion Medicine*, 16(1), 1-10.
17. Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M. F., & Masurier, C. (2010). Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Human gene therapy*, 21(6), 704-712.
18. Brown, H. C., Wright, J. F., Zhou, S., Lytle, A. M., Shields, J. E., Spencer, H. T., & Doering, C. B. (2014). Bioengineered coagulation factor VIII enables long-term correction of murine hemophilia A following liver-directed adeno-associated viral vector delivery. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 1, 14036.
19. Brown, H. C., Zakas, P. M., George, S. N., Parker, E. T., Spencer, H. T., & Doering, C. B. (2018). Target-cell-directed bioengineering approaches for gene therapy of hemophilia A. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 9, 57-69.

20. Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J., & Wilson, J. M. (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *The Journal of infectious diseases*, 199(3), 381-390.
21. Carcao, M. D. (2012, October). The diagnosis and management of congenital hemophilia. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 38, No. 07, pp. 727-734). Thieme Medical Publishers.
22. Carcao, M. D., van den Berg, H. M., Ljung, R., Mancuso, M. E., Altisent, C., Auerswald, G., ... & Rivard, G. (2013). Correlation between phenotype and genotype in a large unselected cohort of children with severe hemophilia A. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 121(19), 3946-3952.
23. Castaman, G. (2008). Desmopressin for the treatment of haemophilia. *Haemophilia*, 14, 15-20.
24. Center for Biologics Evaluation and Research. (2018, July 25). What is gene therapy? U.S. Food and Drug Administration. Erişim tarihi: 25 Aralık 2021 <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy>
25. Chambost, H., Gaboulaud, V., Coatméclec, B., Rafowicz, A., Schneider, P., Calvez, T., & Suivi thérapeutique National des Hémophiles (SNH) Group (2002). What factors influence the age at diagnosis of hemophilia? Results of the French hemophilia cohort. *The Journal of pediatrics*, 141(4), 548–552. <https://doi.org/10.1067/mpd.2002.128115>.
26. Chen, S. L. (2016). Economic costs of hemophilia and the impact of prophylactic treatment on patient management. *Am J Manag Care*, 22(5 Suppl), s126-33.
27. Chuah, M. K., Evens, H., & VandenDriessche, T. (2013). Gene therapy for hemophilia. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 11, 99-110.
28. Coetzee, M. J. (2007). The use of topical crushed tranexamic acid tablets to control bleeding after dental surgery and from skin ulcers in haemophilia.
29. Coppola, A. I. C. E., Margaglione, M., Santagostino, E., Rocino, A., Grandone, E., Mannucci, P. M., ... & AICE PROFIT STUDY GROUP. (2009). Factor VIII gene (F8) mutations as predictors of outcome in immune tolerance induction of hemophilia A patients with high-responding inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(11), 1809-1815.

30. Dahlbäck, B. (2000). Blood coagulation. *The Lancet*, 355(9215), 1627-1632.
31. Dasgupta, S., Repessé, Y., Bayry, J., Navarrete, A. M., Wootla, B., Delignat, S., ... & Lacroix-Desmazes, S. (2007). VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood*, 109(2), 610-612.
32. Davis, E. (2015, January). Lentivirus: That's My MOI, and I'm Sticking To It. Genecopoeia. Erişim tarihi: 16 Aralık 2021, <https://www.genecopoeia.com/resource/lentivirus-thats-my-moi-and-im-sticking-to-it-lentivirus-moi-cell-lines>
33. Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (45), e2565.
34. Doering, C. B., Denning, G., Shields, J. E., Fine, E. J., Parker, E. T., Srivastava, A., ... & Spencer, H. T. (2018). Preclinical development of a hematopoietic stem and progenitor cell bioengineered factor VIII lentiviral vector gene therapy for hemophilia A. *Human gene therapy*, 29(10), 1183-1201.
35. Dropulić, B. (2011). Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research. *Human gene therapy*, 22(6), 649-657.
36. Eaton, D. L., Wood, W. I., Eaton, D., Hass, P. E., Hollingshead, P., Wion, K., ... & Gorman, C. (1986). Construction and characterization of an active factor VIII variant lacking the central one-third of the molecule. *Biochemistry*, 25(26), 8343-8347.
37. Eisenberg, D. (2016). 'Hemophilia and Circumcision: From Observation to Classification: Connecting a Talmudic Presumption to a Modern Diagnosis. *Jewish Medical Ethics and Halacha*, 30-39.
38. El-Maarri, O., Singer, H., Klein, C., Watzka, M., Herbiniaux, U., Brackmann, H. H., ... & Oldenburg, J. (2006). Lack of F8 mRNA: a novel mechanism leading to hemophilia A. *Blood*, 107(7), 2759-2765.
39. Evatt, B. L. (2007). The tragic history of AIDS in the hemophilia population, 1982–1984. *Occasional Papers*, (6).
40. Falati, S., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Furie, B. C., & Furie, B. (2002). Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nature medicine*, 8(10), 1175-1180.
41. Farrugia, A. (2008). Guide for the Assessment of Clotting Factor Concentrates (2nd ed.). World Federation of Hemophilia (WFH).

42. Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T., & Samulski, R. J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *Journal of virology*, 70(5), 3227-3234.
43. Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., Lagresle, C., Garrigue, A., & Cavazana-Calvo, M. (2005). Thérapie génique des déficits immunitaires sévères: preuve de principe d'efficacité et problèmes soulevés. *Thérapie génique, déficits immunitaires, rétrovirus, lentivirus, génome* [Gene therapy of severe combined immunodeficiency disease: proof of principle of efficiency and safety issues. Gene therapy, primary immunodeficiencies, retrovirus, lentivirus, genome]. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, 189(5), 779–788.
44. Fisher, K. J., Gao, G. P., Weitzman, M. D., DeMatteo, R., Burda, J. F., & Wilson, J. M. (1996). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *Journal of virology*, 70(1), 520-532.
45. Franchini, M., Marano, G., Pati, I., Candura, F., Profili, S., Veropalumbo, E., ... & Liumbruno, G. M. (2019). Emicizumab for the treatment of haemophilia A: a narrative review. *Blood Transfusion*, 17(3), 223.
46. Fullard, J. F. (2004). The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis. *Current pharmaceutical design*, 10(14), 1567-1576.
47. Furie, B. (2009). Pathogenesis of thrombosis. *ASH Education Program Book*, 2009(1), 255-258.
48. Gale, A. J. (2011). Continuing education course# 2: current understanding of hemostasis. *Toxicologic pathology*, 39(1), 273-280.
49. George, L. A., Monahan, P. E., Eyster, M. E., Sullivan, S. K., Ragni, M. V., Croteau, S. E., ... & High, K. A. (2021). Multiyear factor VIII expression after AAV gene transfer for hemophilia A. *New England Journal of Medicine*, 385(21), 1961-1973.
50. George, L. A., Eyster, E., Ragni, M., Sullivan, S., Samelson-Jones, B., Evans, M., ... & High, K. (2020). Phase I/II trial of SPK-8011: stable and durable FVIII expression for > 2 years with significant ABR improvements in initial dose cohorts following AAV-mediated FVIII gene transfer for hemophilia A. *Res. Pract. Thromb. Haemost*, 4.
51. Giacca, M., & Zacchigna, S. (2012). Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *Journal of controlled release*, 161(2), 377-388.

