

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**HEMOFİLİ A HASTALARINDA REGULATUVAR T HÜCRE
FONKSİYONLARININ İNHİBİTÖR GELİŞİMİNE ETKİLERİ:
İMMÜN TOLERANS GELİŞİMİNDE SİTOKİNLERİN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre AKKAYA

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Sema GENÇ**

İstanbul 2022

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**HEMOFİLİ A HASTALARINDA REGULATUVAR T HÜCRE
FONKSİYONLARININ İNHİBİTÖR GELİŞİMİNE ETKİLERİ:
İMMÜN TOLERANS GELİŞİMİNDE SİTOKİNLERİN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre AKKAYA

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Sema GENÇ

İstanbul 2022

ÖNSÖZ

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı gibi köklü bir kurumda, faydalı ve keyifli bir uzmanlık eğitimi geçirmenin mutluluk ve onurunu yaşayarak;

Birlikte çalışabildiğim için; kendimi çok şanslı hissettiğim, büyük mutluluk ve onur duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım **Prof. Dr. Sema GENÇ**'e,

Asistanlık eğitimim boyunca, bu güzel aile içerisinde huzurla çalışmamı sağlayan Anabilim Dalı Başkanlarımız Sayın **Prof. Dr. Beşaret Necla Toker** ve **Prof. Dr. Seldağ Bekpınar**'a,

Akademik kimliğinin yanı sıra insan yönetimi ve liderlik vasıflarıyla örnek olan Merkez Klinik Biyokimya Laboratuvarı sorumlusu değerli hocam **Prof. Dr. Beyhan Ömer**'e,

Tez çalışmam süresince desteklerini benden esirgemeyen **Prof. Dr. Evin Ademoğlu**, **Doç. Dr. Fatih Aydın** ve Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki bütün hocalarıma,

Tez çalışmamın klinik ayağını yöneten, klinik anlamda fikirleri yol gösterici olan ve yardımlarını her zaman hissettiğim **Prof. Dr. Osman Bülent Zülfikar** ve **Doç. Dr. Başak Koç Şenol**'a,

Çalışmanın İmmünolojik değerlendirmelerinde yardımcı olan **Prof. Dr. Günnur Deniz**, **Prof. Dr. Esin Çetin** ve **Doç. Dr. Umut Can Küçüksezer**'e

Birlikte güzel günler geçirdiğim asistan arkadaşlarım **Dr. Yusuf Yeşil**, **Dr. Arif Murat Kaytaç**, **Dr. Şefika Nur Gümüş**, **Dr. Gözde Ceylan**, **Dr. Serhat Kılınç** ve **Dr. İlayda Söğmen**'e

Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına;

Ayrıca hayatıma anlam katan sevgili eşime ve aileme en içten teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Emre Akkaya

İstanbul, 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Hemostaz ve Pıhtılaşma Mekanizması	
2.2. Faktör VIII ve von Willebrand Faktör	
2.3. Hemofili A	
2.4. T Regulator Hücresel	
2.5. İmmün Sistem ve Hemofili A’da İnhibitör Gelişimi	
2.6. Hemofili A ve Sitokinler	
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	51
3.1. Gereçler	
3.2. Çalışma Protokolü	
3.3. Plazmada Yapılan Ölçümler	
3.4. Hücre Kültür Süpernatantlarında ELISA Yöntemiyle Sitokin Düzeyi Ölçümü	
3.5. Akan Hücre Ölçer Cihazıyla T Hücre Analizleri	
3.6. İstatistiksel Analiz	
4. BULGULAR	65
4.1. Demografik ve Klinik Özelliklerle İlgili Bulgular	
4.2. Koagülasyon Testlerinden Elde Edilen Bulgular	
4.3. Kültür Öncesi Akan Hücre Ölçer Analizlerinden Elde Edilen Bulgular	
4.4. Kültür Sonrası Akan Hücre Ölçer Analizlerinden Elde Edilen Bulgular	
4.5. ELISA ile Yapılan Sitokin Düzeylerinin Analizinden Elde Edilen Bulgular	
4.6. Korelasyon Analizleri	
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	76
6. KAYNAKLAR.....	82
7. ÖZGEÇMİŞ.....	95

KISALTMALAR LİSTESİ

ADAMTS13	Trombospondin tip-13 ile Disintegrin ve Metalloproteaz
ADP	Adenozin difosfat
aPCC	Aktive Protrombin Kompleks Konsantreleri
aPTT	Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı
ASH	Antijen sunan hücre
AT-2	Anjiyotensin II
ATIII	Antitrombin III
ATP	Adenozin trifosfat
cAMP	siklik Adenozin monofosfat
dak	dakika
DDAVP	1-deamino-8-D-arjinin vazopressin
ELISA	Enzime bağlı immün assay
FEIBA	Factor 8 inhibitör etkisini ortadan kaldırıcı aktivite
FOXP3	Forkhead Box Transkripsiyon Faktörü-3
FVIII	Faktör 8
Gla	γ -karboski Glutamat
Gp	Glikoprotein
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
HMWK	Yüksek Molekül Ağırlıklı Kininojen
ICAM-1	İntersellüler Adezyon Molekülü-1
IFN- γ	İnterferon-gama
IL-	İnterlökin-
IPEX	X'e bağlı İmmünodisregülasyon Poliendokrinopati Enteropati
kDa	kilodalton
KZ	Kanama Zamanı
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LRP	LDL reseptör ilişkili protein
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
Min-Maks	Minimum-Maksimum
MMR/CD206	Makrofaj Mannoze reseptörü
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
NK	Doğal katil hücreler
NO	Nitrik Oksit
NPP	Normal havuz plazma
O ₂	Moleküler Oksijen
Ort	Ortalama
PAF	Trombosit Aktive Edici Faktör

PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PAI-2	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-2
PAMPs	Patojen ilişkili moleküler paternler
pd-FVIII	plazma kaynaklı Faktör 8
PDGF	Trombosit kaynaklı Büyüme Faktörü
PHA	Fitohemaglutinin
PKMH	Periferik Kan Mononükleer Hücre
PLT	Platelet / Trombosit
PRR	Patern Tanıyıcı Reseptör
PT	Protrombin Zamanı
Q1-Q3	Çeyrekler açıklığı (Interquartile aralık)
rFVIII	rekombinant Faktör 8
RİPA	Ristosetin ile uyarılmış trombosit agregasyonu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	dakikaki devir sayısı
sa	saat
SD	Standart sapma
SYÖ	Standart yarı ömürlü
TDP	Taze donmuş plazma
TF	Doku Faktörü
TFPI	Doku Faktör yolu inhibitörü
TGF- β	Transforme edici Büyüme Faktör-beta
Th	T helper / yardımcı T hücre / CD4 ⁺ T
TLR	Toll-like Reseptör
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör-alfa
t-PA	Doku tipi plazminojen aktivatör
Treg	Reglatuvar T Hücre / CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ T
TXA2	Tromboksan A2
u-PA	Ürokinaz tip plazminojen aktivatör
US	Unstimüle / Uyarılmamış
UYÖ	Uzatılmış yarı ömürlü
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
vWF	von Willebrand Faktör
vWF:Rco	vWF Ristosetin Kofaktör Testi
vWH	von Willebrand Hastalığı
WPB	Weibel Palade Cisimciği

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.3.A. γ -karboksi glutamat oluşumu.

Şekil 2.1.3.B. Koagülasyon kaskadı.

Şekil 2.1.4. Doğal Antikoagülanlar.

Şekil 2.1.5. Plazminojen aktivatör ve inhibitörlerle fibrinolizin düzenlenmesi.

Şekil 2.2.1. B alanı silinmiş Faktör VIII'in üç boyutlu yapısı.

Şekil 2.2.2.A. von Willebrand Faktör yapısı.

Şekil 2.2.2.B. Weibel-Palade cisimlerinin strese duyarlı nöbetçiler ve inflamasyon araçları olarak varsayımsal rolü.

Şekil 2.3.2. Hemofili A'da hemartroz süreci. **a.** Tek bir kanama epizodu **b.** Tekrarlayan kanamalarla oluşan inflamasyon sonucu kalıcı deformiteler

Şekil 2.3.3. Hemofili A tanısında laboratuvar testleri algoritması.

Şekil 2.4.A. Treg hücre alt kümeleri.

Şekil 2.4.B. Treg hücre biyobelirteçleri.

Şekil 2.5.1. Hemofili A'da inhibitör antikor gelişiminde primer immün cevap.

Şekil 2.5.2. Hemofili A'da inhibitör antikor gelişiminde sekonder immün cevap.

Şekil 3.2. Çalışma protokolü.

Şekil 3.3.A. İzole PT / aPTT uzamasında uygulanan karışım testinin yorumlanması.

Şekil 3.3.B. Tek aşamalı aPTT bazlı faktör ölçümü (one-stage clotting yöntemi).

Şekil 3.3.C. **a.** Klasik Bethesda testi çalışma ve seri dilüsyon basamakları **b.** Klasik Bethesda testi hesaplama aşamasında kullanılan grafik ve inhibitör titrajını hesaplama tablosu.

Şekil 3.4. Sandviç ELISA yöntemi.

Şekil 3.5.A. Akan Hücre Ölçer cihazının temel bileşenleri.

Şekil 3.5.B. Akan Hücre Ölçerin çalışma prensibi.

Şekil 3.5.C. Akan Hücre Ölçer ile T hücrelerinin proliferatif yanıt analizleri için bir örnek.

Şekil 4.4. Kültür sonrası Akan Hücre Ölçer analizleri ile T hücre proliferasyon yüzde grafikleri (%).

Şekil 4.5. Kültür sonrası süpernatantlardaki sitokin düzeylerinin hasta grupları arası karşılaştırması.

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1.3. Pıhtılaşma faktörleri fonksiyonları, yarılanma ömürleri ve plazma konsantrasyonları.

Tablo 2.3.2. Hemofilide görülen kanama bulguları ve kronik komplikasyonlar.

Tablo 2.3.4. Hemofili A hastalığında uygulanan tedavi modeline göre profilaksi tanımları.

Tablo 2.3.5. İnhibitör gelişimine yatkınlık oluşturan risk faktörleri.

Tablo 2.6. Sitokinler.

Tablo 4.1. Hasta gruplarının demografik ve klinik özellikleri.

Tablo 4.2. Hasta gruplarının FVIII düzeyleri ve inhibitör titreleri.

Tablo 4.3. Kültür öncesi 0. gün Akan Hücre Ölçer analizleri ile Aktive T ve Treg hücre oranları (%).

Tablo 4.4. Kültür sonrası Akan Hücre Ölçer analizleri ile T hücre proliferasyon yüzdeleri (%).

Tablo 4.5. Kültür sonrası süpernatantlardaki sitokin düzeyleri (pg/mL).

ÖZET

Amaç: Hemofili A olgularında tedavide kullanılan FVIII preparatlarının yarı ömürlerinin kısa olması ve tekrarlayan infüzyonların gerekliliği % 25-30 hastada inhibitör gelişimine sebep olur. Bu inhibitörler efektif tedaviyi komplike eder, morbiditeyi arttırarak yaşam kalitesini etkiler. Yapılan çalışmalarda aktive T ($CD4^+CD25^+$ T) hücreleri aracılığıyla FVIII'e karşı tolerans geliştiği ve reglatuvar T / Treg ($CD4^+CD25^+CD127^-$ T) hücrelerinin uzun süreli toleranstaki rolü gösterilmiştir. Ancak inhibitör gelişimi, karışık süreci nedeniyle tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada, inhibitör gelişmiş (İNH(+)) ve inhibitör gelişmemiş (İNH(-)) Hemofili A hastalarında, rFVIII'le uyarılmış T hücre alt grupları ve bu hücrelerden sekrete edilen sitokinlerin inhibitör gelişme patogenezindeki rollerinin ortaya konulmasıyla inhibitör gelişen hastalara uygulanacak immün tedaviye katkıda bulunmayı amaçladık.

Yöntem: Çalışma grubu, 10 İNH(+) ve 10 İNH(-) hemofili hastası ile benzer yaş grubunda 10 sağlıklı kontrolden oluşturuldu. Periferik kan mononükleer hücre (PKMH) izolasyonu için; heparinli tüpe (Vacuette tube, BD, Plymouth, UK) alınan 10 ml kan örnekleri laboratuvara ulaştırılıp 0. gün T hücre oranlarına Akan Hücre Ölçer (Acea Biosystems Novocyte, San Diego, ABD) ile bakıldı. Daha sonra zenginleştirilmiş RPMI-1640 kültür medyumunda 1×10^6 /mL PKMH olacak şekilde 3 koşulda inkübasyon yapıldı; 1) Unstimüle (Uyarılmamış/US), 2) rFVIII ile uyarılmış (1 mg/mL), 3) Fitohemaglutinin (PHA) ile uyarılmış (5 µg/mL). Kültür sonrası T hücre proliferasyon yüzdelere Akan Hücre Ölçer ile, süpernatantlardaki sitokin düzeylerine ELISA (Diacclone Research, Besançon, Fransa) ile bakıldı.

Bulgular: Aktive T hücre proliferasyon yüzdeleri İNH(+) grupta İNH(-) gruba göre, hem US hem rFVIII'le uyarılmış koşulda anlamlı düşük bulundu ($p < 0,05$). Kültür ortamına rFVIII eklenmesi İNH(+) grupta aktive T hücre oranını anlamlı azaltırken, Treg hücre oranını anlamlı arttırdı ($p < 0,05$); diğer gruplarda ise değişim olmadı. TGF- β sitokin düzeyleri İNH(+) grupta, İNH(-) gruba göre anlamlı düşük bulundu ($p < 0,05$). Kültür ortamına rFVIII eklenmesi TNF- α sitokin düzeyini İNH(+) grupta anlamlı azaltırken ($p < 0,001$) İNH(-) grupta değiştirmede; TGF- β sitokin düzeyini İNH(+) grupta değiştirmezken İNH(-) grupta anlamlı azalttı ($p < 0,001$).

Sonuç: Bulgularımız inhibitör gelişiminde özellikle aktive T hücre oranlarının FVIII'e karşı toleranstaki önemini göstermiştir. TGF- β sitokin düzeylerinin iki hasta grubunda anlamlı farklılığı antiinflamatuvar karakterdeki bu sitokinin inhibitör gelişimindeki rolünü düşündürmüştür. Ayrıca bu çalışma, FVIII'in kültür ortamına eklenmesinin İNH(+) grup için T hücre alt gruplarında ve sitokin düzeylerinde farklı sonuçlar doğurduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Hemofili A, inhibitör antikor gelişimi, rFVIII, Treg hücre, sitokin

ABSTRACT

Aim: The most prevalent clinical complication observed after repeated FVIII administration in Hemophilia A patients is the development of anti-FVIII inhibitory antibodies that affect approximately 25-30% of HA patients. The effects of inhibitory antibodies to neutralize the procoagulant activity of FVIII result in increased morbidity and mortality. Studies have shown that initial immunotolerance to FVIII is mediated by activated T cells ($CD4^+CD25^+$ T), but prolonged immune response is mediated by regulatory T cells/Tregs ($CD4^+CD25^+CD127^-$ T). In this study, it was aimed to investigate the role of T cell subgroups and cytokines secreted from these cells in the development of inhibitory antibodies in hemophilia A patients with inhibitor positive (INH(+)) and negative (INH(-)).

Methods: The study group consisted of 10 INH(+) and 10 INH(-) hemophilia patients and 10 healthy controls in the similar age group. Heparinized blood samples collected in vacutainer tubes (Vacurette tube, BD, Plymouth, UK) were used for the isolation of peripheral blood mononuclear cell (PBMC), and the percentages of T cell groups were determined using flow cytometric method (Acea Biosystems Novocyte, San Diego, USA). Then, PBMC were incubated in RPMI-1640 medium being 1×10^6 cell per mL in three conditions; 1) unstimulated 2) stimulated with rFVIII (1 mg/mL) 3) stimulated phytohemagglutinin (PHA) (5 μ g/mL). T cell proliferation percentages after culture were measured by flow cytometric method, and cytokine levels in supernatants were measured by ELISA assay (Diacclone Research, Besançon, France).

Results: Activated T cell proliferation percentages were found to be significantly lower in the INH(+) group compared to the INH(-) group in both US and rFVIII stimulated conditions ($p < 0.05$). In the INH(+) group, a significant decrease was observed in the activated T cells by the addition of rFVIII to the culture medium, while Tregs were significantly increased ($p < 0.05$). There was no significant changes in the activated T cells and Tregs of the other groups. TGF- β levels were lower in the INH(+) group than in the INH(-) group ($p < 0.05$). Addition of rFVIII to the culture medium caused a decrease in TGF- β concentration in the INH(-) hemophilia group ($p < 0.001$), while no change was detected in the INH(+) group. However, with the addition of rFVIII in the INH(+) group, TNF- α levels decreased significantly ($p < 0.001$), while there was no change in the INH(-) group.

Conclusion: The results of our study showed that activated T cells have important roles in the emergence of immunotolerance in inhibitor development. The differences in TGF- β concentrations in both INH(+) and INH(-) groups reveal the important role of the anti-inflammatory property of this cytokine in the pathogenesis. At the same time, changes in the concentrations of some cytokines such as TGF- β , TNF-alpha depending on the addition of FVIII also show the contribution of these cytokines in the development of inhibitors.

Keywords: Hemophilia A, inhibitory antibody development, rFVIII, Treg cell, cytokine

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hemofili A, hereditör kanama bozuklukları arasında en sık görülenlerdendir. Tedavideki gelişmeler sayesinde Hemofili A olgularında; kanama epizodlarının yönetimi kolaylaşmış, mortalite ve morbidite oranları azalmış ve hastaların yaşam kaliteleri artmıştır. Tüm bu gelişmelerle birlikte kas iskelet sistemi ve transfüzyonla ilgili enfeksiyon hastalıkları eskisi kadar sorun oluşturmazken Hemofili A'da inhibitör antikor gelişimi halen büyük bir sorundur (45). İnhibitör gelişme insidansı, ağır Hemofili A olgularında % 20-35 ve hafif / orta dereceli olgularda % 3-13 olarak bildirilmiştir (41).

Hemofili A'da inhibitör gelişimi ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Son yirmi yılda, inhibitör gelişimine yol açan patofizyolojik mekanizmaların anlaşılması için önemli yol katedilmesine rağmen immün sistem hücreleri, sitokinler ve diğer immün sistem komponentlerinin etkili olduğu bu karmaşık süreçte halen aydınlatılamamış birçok konu vardır (77).

İnhibitör antikorlar tedavi amacıyla kullanılan FVIII'in hemostatik etkisini nötralize ederek tedaviyi etkisizleştiren genellikle IgG4 yapısında alloantikorlardır. İnhibitör gelişen olgularda antikoron, FVIII ile ortalama 20-30 kez karşılaşma sonucu ortaya çıktığı bildirilmiştir (42). İnhibitör gelişen hastalarda IgG4 ve IgG1 en bol bulunan IgG alt sınıflarıyken, inhibitör gelişmeyenler ve sağlıklı kontrollerde IgG4 saptanmamıştır (43). Ayrıca, inhibitör gelişen Hemofili A hastalarındaki inhibitör alloantikorların; inhibitör gelişmeyen hastalardaki ve sağlıklı bireylerdeki FVIII'e karşı gelişen antikorlardan, afinitelerinin çok daha fazla olduğu gösterilmiştir (44).

İnhibitör gelişiminde genetik ve çevresel risk faktörleriyle ilgili çalışmalarda, birçok farklı görüş ortaya çıkmıştır. Üzerinde fikir birliği sağlanabilenlerin başında F8 genini etkileyen varyant türü gelir: F8 genini büyük çapta etkileyen insersiyon / delesyonları ve hafif zinciri etkileyen anlamsız mutasyonları olan olgularda inhibitör gelişme riski en yüksek bulunmuştur (47). Bunun yanında Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) genotipi, İnsan Lökosit Antijen (HLA) haplotipi, immün cevapla ilişkili IL-1, IL-2, IL-10, TNF- α ve CTLA-4 vb. gen polimorfizmleri de inhibitör gelişiminde etkili diğer genetik risk faktörleri olarak gösterilmiştir (45, 48, 49, 50). İnhibitör gelişiminde uygulanan FVIII ürününün tipi, FVIII'e maruz kalınan gün sayısı, FVIII ürününe ilk maruz kalma yaşı ve

kullanılan FVIII ürünün tipi (pd-FVIII, rFVIII) gibi edinilmiş çevresel risk faktörleriyle ilgili yapılan birçok çalışmanın sonuçları uyumlu değildir (45, 47, 53, 54). Sadece, özellikle ilk 50 uygulamada uzun süreli (≥ 5 gün) ve yüksek doz (≥ 50 IU/kg) FVIII maruziyetinin, inhibitör gelişme riskini arttırdığını destekleyen birçok çalışma vardır (45, 47, 53, 54, 55).

Hemofili A'da inhibitör antikorlar, doğal immün sistemin desteği ile klasik T hücre bağımlı adaptif immün cevaba bağlı gelişir (77). Yapılan çalışmalarda aktive T ($CD4^+CD25^+$ T) hücreleri aracılığıyla FVIII'e karşı tolerans geliştiği ve reglatuvar T / Treg ($CD4^+CD25^+CD127^-$ T) hücrelerinin uzun süreli toleranstaki rolü gösterilmiştir (77, 125, 126, 127). $CD4^+$ T hücrelerinin FVIII ile uyarımı, foliküler $CD4^+$ T hücreleri aracılığı ile B hücre matürasyonu, bu hücrelerden sitokin sekresyonu, B hücrelerin plazma hücrelerine diferansiyasyonu ve FVIII'e özgül antikor sentezi şeklinde birbirini izleyen bir dizi olay inhibitör gelişiminde rol oynamaktadır (125).

Antijenle uyarımını takiben $CD4^+$ T hücreleri, başta Th1 ve Th2 hücreleri olmak üzere gruplara farklılaşır ve bu hücreler sekrete ettikleri sitokinler aracılığıyla fonksiyon gösterirler (128). Th1 hücrelerinin FVIII'e karşı gelişen immün cevapta başlangıçta etkili rol oynadığı, Th2 hücrelerinin ise güçlü inhibitör antikor cevabından sorumlu olduğu bildirilmiştir (110). Th hücrelerine bağımlı mekanizma ile başlayan immün cevapta Treg hücrelerin ise aktif süpresyon ve immün toleransın stimülasyonu için esas olduğu gösterilmiştir (77, 128). Th1 hücreleri proinflamatuvar sitokinleri (IFN- γ , IL-2 ve TNF- α gibi) sentezleyerek antijen sunan hücre (ASH) aktivasyonunu, antikorları sentezleyen B hücrelerin stimülasyonunu sağlar ve immün cevabın oluşumunu hızlandırır. Th2 hücreleri ise, antiinflamatuvar sitokinleri (IL-4 ve IL-10 gibi) eksprese ederek, aktive olan Th1 hücrelerini ve ASH'leri baskılayıcı etki gösterir (77).

Hemofili A'da inhibitör gelişimi ile ilgili yapılan birçok çalışmaya rağmen T hücreler, bu hücrelerden sekrete edilen sitokinler ve bunların hücre içi sinyal yollarındaki rolleri tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada, inhibitör gelişmiş ve inhibitör gelişmemiş Hemofili A olgularında rFVIII ile uyarılmış T hücre alt grupları ve bu hücrelerden sekrete edilen sitokinlerin inhibitör gelişme patogenezindeki rollerini ortaya koyarak; inhibitör gelişmiş hastalara uygulanacak immün tedaviye katkıda bulunmayı, böylece hastaların morbidite ve mortalitesinin azalıp hayat konforlarının artmasını ve ayrıca tedavi maliyetlerinin de azaltılmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 . Hemostaz ve Pıhtılaşma Mekanizması

Eski çağlardan itibaren kan kutsal bir değer olarak olarak düşünülmüştür. Hemostaz Latince kan anlamına gelen “*hema*” ve duruş anlamlarına gelen “*stasis*” kelimelerinin birleşiminden oluşur (1). Hemostaz; vücudun kan kaybını önleyen fizyolojik bir savunma mekanizmasıdır. Kan pıhtılaşması kavramı, ilk olarak 1964 yılında Davie, Ratnoff ve Macfarlane tarafından, şelale / çağlayan modeli esas alınarak açıklanmış, daha sonra ise pıhtılaşma işlemine katılan çeşitli faktörlerin ve proteinlerin kompleks ilişki ağlarını açıklayan hücre bazlı bir model geliştirilmiştir (2). Hemostaz, hücre ve biyokimyasal bir grup enzimatik aktivasyon ve inhibisyonla oluşur. Damar bütünlüğünün sağlam olması halinde ven ve arterler içindeki kanın sıvı halde akması sağlanırken, damar yaralanmasını takiben kan kaybının önlenmesini sağlayacak şekilde fonksiyon gösterir.

Koagülasyon damar yaralanmasını takiben saniyeler içinde başlayan ve insan organizmasındaki en hızlı tamir sistemlerinden biridir. Koagülasyondaki esas amaç, yaralanma bölgesinde inflamatuvar ve vücut onarım süreçleri ile kanamanın durmasının ve kanın damar içinde tutulmasının sağlanmasıdır. İlk olarak trombositlerin agregasyonu ile yaralanma bölgesi kapatılır ve yaralanma bölgesinde gevşek bir trombosit tıkaçı oluşur. Bu gevşek trombosit tıkaçı daha sonra fibrin ağ ile stabilize edilir. Koagülasyonla sadece kan kaybının önlenmesi değil, aynı zamanda yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonunu uyaran primer ve sekonder hemostaz olarak isimlendirilen bir dizi olaylar zinciri de aktiflenir. Bu olaylar sırasında ayrıca trombositlerden, bu bölgeye mikroorganizmaların girişini bloke eden antimikrobiyal peptitlerin de sentezi gerçekleşir.

Hemostaz aşırı pıhtı oluşumunu engelleyen ve kanın akışkanlığını yeniden kazandıran sistemleri içermektedir (3,4).

Normal hemostaz 4 aşamada gerçekleşir:

1. Vasküler faz: Küçük damar yaralanmasına bağlı olarak kanamanın durdurulabilmesi için önce endotelde refleks nörojenik mekanizmayla vazokontraksiyon olur.
2. Primer Hemostaz: Damar yaralanmasına vasküler sistem ve trombositlerin yanıtıdır.

3. Sekonder Hemostaz: Primer hemostaz ile oluşan zayıf tıkaçın, pıhtılaşma faktörlerinin aktive olmasıyla sağlam fibrin pıhtıya dönüştüğü aşamadır.
4. Tersiyer hemostaz: Oluşan pıhtının erimesiyle sonlanan fibrinoliz aşamasıdır.

Hemostaz ile kanın pıhtılaşması ve akışkanlığı arasındaki hassas denge korunur. Sağlıklı bireylerde endotel hasarı onarılırken, düşük düzeyde bir koagülasyon yanıtı oluşur. Bu dengenin bozulmasıyla ise anormal ve istenmeyen pıhtı oluşumu ya da aşırı kanamalar ortaya çıkabilir (5). Bu hemostatik dengeden primer olarak trombojenik görev yapan endotel, doku faktörü (TF), kollajen, trombositler, platelet aktive edici faktör (PAF), pıhtılaşma faktörleri, protrombin, fibrinojen, von Willebrand Faktör (vWF) ve antitrombojenik görev yapan heparin, trombomodulin, doku plazminojen aktivatör (t-PA), antitrombin (AT), protein C, protein S, plazminojen sorumludur. Tüm bunların yanı sıra daha birçok faktörün de bu dengede indirekt etkisi vardır.

Hemostazı Etkileyen Faktörler

Hemostaz; vasküler sistem, koagülasyon sistemi, fibrinolitik sistem, trombositler, kinin sistemi, serin proteaz inhibitörleri ve kompleman sistemlerinin birlikte hassas bir denge içinde fonksiyon göstermeleri ile oluşur. Hemostatik dengenin aksaması hiperkoagülasyona bağlı tromboz oluşumu ile veya hipokoagülasyona bağlı kanama ile sonuçlanabilir.

Primer hemostazın üç sacayağı vardır: endotel, trombositler ve adezyon proteinleri. Bunlar arasındaki karışık süreç, başlangıçtaki zayıf, geçici trombosit tıkaç oluşumu ile sonuçlanır.

2.1.1. Endotel

Vasküler sistemin prokoagülan, antikoagülan ve fibrinolitik özellikleri vardır. Kan damarlarının iç yüzeyi, hemostaz için hayati öneme sahip kollajenden zengin bazal membran ve bağ doku ile desteklenen endotel hücrelerinden oluşur.

Vasküler homeostazda endotel hücre tabakasının önemi, ilk kez 1980 yılında asetilkolinin vazodilatasyon oluşturabilmesi için endotel hücrelerinin varlığına gereksinim

duymasıyla ortaya konmuştur (6). Endotel, vücudun en büyük organıdır ve kan damar duvarı ile kan bileşenleri arasında yer alır. Basınç ve temas gibi mekanik ve hormonal uyarılara yanıt olarak vazomotor fonksiyonu düzenleyen, inflamasyonu uyaran ve hemostazı etkileyen ajanları sentezler.

a- Endotel tarafından sentezlenen vazodilatör maddeler:

- Nitrik oksit (NO)
- Prostaglandin
- Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktörler
- C-tipi natriüretik peptit

b- Vazokonstriktör maddeler:

- Anjiyotensin-II (AT-2)
- Endotelin-1
- Tromboksan-A2 (TXA2)
- Reaktif oksijen türleri (ROS)

c- İnflamatuvar modülatörler:

- NO
- İnterselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1)
- Vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1)
- E-selektin
- Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)

d- Hemostazın sağlanması için gerekli maddeler:

- Doku plazminojen aktivatörü (t-PA)
- Doku faktörü inhibitörü (TFPI)
- vWF
- NO
- Prostaglandin
- TXA2
- Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1)
- Fibrinojen

Vasküler duvarı kaplayan endotel hücreleri, negatif bir elektriksel yüke sahiptir. Özellikle negatif yüklü bir glikozaminoglikan olan heparinin sağladığı elektriksel itimin

yanı sıra; trombosit inhibitörlerinin sentezi ve sekresyonu, pıhtılaşma inhibitörleri ve fibrinoliz aktivatörleri endotel dokuya antitrombojenik özellik kazandırır. Buna karşılık, subendotelial tabaka; kollajen, vWF ve trombosit yapışmasında etkili olan laminin, trombospondin ve vitronektin gibi diğer proteinler nedeniyle trombojenik özelliktedir (7, 8, 9).

Damar endoteli çok işlevli bir dokudur. Yarı geçirgen bir engel olarak arter, kapiller ve venüllerin duvarları arasından moleküllerin geçişlerini kontrol eder. Öyle ki birçok bölgede hücrelerarası kompartman çoğu moleküle geçirgen değilken, yüksek kan basıncı gibi hemodinamik faktörler ve inflamasyon sırasında histamin gibi vazoaaktif ajanların etkisiyle endotel hücrelerinin geçirgenliği değişebilir. Endotel hücrelerinin kan-doku bariyerinin korunmasında, kan akımı ve damar direncinin düzenlenmesinde, anjiyogenezde, sıvı dengesinin sağlanmasında, hormon metabolizmasında, immün ve inflamatuvar reaksiyonların düzenlenmesinde, özellikle düz kas hücreleri olmak üzere diğer hücre tiplerinin çoğalmalarının kontrolünde önemli rolleri vardır. Bu sebeple endotel, kan ve dokular arasındaki etkileşimlerde endokrin (uzak hücre üzerinde etki), parakrin (yakın hücre üzerinde etki) ve otokrin (aynı hücre üzerinde etki) etkili vazgeçilmez bir organ olarak işlev görmektedir.

Epitel bütünlüğü bozulmamış kan damarları, pıhtılaşma eğilimini önleyen en önemli faktördür. Sağlam endotel hücreleri, trombosit agregasyonunu önleyen NO ve prostasiklin moleküllerini salgılayarak; pıhtılaşma kaskadını durduran fibrinolitik heparini ve trombomodulini eksprese ederek pıhtılaşmayı önler. Endotel hasarı oluştuğunda ise endotel hücreleri pıhtılaşma ve agregasyon inhibitörlerinin sekresyonunu durdurur; pıhtı oluşumunda trombosit adezyonunda etkili vWF'ü salgılar.

Yaralanma bölgesindeki ağrı sempatik ağrı reseptörleri ile refleks vazokonstriksiyona neden olur. Ayrıca endotel bütünlüğünün bozulmasıyla endotel hücrelerinden sekrete edilen endotelin, trombositlerden sekrete edilen TXA2 ile serotonin ve norepinefrin de vazokonstriksiyon oluşumuna katkıda bulunur.

2.1.2. Trombositler ve Primer Hemostaz

Damar yaralanmasını takiben birkaç dakika (dak) içerisinde kanama, primer trombüs (trombosit tıkaçı) oluşumu ile geçici olarak durdurulur. Primer hemostaz sonucu oluşan trombosit tıkaçı kanamayı durdurmaya yeterli olmazsa hemostaz başlar. Trombosit tıkaçı,

belirgin morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere uğrayan irreversibl trombosit agregatıdır. Son olarak hemostatik kapanma ise, yaklaşık 10-20 dak sonra sekonder trombüs (fibrin tıkaç) oluşumu ile gerçekleşir. Sekonder trombüs, başlangıçtaki trombosit tıkaç hücrelerin katılımı ve fibrin ağ ile güçlenir. Fibrin ağ içinde kalan trombositlerin kontraktıl proteinleri, başlangıç jelatinöz fibrin pıhtıyı stabilize eder ve yara kenarlarının birbirlerine yaklaşmasını sağlar. Daha sonraki fazlarda pıhtılaşma faktörlerinin bağlanması ile fibrinin büyümesi gerçekleşir.

2.1.2.1. Trombositler

Trombositler, kemik iliğindeki megakaryosit diye adlandırılan büyük ve multinükleer hücrelerinin parçalanmasıyla oluşan, çapları 1,5 - 3,0 µm arasında değişen, çekirdeksiz ve diskoid şekilli, çok sayıda granül içeren hücre fragmanlarıdır. Hücre membranının sitoplazmaya doğru parmak şeklinde girmesiyle oluşan, membran yüzeyine açılan ve “kanaliküler sistem” adı verilen bir kanal sistemine sahiptirler. Trombositler; fibrin stabilize edici trombosit agregatlarının, pıhtı retraksiyonunun ve aktif pıhtılaşma faktörlerinin bağlanması için yüzey sağlayan ilk hemostatik tıkaçın oluşumu sayesinde hemostazda önemli bir role sahiptir.

Trombositler iki tip granüle sahiptir:

- Alfa granülleri: fibrinojen, faktör 5 (FV), vitronektin, trombospondin ve vWF içeren, 300-500 nanometre (nm) çapındaki granüllerdir.
- Delta granülleri: ADP, ATP, kalsiyum iyonları, pirofosfat ve plazmadan alarak depoladıkları serotonin içeren, 250-300 nm çapındaki granüllerdir.

Trombositler; antitrombojenik özelliklerinden dolayı, bütünlüğü bozulmamış sağlam endotel hücrelerine yapışamaz. Ancak trombositler vasküler yaralanmayı takiben açığa çıkan kollajen, vWF ve fibronektin gibi subendotelyal matriks proteinleri ile temas ederek aktifleşir. Aktifleşen trombositler subendotelyal dokudaki kollajen ve vWF'e yapışırlar. Subendotelyal dokuyla etkileşiminden sonra trombositler diskoid şekilden sferik şekle döner, ayrıca çok sayıda psödopod oluşturarak yüzey alanlarını önemli ölçüde arttırırlar (10). Bu süreçte trombositlerin dış yüzeylerinde, reseptör olarak görev yapan bir grup glikoprotein (Gp) büyük önemi vardır (7):

- GpIb: Disülfid bağı ile bağlı heterodimerik yapıdadır ve GpIX ile kompleks oluşturur. GpIb reseptörünün yokluğunda Bernard-Soulier sendromu ortaya çıkar.

- GpV: Trombin için majör substrattır ve trombosit membranında diğer trombosit glikoproteinini (GpIb-IX) ile nonkovalan kompleks oluşturur.
- GpIb-IX-V: Trombositlerin hasarlanmış damar duvarı subendotelyal tabakasında vWF'e tutunmasını sağlar. GpIb α , özellikle A1 domeni ile vWF'ü bağlar ve vWF ile GpIb α 'nın bağlanması trombosit adezyonunu başlatır.
- GpIIb-IIIa: Trombosit agregasyonunu düzenler ve GpIIb-IIIa yokluğu Glanzmann Trombostopenisi'ne sebep olur.
- GpIa-IIa ve GpVI: Kollajene bağlanırlar. GpIa-IIa'nın kollajene bağlanması trombosit adezyonunda reseptör rolü vardır. GpVI'nın kollajene bağlanması ise trombosit degranülasyonunu uyarır.

2.1.2.2. Primer Hemostaz

Primer hemostazda, trombositler subendotelyal tabakaya (adezyon) ve birbirlerine (agregasyon) yapışarak yaralanma bölgesini kapatır. Trombosit adezyonu için vWF ve trombosit reseptör glikoproteinleri (GpIIb-IIIa, GpIb-IX) gereklidir. Trombosit granüllerinden adenosin difosfat (ADP), TXA₂, serotoninin sekrete edilmesiyle ilave trombositler de yaralanma bölgesine çekilir. Primer hemostaz sonucu oluşan ilk trombosit tıkaçı reversibl olup daha sonra fibrin ağ ile stabilize edilir ve irreversibl sekonder pıhtı oluşur.

Trombosit aktivasyonu trombositlerdeki morfolojik veya biyokimyasal reaksiyonları kapsar. Bu iki reaksiyon birbirinden bağımsız veya eş zamanlı oluşabilir (8).

Trombosit Adezyonu

Trombositlerin hasarlı vasküler yapılar gibi fizyolojik olmayan yüzeylerde normalde teması yoktur. Trombosit adezyonu, subendotelyal tabakadaki kollajen gibi moleküllerle temas sonucu oluşan karmaşık bir olaydır.

Subendotelyal tabakadaki adeziv proteinlere trombositlerin tutunması, trombosit yüzey reseptörleri aracılığı ile gerçekleşir. Trombositlerin düşük sürtünme kuvveti altında, subendotelyal dokudaki kollajene bağlanmaları GPIa-IIa reseptörleri ile, yüksek sürtünme kuvveti altında vWF'e bağlanmaları ise GPIb-IX-V aracılığı ile gerçekleşir. GpIIb-IIIa'nın aktivasyonu kollajen tarafından sağlanır. Kollajen ve trombinin bağlanması; trombotik

maddelerin salınımını, prostaglandin sentezini ve selektinlerin translokasyonunu uyarır. Trombosit GpIb glikoproteini, subendotelyal doku ve trombosit granüllerinde bolca bulunan vWF için ana reseptördür. vWF endotelyal kollajen ve trombosit yüzey reseptörleri GpIb arasında bir köprü görevi görür ve trombositlerin damar duvarına yapışmasını destekler. Trombositlerin kollajene sıkıca tutunmasını sağlayan vWF, bir tür moleküler tutkal işlevi görür.

Trombositleri aktif hale getiren diğer etkenler arasında trombin, ADP, TXA₂, serotonin, epinefrin ve aktif trombositler sayılabilir. Adezyonu takiben, trombositlerin alfa ve delta granüllerinden çeşitli moleküller sekrete edilir. Bunlardan biri de koagülasyonun birçok aşamasında etkili olan kalsiyum iyonudur. Kalsiyum, fosfolipitlere bağlanarak çeşitli pıhtılaşma faktörlerinin yapışması için gerekli yüzeyi sağlar.

Adezyon olayında plazma proteinleri, kan akımı ve sürtünme kuvvetleri de önemlidir. Ayrıca çeşitli dokularda farklı tipleri bulunan kollajen moleküllerinin adezyon uyarıcı etkileri de birbirinden farklıdır.

Trombosit Agregasyonu

Trombositlerin şekil değişiklikleri ile birbirlerine tutunmasıdır. Agregasyon trombosit yüzeyindeki GPIIb-IIIa reseptörü ile sağlanır. Aktifleşen trombositlerde sentezlenen TXA₂, daha fazla trombositin bölgeye gelip agregasyonu için uyarıcıdır. TXA₂, ADP ile birlikte, bu trombosit agregatını büyütür, vasküler yaralanmayı geçici olarak kapatan trombosit tıkaçının oluşumunu sağlar. ADP bağlanması ayrıca trombosit yüzeyinde bulunan GPIIb-IIIa reseptörlerinde fibrinojenin birikmesine neden olan konformasyonel bir değişikliğe neden olur. Trombin, trombosit tıkaçının stabilitesini sağlayan fibrinojenin fibrine dönüşümünü kataliz eder (7).

Trombosit aktivasyonu sırasında trombositlerin degranülasyonu ile adezyonu ve agregasyonu kolaylaştıran ADP, P-selektin, intersellüler adezyon molekülleri (ICAM- 1 / 2), TXA₂, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), serotonin ve koagülasyon faktörleri sekrete edilir. Düz kas hücreleri ve fibroblastlar, FVII'yi aktive eden doku faktörünü (TF) serbestleştirirler. PDGF ve TGF- β tamir mekanizmasında; ADP ve vWF tıkaç oluşumunda daha fazla trombosit aktive ederek pozitif feed-back etki gösterirler.

Prostasiklin antiagregan etki gösterir. TXA₂ ve prostasiklin arasındaki denge, pıhtılaşmanın uzamasını önler ve böylece damar lümeni açıklığı korunur.

2.1.3. Sekonder Hemostaz: Pıhtılaşma Faktörleri ve Koagülasyon Kaskadı

Primer hemostaz sonucu oluşan geçici, zayıf trombosit tıkaçı; sekonder hemostazla birlikte kalıcı, sağlam fibrin tıkaçına dönüşür. Koagülasyon işlemine karaciğerde sentezlenen 20 pıhtılaşma faktörü katılır. TF ve FVIII hariç prokoagülanların ve antikoagülanların çoğu karaciğerde sentezlenir.

Pıhtılaşma faktörlerinin çoğu, plazmada inaktif proenzim veya kofaktör şeklinde bulunur ve proteolitik işlem ile aktifleşerek zimojen olarak bilinen proteolitik enzimlere dönüşürler. Aminotransferaz aktivitesi gösteren FXIII dışında kalan diğer plazma pıhtılaşma faktörleri serin proteaz yapısındadır.

Pıhtılaşma faktörlerinin isimlendirilmesi oldukça karmaşıktır. Başlangıçta tanımlanan ilk dördü fibrinojen, protrombin, doku faktörü ve kalsiyumdur. Yakın zamanlarda ortaya konulan prekallikrein ve yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK) gibi pıhtılaşma faktörlerine Romen rakamları atanmamıştır. FVI mevcut değildir. FV ve FVIII pıhtılaşma aktiviteleri depolanan kanda dayanıklı olmadığından kararsız faktörler olarak bilinir.