52. Gitschier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., Wion, K. L., Chen, E. Y., Eaton, D. H., ... & Lawn, R. M. (1984). Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, 312(5992), 326-330.
53. Giuffrida, G., Nicolosi, D., Condorelli, A., Markovic, U., & Di Raimondo, F. (2021). Use of Emicizumab in Patients with Hemophilia a with and without Inhibitors: A Single Center Experience. *Blood*, 138, 4248.
54. Glauser, D. L., Ackermann, M., Saydam, O., & Fraefel, C. (2006). Chimeric herpes simplex virüs/adeno-associated virüs amplicon vectors. *Current gene therapy*, 6(3), 315-324.
55. Goodeve, A. C., & Peake, I. R. (2003). The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 29, No. 01, pp. 023-030). Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.
56. Gouw, S. C., & van den Berg, H. M. (2009, November). The multifactorial etiology of inhibitor development in hemophilia: genetics and environment. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 35, No. 08, pp. 723-734). © Thieme Medical Publishers.
57. Gouw, S. C., van den Berg, H. M., Fischer, K., Auerswald, G., Carcao, M., Chalmers, E., ... & van der Bom, J. G. (2013). Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 121(20), 4046-4055.
58. Gouw, S. C., van den Berg, H. M., Oldenburg, J., Astermark, J., de Groot, P. G., Margaglione, M., ... & van der Bom, J. G. (2012). F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(12), 2922-2934.
59. Gouw, S. C., van der Bom, J. G., & Marijke Van Den Berg, H. (2007). Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 109(11), 4648-4654.

60. Graham, J. B., Penick, G. D., & Brinkhous, K. M. (1951). Utilization of the antihemophilic factor during clotting of canine blood and plasma. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 164(3), 710-715.
61. Graw, J., Brackmann, H. H., Oldenburg, J., Schneppenheim, R., Spannagl, M., & Schwaab, R. (2005). Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nature Reviews Genetics*, 6(6), 488-501.
62. Haemophilia A Mutation, Search, Test and Resource Site. (1996). The HAMSTeRS. Erişim tarihi: 15 Ocak 2021, <http://europium.mrc.rpms.ac.uk>
63. Handin, R. I., & Wagner, D. D. (1989). Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Progress in hemostasis and thrombosis*, 9, 233–259.
64. Hay, C. R. M., Oilier, W., Pepper, L., Cumming, A., Keeney, S., Goodeve, A. C., ... & Party, U. I. W. (1997). HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. *Thrombosis and haemostasis*, 77(02), 234-237.
65. Hay, C. R., & DiMichele, D. M. (2012). The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(6), 1335-1344.
66. Hermans, C., Altisent, C., Batorova, A., Chambost, H., De Moerloose, P., & Karafoulidou, A. (2009). European Haemophilia Therapy Standardisation Board. Replacement therapy for invasive procedures in patients with haemophilia: literature review, European survey and recommendations. *Haemophilia*, 15(3), 639-658.
67. High, K. A., George, L. A., Eyster, M. E., Sullivan, S. K., Ragni, M. V., Croteau, S. E., ... & Reape, K. B. (2018). A phase 1/2 trial of investigational SPK-8011 in hemophilia A demonstrates durable expression and prevention of bleeds.
68. High, K.A., & Roncarolo, M. (2019). Gene Therapy. *The New England journal of medicine*. 381. 455-464.
69. Hitchings, E. J. (2011). The oral health of individuals with haemophilia: a review of the literature. *New Zealand Dental Journal*, 107(1).
70. Hoots, W. K., & Shapiro, A. D. (2022). Clinical manifestations and diagnosis of hemophilia. Erişim tarihi: 9 Ocak 2022 from <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-hemophilia>

71. Howe, S. J., Mansour, M. R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Hubank, M., Kempinski, H., ... & Thrasher, A. J. (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of clinical investigation*, 118(9).
72. Hoylaerts, M., Lijnen, H. R., & Collen, D. (1981). Studies on the mechanism of the antifibrinolytic action of tranexamic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 673, 75-85.
73. Ingram, G. I. (1976). The history of haemophilia. *Journal of clinical pathology*, 29(6), 469.
74. Kaadan, A. N., & Angrini, M. (2010). Who discovered hemophilia?. *J Int Soc Hist Islamic Med*, 8-9.
75. Kalidasan, V., Ng, W. H., Ishola, O. A., Ravichantar, N., Tan, J. J., & Das, K. T. (2021). A guide in lentiviral vector production for hard-to-transfect cells, using cardiac-derived c-kit expressing cells as a model system. *Scientific Reports*, 11(1), 1-11.
76. Kavaklı, K. (Ed.). (2014). *Hemofili Rehberi*. Ege Hemofili Derneği.
77. Kay, M. A., Glorioso, J. C., & Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature medicine*, 7(1), 33-40.
78. Kazazian, H. H., Wong, C., Youssoufian, H., Scott, A. F., Phillips, D. G., & Antonarakis, S. E. (1988). Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*, 332(6160), 164-166.
79. Kershaw, G., Jayakodi, D., & Dunkley, S. (2009, November). Laboratory identification of factor inhibitors: the perspective of a large tertiary hemophilia center. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 35, No. 08, pp. 760-768). © Thieme Medical Publishers.
80. Key, N. S. (2004). Inhibitors in congenital coagulation disorders. *British journal of haematology*, 127(4), 379-391.
81. Khair, K., Baker, K., Mathias, M., Burgess, C., & Liesner, R. (2007). Intranasal desmopressin (Octim™): a safe and efficacious treatment option for children with bleeding disorders. *Haemophilia*, 13(5), 548-551.,

82. Kirchhofer, D., & Nemerson, Y. (1996). Initiation of blood coagulation: the tissue factor/factor VIIa complex. *Current opinion in biotechnology*, 7(4), 386-391.
83. Komar, A. A. (2007). SNPs, silent but not invisible. *Science*, 315(5811), 466-467.
84. Konkle, B. A., Stine, K., Visweshwar, N., Harrington, T. J., Leavitt, A. D., Giermasz, A., ... & Rouy, D. (2019). Updated follow-up of the Alta study, a phase 1/2, open label, adaptive, dose-ranging study to assess the safety and tolerability of SB-525 gene therapy in adult patients with severe hemophilia A. *Blood*, 134, 2060.
85. Kulkarni, R., Presley, R. J., Lusher, J. M., Shapiro, A. D., Gill, J. C., Manco-Johnson, M., ... & Soucie, J. M. (2017). Complications of haemophilia in babies (first two years of life): a report from the Centers for Disease Control and Prevention Universal Data Collection System. *Haemophilia*, 23(2), 207-214.
86. Lakich, D., Kazazian, H. H., Jr, Antonarakis, S. E., & Gitschier, J. (1993). Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature genetics*, 5(3), 236-241. <https://doi.org/10.1038/ng1193-236>
87. Langdell, R. D., Wagner, R. H., & Brinkhous, K. M. (1953). Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests: a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 41(4), 637-647.
88. Lannoy, N., & Hermans, C. (2010). The 'royal disease'—haemophilia A or B? A haematological mystery is finally solved. *Haemophilia*, 16(6), 843-847.
89. Lannoy, N., Grisart, B., Eeckhoudt, S., Verellen-Dumoulin, C., Lambert, C., Vikkula, M., & Hermans, C. (2013). Intron 22 homologous regions are implicated in exons 1-22 duplications of the F8 gene. *European journal of human genetics* : *EJHG*, 21(9), 970-976. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.275>
90. LaPelusa, A., & Dave, H. D. (2022). *Physiology, Hemostasis*. In StatPearls. StatPearls Publishing.
91. Lee, C. A., Berntorp, E. E., & Hoots, W. K. (Eds.). (2010). *Textbook of hemophilia*. John Wiley & Sons.