2.1.3.1. Pıhtılaşma faktörleri

Üç grupta incelenir:

1. Fibrinojen veya trombin duyarlı protein ailesi: fibrinojen, FV, FVIII, FXIII
2. K vitamini bağımlı protrombin proteinleri: trombin, FVII, FIX, FX
3. Kontakt proteinleri: FXI, FXII, HMWK, prekallikrein

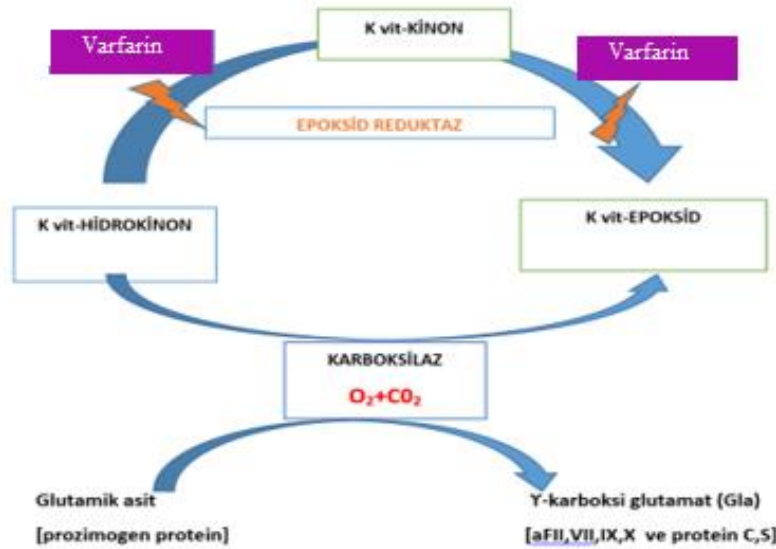
Kontakt faktörler; hasarlı yüzeyi, kollajen lifleri ve trombositlerden sekrete edilen fosfolipitleri bağlar. Davie, Ratnoff ve Macfarlane'nin 1964 yılında yayınladıkları kaskad teorisine göre bu 4 kontakt faktörün koagülasyonun aktivasyonunda rolleri vardır (2).

FV, FVIII, HMWK koagülasyon kaskadında aktif rol alan enzimlerin aktivitelerini hızlandıran kofaktörler olarak görev yapar. Her bir zimojenin aktivasyonu, molekülü tanımlayan Romen rakamına "a" harfi eklenerek isimlendirilir.

K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörleri, kalsiyum ve diğer iki değerlikli katyonları bağlamalarını ve pıhtılaşma kaskadına katılmalarını sağlayan posttranslasyonel modifikasyona uğrarlar (11). Protrombin, FVII, FIX, FX, protein C ve protein S biyosentezleri için K vitamini gereklidir. K vitamini, γ -karboksi glutamat (Gla)

oluşturmak üzere, bu proteinlerin yapılarındaki glutamik asit kalıntılarının karboksilasyonunu sağlayan karboksilaz enziminin kofaktörüdür. Eklenen karboksil grubu, kalsiyum aracılığı ile bu faktörlerin negatif yüklü fosfolipit tabakalara bağlanmasını sağlar.

K vitamini naftakinon türevidir ve 2. pozisyonunda bulunan metil grubu ve farklı uzunluktaki fitil (prenil) yan zincir, K vitaminin aktifleşmesi için gereklidir. K vitaminin diyetteki formu fitanodion (K1) ve bağırsakta bakteriyel aktivasyon ile oluşan menakinon (K2)'dur. K2 vitamini K1 vitamininin % 60 aktivitesine sahiptir. K vitamininin Gla oluşumunu sağlayan karboksilasyon reaksiyonunda, diyetten bulunan kinon formu aktif olmayıp; indirgenmiş formu olan hidrokinon formu aktiftir. Karboksilasyon reaksiyonu sırasında moleküler oksijen (O_2), hidrokinon formunda K vitamini ve glutamat anyonu Gla oluşumu için gereklidir. K vitamini eksikliği veya varfarin gibi K vitamini antagonistlerinin kullanılması halinde karaciğerden karboksillenmemiş proteinler sentezlenerek dolaşıma sekrete edilir. Bu proteinler, kalsiyum iyonunu bağlayamayacağından hücre membranlarındaki fosfolipit yüzeylere tutunamazlar. Dolayısıyla K vitamini eksikliği veya K vitamini antagonistlerinin uygulanması antikoagülasyona yol açar.



Şekil 2.1.3.A. γ -karboksi glutamat oluşumu.

Fibrinojen, karaciğer tarafından sentezlenen koagülasyonun esas substratıdır ve fibrinin öncüsüdür.

Protrombin karaciğer tarafından sentezlenip küçük proteinlere bölünen kararsız bir plazma proteindir. Protrombinden sentezlenen trombinin; monositler, lenfositler, endotel

ve dendritik hücreler üzerinde bulunan proteaz aktive edici reseptörlerin aktivasyonu ile ortaya çıkan proinflamatuvar etkileri vardır (11).

1830'lu yıllarda Andrew Buchanan kan içinde bulunan bir maddenin pıhtılaşmayı başlattığı kavramını ortaya atmıştır, sonradan bu maddenin doku faktörü olduğu anlaşılmıştır. Faktör 3 de denen doku faktörü (TF); *in vivo* pıhtılaşmayı başlatan, subendotelyal doku ve fibroblastlarda bulunan membrana bağlı bir prokoagülan glikoproteindir. Ağırlıklı olarak kan damarlarının tunika medya ve tunika adventisiasında lokalize olan doku faktörünün endotel bütünlüğünün bozulmasına kadar kanla teması yoktur (12). Doku faktörü, fibroblast yüzeylerinden ve uyarılan monosit, makrofaj, endotel hücrelerinden sürekli olarak eksprese edilir. Fiziksel yaralanma gibi doğrudan damar duvarındaki doku faktörünün aktivasyonu veya hipoksi, sepsis, malignite, inflamasyon gibi fonksiyonel hasar sonucu dolaşımdaki doku faktörünün aktivasyonu oluşabilir (13).

Kalsiyumun pıhtılaşmada önemli görevleri vardır. Endotel bütünlüğünün bozulması sonucu primer hemostazın başlangıcında, vazokonstriksiyon ve trombosit sekresyonu sırasında kontraksiyonda etkilidir. Kalsiyum, sekonder hemostazda intrinsek yolun ilk 2 basamağı hariç bütün reaksiyonların başlatılması ve hızlandırılmasında görev yapar. Ayrıca FX'un aktifleşmesi aşamasında enzimatik etki gösterir. Plazmadaki kalsiyum düzeyi hiçbir zaman pıhtılaşmayı inhibe edecek seviyeye düşmez. Pıhtılaşmadaki bu rolleri göz önüne alındığında oksalat, sitrat gibi moleküllerle kalsiyumun presipitasyonu *in vitro* şartlarda kalsiyumun inhibe olmasını sağlayarak pratikte plazma pıhtılaşmasının engellenmesinde kullanılır.

Faktör V diğer birçok pıhtılaşma faktörünün aksine enzimatik olarak aktif değildir ve kofaktör görevi görür. Eksikliği kanamaya yatkınlığa neden olurken, bazı mutasyonları ise (özellikle faktör V Leiden) tromboza yatkınlıkla sonuçlanır.

Faktör VII'nin esas rolü, TF ile birlikte pıhtılaşma sürecini başlatmaktır. Aktif FVII-TF kompleksi, FIX ve FX'un sırasıyla aktif proteazlarına dönüşümünü katalize eder.

Faktör IX intrinsik pıhtılaşma yoluna katılan tek zincirli bir plazma glikoproteinidir. Kalsiyum iyonları varlığında aktif FXI'in serin proteaz aktivitesi ile aktif FIX'a dönüştürülür. Aktif FIX ise kalsiyum, membran fosfolipitleri ve FVIII varlığında; FX yapısında bir arginin-izolösin bağımlı hidrolize ederek aktif FX'u oluşturur.

Faktör X, hem intrinsik yoldaki FIX hem de ekstrinsek yoldaki FVII ile aktive edilir, bu nedenle nihai ortak yolun ilk üyesidir.

Aktif Faktör XI, seçici olarak arginin-alanin ve arginin-valin peptit bağlarını kırarak FIX'u aktive eder.

Faktör XII, intrinsek yolun başlangıç noktasıdır. FXI ve prekallikreini *in vitro* aktive eder. FXII, cam gibi negatif yüklü yüzeyler tarafından aktive edilir ve laboratuvar çalışmalarında pıhtılaşma kaskadlarını başlatmak için kullanılabilir.

Faktör XIII bir heterotetramerdir: enzimatik aktif 2 A ve enzimatik olmayan 2 B peptitlerinden oluşur. Aktif FXIII, çeşitli glutamin ve fibrin gruplarının lizin aminoasitleri arasında izopeptit bağları oluşturarak pıhtı içindeki fibrinlerin çapraz bağlarla güçlenmesini sağlar. Bu bağlar pıhtıyı fiziksel olarak daha dayanıklı hale getirir ve erken fibrinolizin etkisinden korur. İnsanda, plazmin, antitrombin ve TFPI, aktif FXIII'ün proteolitik inhibitörleridir. α 2-makroglobulin ise, proteolitik olmayan önemli bir inhibitördür (14).

Tablo 2.1.3. Pıhtılaşma faktörleri fonksiyonları, yarılanma ömürleri ve plazma konsantrasyonları.

Pıhtılaşma Faktörü	Molekül İsmi	Fonksiyon	Koagülasyon yolu	Yarılanma Ömrü (sa)	Plazmadaki Konsantrasyonu (mg/L)
I	Fibrinojen	Trombin substratıdır. Fibrine polimerize olur. Pıhtıyı oluşturur.	Ortak yol	90	3000
II	Protrombin	Serin proteazdır. Fibrinojen, FV, FVII, FVIII, FXI, FXIII, protein C ve trombosit aktive eder.	Ortak yol	65	100
III	Doku Faktörü	Serin proteazdır. Aktif FVII'nin kofaktörüdür.	Ekstresek yol		
IV	Kalsiyum	Koagülasyon faktörlerinin fosfolipitlere bağlanmasını sağlar.			
V	Proakselerin, labil faktör	FX'un kofaktörüdür ve protrombinaz kompleksini oluşturur.	Ortak yol	15	10
VII	Prokonvertin, stabil faktör	Serin proteazdır. FIX ve FX'u aktive eder.	Ekstresek yol	5	0,5
VIII	Antihemofilik faktör-A	FIX'un kofaktörüdür ve tenaz kompleksini oluşturur.	İntrinsik yol	10	0,1
IX	Antihemofilik faktör-B, Christmas faktörü	Serin proteazdır. FX'u aktive eder, FVIII'le tenaz kompleksini oluşturur.	İntrinsik yol	25	5
X	Stuart-Prover faktörü	Protrombini aktive eder ve FV ile protrombinaz kompleksini oluşturur.	Ortak yol	40	10

XI	Plazma tromboplastin öncüsü	FIX'u aktive eder.	İntrinsik yol	45	5
XII	Hageman faktörü	Serin proteazdır. FXI, FVII ve prekalikrein'i aktive eder.	İntrinsik yol		
XIII	Fibrin stabilize edici faktör	Transglutaminazdır. Fibrin monomerlerini fibrin polimerlerine dönüştürür.	Ortak yol	200	30
XIV	Prekallikrein, Fletcher faktörü	Serin proteazdır. FXII ve prekalikrein'i aktive eder, HMWK'i böler.	İntrinsik yol	35	
XV	HMWK, Fitzgerald faktörü	FXII, FXI ve prekalikrein'in karşılıklı aktivasyonunu destekler.	İntrinsik yol	150	
XVI	vWF	FVIII'e ve subendoteldeki kollajene bağlanır, trombositlerin adezyonunu sağlar.		12	10 µg/mL
XVII	ATIII	Aktif protrombini, aktif FX'u ve bazı diğer proteazları inhibe eder.		72	0,15-0,2 µg/mL
XVIII	Heparin kofaktör II, minör antitrombin	Aktif protrombini inhibe eder, heparin ve dermatan sülfatın kofaktörüdür.		60	
XIX	Protein C	Aktif FV ve aktif FVIII'i inaktive eder.		0,4	
XX	Protein S	Aktif protein C'nin kofaktörüdür.			

2.1.3.2. Koagülasyon kaskadı

Koagülasyon, seri halde serin proteaz enzimleri ve bunların kofaktörlerinin trombosit membranı veya hasarlanmış endotel tabakası fosfolipit yüzeyleriyle etkileşimleri sonucu stabil fibrin pıhtının oluşumunu kapsayan bir dizi reaksiyondan oluşur. Koagülasyon sırasında birçok noktada hemostatik komponentlerle kompleksler oluşur. Komplekslerin oluşumunun amacı; pıhtılaşma faktörlerinin yaralanmanın olduğu bölgede konsantre olması, koagülasyonun hızlanması ve aktifleşen faktörlerin plazma inhibitörleri ile (protrombinaz kompleksi gibi) inaktivasyonunun geçici olarak önlenmesidir.

Koagülasyon kaskadı, intrinsik (yüzeyel temas yolu) ve ekstrinsik (doku faktör yolu) olmak üzere iki farklı yol izler. İntrinsik yolda; damar yaralanmasını takiben pıhtılaşma, FXII gibi kan damarları içinde bulunan moleküllerin temas halinde olmadığı kollajen lifler gibi yabancı bir yüzeyle temas etmesi sonucu aktive olur. Ekstrinsik yolda ise; pıhtılaşma, doku hasarını takiben damar dışında bulunan ve hücre yıkımı ile serbestleşen TF gibi moleküller aracılığı ile aktiflenir.

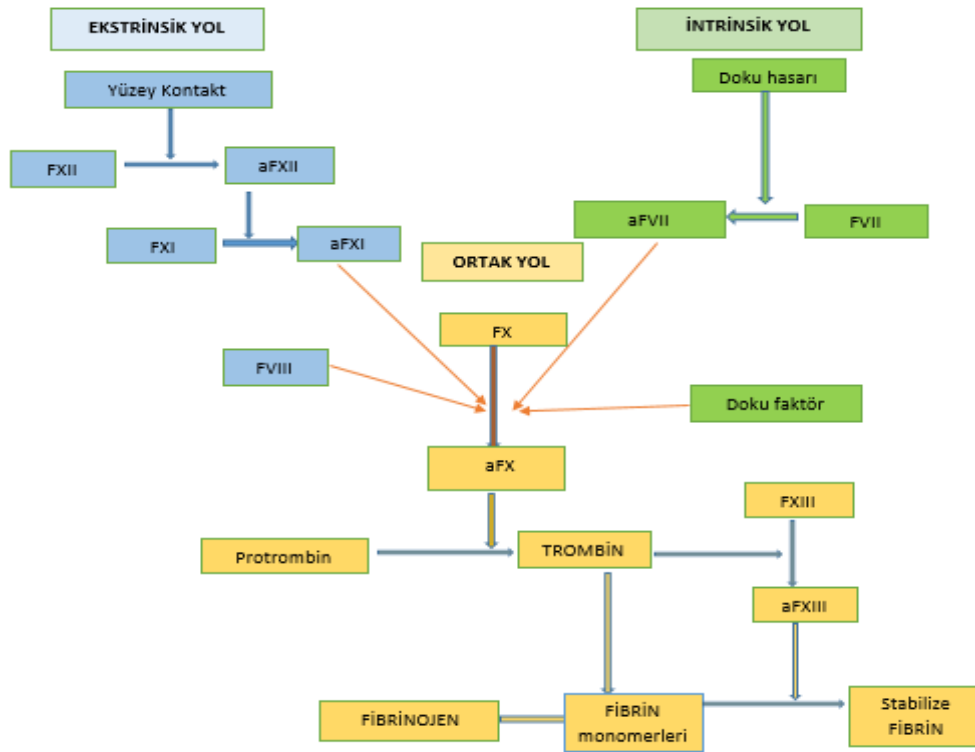
İn vivo koagülasyon, genellikle vasküler ve doku hasarına yol açan damar travması gibi her iki mekanizmayı kapsayan olaylar ile başlar. İn vitro koagülasyonda ise, iki sistem trombosit fosfolipit, doku tromboplastin gibi özgül aktivatörler ile ayrılabilir.

Klinik laboratuvarında uygulanan koagülasyon tarama testleri, patolojilerin ekstrinsik (protrombin zamanı - PT), intrinsik (aktive parsiyel tromboplastin zamanı - aPTT) veya ortak yol (trombin zamanı - TT) ile ilgili olup olmadığının ayırıcı tanısının yapılabilmesi açısından önemlidir.

Hemostatik cevap, subendotel tabakadaki perisit ve fibroblastların TF ile uyarılmasıyla başlar. Normal dolaşımda düşük konsantrasyonda bulunan aktif FVII, endotel hasarı sonucu TF'ünü bağlar; FIX ve FX'un aktifleşmelerini sağlar. Bu olaylar *“koagülasyonun başlangıç evresi”* olarak tanımlanır. TF-aktif FVII kompleksiyle yeterli aktif FIX oluşamamışsa, intrinsik yol kontakt faktörlerinden aktif FXI'e gereksinim olur. İntrinsik yolun bundan sonraki bölümü *in vitro* önemli olmakla birlikte, hemostatik olarak önemli değildir.

Başlangıç evresini takiben, *“koagülasyonun yayılma aşaması”* olarak tanımlanan evrede ise aktif FX; lokal trombosit agregasyonunu uyuracak yeterli trombin oluşumunu ve kritik kofaktörler FV ve FVIII'in aktivasyonunu sağlar. Ancak doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) ile TF-aktif FVII kompleksi hızla inaktive olabileceğinden, aktif FX'a bağlı hemostaz sürdürülemez ve aktif FX, aktif FVIII etkisiyle, protrombinaz kompleksini oluşturur (15, 16).

Ortamda aktif FX'un çok miktarda bulunması halinde, protrombinaz kompleksi (aktif FX-aktif FV) oluşur ve bu kompleks süratle protrombinin trombine dönüşümünü sağlar. Trombin, fibrinojenin arginin-glisin amino asitleri arasındaki bağları hidrolize ederek fibrinojenin fibrin monomerlere dönüşmesini ve diğer taraftan FXIII'ü aktive ederek fibrin monomerler arasında çapraz bağların oluşumunu sağlar. Trombin aynı zamanda pozitif feed-back mekanizmayla FIX'un ve kofaktörler FV ile FVIII'in aktivasyonlarına etki ederek hemostatik tıkaç oluşumuna katılır. Fibrin çapraz bantların oluşumu, hemostazın ikinci aşamasını oluşturur.



Şekil 2.1.3.B. Koagülasyon kaskadı.

Stabil fibrin oluşumu ‘‘koagülasyonun son aşaması’’ olup, bu evrede fibrinojenin fibrin monomerleri, fibrinopeptit A ve B olarak hidrolize olmasını sağlayan trombinin önemi büyüktür. Trombin aynı zamanda FXIII’ün aktifleşmesini, FV, FVIII ve FXI’in feed-back aktivasyonunu ve trombomoduline bağlanarak aktif FV ile aktif FVIII inaktivasyonu için gerekli protein C’nin aktivasyonunu sağlar.

Trombin-trombomodulin kompleksi, trombini aktive ettiği gibi; trombin ile aktive olan fibrinoliz inhibitörü (TAFI) ve trombositlerin aktivasyonunu, endotel hücrelerindeki maddelerin sentezlerinin ve sekresyonlarının stimülasyonunu ve sitokin salınımı ile monosit ve granülositlerin bağlanmasını gerçekleştirir.

TF uyarımıyla gerçekleşen prokoagülan cevabın iki inhibitörü vardır;

1. Doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI), TF-aktifFVII kompleksini inhibe eder. Ayrıca reversibl olarak trombin ve aktif FX’u da inhibe eder.
2. Antitrombin III (ATIII), önceden oluşan aktif FX ve trombinin nötralizasyonunda etkili bir düzenleyicidir. Öyle ki prokoagülan reaksiyonun sürmesi; TF düzeyinin, TFPI ve ATIII’ün inhibitör etkilerini aşacak kadar yüksek olması halinde gerçekleşir. Günümüzde trombin ve aktif FX’u inhibe eden yeni antikoagülanların kullanımı (YOAK), güvenilir şekilde klinik uygulamadaki yerlerini almıştır.

Pıhtı stabilitesini etkileyen diğer faktörler; lokal kalsiyum düzeyi, pH, trombosit sayısıdır. Fibrin stabilitesi aynı zamanda fibrin çapı ve fibrin ağının yapısından da etkilenir.

2.1.4. Antikoagülan Sistem

Doğal antikoagülanlar, koagülasyon yolunda etkili serin proteazların inhibisyonundan sorumlu serpinlerden olan antitrombinler ve koagülasyon kofaktörlerini nötralize eden protein C'den oluşur. Yaralanma bölgesinde oluşan pıhtının kontrolü, prokoagülan ve antikoagülan mekanizmalar arasındaki hassas dengeye bağlıdır. Anti-trombotik bir yüzey oluşturmak suretiyle koagülasyon kaskadının inhibisyonu ile gerçekleşen bu olay, endotel tarafından gerçekleştirilir. Endotel hücreleri trombin aktivasyonunu ve oluşumunu önleyerek bu dengeyi sağlar. Endotel hücrelerinden sekrete edilen heparan sülfat, ATIII'ün ekspresyonunu uyarır ve ATIII etkisiyle trombin, FVII, FIX, FX, FXI ve FXII gibi koagülasyon faktörlerinin nötralizasyonu sağlanır.

Serpinlerden yaklaşık 7 antikoagülan tanımlanmış olmakla birlikte, ATIII ile heparin kofaktör II etkisi ve aktivitesi açısından en iyi bilinen antikoagülandır:

Antitrombin (ATIII)

Trombin, aktif FX, aktif FXI, aktif FXII ve kallikreini inhibe eder. ATIII'ün bu etkisi heparinin etkisiyle potasyalize olur.

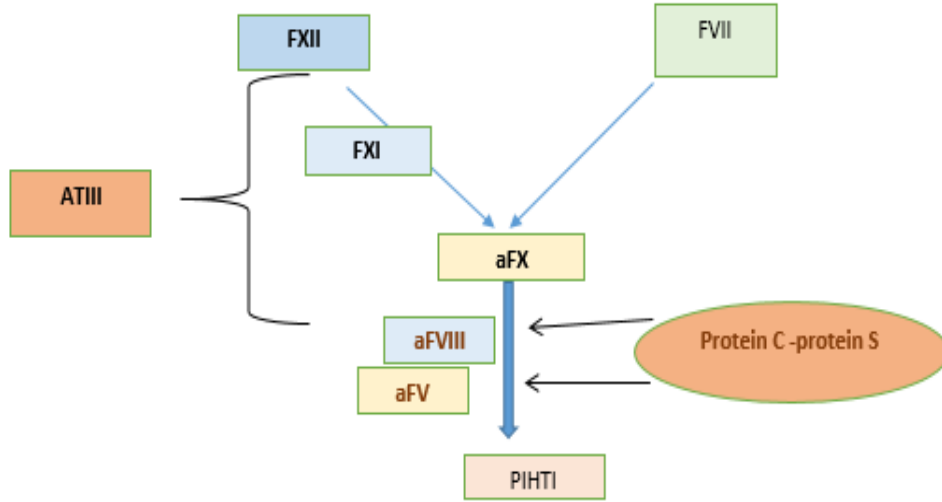
Protein C

K vitaminine bağlı karaciğer tarafından sentezlenen bir koagülasyon inhibitörüdür. Protein C, trombin ile aktifleşmesini takiben aktif FV ve aktif FVIII'i inhibe eder.