92. Leissinger, C., Cooper, D. L., Solem, C. T., & HTRS Investigators. (2011). Assessing the impact of age, race, ethnicity and inhibitor status on functional limitations of patients with severe and moderately severe haemophilia A. *Haemophilia*, 17(6), 884-889.
93. Levinson, B., Kenwrick, S., Gamel, P., Fisher, K., & Gitschier, J. (1992). Evidence for a third transcript from the human factor VIII gene. *Genomics*, 14(3), 585-589.
94. Levinson, B., Kenwrick, S., Lakich, D., Hammonds Jr, G., & Gitschier, J. (1990). A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics*, 7(1), 1-11.
95. Lin, P., Lin, Y., Lennon, D. P., Correa, D., Schluchter, M., & Caplan, A. I. (2012). Efficient lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells that preserves proliferation and differentiation capabilities. *Stem cells translational medicine*, 1(12), 886-897.
96. Liu, Q., Nozari, G., & Sommer, S. S. (1998). Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 92(4), 1458-1459.
97. Ljung, R. C. (2008). Intracranial haemorrhage in haemophilia A and B. *British journal of haematology*, 140(4), 378-384.
98. Loeliger, A., & Koller, F. (1952). Behaviour of factor VII and prothrombin in late pregnancy and in the newborn. *Acta haematologica*, 7(3), 157-161.
99. Lorenzo, J. I., López, A., Altisent, C., & Aznar, J. A. (2001). Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age. *British journal of haematology*, 113(3), 600-603.
100. Louis Jeune, V., Joergensen, J. A., Hajjar, R. J., & Weber, T. (2013). Pre-existing anti-adenovirus-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Human gene therapy methods*, 24(2), 59-67.
101. Macfarlane, R. G. (1948). Normal and abnormal blood coagulation: a review. *Journal of Clinical Pathology*, 1(3), 113.
102. Machin, N., Ragni, M. V., & Smith, K. J. (2018). Gene therapy in hemophilia A: a cost-effectiveness analysis. *Blood advances*, 2(14), 1792-1798.

103. Mannucci, P. M. (1997). Desmopressin (DDAVP) in the treatment of bleeding disorders: the first 20 years. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 90(7), 2515-2521.
104. Mannucci, P. M. (1998). Hemostatic drugs. *New England Journal of Medicine*, 339(4), 245-253.
105. Mannucci, P. M. (2003). AIDS, hepatitis and hemophilia in the 1980s: memoirs from an insider. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(10), 2065-2069.
106. Mátrai, J., Chuah, M. K., & VandenDriessche, T. (2010). Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Molecular therapy*, 18(3), 477-490.
107. Merskey, C. (1950). The laboratory diagnosis of haemophilia. *Journal of Clinical Pathology*, 3(4), 301.
108. Merskey, C., & Macfarlane, R. G. (1951). The female carrier of haemophilia A clinical and laboratory study. *The Lancet*, 257(6653), 487-490.
109. Morado, M., Villar, A., Jimenez Yuste, V., Quintana, M., & Hernandez Navarro, F. (2005). Prophylactic treatment effects on inhibitor risk: experience in one centre. *Haemophilia*, 11(2), 79-83.
110. Morfini, M., Coppola, A., Franchini, M., & Di Minno, G. (2013). Clinical use of factor VIII and factor IX concentrates. *Blood Transfusion*, 11(Suppl 4), s55.
111. Naldini, L. (1998). Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Current opinion in biotechnology*, 9(5), 457-463.
112. Naldini, L., Blömer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., ... & Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259), 263-267.
113. Nathwani, A. C., Tuddenham, E., Chowdary, P., McIntosh, J., Lee, D., Rosales, C., ... & Riddell, A. (2018). GO-8: preliminary results of a phase I/II dose escalation trial of gene therapy for haemophilia A using a novel human factor VIII variant. *Blood*, 132, 489.
114. Naylor, J., Brinke, A., Hassock, S., Green, P. M., & Giannelli, F. (1993). Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Human Molecular Genetics*, 2(11), 1773-1778.
115. Naylor, J. A., Buck, D., Green, P., Williamson, H., Bentley, D., & Giannelli, F. (1995). Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h)