Protein S

K vitaminine bağımlı olarak karaciğerde ve aynı zamanda megakaryositlerde sentezi olan protein S, protein C'nin kofaktörü olarak fonksiyon gösterir. Aktif FV ve aktif FVIII'in inaktivasyonunu sağlar. Protein S'nin % 60'ı, plazmada akut faz reaktanı olan C4b-bağlayıcı proteinle birlikte bulunur ancak bu fraksiyonu fonksiyonel olarak aktif değildir.

Bu antikoagülanlar dışında, trombini inhibe eden heparin kofaktör II, aktif FX'u inhibe eden protein Z-bağımlı proteaz inhibitörü, aktive protein C inhibitörü, aktif FXI'i inhibe eden C1-inhibitör antikoagün etkileri olan diğer serpinlerdir. Ayrıca doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) ve α -2 makroglobulinin de, aktif FX ve trombini inhibe edici etkileri vardır.



Şekil 2.1.4. Doğal Antikoagülanlar.

2.1.5. Fibrinolitik Sistem

Fibrinoliz, sağlıklı damar dokusunda normal kan akışının sürmesi için, gereksiz fibrin ve trombüsün uzaklaştırılmasını sağlayan bir dizi enzimatik olaydan oluşur. Koagülasyon kaskadı sonucunda oluşan fibrin, aynı zamanda fibrinoliz için de substrattır.

Fibrinolitik sistemde, fibrinolitik faktörler ve fibrinoliz inhibitörleri görev alır. Fibrinolitik sistemin düzenlenmesinden, koagülasyon kaskadının kontrolünde olduğu gibi birçok kofaktör, reseptör ve inhibitör sorumludur. Ancak fibrinolitik sistemde esas olarak dolaşımda bulunan proenzim halindeki 3 serin proteaz etkindir.

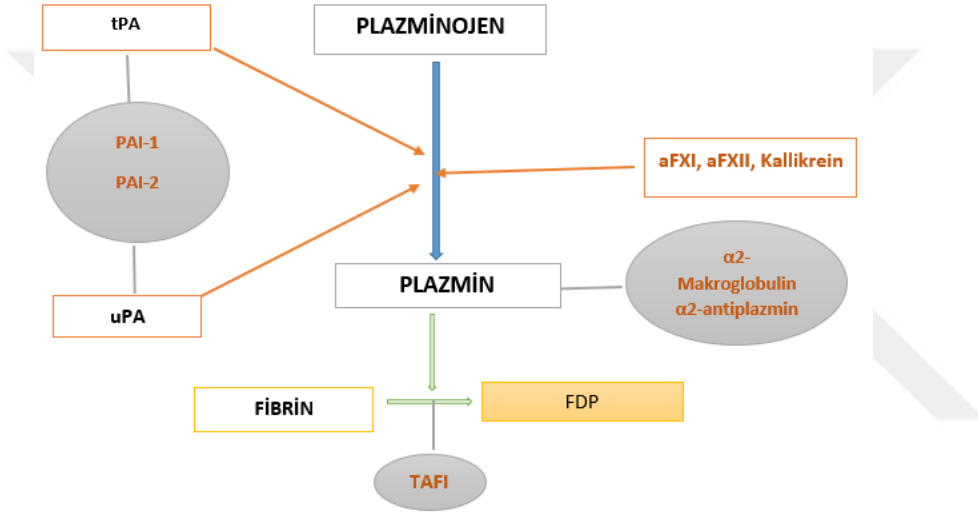
Plazmin, inaktif zimojen halindeki plazminojenin doku tipi plazminojen aktivatör (t-PA) veya ürokinaz tip plazminojen aktivatör (u-PA) ile aktifleşmesiyle oluşur. Plazminojen molekülü, yapısındaki bazı özel bölgeler (kringle) aracılığı ile fibrinojenin lizin ve arjinin rezidülerine bağlanır. Plazminojen, t-PA ve / veya u-PA aktivasyonu ile plazmine dönüştüğünde serin proteaz olarak etki göstermeyi sürdürür ve fibrin molekülünü C-terminalinden lizin ve arginin rezidülerini ayırarak solubl fibrine dönüştürür.

Fibrin yüzeyler, fibrinoliz için önemli aktivasyon bölgeleridir. Fibrinoliz, fibrin içeren trombüs üzerinde veya pro-fibrinolitik reseptörleri eksprese eden birçok hücrede gerçekleşebilir. t-PA ve plazminojen, fibrin pıhtı üzerinde biraraya gelerek birbirlerini bağlar ve böylelikle t-PA'nın plazminojeni aktivasyonu gerçekleşir. Buna karşılık u-PA, plazminojeni u-PA reseptörü bulunan çeşitli hücrelerde aktifleyebilir. u-PA'nın plazminojene afinitesi t-PA'ye göre daha düşüktür ve esas olarak ekstravasküler etkilidir.

Fibrinolizin Regülasyonu

Fibrinolizin regülasyonu için özel moleküller mevcuttur. Dolaşımdaki plazmin ve plazminojen aktiviteleri, serin proteaz inhibitörleri veya serpinlerle nötralize edilir. Fibrinolizin kontrolünden, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), plazminojen aktivatör inhibitör-2 (PAI-2) ve α 2-antiplazmin sorumludur.

α 2-antiplazmin, plazmini ve plazminojeni 1:1 oranında bağlayıp inaktive eder. Plazminin fibrine bağlanması, fibrini α 2-antiplazmin inhibisyonundan korur ve böylelikle fibrinoliz sürer. Fibrin ve fibrinogenin her ikisi de plazminojenin plazmine dönüşümünü artırır, yıkımlarını da kolaylaştırır.



Şekil 2.1.5. Plazminojen aktivatör ve inhibitörlerle fibrinolizin düzenlenmesi.

tPA: Doku plazminojen aktivatörü; uPA: Ürokinaz tip plazminojen aktivatörü.

PAI-1 ve PAI-2: Plazminojen aktivatör inhibitör 1-2;

TAFI: Trombin ile aktive fibrinoliz inhibitörü, FDP: Fibrin degradasyon ürünleri

2.2 . Faktör VIII ve von Willebrand Faktör

2.2.1. Faktör VIII Yapısı ve İşlevi

FVIII, normal kan pıhtılaşması için gerekli, enzimatik olmayan bir plazma glikoproteinidir. FVIII normal plazma düzeyi 50-100 U/dL'dir. İnsanlarda FVIII aktivitesinin eksikliği, Hemofili A adı verilen konjenital bir kanama bozukluğunun gelişimine sebep olur. Hemofili A'da FVIII düzeyleri normalin % 1'inin altına inebilir.

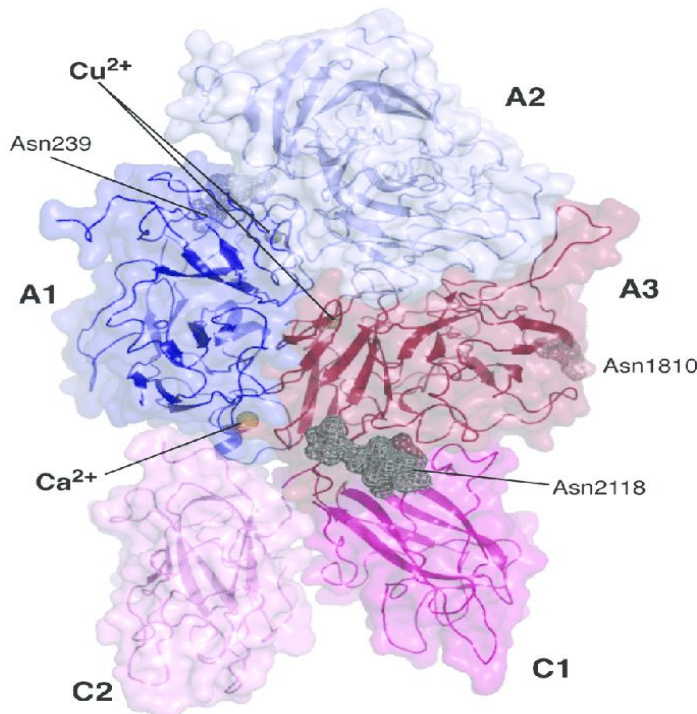
Faktör VIII geni (F8), ilk olarak 1984'te Genentech'teki bilim adamları tarafından tespit edilmiştir (17). F8, X kromozomunun uzun kolunda (Xq28) bulunur ve % 0,1'ini oluşturur. 25 kodlayıcı olmayan intron ile ayrılmış en az 26 ekzondan oluşur.

FVIII, özellikle karaciğer sinüzoidal hücrelerinde molekül ağırlığı yaklaşık 330 kDa olan büyük tek bir polipeptit zinciri olarak sentezlenir ve 280 kDa'luk iki zincir olarak salgılanır (18). A1-A2-B-A3-C1-C2 şeklinde altı domainden meydana gelir. Bir zincir A1 ve A2 alanlarına, diğeri B alanına A3 bölgesinin amino terminali ile bağlanan küçük asidik peptit bölgeleri içerir. FVIII'in aktif FVIII'e aktivasyonu, B domaininin ayrılması ile gerçekleşir. Aktif FVIII, A1-A2-B domainlerinden oluşan bir ağır zincire (200 kDa) ve A3-C1-C2 domainlerinden oluşan bir hafif zincire (80 kDa) hidrolize olur. Her iki zincir kalsiyum bağımlı bir şekilde kovalent olmayan bir kompleks oluşturur. Aktif FVIII molekülündeki ağır ve hafif zincir arasındaki metal iyon köprüsünün A1 ve A3 alanları arasında olduğu, A2 alanının elektrostatik etkileşimler yoluyla heterodimerik yapıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir (18). C alanları ise, negatif yüklü fosfolipitleri bağlayan proteinlerle homoloji gösterir; bu alan, prokoagülan fosfolipitlerle etkileşim için önemlidir.

FVIII'in genel yapısı, FV ile yüksek bir homolojiye sahiptir; ancak amino asit sekansının benzerliği, iki proteinin B alanları için sınırlıdır ve B alanlarının asparajin bağlantılı karbonhidratlar yoluyla glikozile olma özelliği iki protein için de ortaktır. FVIII yapısındaki A alanlarının her biri, bakır bağlayıcı protein seruloplazmin ile yaklaşık % 30 sekans homojisi gösterir (18). A alanlarının seruloplazmin ile homoloji göstermesi, FVIII'in bakır içerebileceğini düşündürmüştü ve yapılan çalışmalar FV ile FVIII'in protein molü başına 1 mol bakır içerdiğini göstermiştir. Bakır (I) iyonunun, ağır ve hafif zincirlerin uygun şekilde biraraya gelerek FVIII aktivitesinin restorasyonu için önemli olduğu bildirilmiştir. A1 alanına bağlı olsa da bakır iyonu koordinasyon ve değerliliği tartışmalıdır. Bakır iyonunun aktif FVIII'in kofaktör aktivitesini arttırdığını gösteren

veriler de vardır (18).

FVIII, vWF ile nonkovalent kompleks yapmış olarak dolaşımda bulunur. Yarılanma ömrü 8 saattir. FVIII, trombin ile aktivasyonunu takiben vWF'den ayrılır. Kalsiyum ve fosfolipitlerin varlığında, FX'un aktifleşmesini 10^5 kat hızlandırır. vWF tarafından korunmayan aktif FVIII ise, proteolitik olarak A1 ve A2 alanlarının ayrılmasıyla inaktive edilir. FVIII'in endoplazmatik retikuluma translokasyonu ile amino-terminal sinyal peptidi ortaya çıkar ve daha sonra FVIII molekülünün sekresyonuyla B alanından ayrılır. Bu durum, bir metal iyonuna bağlı ağır ve hafif zincirden oluşan heterodimerin sekresyonuyla sonuçlanır. vWF süreçte etkilidir.



Şekil 2.2.1. B alanı silinmiş Faktör VIII'in üç boyutlu yapısı.
(Kaynak: Ngo ve ark.,
doi.org/10.1016/j.str.2008.03.001)

2.2.2. von Willebrand Faktör (vWF) Yapısı ve İşlevi

vWF, 1926'da kesin nedenini tanımlayamamasına rağmen, von Willebrand Hastalığı (vWH)'nin hemofili ve diğer kanama diyatezlerinden farklı kalıtsal bir kanama bozukluğu olduğunu belirten Finli hekim Erik Adolf von Willebrand'ın adıyla literatüre girmiştir (19).

vWF, endotel hücrelerinde ve megakaryositlerde sentezlenen, molekül kütlesi yaklaşık 270 kDa olan A-B-C-D domainlerinin çoklu kopyasından oluşan bir glikoproteindir. vWF geni 12. kromozomun kısa kolunun ucunda yer alır ve yaklaşık 180 kb'lık bir alanı kapsar, 52 ekzon içerir (20). 350 kDa'luk bir polipeptit, 2050 amino asit

kalıntısı uzunluğunda olgun vWF polipeptidi, 22 amino asit uzunluğunda sinyal peptidi ve 741 amino asit kalıntısı uzunluğunda propeptidi içerir. Bu pro-vWF, disülfid oluşumuyla endoplazmik retikulumda hızla dimerleşir.

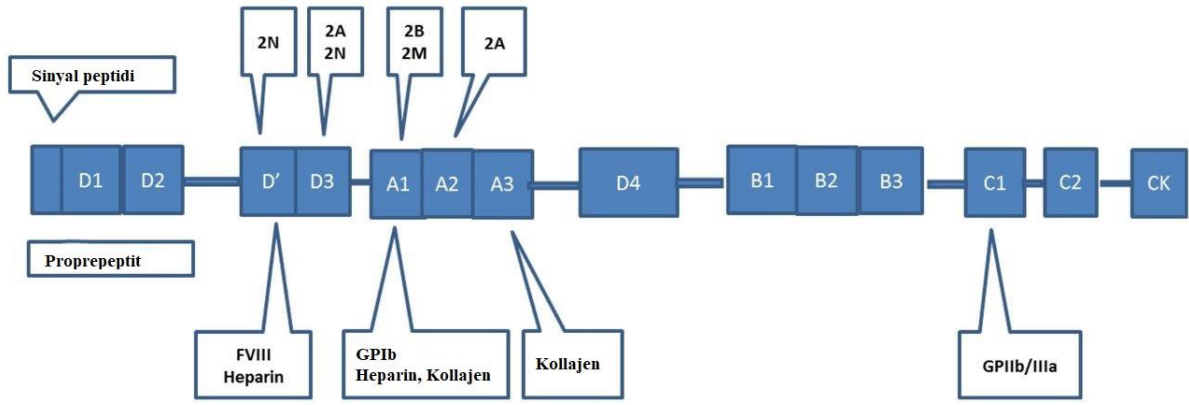
vWF'ün biyosentezinde monomerler; N-glikozillenir, sistein kalıntıları disülfür bağlarıyla çapraz bağlanır, endoplazmik retikulumdaki dimerlere ve golgi cisimciğindeki multimerlere yerleştirilir (20). Sentez ayrıca sialilasyon, sülfatlanma gibi posttranslasyonel modifikasyonları da içerir (20). Daha sonra golgi cisimciğinden çıkan vWF'ler, depolama organellerine, endotel hücrelerindeki Weibel-Palade cisimlerine (WPB) ve trombositlerdeki α -granüllere paketlenir (21).

Öncü polipeptit, endoplazmik retikulumda ve endotel hücrelerinin golgi aygıtında işlendikten sonra multimerizasyona uğrar ve biri olgun protein, diğeri ise 97 kDa'luk bir propeptit olarak iki bileşene bölünür (22). Bu olgun protein, vWF'ün işlevselliğinden sorumludur. Serbest pro-polipeptit, fonksiyonu bilinmeyen bir plazma glikoproteini olan von Willebrand antijen II olarak tanımlanır (23). Sonuç olarak dolaşımdaki plazma vWF molekülü, disülfid bağlarıyla birbirine bağlanmış büyüklükleri 500 ila 20000 kDa arasında değişen heterojen bir dizi multimerden oluşur.

Vasküler endotelial hücrelerden ve aktive trombositlerden dolaşıma sekrete edildiğinde multimerler, sirkülasyonda bulunan şeklinden çok daha geniş bir yapıya sahiptir ve protrombotik etkilidir. Daha sonra multimerler, “*disintegrin ve trombospondin metalloproteaz tip-1*” aktivitesi olan ADAMTS13 sirkülatuar proteazları sayesinde normal multimerler haline getirilir. Multimerik büyüklük vWF proteinin fonksiyonunda önemlidir ve en büyük olan multimerlerin hemostatik olarak en etkili olduğu bilinmektedir.

vWF'ün koagülasyonun iki farklı yolunda etkili olarak hemostaza katılır. vWF, trombosit yüzey reseptörleri GpIb α ile vWF'ün A1 domain arasında adeziv bir köprü oluşturarak primer hemostaz aşamasında etkili olur. İkinci önemli fonksiyonu ise FVIII'in dolaşımda taşınması ve stabilizasyonunun sağlanmasıdır. vWF, FVIII'in pıhtı oluşum bölgesine taşınmasını sağlar. Özellikle FVIII'in aktifleşmesi ile aktif FVIII ile vWF ayrılır ve aktif FVIII, pıhtı oluşumundaki yoluna devam eder. vWF düzeyinin çok düşük olması halinde, FVIII'in yarı ömrü kısalmış ve plazma FVIII konsantrasyonu düşer. Bu nedenle vWF'ün tam eksikliğiyle seyreden tip 3 vWH olgularında FVIII aktivitesi < 10 IU/dL gibi oldukça düşük düzeylerde olur.

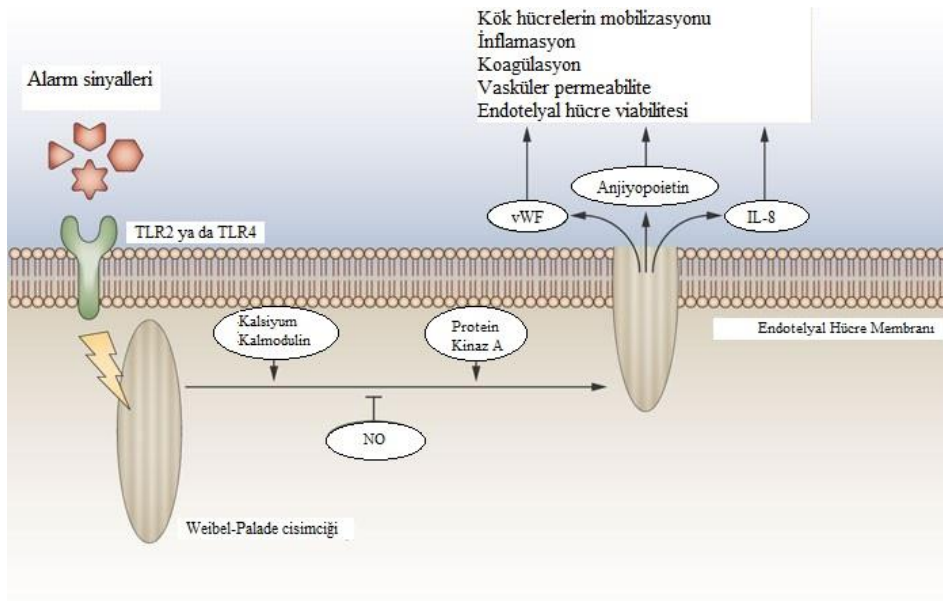
vWF'ün sekresyonu; biri sürekli ve herhangi bir hücresel uyarı olmaksızın meydana gelen, diğeri depolama granülleri tarafından düzenlenen (24), üçüncüsü de bazal sekresyon olarak bilinen 3 farklı yoldan meydana gelir (25).



Şekil 2.2.2.A. von Willebrand Faktör yapısı.

vWF yapısında bulunan her monomer farklı işlevleri olan özgül alanlar içerir (26):

- A1 domaini: trombosit GPIb reseptörüne, heparine ve kollajene bağlanır.
- A2 domaini: vWF'ü inaktive eden özgül ADAMTS13 proteazı için yarıılma bölgesi. ADAMTS13 proteazının aktive olması için bu bölgenin kısmi olarak açılması gerekir.
- A3 domaini: Kollajene bağlanır.
- D'D3 domaini: FVIII'e bağlanan bölge.
- C4 domaini: Arginin-Glisin-Aspartat'tan oluşan RGD motifinin trombosit integrin α IIb β 3'e bağlandığı alan.
- ER dimerlerinde etkileşime girebilen diğer C alanları.
- Sistin düğümü: PDGF, TGF- β ve β -HCG ile ortak alan.



Şekil 2.2.2.B. Weibel-Palade cisimlerinin strese duyarlı nöbetçiler ve inflamasyon araçları olarak varsayımsal rolü. (*Kaynak*:http://www.nature.com/nrneph/journal/v5/n7/fig_tab/nrneph.2009.87_F3.html)

2.3 . Hemofili A

2.3.1. Hemofili A Hastalığı

Hemofili A, X'e bağılı resesif geçiş gösteren, F8 genindeki mutasyonların neden olduğu hereditör bir kanama bozukluğudur. Hemofili A prevalansı 1/5000 – 1/ 10000 erkek doğum olacak şekilde bildirilmektedir (27, 28). Hemofili A'lı hastaların çoğunda FVIII'in yetersiz sentezi söz konusu olmakla birlikte, olguların % 5-10'nunda da disfonksiyonel FVIII proteini söz konusudur. Olguların birçoğu hereditör olmasına rağmen, nadiren ileri yaşlarda FVIII'e karşı otoantikorların gelişimi ile edinsel hemofili ortaya çıkar.

Hemofili A olguları plazma FVIII aktivitelerine göre; FVIII aktivitesi % 5-40 olan hafif Hemofili olguları, % 1-5 olan orta dereceli Hemofili olguları ve % 1 altında olan ağır Hemofili olguları olarak sınıflandırılır (27). Kanama fenotipi genellikle FVIII eksikliğinin ciddiyeti ile ilişkilidir.

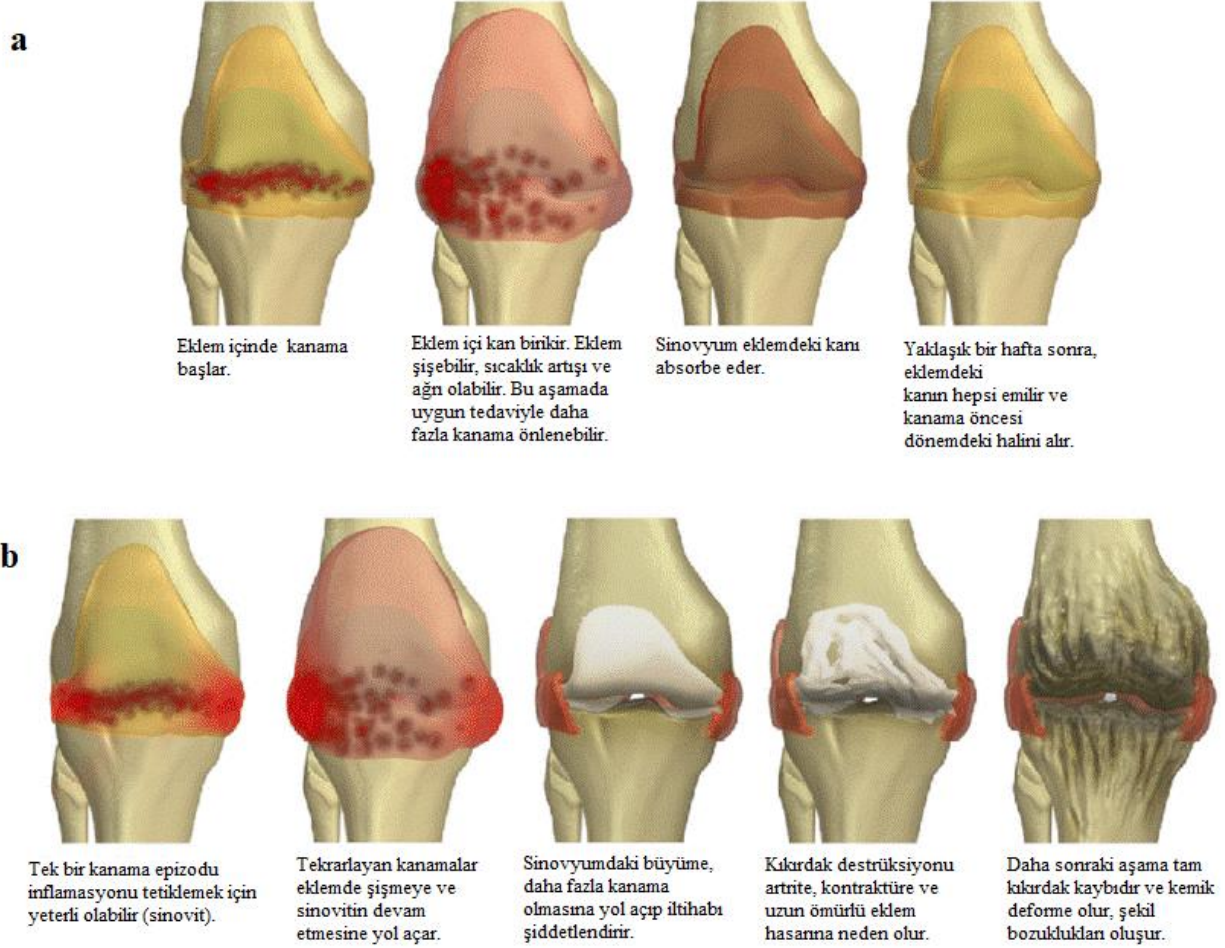
Hemofili A'ya sebep olan 100'den fazla mutasyon gösterilmiştir. Ancak en yaygın olanı, ağır Hemofili A olgularının da % 45-50'sinde bulunan 1-22 intronlarının büyük bir inversiyonu ve translokasyonudur. F8 genini büyük oranda etkileyen 1-22 inversiyonları, büyük delesyonları, anlamsız mutasyonları olan hastalar; nokta mutasyonları, küçük delesyonları veya insersiyonları olan hastalardan daha duyarlıdırlar ve kanama diyatezleri daha şiddetlidir (28). Aile hikayesi olmayan yaklaşık % 30 olguda ise Hemofili A'nın yeni mutasyonlara bağılı ortaya çıktığı gösterilmiştir.

2.3.2. Hemofili A'da Klinik

Hemofili A'da FVIII düzeyine bağılı olarak uzun veya daha kısa süreli, internal veya eksternal kanamalar görülebilir. Hafif olgularda ciddi travmalar dışında az veya hiç kanama epizodu görülmezken, ciddi olgularda spontan kanamalar görülebilir. Hemofili A'nın en özgün klinik belirtileri özellikle dizlerde, dirseklerde, ayak bileklerinde görülen hemartroz ve hematomlardır.

Akut hemartrozlar genellikle hafif rahatsızlık ve hafif eklem hareket kısıtlılığı ile başlar; bunu ağrı, eklem şişmesi ve sıcaklık artışı izler. Tedavi edilmezse eklem kanaması genellikle ciddi hareket kısıtlılığı ile sonuçlanır. Patolojik süreçler kanama durduktan sonra da devam eder, çünkü inflamasyon kanla dolu eklemlerde hasara yol açarak sinovite neden

olur, bu da aynı eklemlerde tekrarlayan hemartroz sıklığını artırır. Hemofilik artropatiye neden olan bu kısır döngünün son adımı ise kıkırdak kaybı sonucu eklem aralığının daralması, kemik kistlerinin gelişmesi ve kalıcı sakatlık ile sonuçlanan hareket kısıtlılığıdır.



Şekil 2.3.2. Hemofili A’da hemartroz süreci. **a.** Tek bir kanama epizodu

b. Tekrarlayan kanamalarla oluşan inflamasyon sonucu kalıcı deformiteler

Hemofili hastalarında tüm kanamaların % 10-25’ini kas içi hematomlar oluşturur ve hayati yapıları sıkıştırarak ciddi sorunlara neden olabilir. Hematomların yetersiz tedavisi ağrıya, anemiye, sinir hasarı ile birlikte Kompartman Sendromu’na, hareket açıklığında azalmaya, fonksiyon kaybına, zayıflamaya ve psödötümör oluşumuna neden olabilir. İliopsoas kasına kanama kalça ekleminin fleksiyonunu kısıtlayarak hemofiliğin tipik bir klinik belirtisi olan yürüme bozukluğuna neden olabilir ve bu olguların agresif bir şekilde tedavi edilmesi gereklidir.

Kas-iskelet sistemi kanamasından daha nadir olmakla birlikte gastrointestinal sistem, idrar yolu ve kafa içi kanamaları da meydana gelebilir. Serebral kanama hemofilik

hastalarda yaşamı tehdit eden en tehlikeli hemorajik olaydır ve acil tedaviyi gerektirir. Açıklanamayan ve inatçı baş ağrıları olan hemofilik hastaların ayırıcı tanısında; subdural kanama, epidural kanama ve beyin parankimi kanaması mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. İntrakraniyal kanama spontan olarak her yaşta ortaya çıkabilir, ancak özellikle yenidoğan ve yaşlı hastalarda daha sık rastlanır.

Tablo 2.3.2. Hemofilide görülen kanama bulguları ve kronik komplikasyonlar.

KANAMA BULGULARI		
Kanama yeri-sıklık	Yaşamı tehdit eden kanamalar-sıklık	
• Hemartroz - % 70-80 • Eklemlerdeki kanama sıklığı - Diz - % 45 - Dirsek - % 30 - Ayak bileği - % 15 - Omuz - % 3 - El bileği - % 3 - Kalça - % 2 - diğer - % 2 • Kas / yumuşak doku - % 10-20 • Ağız / dişeti / burun / genitoüriner sistem • diğer kanamalar - % 5-10	• Merkezi sinir sistemi < % 5 • Sindirim sistemi • Boyun / boğaz • Ciddi travma (Üçüncü boşluk kanamaları)	
KRONİK KOMPLİKASYONLAR		
Kas-iskelet	İnhibitör gelişimi	Transfüzyonla ilişkili enfeksiyöz hastalıklar
• Kronik hemofilik artropati • Kalıcı sakatlıklar, kontraktür • Psödotümör • Kırıklar	Alloantikor özelliğinde zamana ve sıcaklığa duyarlı inhibitör, Tip 1 inhibisyon kinetiği gösterir.	• HIV • Hepatit B virüsü • Hepatit C virüsü • Hepatit A virüsü • Parvovirüs B19

(Kaynak: Türk Hematoloji Derneği Hemofili Tanı ve Tedavi Kılavuzu-2021)

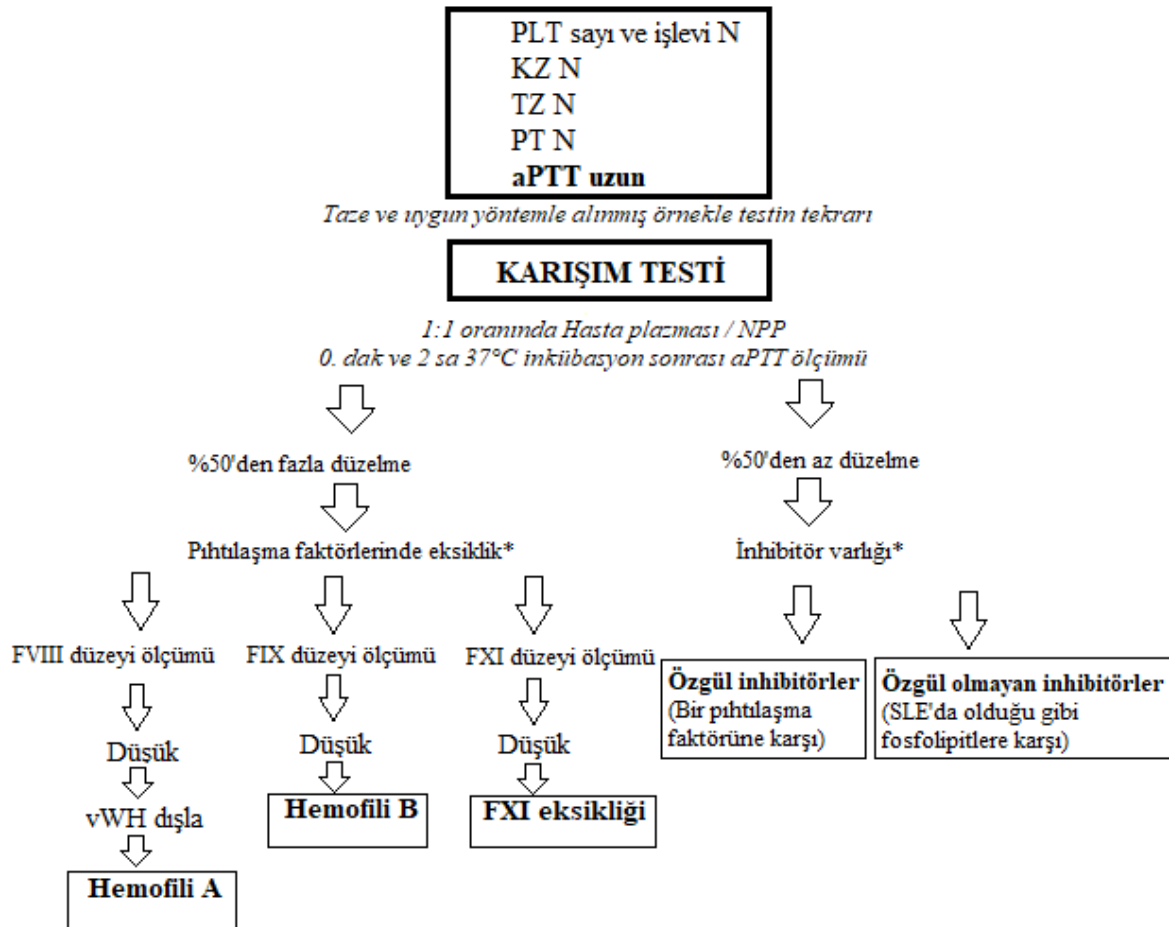
2.3.3. Hemofili A’da Klinik Şüphe ve Tanı

Hereditör Hemofili A’da hastalık taşıyıcı annelerden erkek çocuklara geçebilir. Hemofili A taşıyıcısı olan kadınlarda FVIII düzeyi normalin % 50’sidir ve vWF düzeyleri ise normal referans aralığındadır; klinik bulgu beklenmez.

Hemofili A hastalığında aile öyküsü önemlidir. Ancak olguların yaklaşık 1/3’ünde hastalık spontan *de novo* mutasyonlarla ortaya çıkabilir. Erken çocukluk döneminde kolay ekimoz oluşumu, özellikle eklem içi ve kas içi spontan kanamaların varlığı ve cerrahi girişim, travma sonrası beklenenden uzun süren kanama öyküsünün varlığı Hemofili A’yı akla getirmelidir. Doğumda kullanılan vakum uygulaması sonucu kafa içi, subdural veya

periostal kanamalar görülebilir. Özellikle orta ve ağır Hemofili A tanılı çocuklarda emekleme ve yürümeye başlama dönemlerinde hemartrozlar, hematomlar, travmatik ağız içi kanamaları oluşmaya başlamaktadır. Bir kısım hasta ise sünnet sonrasındaki kanama diyatezi nedeniyle tanı almaktadır.

Klinik olarak şüphelenilen vakalarda Hemofili A tanısı laboratuvar testleriyle konur. Hemofili A olgularında, ilk aşama koagülasyon testlerinden protrombin zamanı (PT) ve kanama zamanı (KZ) normal, aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) ise uzamıştır. Normal plazma ile yapılan 1/1 oranındaki karışım testi ile aPTT süresinin % 50'den fazla normale yaklaşması faktör eksikliğini göstererek tanıyı doğrulamamızı sağlar. aPTT'deki uzama ve bu uzamanın faktör eksikliği olduğu görüldükten sonra kesin tanıya yönelik olarak öncelikle FVIII olmak üzere FIX, FXI veya FXII düzeyleri ölçülmelidir. Hemofili A kesin tanısı, plazmada düşük FVIII düzeyinin gösterilmesi ile konur. FVIII düzeyi düşük olan hastalarda vWH mutlaka dışlanmalıdır. Ancak FVIII aktivitesi > %30 olanlarda genellikle aPTT'nin normal aralıkta olduğu da unutulmamalıdır.



Şekil 2.3.3. Hemofili A tanısında laboratuvar testleri algoritması.

(Kaynak: Türk Hematoloji Derneği Hemofili Tanı ve Tedavi Kılavuzu-2021)

2.3.4.Hemofili A Tedavisi

Hemofili A tedavisinde eksik olan FVIII'in replasmanı esastır. Tedavinin modern yönetimi 1970'lerde plazma kaynaklı FVIII (pd-FVIII) konsantrelerinin endüstriyel gelişimi ile başlamıştır. Ancak gelişen yaşam kalitesi ve artan yaşam süresi beklentisi sağlayan tedavideki bu başarı, birçok hastanın insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ve hepatit virüsleri tarafından kan yoluyla bulaşan enfeksiyonlardan öldüğü 1980'lerde önemli ölçüde kesintiye uğramıştır: Binlerce donörden toplanan insan plazmasından üretilen faktör konsantreleri kan yoluyla bulaşan bu enfeksiyonların artması nedeniyle güvenli bir tedaviye duyulan ihtiyacı önemli hale getirmiştir (29).

Kan bağışlarında virüs taraması, saflaştırma ve viral inaktivasyon gibi yeni yöntemlerin geliştirilmesi plazma kaynaklı ürünlerin güvenliğini büyük ölçüde arttırmış olsa da (29); Hemofili A tedavisindeki en önemli gelişme, F8 geninin 1984 yılında klonlanmasının ardından, rekombinant FVIII (rFVIII) ürününün endüstriyel üretimine izin veren DNA teknolojisindeki hızlı ilerleme ile gerçekleşmiştir (15). 1989 yılında White ve ark., ağır Hemofili hastalığı olan iki hastada bu ürünün klinik etkinliği üzerine makale yayınlamışlardır (30).

Üç farklı nesil rFVIII ürünü ticari olarak mevcuttur: birinci nesil ürünler, üretim aşamasında ve son üründe hayvan ya da insan plazma proteini içerirken; ikinci nesil ürünler, üretim aşamasında hayvan ya da insan plazma proteini içerip son üründe içermez ve üçüncü nesil ürünlerse hayvan ya da insan plazma proteini içermez. İkinci ve üçüncü nesil rFVIII ürünleri, tam uzunlukta olabilir veya pıhtılaştırıcı aktivite için kullanılıp atılan B-domaininden yoksun olabilir (31).

Hemofili A'da profilaksi tedavisinin önemi büyüktür. Profilaksi eklem kanamaları başta olmak üzere eklem hasarını önleme, hastaların fiziksel ve sosyal olarak aktif bir hayat sürmelerini ve yaşam kalitesini yükseltmeyi hedefleyen, hemostazı sağlayan ürünlerin sürekli ve düzenli olarak kullanılmasıdır. Dünya Hemofili Federasyonu; ağır Hemofili A olgularında eklem hasarı gelişmeden ve ideal olarak 3 yaşından önce profilaksi başlanmasını önermektedir (32).

Hemofili A'nın profilaktik tedavisinde doz sıklığının azaltılması, hasta uyumunun artması ve yaşam kalitesinin düzelmesini sağlamak amacıyla standart yarı ömürlü (SYÖ) FVIII preparatlarının yanı sıra son dönemde uzatılmış yarı ömürlü (UYÖ) FVIII preparatları (Efraloctocog alfa, Octocog alfa pegol, Turoctocog alfa pegol, Damoctocog alfa pegol) kullanıma girmiştir (33).

Tablo 2.3.4. Hemofili A hastalığında uygulanan tedavi modeline göre profilaksi tanımları.

Tedavi Modeli	Tanım
Primer profilaksi	İkinci büyük eklem kanamasından ve 3 yaşından önce, fizik muayene ve / veya görüntüleme yöntemleri ile eklem hasarının oluşumuna ait bulgular ortaya çıkmadan önce başlanan sürekli ve düzenli* tedavi
Sekonder profilaksi	İki ya da daha fazla sayıda eklem kanamasından sonra, ancak fizik muayene ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile “eklem hasarının” oluşmasından önce başlanan sürekli ve düzenli* tedavi
Tersiyer profilaksi	Fizik muayene ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile etkilenen eklemlerde eklem hasarının başladığının gösterilmesinden sonra uygulanan sürekli ve düzenli* tedavi (Genellikle erişkin hemofililerde başlanan profilaksi bu tiptir)
İntermitan (Aralıklı) profilaksi	Kanamaların önlenmesi amacıyla bir yıllık sürede toplam 45 haftayı aşmayan kısa süreli tedavi uygulanması
<i>*Bir yıllık sürede (52 hafta) en az 45 hafta boyunca düzenli tedavi uygulanması</i>	

(Kaynak: WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition, 2020 (32))

Yüksek düzeyde inhibitör gelişen Hemofili A hastalarının kanama ve profilaksi FVIII preparatlarına alternatif olarak by-pass edici ilaçlar kullanılmaktadır. FEIBA (Faktor 8 inhibitör etkisini ortadan kaldırıcı aktivite) olarak da bilinen aPCC (Aktive Protrombin Kompleks Konsantreleri) kompleksi ve aktif rekombinant FVII, FVIII'e ihtiyaç duyulmadan hemostazı sağlayan by-pass edici ajanlar olarak kullanılan tedavi seçeneğidir (34). Faktör preparatlarına ulaşılamadığı ve acil gereksinimin olduğu durumlarda kriyopresipitat, taze donmuş plazma (TDP) da tedavide kullanılmaktadır.

Özellikle Hafif seyirli Hemofili A tedavisinde FVIII preparatlarına alternatif olarak, sentetik vazopressin analogu 1-deamino-8-D-arjinin vazopressin (DDAVP) kullanılabilir. DDAVP uygulanmasının FVIII ve vWF düzeylerini geçici olarak iki ila dört kat arttırdığı gösterilmiştir (35). Ancak DDAVP kullanımı hiponatremi, ödem, yüzde kızarma vb. gibi yan etkilerinin çok olması nedeniyle sınırlıdır (36).

Bu tedavi opsiyonlarının yanı sıra, antifibrinolitik mekanizmayla plazminojen aktivasyonunu yarışmalı olarak inhibe edip fibrin stabilitesini sağlayan traneksamik asit; FVIII'in kofaktör fonksiyonunu taklit ederek FX aktivasyonu ve tenaz oluşumunu sağlayan FVIII mimetik ilaç emicizumab (37); Hemofili'de prokoagulan bir faktör

eksikliği nedeniyle antikoagülan yöne kayan hemostazı dengelemek için doğal antikoagülanların inhibisyonunu sağlayan fitusuran ve doku faktörü yolağı inhibitörü (TFPI) antikorları (Concizumab) son yıllarda tedavide denenilen diğer ajanlardır (38,39). Ayrıca genetik alanındaki gelişmeler, Hemofili A'da gen terapisinin umut verici olduğunu ortaya koymaktadır (40).