- and the associated inversion junctions. *Human molecular genetics*, 4(7), 1217–1224. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.7.1217>
116. Nishino, M., Girma, J. P., Rothschild, C., Fressinaud, E., & Meyer, D. (1989). New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII.
 117. Oldenburg, J. (2015). Optimal treatment strategies for hemophilia: achievements and limitations of current prophylactic regimens. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(13), 2038-2044.
 118. Oldenburg, J., & El-Maarri, O. (2006). New insight into the molecular basis of hemophilia A. *International journal of hematology*, 83(2), 96-102.
 119. Oldenburg, J., El-Maarri, O., & Schwaab, R. (2002). Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia*, 8, 23-29.
 120. Oldenburg, J., Picard, J. K., Schwaab, R., Brackmann, H. H., Tuddenham, E. G. D., & Simpson, E. (1997). HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thrombosis and haemostasis*, 77(02), 238-242.
 121. Oldenburg, J., Schröder, J., Brackmann, H. H., Müller-Reible, C., Schwaab, R., & Tuddenham, E. (2004, January). Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. In *Seminars in hematology* (Vol. 41, pp. 82-88). WB Saunders.
 122. Parisi, K., & Kumar, A. (2020). Emicizumab.
 123. Pasi, K. J., Rangarajan, S., Mitchell, N., Lester, W., Symington, E., Madan, B., ... & Wong, W. Y. (2020). Multiyear follow-up of AAV5-hFVIII-SQ gene therapy for hemophilia A. *New England Journal of Medicine*, 382(1), 29-40.
 124. Pavlova, A., Delev, D., Lacroix-Desmazes, S., Schwaab, R., Mende, M., Fimmers, R., ... & Oldenburg, J. (2009). Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor- α and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(12), 2006-2015.
 125. Peake, I., Seligsohn, U., Gitel, S., Kitchen, S., & Zivelin, A. (1995). The laboratory diagnosis of haemophilia: Recommendations by the Laboratory Activities Committee of the World Federation of Hemophilia. *Haemophilia*, 1(3), 159-164.

126. Periyah, M. H., Halim, A. S., & Saad, A. Z. M. (2017). Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in hemostasis. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 11(4), 319.
127. Peters, M. F., & Ross, C. A. (2001). Isolation of a 40-kDa Huntingtin-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3188-3194.
128. Picanço, V., Heinz, S., Bott, D., Behrmann, M., Covas, D. T., Seifried, E., & Tonn, T. (2007). Recombinant expression of coagulation factor VIII in hepatic and non-hepatic cell lines stably transduced with third generation lentiviral vectors comprising the minimal factor VIII promoter. *Cytherapy*, 9(8), 785-794.
129. Pittman, D. D., Marquette, K. A., & Kaufman, R. J. (1994). Role of the B domain for factor VIII and factor V expression and function.
130. Pool, J. G., Hershgold, E. J., & Pappenhagen, A. R. (1964). High-potency antihaemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. *Nature*, 203(4942), 312-312.
131. Quick, A.J., Stanley-Brown, M., Bancroft, F.W. (1935). A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am. J. Med. Sci.*, 190, 501-511.
132. Quick, A. J., & Favre-Gilly, J. E. (1949). The prothrombin consumption test: its clinical and theoretic implications. *Blood*, 4(12), 1281-128.
133. Rakocz, M., Mazar, A., Varon, D., Spierer, S., Blinder, D., & Martinowitz, U. (1993). Dental extractions in patients with bleeding disorders: The use of fibrin glue. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology*, 75(3), 280-282.
134. Rangarajan, S., Walsh, L., Lester, W., Perry, D., Madan, B., Laffan, M., ... & Pasi, K. J. (2017). AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *New England Journal of Medicine*, 377(26), 2519-2530.
135. Ronzitti, G., Gross, D. A., & Mingozzi, F. (2020). Human immune responses to adeno-associated virus (AAV) vectors. *Frontiers in Immunology*, 11, 670.
136. Rosner, F. (1969). Hemophilia in the Talmud and rabbinic writings. *Annals of internal medicine*, 70(4), 833-837.
137. Ruggeri, Z. M. (2007). The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thrombosis research*, 120, S5-S9.