2.3.5. Hemofili A Tedavisinin Komplikasyonları: İnhibitör Antikor Gelişimi

Tedavideki yeni gelişmeler Hemofili A'nın kas-iskelet sistemi ve transfüzyon enfeksiyonlarıyla ilgili komplikasyonlarını son yıllarda büyük oranda azaltmıştır. Ancak diğer bir kronik komplikasyon olan inhibitör gelişimi önemini korumaktadır. Faktörlerin prokoagülan işlevini nötralize eden antikorlar, inhibitör olarak bilinir. Hemofili A hastalarının farklı kaynaklara göre % 30-40'ı kadarında inhibitör geliştiği bildirilmiştir. İnhibitör gelişme insidansı moleküler kusurun ciddiyetini yansıtır ve FVIII inhibitörleri, ağır Hemofili A hastalarının % 20-35'inde ve hafif / orta dereceli hastaların % 3-13'ünde geliştiği raporlanmıştır (41).

İnhibitörler, replasman tedavisini etkisiz hale getirir, hastanın güvenli ve etkili bir tedaviye erişimini sınırlar, yaşam kalitesini azaltır, artan morbidite ve mortalite riskine neden olur. Tedavi maliyetlerini de önemli ölçüde artırır. Bu nedenle uzun yıllardır Hemofili A'da inhibitör gelişimi konusunda araştırmalar yoğun bir şekilde sürmektedir. Son yirmi yılda inhibitör gelişimine yol açan patofizyolojik mekanizmaların anlaşılması konusunda önemli yol katedilmiştir. Ancak bu oldukça karmaşık bir süreç olup; immün sistem hücreleri, sitokinleri ve diğer immün sistem komponentlerinin etkileşimlerini içerir.

Alloantikorlar FVIII'in hemostatik etkisini nötralize eden sıklıkla IgG4 alt grubu yapısında antikorlardır ve genellikle hastaların FVIII konsantreleri ile ortalama 25 kez karşılaşmaları sonucu ortaya çıktığı bildirilmektedir (42). IgG4 ve IgG1, FVIII inhibitörleri olan hastalarda en bol bulunan IgG alt sınıflarıyken, FVIII inhibitörleri olmayan hastalarda ve sağlıklı bireylerde IgG4 saptanmamıştır (43). Ek olarak, inhibitörlü Hemofili A hastalarındaki antikorların, inhibitörü olmayan hastalarda veya sağlıklı bireylerde bulunan antikorlardan yaklaşık 100 kat daha yüksek afiniteye sahip olduğu gösterilmiştir (44).

Hemofili A hastalarında FVIII preparatına ilk maruz kalma sonrası, beş günü aşan yoğun FVIII maruziyeti sonrası, etkin replasmana rağmen kanama gelişmesi, replasman

sonrası yetersiz klinik yanıt ve planlı tüm cerrahi girişimler öncesi inhibitör taraması önerilmektedir (45). Hemofili A'da inhibitör varlığı klasik Bethesda testiyle incelenir ve mililitrede 0,6 Bethesda Ünitesinden (BU/mL) yüksek inhibitör titresi klinik olarak anlamlı kabul edilir. FVIII inhibitör düzeyleri; hastanın immün sisteminin cevabına göre ‘‘yüksek cevaplı’’ veya ‘‘düşük cevaplı’’ inhibitörler olarak sınıflandırılır. Yüksek cevaplı inhibitörler, immün sistemin hemen ve güçlü şekilde cevap verdiği, inhibitör titresinin süratle 5 BU ve üstü düzeylere ulaştığı inhibitörlerdir. Buna karşılık düşük cevaplı inhibitörler, immün cevabın yavaş ve zayıf olduğu hastalarda ortaya çıkar ve inhibitör titresi genelde 0,6-5 BU aralığındadır (46).

Inhibitör gelişimini etkileyen Eksojen ve Endojen Faktörler

Inhibitör gelişimiyle ilgili genetik ve çevresel çeşitli risk faktörleri ortaya konmuş ve bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. İnhibitör gelişiminde bilinen en önemli genetik risk faktörünün, F8 genini etkileyen bir varyant türü olduğu gösterilmiştir. F8 genini büyük çapta etkileyen insersiyon ve delesyonlarla hafif zinciri etkileyen anlamsız mutasyonları olan olgularda inhibitör gelişme riski en yüksek bulunmuştur (47). Hemofili A'da en sık görülen 1-22 inversiyon mutasyonlarında inhibitör gelişme riski orta düzeyde saptanmıştır (47). F8 geni dışındaki Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) genotipi, İnsan Lökosit Antijen (HLA) haplotipi, immün cevapla ilişkili IL-1, IL-2, TNF- α , IL-10 ve CTLA-4 vb. gen polimorfizmlerinin de inhibitör gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir. Oldenburg ve ark., HLA-A3, HLA-B7, HLA-C7, HLA-DQA0102, HLA-DQB0602, HLA-DR15 haplotipinin, inhibitör gelişen hastalarda daha sık bulunduğunu göstermişlerdir (48). Astermark ve ark. yaptıkları çalışmalarda ise, IL10 geninin promotör bölgesinde yer alan sitozin adenozin (C'A') tekrar mikrokodonlarından biri olan IL10G'deki 134 bp'lik bir alel ile ve TNF- α lokusundaki bir polimorfizm (-308 G/A genotipi) ile inhibitör gelişimi arasında ilişki olabileceğini saptamışlardır (49, 50). Ayrıca inhibitör gelişiminde ırk farklılığına dikkat çekilmiş, siyah ırk ve İspanyol kökenlilerde beyaz ırka göre inhibitör gelişiminin daha fazla olduğu gösterilmiştir (51, 52). Ancak F8 gen mutasyonu hariç, inhibitör gelişimi için muhtemel genetik risk faktörleri halen tartışmalıdır ve genetik varyasyonlarla inhibitör gelişimi arasındaki ilişkiyi ortaya koyacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır (47).

Inhibitör gelişiminde çevresel faktörlerin çoğu tedavi ile ilgili ve değiştirilebilir risk faktörleridir. Uygulanan FVIII ürününün tipi, FVIII'e maruz kalınan gün sayısı, FVIII

ürününe ilk maruz kalma yaşı ve kullanılan FVIII ürünün tipi (pd-FVIII, rFVIII) gibi edinilmiş risk faktörleriyle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Kullanılan FVIII ürünü tipiyle ilgili çalışmalarda, farklı görüşler ortaya konmuştur (47). FVIII ürünlerini karşılaştıran çok merkezli randomize klinik bir çalışma olan SIPPET çalışmasında kümülatif inhibitör insidansı pd-FVIII ile tedavi edilenlerde (% 26,5), rFVIII ile tedavi edilenlere (% 44,5) göre daha düşük olarak bulunmuştur (53). pd-FVIII ile tedaviyle, rFVIII ile tedaviye göre daha düşük bir inhibitör gelişme insidansı saptanması; insan plazmasından elde edilen doğal FVIII ürünlerinin, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilenlerden daha az immünojenik olmasıyla ilişkilendirilmiştir (53). Ancak pd-FVIII ürünlerinde rFVIII ürünlerinden farklı vWF içermesinin, inhibitör gelişimine karşı koruyucu rolünün olduğunu savunan çalışmalar da vardır (54). İnhibitör gelişiminde FVIII'e ilk maruz kalma yaşı, tedavi rejiminin tipi, FVIII'e maruz kalınan gün sayısı gibi diğer çevresel risk faktörlerinin rolleri de tartışılmıştır ancak bu konudaki çalışmaların sonuçları uyumsuz ve yetersiz kalmıştır (47). Sadece, ilk maruziyette veya ilk 50 uygulamada herhangi bir zamanda uzun süreli (≥ 5 gün) ve yüksek doz (≥ 50 IU/kg) olacak şekilde yoğun FVIII maruziyetinin, inhibitör gelişme riskini arttırdığı konusunda fikir birliği vardır (55).

Tablo.2.3.5. İnhibitör gelişimine yatkınlık oluşturan risk faktörleri.

Hasta ilişkili kalıcı risk faktörleri	
Hemofili tipi	Ağır Hemofili A'da (% 20-35), hafif ve orta Hemofili A'dan (% 3-13) daha sık
Hemofili mutasyonu	F8 genini büyük çapta etkileyen insersiyon ve delesyonlarla hafif zinciri etkileyen anlamsız mutasyonlarda risk en yüksek
Etnik köken	Siyah ırk ve İspanyol kökenlilerde sık
Aile öyküsünde inhibitörlü birey olması	
Bağıışıklığı düzenleyici genlerdeki polimorfizm ya da mutasyonlar	IL-10, TNF- α ve CTLA-4 genlerinde belli polimorfizmlerde riski yüksek
Tedavi ilişkili değiştirilebilir çevresel risk faktörleri	
FVIII preparatına yoğun maruz kalma	Uzun süreli (≥ 5 gün) ve yüksek doz (≥ 50 IU/kg) olacak şekilde yoğun FVIII maruziyetinde risk yüksek
FVIII ürününün tipi	Oldukça fazla tartışma bulunmakla birlikte SIPPET çalışmasında rFVIII ürünlerinde risk yüksek

(Kaynak: Türk Hematoloji Derneği Hemofili Tanı ve Tedavi Kılavuzu-2021)

2.4 . T Reglatuvar Hücreler

T hücreleri

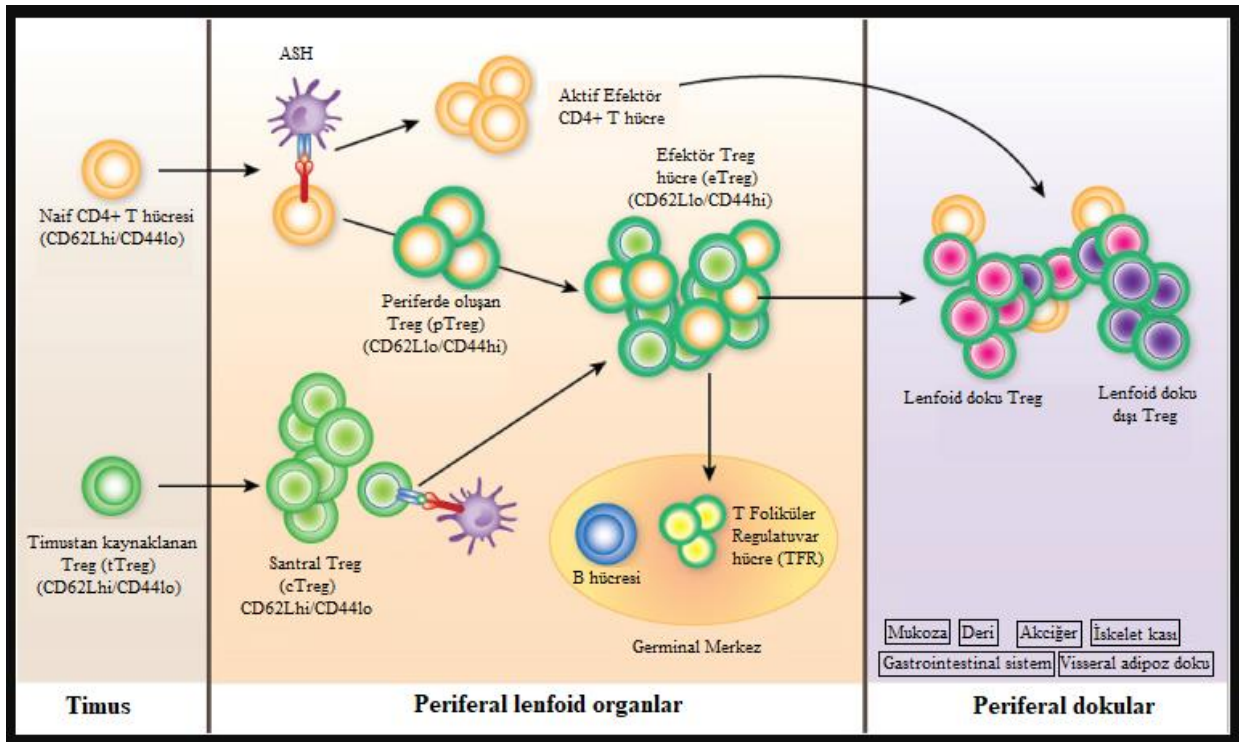
T hücreleri, esas olarak timusta geliştiklerinden dolayı "T" hücreleri olarak isimlendirilen, CD3 yüzey molekülü taşıyan ve T hücre reseptörleri aracılığıyla yabancı partikülleri tanıyan immün sistem hücreleridir. İmmün sistemde ürettikleri sitokinlerle diğer hücreleri yönlendiren, CD4 yüzey antijeni taşıyan yardımcı T hücreleri (T helper / Th / CD4⁺ T) ve virüsle enfekte hücreleri, tümör hücrelerini öldüren, CD8 yüzey antijeni taşıyan sitotoksik T hücreleri vardır. Bir diğer T hücre alt grubu da bellek T hücreleridir. CD3 yüzey molekülü taşıyan doğal katil (NK) hücreleri ise T hücrelerle aynı progenitör hücreden kaynaklanan lenfositlerdir. Başlangıçta CD4⁺ T hücrelerinin iki farklı alt gruba, yani Th1 ve Th2 hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir (56). Son 20 yılda ise bunların yanında Th9, Th17, Th22, Treg gibi birçok alt grup tanımlanmıştır. Th1 hücreleri; IFN- γ , IL-12 gibi sitokinler aracılığıyla hücre içi virüs veya bakteri gibi patojenlere karşı immün cevapta görevli Th alt grubudur. Th2 hücreleri ise helmint gibi büyük ekstrasellüler organizmalara karşı IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinleri aracılığıyla eozinofili, mastositoz ve goblet hücre hiperplazisini uyarak immün cevap oluşumunda etkilidir.

T hücrelerinin aracılık ettiği süpresyon kavramı, T hücrelerinin ayrı bir lenfosit dizisi olarak keşfedilmesi kadar eskidir. 1970'lerin başında T hücrelerinin immün cevapları süprese edebileceği düşünülmüş ancak özgül biyobelirteçlerin saptanamaması nedeniyle konuya ilgi azalmıştır. 1995'te Sakaguchi'nin IL-2Ra'yı (CD25) eksprese eden hücreleri tanımlaması; timektomize edilmiş farelerde ve diğer otoimmünite modellerinde otoimmün hastalığı baskılayan, CD4 ve CD25 yüzey antijenlerini taşıyan düzenleyici T hücre (reglatuvar T hücre / Treg) alt kümelerinin tanımlamasını sağlamıştır (57).

Reglatuvar T hücreler (Treg)

Adından da anlaşılacağı gibi reglatuvar T hücreler immün sistemdeki diğer hücreleri düzenlemede veya baskılamada rolü olan, kendine ve yabancı antijenlere karşı immün cevabı kontrol eden, böylece otoimmün hastalıkları önlemede etkili olan; birçok farklı biyobelirteç taşıyıp, bulundukları immün çevreye göre adaptasyon gösterebilen ve kendi içinde çok farklı alt gruplara ayrılabilen bir T hücre alt grubudur.

Treg hücreleri, orijinleri, fonksiyonel aktiviteleri ve aktivasyon durumları açısından heterojen bir T hücre popülasyonudur. Son yıllarda Treg hücreleri, farklılaşmalarının gerçekleştiği anatomik lokalizasyonlara göre; timustan kaynaklanan reglatuvar T hücreler (tTreg hücreler), antijenle karşılaşma sonucu periferde oluşan reglatuvar T hücreler (pTreg hücreler) ve T hücre reseptörü sinyali, IL-2, TGF gibi ek faktörlere bağlı *in vitro* olarak naif T hücrelerinden gelişen uyarılmış reglatuvar T hücreler (iTreg hücreler) olarak sınıflandırılmıştır (58). Bu Treg alt gruplarının hepsi immün dengenin korunması için esastır; bununla birlikte yapılan çalışmalar Treg alt gruplarının fenotip ve fonksiyonlarıyla ilgili çok fazla bilinmezliğin bulunduğunu göstermektedir (58).



Şekil 2.4.A. Treg hücre alt kümeleri.

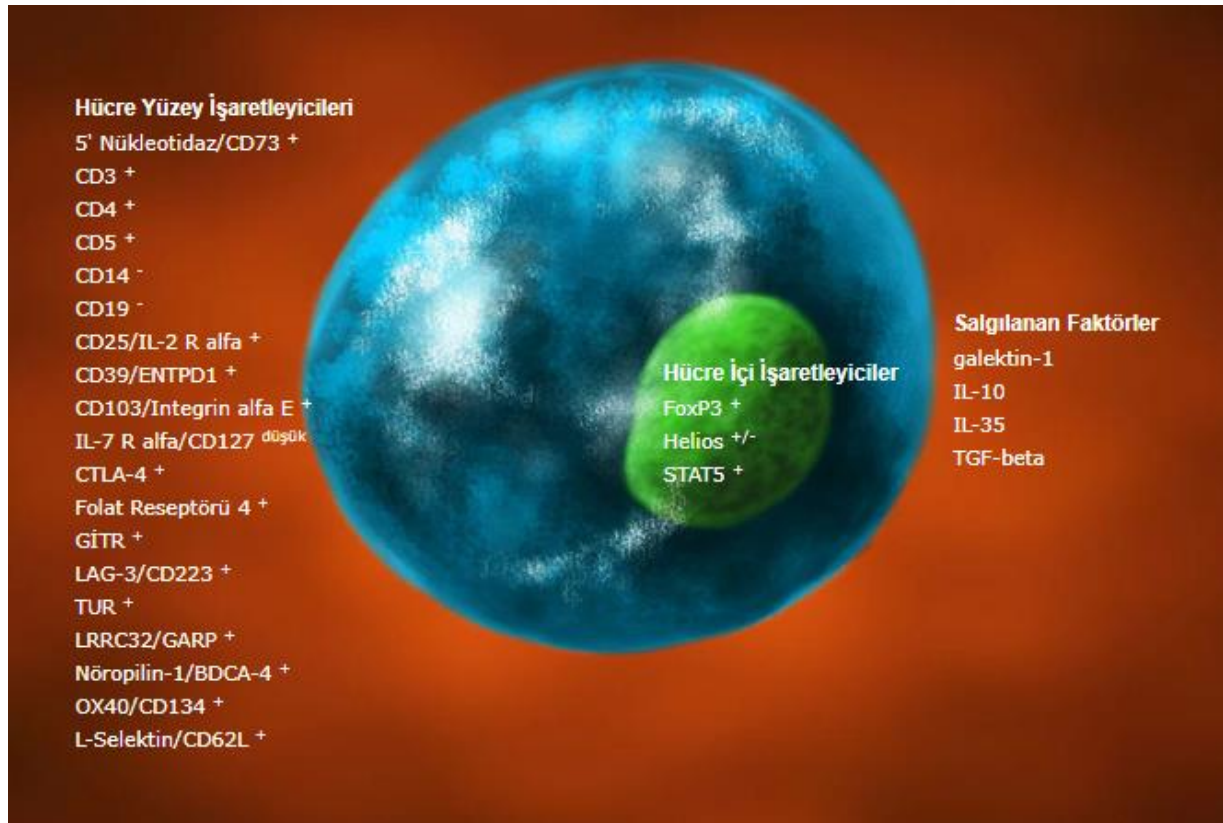
(Kaynak: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841119307802?via%3Dihub>)

Treg hücreleri, lenfoid organların T hücre bölgelerinin yanı sıra antikor olgunlaşmasını ve sentezini kontrol eden B hücre alanlarında da bulunur (59). Treg hücreleri lenfoid organlar dışında visseral yağ doku, iskelet kası, deri, kolon, akciğer gibi organ ve dokularda bulunur (60). Treg hücreleri bulunduğu dokuda reseptörleri ve immünoşüpresif sitokinleri kodlayan genlerdeki ekspresyonu regüle edip dokuya özgü efektör bir fenotipine dönüşür (53, 61). Buna visseral yağ dokusundaki Treg hücre popülasyonunun, adiposit farklılaşmasının “ana düzenleyicisi” olduğu düşünülen, nükleer reseptör ailesi üyesi olan Peroksizom Prolifere Aktive Edici- γ (PPAR- γ) ekspresyonu

örnek gösterilebilir (62).

Birçok biyobelirteç Treg hücre tipleriyle ilişkilendirilmiştir. CD4 yüzey antijeninin yanı sıra, IL-2 reseptörünün bir bileşeni olan CD25 yüzey antijeni Treg hücrelerinin karakterize edilmesinde kullanılır. Ancak biyobelirteçlere her geçen gün yenileri eklenmektedir. CD152 (CTLA-4) ve glukokortikoid uyarımlı TNF reseptörü (GITR) Treg hücrelerinin diğer biyobelirteçleridir. Ancak bunlar diğer T hücrelerinde de bulunduğu için diagnostik önemleri yoktur.

Bu biyobelirteçlerden Helios ve Nöropilin-1'in, tTreg hücreleri tarafından yüksek düzeyde eksprese edilip pTreg hücreleri tarafından zayıf eksprese edilmesi, bu iki Treg alt grubunun ayrımı için kullanılmaktadır (63, 64).



Şekil 2.4.B. Treg hücre biyobelirteçleri.

(Kaynak: <https://www.rndsystems.com/resources/cell-markers/immune-cells/regulatory-t-cell/regulatory-t-cell-markers>)

Tüm bu belirteçlerin yanında 2003 yılında, baskılayıcı aktivitelere önemli olan, Treg hücreleri için özgül Forkhead Box Transkripsiyon Faktörü-3 (FOXP3) tanımlanmıştır (65, 66). FOXP3'ün otoimmünite baskılanmasının sürdürülmesi için önemini; mutasyonuyla yaşamın ilk aylarında sistemik otoimmün bir hastalık olan ve kronik diare,

ekzematöz dermatit, endokrinopati klinik tablosuyla karakterize IPEX (X'e bağlı İmmünodisregülasyon Poliendokrinopati Enteropati) Sendromu göstermektedir (65,66).

FOXP3⁺ Treg Hücrelerinin Baskılayıcı İşlevinin Altında Yatan Mekanizmalar

Treg hücrelerinin süpresif fonksiyonu ile ilişkili birçok mekanizma tanımlanmış olmakla birlikte esas olarak üç görüş mevcuttur:

1. **Hücre-hücre etkileşimi:** Treg hücrelerin, dendritik hücreler veya doğrudan efektör T hücrelerle etkileşimleri sonucu oluşur. Treg hücrelerinin yüzeyinde yüksek oranda eksprese edilen CTLA-4, ortak uyarıcı moleküldür. CTLA-4'ün, dendritik hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen CD80 ve CD86 ligandları ile etkileşimi; bu hücrelerde indolamin 2,3-dioksijenaz up-regülasyonu ve sekresyonu ile sonuçlanır (67). Bunun yanı sıra Treg hücrelerindeki lenfosit aktivasyon geninin MHC-II molekülü ile etkileşimi; Treg hücrelerinin, dendritik hücre olgunlaşmasını ve efektör T hücrelerinin aktivasyonunu engellemesine sebep olur (68). Treg hücreleri üzerindeki Nörofilin-1'in dendritik hücrelerle etkileşimi; efektör T hücreler ve dendritik hücreler arasındaki etkileşimi sınırlar (69). Ayrıca Treg hücrelerinde serin proteaz, granzim ve galektin-1 ekspresyonu, doğrudan temas yoluyla efektör T hücrelerinin apoptozuna yol açar (70).
2. **Hedef hücre metabolizmasında bozulma:** Treg hücreleri, hücre yüzeylerinde IL-2R α zincirini yüksek oranda eksprese eder, buna bağlı olarak da yüksek IL-2 yıkımı gerçekleşir. IL-2, efektör T hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonu için gerekli olduğundan efektör T hücrelerini baskılar (71). Ayrıca Treg hücrelerinin yüzeyinde ATP veya ADP'yi cAMP'ye hidrolize eden CD39 ve CD73'ün ekspresyonu, efektör T hücre fonksiyonunu ve dendritik hücre olgunlaşmasını inhibe eder (72).
3. **Sitokin Sekresyonu:** Treg hücreleri süpresif etkili TGF- β , IL-10 sitokinleri ve adenoziini sentezler. Yapılan hayvan deneylerinde, farelerde inflamatuvar barsak hastalığı, kolit ve hava yolu inflamasyonu gibi inflamatuvar süreçlere cevapta Treg hücrelerinin IL-10, TGF- β , IL-35 sitokinlerinin önemi gösterilmiştir. (73, 74, 75).

Doğal Katil (NK) Hücreler

T hücrelerle aynı progenitör hücreden kaynaklanan lenfositlerdir. Bu hücreler viral olarak enfekte hücrelerin yok edilmesi, kanserin erken saptanması ve kanser belirtilerinin kontrol edilmesinde rol alırlar. Kanser hücreleri ve enfekte hücre yüzeylerinden eksprese edilen NK reseptörlerini aktive eden moleküller, NK hücrelerinin aktivasyonunu başlatır. NK hücrelerinden serbestleşen perforin ve granzim içeren sitotoksik granüller hedef hücrenin lizisine sebep olur. NK hücreleri yüzeyindeki inhibitör reseptörler, normal sağlıklı hücrelerde “*kendinden olanı tanıma*” için gerekli MHC-I moleküllerinin tanınmasını ve NK hücrelerinin öldürücü etkisinin kontrolünü sağlar. Kanser hücrelerinde veya enfekte hücrelerde MHC-I molekülünün kaybedilmesi, bu hücrelerin NK hücrelerinin öldürücü etkisine maruz kalmasına sebep olur.

2.5 . İmmün Sistem ve Hemofili A'da İnhibitör Gelişimi

2.5.1. Primer İmmün Cevap (Doğal İmmünite)

Memelilerde doğal immün cevap; deri, solunum ve gastrointestinal sistem mukozal yüzeyleri gibi doğal bariyerler dâhil olmak üzere tüm dokularda bulunur. Özelleşmiş myeloid, lenfoid, efektör ve nonhematopoetik hücreler; doku hasarı, enfeksiyon veya genotoksik stres gibi uyarılara cevap olarak doğal immün cevabı başlatabilir. Bu uyarılar, Patern Tanıyıcı Reseptör (PRR) ailesinden olan Toll-like Reseptörler (TLR) aracılığıyla tanınır ve fagositoz, sitotoksikite gibi hücrel mekanizmalar, antimikrobiyal peptitler, kompleman faktörleri, akut faz proteinleri, sitokin/kemokinler gibi elemanlar aracılığıyla doğal immün cevap kontrol edilir. Doğal immünitede patojen tanıyan epitelyal hücreler veya hematopoietik hücreler tarafından eksprese edilen TLR'ler, patojen ilişkili moleküler paternleri (PAMPs) tanır. Doğal immün cevap, adaptif immüniteden farklı olarak patojen ile uyarım sonucu PRR aktivasyonuna bağlı ancak selektif bir olaya bağlı olmaksızın ve immünolojik bir hafıza oluşturmada hemen başlatılır. Buna karşılık, adaptif immün cevapta, antijen özgüllüğü ve immünolojik hafıza önemlidir. Son yıllarda bu farklılık, ‘*eğitilmiş immünite*’ kavramı ile yeni bir anlam kazanmıştır (76). Eğitilmiş immünite kavramı, doğal immün hücrelerin; eksojen veya endojen uyarılarla uyarılıp bazal bir duruma döndükten sonra ikinci bir uyarana karşı ilk cevaptan daha fazla veya daha az olacak şekilde farklı bir cevap vermesini ve uzun süreli adaptasyonla fonksiyonel olarak yeniden programlanmasını tanımlar (76). Uyarılar eksojen mikroorganizmalar olabileceği gibi; katekolaminler, ürik asit, okside Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL) gibi endojen moleküller de olabilir (76). Eğitilmiş immünite, enfeksiyon hastalıklarında çapraz reaksiyonlardaki koruyucu etkisi ile faydalı olurken; kronik sistemik inflamasyon zemininde gelişen ateroskleroz gibi bazı durumlarda ise aşırı ve güçlenmiş olarak bozulmuş immün cevaba sebep olabilmektedir. Ayrıca, immün olmayan hücrelerde de eğitilmiş immün cevap özelliklerinin varlığı gösterilmiştir (76).

Makrofaj, monosit gibi immün hücrelerin yanı sıra, immün olmayan endotel, fibroblast gibi hücrelerden sekrete edilen sitokinler doğal immün cevapta etkilidir. Sitokinler enfeksiyonun erken aşamasında etkene direkt etki yaparak veya NK hücreleri ve monosit-makrofaj aktivasyonunu sağlayarak immünomodülatör etki gösterirler. Herhangi

bir antijenin kimyasal veya fiziksel bariyeri aşması halinde sitokin ve interferonlar aracılığıyla viral replikasyon bloke edilir, ateş gibi inflamatuvar cevap uyarılıp NK hücrelerinin ve makrofajların aktivasyonu sağlanır.

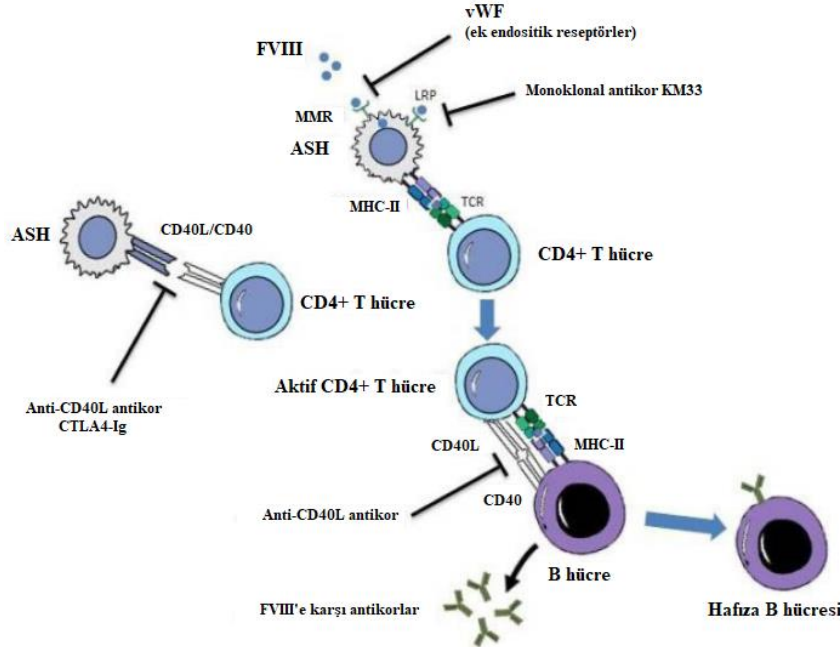
Hemofili A’da İnhibitör Gelişimi ve Doğal İmmünite

Replasman amaçlı kullanılan FVIII preparatlarının ilk 30 dak içinde dalakta biriktiği ve immünojenitede dalağın önemli rolünün olduğu ortaya konmuştur (77). Dalak, immün kompleksler, bakteri veya koloidal partikülleri kandan uzaklaştırarak immünitenin gelişimine katkıda bulunur. Antijenler kırmızı pulpadan makrofaj, B lenfosit ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin (ASH) bulunduğu marjinal zon bölgesine dalak arteri yoluyla ulaşır. Navarette ve ark., FVIII eksikliği olan farelere uygulanan replasman tedavisi sonucu, FVIII moleküllerinin özellikle dalağın marjinal zon bölgesinde biriktiğini ve marjinal zonda FVIII molekülleriyle ilgili reseptörlerin tanımlanmasının immünojeniteyi azaltmayı amaçlayan yeni stratejilerin geliştirilmesine imkan sağlayacağı görüşünü ortaya koymuşlardır (78). Diğer bir çalışmada splenik germinal bölgelerin anti-CD154 antikoru ile harap edilmesini takiben FVIII’e karşı gelişen antikorların azaldığı, hatta ortadan kalktığı gösterilmiştir (79). Ancak splenektomi uygulanmış hayvanlarda da terapötik FVIII’e karşı immün cevabın gelişmesi, lenf düğümleri ve kemik iliği gibi alternatif sekonder organların da terapötik FVIII’e karşı immün reaksiyona katılabileceğini düşündürmüştür (80). Bununla birlikte kanama bölgelerinde oluşan inflamatuvar ortamın, ASH’ler tarafından CD4⁺ T hücrelerine sunulmak üzere FVIII’in sekonder lenfoid organlara taşınmasında etkili olduğu düşünülmüştür. İnflamatuvar ortamda aktifleşen ASH’ler, endositozla hücre içine alınan FVIII molekülünü yaklaşık 9-14 amino asit uzunluğunda peptitlere hidrolize eder ve splenik arteri çevreleyen periarteriyolar lenfoid kılıf gibi T hücresi açısından zengin sekonder lenfoid organlara göç ederler. FVIII kaynaklı peptitler ve MHC-II molekül kompleksi doğal CD4⁺ T hücrelere sunulur; T hücre reseptörü tarafından tanınması ile ilk aktivasyon sinyali oluşur. FVIII’e özgül doğal T hücre cevabı için ASH-T hücre etkileşimi yanı sıra sitokinler aracılığı ile proinflamatuvar ortamın oluşumu gibi ilave uyarı yolları da gereklidir (78).

T hücre cevabının oluşumunda esas, antijenin tanınıp ASH hücreler tarafından internalizasyonudur. ASH’lerin etkinliği, hastanın immün sisteminin eksojen FVIII “deneyimine” bağlı olarak farklılık gösterir. FVIII’e daha önce maruz kalmayan

hastalarda immün cevabın dendritik hücreler yoluyla gerçekleştiği, daha önce maruziyeti sonucu mevcut bir immün cevabı olan hastalarda ise B hücrelerinin anahtar ASH olduğu gösterilmiştir (81).

Primer immün cevap



Şekil 2.5.1. Hemofili A'da inhibitör antikor gelişiminde primer immün cevap.

(Kaynak: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6951349/figure/f1-mjhid-12-1-e2020001/?report=objectonly>)

FVIII'e hiç maruz kalmamış hastalarda, FVIII'e özgü B lenfositleri uyarılmamış olduğundan ASH'lerin fonksiyon gösterecek yoğunlukta bulunmaları mümkün değildir. B hücreleri ve makrofajlar, ASH'ler olarak kabul edilmelerine rağmen naif CD4⁺ T hücrelerine FVIII molekülünü sunamazlar (82). Bu durum, naif T hücrelerini uyarma kapasitesi göz önüne alındığında, dendritik hücrelerin pıhtılaşma faktörlerine karşı primer immün cevaptaki esas ASH grubu olduğunu düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada, insan dendritik hücrelerinin *in vitro* olarak FVIII ile kültüre edildiğinde olgunlaşmadıkları ve bu nedenle FVIII'in insan dendritik hücreleri için doğal tehlike sinyallerine sahip olmadığı ortaya konmuştur (83). Ancak, bu çalışmada kullanılan monosit türevli dendritik hücrelerin vücuttaki dendritik hücre popülasyonunu temsil etmediği görüşü de vardır. Ayrıca FVIII ile birlikte kullanılan adjuvanlar ve inflamatuvar ortamın immün cevabın oluşmasında önemli olduğu; aşırı kanama epizodları nedeniyle FVIII preparatlarının yüksek konsantrasyonda kullanımının, FVIII'in ASH'ler tarafından alımını ve FVIII'den türetilen peptitlerin CD4⁺ T hücrelerine sunumunu arttırarak daha yüksek

konsantrasyonda inhibitör gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (84).

FVIII'in ASH'ler tarafından tanınmasını sağlayan LRP (LDL reseptör ilişkili protein), Asialoglikoprotein reseptörü ve Makrofaj Mannoze reseptörü (MMR/CD206) gibi birkaç endositik reseptör tanımlanmıştır. LRP, FVIII'in ağır ve hafif zincirlerindeki protein yapılarını tanır (85), asialoglikoprotein reseptörü FVIII'in B bölgesinin galaktoz-uçlu glikanlarına bağlanır (86), MMR/CD206 ise molekülün A1 ve C1 alanlarında mannoze glikanlarla etkileşime girer (87). Dasgupta ve ark., FVIII molekülünün hem ağır hem de hafif zincirlerindeki mannoze glikanları tanıyan MMR/CD206 tarafından hücre içine alındığını göstermek için yaptıkları çalışmada; doza bağımlı olarak vWF'ün, FVIII'in MMR'ne bağlanmasını önleyip endositozu bloke ettiğini göstermişlerdir (87). Bu nedenle vWF'ün Hemofili A hastalarında tedavi amaçlı kullanılan FVIII'in immünojenisitesini azalttığı düşünülmüştür.

Dendritik hücreler gelişimleri sırasında, $CD4^+$ T hücre aktivasyonu için gerekli olan CD80/86 ve CD40 gibi uyarıcı molekülleri eksprese ederler (88). Sekonder lenfoid organlarda olgun dendritik hücreler, MHCII-T hücre reseptörü etkileşimi sayesinde FVIII'e özgü $CD4^+$ T hücreleri tarafından tanınır; dendritik hücre ve T hücresi arasında kostimülatör hücre yüzey molekülleri (CD40L-CD40, CD28-CD80/CD86) arasında etkileşim meydana gelir. Dendritik hücre ve T hücreleri tarafından sitokin sekresyonu, T hücresi aktivasyonunu ve proliferasyonunu uyarır. 2000'li yılların başında anti-CD40L monoklonal antikor ve anti-CTLA4'ün tedavide kullanılarak ASH'ler ve T hücreleri arasındaki çapraz reaksiyonun ortadan kaldırılması denenmiştir (89). Ancak CD40-CD40L blokajı ile tromboembolik komplikasyonların ortaya çıkabileceğinin gösterilmesiyle, bu tedavi FVIII tolerans indüksiyonu için güvenli bir alternatif olarak kabul edilmeyip terkedilmiştir (90).

2.5.2. Sekonder İmmün Cevap

Aktive edilmiş $CD4^+$ T hücreleri, FVIII'e özgü naif B hücrelerini aktive ettikleri dalaktaki B hücre foliküllerine girerler. Kemik iliği kaynaklı B hücrelerinin, reseptör aracılı endositoz yoluyla FVIII molekülünü hücre içine alıp MHC-II ve T hücre reseptörü sayesinde aktive edilmiş $CD4^+$ T hücreleri ile etkileşime girdiği ortaya konmuştur (91). Aktive edilmiş B hücreleri daha sonra proliferasyon olarak FVIII'e özgü bellek B hücrelerine

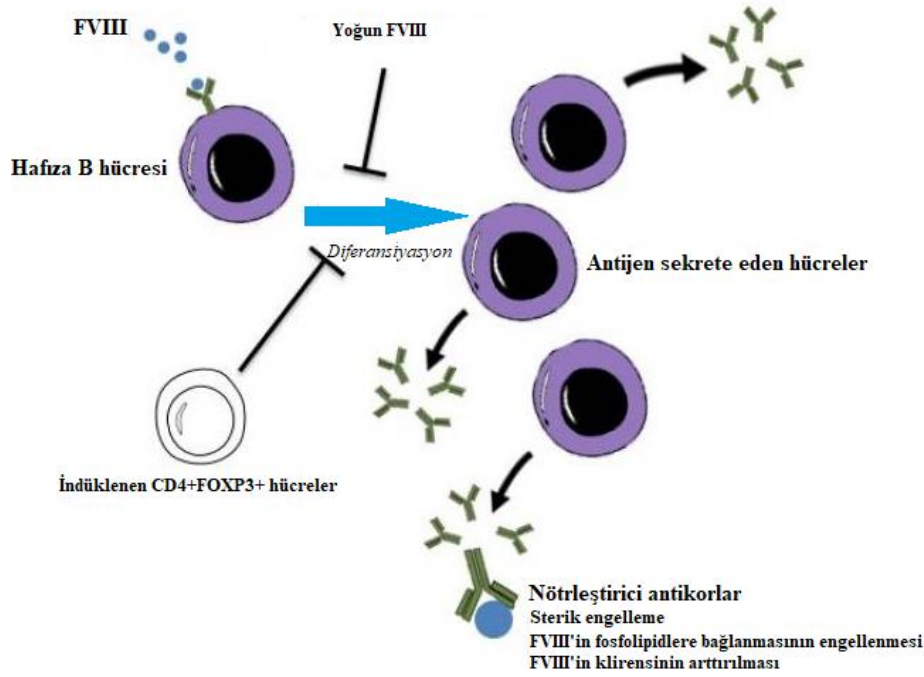
veya anti-FVIII antikorlarını sekrete eden plazma hücrelerine farklılaşırlar. Bellek B hücreleri, anti-FVIII antikorları salgılamaz. Bu hücreler dalakta veya kemik iliğinde bulunur ve daha sonra FVIII'e maruz kaldıktan sonra hızla plazma hücrelerine dönüşürler (90). Eksojen FVIII molekülü ile ikinci karşılaşma sonucu ise, primer immün cevap sırasında oluşan FVIII'e özgül bellek hücreleri artar. Bellek hücreleri doğal T hücrelerinden daha hızlı ve güçlü bir immün cevap oluşturabilir ve bu hücrelerin çoğalması yüksek afiniteli nötralizan antikorların oluşumuyla sonuçlanır. Hemofilili farelerde, T ve B hücre etkileşimlerinin sekonder humoral cevap (anti-FVIII) oluşumunda esas olduğu gösterilmiştir (92). FVIII'e tekrar maruziyette ise, uzun süreli humoral cevap ve hızlı immün cevap oluşumları için anti-FVIII bellek B hücrelerinin esas olduğu ortaya konmuştur (92). van Helden ve ark., bellek B hücrelerinin lenfoid organların yanı sıra inhibitör gelişen Hemofili A hastalarında periferde de bulunduğunu göstermişlerdir (92).

Plazma hücrelerinden sekrete edilen çoğu antikor, FVIII'in A2 veya C2 alanlarına karşı ve esas olarak IgG1, IgG4 alt tipindedir. Bunların dışında, bazıları B alanında yer alan nötralizan ve nötralizan olmayan birkaç epitop tanımlanmıştır (93).

Antikorların FVIII'i nötralize edici mekanizmaları; sterik engelleme, immün komplekslerin oluşumu, artan katabolizma ve hidroliz olarak açıklanmıştır (77). Antikorların FVIII'in C2 alanına bağlanması, FVIII'in fosfolipitlere veya vWF'e bağlanmasını engelleyebilir (94). Ayrıca antikorların, FIX'a FVIII'in bağlanmasını engelleyebildiği veya aktif FVIII-aktif FIX kompleksinin intrinsik FX'a bağlanarak aktivitesini bloke edebildiği bildirilmiştir (95,96). Alternatif olarak, antikorların doğrudan proteoliz yoluyla FVIII'in klirensini arttırabildiği gösterilmiştir (97). Nötralizan olmayan antikora karşı immün cevabın, klinik öneminin olup olmadığı ve dikkate alınması gerekip gerekmediği konusunda tartışmalar devam etmektedir (98).

ASH ve CD4⁺ T hücreleri arasındaki ilişki; CD40 ligandı, CD80/86 ve CTLA4'e bağlanmayı etkileyen kostimülatör hücre yüzeyi moleküllerine yönelik antikorların kullanıldığı hayvan modellerinde gösterilmiştir (99). Bir mürin hemofili modelinde uyarıcı sinyallerin bloke edilmesiyle inhibitör sentezinin önlenmesi, CD4⁺ T hücrelerinin bir anti-FVIII yanıtının geliştirilmesi için gerekli olduğunu gösteren önemli bir bulgudur (100). CD4⁺ T hücrelerinin FVIII'e karşı gelişen antikor sentezinde etkin olduğuna dair indirekt diğer bir kanıt ise, inhibitör antikor düzeylerinin HIV ile ilişkili azalabileceğinin ve kendiliğinden kaybolabileceğinin gösterilmesidir (101).

Sekonder immün cevap



Şekil 2.5.2.

Hemofili A'da inhibitör antikor gelişiminde sekonder immün cevap.