138. Rushton, A. R. (2011). Leopold: the “bleeder prince” and public knowledge about hemophilia in Victorian Britain. *Journal of the history of medicine and allied sciences*, 67(3), 457-490.
139. Saenko, E. L., Shima, M., & Sarafanov, A. G. (1999). Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex. *Trends in cardiovascular medicine*, 9(7), 185-192.
140. Sangamo and Pfizer announce phase 1/2 interim data for investigational hemophilia a gene therapy. Pfizer. (n.d.). Retrieved January 20, 2022, from https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/sangamo_and_pfizer_announce_phase_1_2_interim_data_for_investigational_hemophilia_a_gene_therapy
141. Santagostino, E., Mancuso, M. E., Rocino, A., Mancuso, G., Mazzucconi, M. G., Tagliaferri, A., ... & Mannucci, P. M. (2005). Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *British journal of haematology*, 130(3), 422-427.
142. Sastry, L., Miller, C., Johnson, T., Jasti, A., Gattone, V., & Cornetta, K. (2005). 494. Assessing lentiviral vector quality using transmission electron microscopy. *Molecular Therapy*, 11(S1), S191.
143. Schep, S. J., Boes, M., Schutgens, R. E., & van Vulpén, L. F. (2019). An update on the ‘danger theory’ in inhibitor development in hemophilia A. *Expert Review of Hematology*, 12(5), 335-344.
144. Schramm, W. (2014). The history of haemophilia—a short review. *Thrombosis research*, 134, S4-S9.
145. Schwartz, R. S., Abildgaard, C. F., Aledort, L. M., Arkin, S., Bloom, A. L., Brackmann, H. H., ... & Recombinant Factor VIII Study Group*. (1990). Human recombinant DNA-derived antihemophilic factor (factor VIII) in the treatment of hemophilia A. *New England Journal of Medicine*, 323(26), 1800-1805.
146. Serban, M., Poenaru, D., Pop, L., Ionita, H., Mihailov, D., Tepeneu, N., ... & Schramm, W. (2009). Surgery—a challenge in haemophiliacs with inhibitors. *Hämostaseologie*, 29(S 01), S39-S41.
147. Shenzhen Geno-Immune Medical Institute (Other). (2019, May 23). Hemophilia a trial in Shenzhen (Yuva-GT-F801). Lentiviral FVIII Gene

- Therapy. Retrieved February 4, 2022, from <https://www.clincosm.com/trial/hemophilia-a-shenzhen-yuva-gt-f801>
148. Srivastava, A., Brewer, A. K., Mauser-Bunschoten, E. P., Key, N. S., Kitchen, S., Llinas, A., ... & Treatment Guidelines Working Group The World Federation Of Hemophilia. (2013). Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*, 19(1), e1-e47.
 149. Stephensen, D., Tait, R. C., Brodie, N., Collins, P., Cheal, R., Keeling, D., ... & Winter, M. (2009). Changing patterns of bleeding in patients with severe haemophilia A. *Haemophilia*, 15(6), 1210-1214.
 150. Sudhakar, K., & Fay, P. J. (1996). Exposed hydrophobic sites in factor VIII and isolated subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 271(38), 23015-23021.
 151. Sukarova, E., Dimovski, A. J., Tchacarova, P., Petkov, G. H., & Efremov, G. D. (2001). An Alu insert as the cause of a severe form of hemophilia A. *Acta haematologica*, 106(3), 126-129.
 152. Swiech, K., Picanço-Castro, V., & Covas, D. T. (2017). Production of recombinant coagulation factors: Are humans the best host cells?. *Bioengineered*, 8(5), 462-470.
 153. Themis, M., Waddington, S. N., Schmidt, M., Von Kalle, C., Wang, Y., Al-Allaf, F., ... & Coutelle, C. (2005). Oncogenesis following delivery of a nonprimate lentiviral gene therapy vector to fetal and neonatal mice. *Molecular Therapy*, 12(4), 763-771.
 154. Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L., Pittman, D. D., ... & Hewick, R. M. (1984). Molecular cloning of a cDNA encoding human antihaemophilic factor. *Nature*, 312(5992), 342-347.
 155. Türk Hematoloji Derneği (2021). Hemofili Tanı ve Tedavi Kılavuzu.
 156. Valentino, L. A. (2010). Blood-induced joint disease: the pathophysiology of hemophilic arthropathy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8(9), 1895-1902.
 157. Van den Berg, H. M., De Groot, P. H. G., & Fischer, K. (2007). Phenotypic heterogeneity in severe hemophilia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, 151-156.
 158. van der Bom, J. G., Mauser-Bunschoten, E. P., Fischer, K., & van den Berg, M. H. (2003). Age at first treatment and immune tolerance to factor VIII in severe hemophilia. *Thrombosis and haemostasis*, 89(03), 475-479.

159. Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., & Pistello, M. (2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*, 36(1), 1-22.
160. Varga-Szabo, D., Pleines, I., & Nieswandt, B. (2008). Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(3), 403-412.
161. Vehar, G. A., Keyt, B., Eaton, D., Rodriguez, H., O'Brien, D. P., Rotblat, F., ... & Capon, D. J. (1984). Structure of human factor VIII. *Nature*, 312(5992), 337-342.
162. Verbruggen, B., Novakova, I., Wessels, H., Boezeman, J., van den Berg, M., & Mauser-Bunschoten, E. (1995). The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thrombosis and haemostasis*, 73(02), 247-251.
163. Viiala, N. O., Larsen, S. R., & Rasko, J. E. (2009, February). Gene therapy for hemophilia: clinical trials and technical tribulations. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 35, No. 01, pp. 081-092). © Thieme Medical Publishers.
164. Wadelius, C., Lindstedt, M., Pigg, M., Egberg, N., Pettersson, U., & Anvret, M. (1993). Hemophilia B in a 46, XX female probably caused by non-random X inactivation. *Clinical genetics*, 43(1), 1-4.
165. Wang, D., Wang, K., & Cai, Y. (2020). An overview of development in gene therapeutics in China. *Gene Therapy*, 27(7), 338-348.
166. Wang, W., Wang, Y. J., & Kelner, D. N. (2003). Coagulation factor VIII: structure and stability. *International journal of pharmaceutics*, 259(1-2), 1-15.
167. White, G. C. I., Rosendaal, F., Aledort, L. M., Lusher, J. M., Rothschild, C., & Ingerslev, J. (2001). Definitions in hemophilia. *Thrombosis and haemostasis*, 85(03), 560-560.
168. Wight, J., & Paisley, S. (2003). The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*, 9(4), 418-435.
169. Wright, I. S. (1962). The nomenclature of blood clotting factors. *Thrombosis and Haemostasis*, 7(02), 381-388.
170. Wu, Z., Yang, H., & Colosi, P. (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Molecular Therapy*, 18(1), 80-86.
171. Yoneyama, K., Schmitt, C., Kotani, N., Levy, G. G., Kasai, R., Iida, S., ... & Kawanishi, T. (2018). A pharmacometric approach to substitute for a

conventional dose-finding study in rare diseases: example of phase III dose selection for emicizumab in hemophilia A. *Clinical pharmacokinetics*, 57(9), 1123-1134.

172. Young, G., Liesner, R. I., Chang, T., Sidonio, R., Oldenburg, J., Jiménez-Yuste, V., ... & Mancuso, M. E. (2019). A multicenter, open-label phase 3 study of emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors. *Blood*, 134(24), 2127-2138.
173. Zimmerman, T. S., Ratnoff, O. D., & Littell, A. S. (1971). Detection of carriers of classic hemophilia using an immunologic assay for antihemophilic factor (factor VIII). *The Journal of Clinical Investigation*, 50(1), 255-258.
174. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., & Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology*, 72(12), 9873-9880.

7. EKLER LİSTESİ

EK 1. Kurum İzin Yazısı.



EK 2. Etik kurul raporu.



8. ÖZGEÇMİŞ



9. İNTİHAL RAPORU

HEMOFİLİ A GEN TEDAVİSİ İÇİN TRANSGENİK KÖK HÜCRE PLATFORMUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO ETKİNLİĞİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 7	% 6	% 3	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	9lib.net İnternet Kaynağı	% 1
2	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	"Textbook of Hemophilia", Wiley, 2010 Yayın	% 1
4	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	bloodjournal.hematologylibrary.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.thd.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Paul Batty, K John Pasi. "Gene therapy trials for haemophilia: a step closer to a cure?", Expert Review of Precision Medicine and Drug Development, 2019 Yayın	<% 1