(Kaynak: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Clic k%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=6951349_mjhid-12-1-e2020001f2.jpg)

Antijenik stimülasyonu takiben naif CD4⁺ T hücreleri, işlev ve sitokin sekresyonu açısından farklılık gösteren birkaç T hücre alt kümesinden birine farklılaşabilir. Th1 hücreleri, IL-2 ve IFN- γ gibi proinflatuvar sitokinleri sekrete edip IgG1 gibi kompleman sabitleyici antikorların sentezine yardımcı olur (102). Th2 hücreleri ise, ASH'in proliferasyonunu ve işlevini baskılayan IL-4, IL-10 gibi antiinflatuvar sitokinleri sekrete ederek immün cevap üzerinde inhibe edici bir etki gösterir (102). Bununla birlikte, Th2 hücreleri, inhibitör gelişen Hemofili A hastalarında, FVIII'e karşı yüksek afinitesi olan ve çoğunlukla IgG4 tipinde belirli antikor alt sınıflarını üreten B hücrelerini ise uyabilir. Bu da Hemofili A'da inhibitör gelişiminde, Th2 hücrelerinin immün reglatuvar olarak önemli olduğunu düşündürmüştür (103).

Genel olarak, B hücreleri tarafından inhibitör sentezi, farklı CD4⁺ T hücre alt kümelerinin karmaşık bir etkileşimi ile kontrol edilir (102). Reding ve ark., anti-FVIII antikorlarının sentezinde Th1 ve Th2 hücrelerinin birlikte rol oynadığını göstermişlerdir (104). Yüksek düzeyde anti-FVIII yanıtının ve yüksek inhibitör titrelerinin Th2 ve IgG4 sentezi baskınlığı ile ilişkili olduğu; başarılı immün tolerans tedavi uygulamaları ve hafif

olgularda Th1'in ürettiği anti-FVIII antikor sentezinin baskın olduğu bildirilmiştir (104).

FVIII inhibitörlerinin patogenezinde T hücrelerinin rolünü araştıran Reding ve ark, FVIII üzerinde $CD4^+$ T hücresinin epitoplarının haritasını çıkarmıştır ve FVIII molekülünün C2 alanında 2191-2210, 2241-2290 ve 2291-2330 kalıntılarına karşılık gelen üç $CD4^+$ T hücre epitopunun varlığını göstermişlerdir (105). Bu epitopların her birinin inhibitör bağlanma bölgeleriyle örtüştüğü, bunun da dizileri tanıyan $CD4^+$ T hücrelerinin inhibitör sentezinin düzenlenmesindeki rolünü güçlendirdiği ortaya konmuştur (105). Ayrıca aynı çalışmada bazı özgül $CD4^+$ T hücre epitoplarının, FVIII molekülü 2191-2210 aminoasit kalıntıları gibi bazı bölgeleri tanınamamasının ve bunun sonucunda $CD4^+$ T hücrelerinin etkinleştirilmemesinin de inhibitör antikor gelişiminde etkili olduğu saptanmıştır (105).

Tüm bunların yanı sıra, konjenital ve edinisel Hemofili A hastalarının $CD4^+$ T hücre epitopları arasında dikkate değer farklılıklar bulunmuştur: inhibitörlerin konjenital olgularda alloimmün bir cevabın, edinisel Hemofili A olgularındaysa otoimmün bir cevabın sonucu olduğu göz önüne alındığında, beklenen farklı inhibitör oluşum mekanizmalarını düşündürmüştür (77).

Treg hücreler, hemofili tedavisinde immün toleransın indüksiyonunda etkindir. Sistemik inflamasyonun olmaması durumunda, FVIII preparatlarına sık maruz kalma, Th hücre eksikliği ile birlikte Treg hücreleri uyarabilir ve B hücre farklılaşmasını önleyebilir. B hücre anerjisi ve / veya delesyonu yoluyla da immün toleransın oluşabileceği düşünülmüştür (106). Bir mürin Hemofili A modeli çalışmasında yüksek doz FVIII maruziyetinin, hem ASH'ler hem de T hücreleri üzerinden indirekt olarak bellek B hücrelerini inhibe ettiği gösterilmiştir (107).

Inhibitör antikor oluşumunda Treg hücrelerin önemi ortaya konmuş ve süpresör aktiviteleri olan farklı hücre alt grupları tanımlanmıştır. Treg aktivasyonu, T hücre reseptörlerinin antijene özgü bağlanması yoluyla gerçekleşir; ancak Treg süpresyonunun özgül olmayan bir şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir. Özellikle, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin inhibitör oluşumunda karışık ve çok yönlü bir şekilde etkili olduğu gösterilmiştir (108). Treg hücreler bu süreçte; ASH'ler ve / veya efektör T hücrelerle direkt hücre teması, proliferasyon ve / veya hücre farklılaşmasının sitokin aracılı baskılanması ve dendritik hücreler tarafından baskılayıcı faktörlerin sekresyonunun uyarılması şeklinde farklı mekanizmalarla etkindir (108).

2.6 . Hemofili A ve Sitokinler

Etkili bir immün cevap oluşturmak ve koordine etmek için lenfositlerin, inflamatuvar hücrelerin ve hematopoetik hücrelerin birbirleriyle iletişim kurabileceği bir mekanizma gereklidir. Bu iletişimde etkili olan sitokinler, başlıca suda çözünebilir küçük proteinlerin ve glikoproteinlerin 8-30 kDa'luk birimlerini içerir. Başlangıçta immünomodülatör yetenekleri ortaya konmuş olmasına rağmen, hücre farklılaşması ve hücre migrasyonu gibi süreçlerde de rolleri vardır. Sitokinlerin etkileri, bir hedef hücrenin yüzeyinde eksprese edilen reseptörüne yüksek afinite ile bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu etki otokrin, parakrin veya endokrin olarak meydana gelebilir. Reseptör bağlantısı, hedef hücrede biyolojik bir etkiyle gen ekspresyonuna yol açıp hücre içi sinyalleşme basamaklarını uyarır. Sitokin uyarımı sonrasında hedef hücrenin farklılaşması, çoğalması ve aktivasyonu saptanabilen etkilerdir.

Sitokin terimi büyük bir protein grubunu tanımlar ancak sitokinleri tanımlamak için yaygın kullanılan diğer terimler de vardır: Monokinler tek çekirdekli fagositik hücreler tarafından sentezlenen, lenfokinler Th hücreler başta olmak üzere aktif lenfositler tarafından sentezlenen, interlökinler lökositler arasında mediatör olarak görev yapan, kemokinlerse öncelikle lökosit göçünden sorumlu küçük sitokinlerdir. Sitokinler genellikle öncül proteinler olarak depolanmazlar. Sentezleri, gen transkripsiyonuyla başlatılır ve mRNA'ları kısa ömürlüdür. İmmün cevapta ihtiyaç duyulduğunda sentezlenir. Sitokinler; kendilerini kodlayan genlerin birbirinden çok farklı olmamasına rağmen, çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlarla biyolojik olarak farklı biyoaktiviteye sahip proteinlerdir.

Hem doğuştan gelen hem de adaptif immün cevabı düzenleyen Th hücreleri ve makrofajlar iki temel sitokin üreticisidir; ancak sitokinler tüm çekirdekli hücreler tarafından geçici uyarılarla sentezlenip sekrete edilebilirler. Th1 hücreleri genelde IL-2, TNF- α , INF- γ gibi proinflamatuvar; Th2 hücreleri ise IL-4, IL-10, IL-13 gibi antiinflamatuvar karakterdeki sitokinleri üretir.

Tablo.2.6. Sitokinler.

<u>Sitokin</u>	<u>Sekrete edildiği hücreler</u>	<u>Başlıca Etkileri</u>
Doğal bağışıklığın mediatörleri		
TNF-α	Makrofaj, T hücreleri	Kostimülatör molekül İnflamasyon Ateş Akut faz reaktanı
IL-1	Makrofaj, Fibroblast, Epitelyal hücreler, Endotelyal hücreler, Astrositler	Kostimülatör molekül İnflamasyon Ateş Akut faz reaktanı
IL-10	Makrofaj, Th2	ASH aktivitesinin inhibisyonu Sitokin sentezinin inhibisyonu
IL-12	Makrofaj, Dentritik hücre, NK hücreleri	Th hücrelerin Th1 hücelere farklılaşması IFN- γ sentezinin uyarılması Sitotoksik T ve NK hücrelerinin sitolitik fonksiyonlarının aktivasyonu
IFN-α IFN-β	Birçok hücre tipi	Viral replikasyonu inhibe etme MHC-I molekül ekspresyonunu artırma NK hücre aktivasyonu
IFN-γ	Th1, sitotoksik T, NK hücreleri	Makrofaj aktivasyonu MHC-II molekül ekspresyonunu artırma
Kemokinler	Birçok hücre tipi	Kemotaksi
Kazanılmış immünitenin mediatörleri		
IL-2	Th1, NK hücreleri	T hücresi büyüme faktörü B hücresi büyüme faktörü NK hücre ve monosit aktivasyonu
IL-4	Makrofaj, Th2	Th hücrelerin Th2 hücelere farklılaşması Farklılaşmış Th2 hücre büyümesi IgE izotipine dönüşüm
IL-5	Th2	B hücrelerinin büyümesi ve farklılaşması Eozinofillerin büyümesi ve farklılaşması
TGF-β	T hücreleri, Makrofajlar	T hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonu Makrofaj aktivasyonunun inhibisyonu Proinflamatuvar sitokinlerin etkilerinin inhibisyonu
Hematopoez stimülatörleri		
GM-CSF, M-CSF, G-CSF	T hücreleri, Makrofajlar, Endotelyal hücreler, Fibroblastlar	Hematopoetik hücrelerin büyümesi ve farklılaşması

İnterlökin 17		
IL-17	Th17	<i>Aşırı ekspresyonu multipl skleroz, romatoid artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalığı dâhil olmak üzere otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.</i>

(Kaynak: <https://www.microbiologybook.org/Turkish-immunol/immunolchapter13turk.htm>)

Sitokinlerin Hemofili A'da İnhibitör Gelişimine Etkileri

Tümör Nekroz Faktör-alfa (TNF-α)

TNF-α, mikroplara özellikle Gram negatif bakterin lipopolisakkaridlerine (LPS) karşı yanıtta aktifleşmiş makrofajlar tarafından sentezlenir. Akut inflamasyonda endotel hücrelerini adezyon moleküllerini üretmek üzere uyarıp kemokinleri üreterek enfeksiyon bölgesine nötrofil ve makrofajların migrasyonunu sağlar. Aynı zamanda, ateş oluşumu için hipotalamusa etki eder ve akut faz proteinlerinin sentezini uyarır.

Brezilya merkezli 2 çalışmada inhibitör gelişen Hemofili A hastalarında plazma TNF-α sitokin düzeyleri gelişmeyenlere göre düşük bulunmuştur (109, 110). Buna karşılık yeni bir çalışmada ise ağır Hemofili A hastalarında inhibitör titreleri yüksek olan olguların TNF-α düzeyleri de yüksek bulunmuştur (111). Soori ve ark., TNF-α gen polimorfizmi ile Hemofili A ilişkisini göstermişlerdir (112).

İnterferon-gama (IFN-γ)

IFN-γ, en önemli makrofaj uyarıcı sitokinlerdendir ve makrofajların fagosite ettikleri mikropları öldürmesini uyarır. CD4⁺ T, CD8⁺ T hücreleri ve NK tarafından sentezlenir. MHC-II molekül ekspresyonunu artırır. Towfighi ve ark., Hemofili A hastalarında IFN-γ sitokin düzeyini normal bireylere göre anlamlı düşük bulmuştur (113).

İnterlökin-2 (IL-2)

IL-2, T hücreleri için esas büyüme faktörüdür. B hücrelerinin büyüme ve gelişmesini uyarır. NK hücreleri ve monositleri aktive eder. IL-2, T hücreleri üzerinde otokrin etkilidir: T hücrelerinin aktivasyonu, IL-2R ekspresyonu ve IL-2 sentezi ile sonuçlanır; IL-2 de, IL-2R'ye bağlanır ve hücre bölünmesini uyarır. T hücrelerin antijen tarafından uyarılması bittiğinde, IL-2R ekspresyonu azalır ve çoğalma fazı sonlanır. Hemofili A'da inhibitör gelişiminde IL-2 sitokini ve IL-2 gen polimorfizminin etkisi ortaya konmuştur (114).

İnterlökin-10 (IL-10)

IL-10, genel olarak inhibitör karakterde, immünosüpresif bir sitokindir. IFN- γ 'nın Th1 hücreleri tarafından sentezini inhibe eder, böylece immün cevabı Th2 yönüne kaydırır. Aynı zamanda, aktive edilmiş makrofajlarda sitokin sentezini, MHC-II ekspresyonunu ve makrofaj üzerindeki kostimülatör molekülleri inhibe ederek immün cevabı süprese eder. Bazı çalışmalarda inhibitör karakterde olan IL-10 sitokininin plazma düzeyleri inhibitör gelişen Hemofili A hastalarında yüksek bulunurken (110), bazılarında fark gözlenmemiştir(109). Hemofili A'da IL-10 polimorfizminin inhibitör gelişimi üzerindeki etkisi de gösterilmiştir (113).

İnterlökin-13 (IL-13)

IL-13, esas olarak birçok dokuda alerjik inflamasyonun neden olduğu fizyolojik değişikliklerin merkezindeki sitokin olmakla birlikte antiinflamatuvar özelliklere de sahiptir. Otoimmün hastalıklarda önemli olan IL-13 genindeki polimorfizmlerin Hemofili A'da inhibitör gelişiminde etkili olabileceğini düşündüren çalışmalar vardır (115).

Transforme edici Büyüme Faktör-beta

TGF- β , esas olarak inhibitör bir sitokindir. T hücrelerinin çoğalmasını ve makrofaj aktivasyonunu inhibe eder. Aynı zamanda, proinflamatuvar sitokinlerin etkilerini, granülositler ve endotelial hücreler üzerine etki ederek bloke eder. Hemofili A'da TGF- β 'nın immünomodülatör etkinliği gösteren çalışmalar vardır (116, 117).

İnterlökin-5 (IL-5)

IL-5; B hücrelerinin, eozinofillerin büyüme ve farklılaşmasında rol oynayan bir sitokindir. Ayrıca, olgun eozinofilleri aktive eder. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, IL-5 genindeki polimorfizmin ağır Hemofili A hastalarında inhibitör gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (118).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

1. Acea Biosystems Novocyte Akan Hücre Ölçer cihazı (San Diego, ABD)
2. Diaclone Research IL-2 / IL-10 / IL-13 / TNF- α / TGF- β / IFN- γ ELISA kiti (Besançon, Fransa)
3. ELISA plak yıkayıcı (ESW 300 Medispec, US)
4. ELISA plak çalkalayıcı (IKA-Werke, USA)
5. ELISA plak okuyucu (Biotech, UK)
6. Otomatik pipet seti (Eppendorf, USA)
7. 144 IU Lityum Heparinli Yeşil Kapaklı Tüp (Vacuette tube, BD, Plymouth)
8. % 3,2 Sodyum Sitratlı Mavi Kapaklı Tüp (Vacuette tube, BD, Plymouth)
9. Koagülasyon Otoanalizörü (Sysmex CN-6000, Norderstedt, Almanya)
10. Santrifüj (Nüve NF 1200R, Ankara, Türkiye)
11. Hematokrit santrifüj (Elektromag M 19 II, Türkiye)
12. İnvert Mikroskop (Euromex, Hollanda)
13. -80°C Derin Dondurucu (Şenocak D 315 DF Dual, Türkiye)
14. Hassas terazi (Scaltec, Germany)
15. Manyetik karıştırıcı (IKA Labortechnik RH Basic, USA)
16. Mikrotüp santrifüjü (Hettich, Germany)
17. pH metre (Hanna Instruments, Portugal)
18. Santrifüj (Heraeus, Germany)
19. Spektrofotometre (Pharmaco Biotech, UK)
20. Vorteks karıştırıcı (IKA Work Inc. Minishaker, USA)
21. Sıcak su banyosu (Elektro-mag, USA)
22. Saf su cihazı (Millipore, USA)
23. Doku homojenizatörü (Heidolph, Germany)
24. Isıtıcı Blok (Techne, UK)
25. Örnek yoğunlaştırıcı (Azot evaporatör, Techne, UK)
26. Ultra turrax (Virsonic, USA)

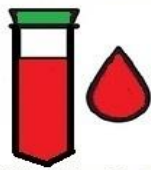
3.2. Çalışma Protokolü

Çalışma grubu inhibitör gelişmiş 10 Hemofili A hastası (İNH(+)), inhibitör gelişmemiş 10 Hemofili A hastası (İNH(-)) ve 10 sağlıklı kontrol grubundan (KONTROL) oluşturuldu. İNH(+) ve İNH(-) grupları, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü takibi altındaki ağır Hemofili A hastalarıdır. KONTROL grubu ise hastalarla yaş / cinsiyet uyumlu kişilerden seçildi.

Sağlıklı kontrol grubu

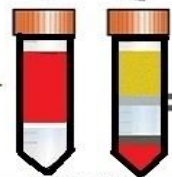


Numune toplanması



PKMH kültürü için vakumlu tüplerde (BD Pharmingen, San Diego, CA, ABD) toplanan heparinize kan örnekleri kullanıldı.

Santrifüjleme ve PKMH izolasyonu



PKMH'ler, Ficoll (Sigma Chemicals Company, St. Louis, MO, ABD) üzerinde yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile heparinize kandan izole edildi.

Kültür ortamında inkübasyon



Taze saflaştırılmış PKMH'ler iki kez fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonu ile yıkandı ve 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde RPMI-1640 kültür ortamında 120 saat 37°C 'de %5 CO_2 ile inkübe edildi.

İNH(+) ve İNH(-) ağır Hemofili A hasta grupları



Süpernatantların saklanması



İnkübasyonun sonunda, süpernatantlar sitokinlerin ölçümü için -80°C 'de saklandı.

Kültür sırasında invert mikroskopla takip



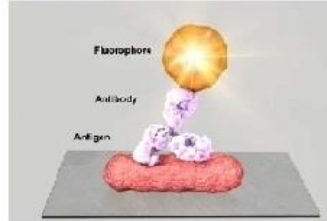
Deneyler sırasında kültür plakaları, hücre canlılığı, hücre çoğalması ve kültür kontaminasyonu açısından invert mikroskop kullanılarak düzenli aralıklarla incelendi.

ELISA ile sitokin düzeyi ölçümü



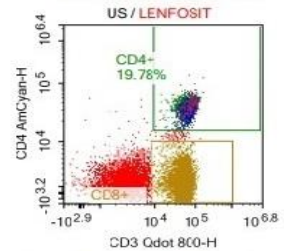
Saklanan süpernatantlardan IL-10, IL-13, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$ sitokin düzeylerine sandviç ELISA yöntemiyle bakıldı.

Florokrom işaretli monoklonal antikorlarla boyama



Süpernatantların ayrılmasından sonra hücreler, flow sitometri tüplerine aktarılıp; PBS ve FACS tamponu ile yıkandı. CD4, CD25, CD127 yüzey antijenlerine karşı florokrom işaretli monoklonal antikorlarla boyandı.

Flow sitometri ile T hücre alt grup analizi



Flow sitometri cihazıyla T hücre alt grup (total T hücre, CD4^+ T hücre, $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T hücre ve $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^-$ (Treg)) analizi yapıldı.

Şekil 3.2. Çalışma protokolü.

Çalışma grubundan heparinli tüplere alınan kan örnekleri hızla laboratuvara ulaştırıldı, 1:1 oranında steril PBS tampon çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra, konik tüpler içerisinde 10 mL ficoll üzerine yayılarak, oda ısısında 2000 rpm'de 20 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası interfaz ayrı bir tüpe alındı ve 2 kez PBS ile 1500 rpm'de yıkandı. Elde edilen hücreler periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) olup, olası eritrosit kontaminasyonu amonyum klorür (NH_4Cl) çözeltisiyle uzaklaştırıldı. Ayrılan PKMH'ler proliferasyon öncesi (0.gün) Akan Hücre Ölçer analizi için hücre yüzeyindeki CD4, CD25, CD127 moleküllerine karşı florokrom işaretli monoklonal antikorlar ile işaretlendi. Bu amaçla, tüp içindeki hücrelerin üzerine ilgili antikorlar eklenerek 20 dak karanlıkta inkübe edildi ve ardından Akan Hücre Ölçer tamponu ile 1500 rpm'de 10 dak yıkama yapılarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Daha sonra Akan Hücre Ölçer cihazıyla analiz gerçekleştirildi. Analizde aktive T ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T) hücre ve Treg ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^-$) hücre oranları saptandı.

0. gün Akan Hücre Ölçer analizi sonrası PKMH'ler ışık mikroskobunda sayılarak, maksimum hücre konsantrasyonu 2×10^7 PKMH/mL olacak şekilde süspanse edildi. Daha sonra 5 μM konsantrasyonda CFSE eklenerek 6 dak karanlıkta, oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonu takiben hücreler 2 kez 1800 rpm'de 5 dak santrifüj edilerek fazla CFSE uzaklaştırıldı. CFSE, hücre membranlarına kovalent bağlanır ve her hücre bölünmesi ile kardeş hücrelere % 50 oranında bölüştürülür, böylece floresan şiddeti her bölünme ile yarı yarıya azalmış olur. CFSE'nin, Akan Hücre Ölçer'in 1. floresan kanalından okunabilmesi sayesinde de hücre proliferasyonu değerlendirilmiş olur.

Yıkama basamaklarının ardından, hücreler ışık mikroskobunda sayılıp 1×10^6 /mL konsantrasyona ayarlanarak zenginleştirilmiş RPMI-1640 kültür medyumuna hücre kültürüne alındı. Elde edilmiş PKMH'ler, hücre kültürü sırasında unstimüle (uyarılmamış / US), 1 mg/mL rFVIII ile uyarılmış (rFVIII) ve pozitif kontrol olarak 5 μg /mL fitohemaglutinin ile uyarılmış (PHA) olacak şekilde 3 koşulda inkübe edildi. Kültür, steril koşullarda, 120 sa, 37°C'de % 5 CO_2 içeren hücre kültürü inkübatöründe gerçekleştirildi. Her bir uygulama için 1×10^6 /mL hücre gerekti ve buna göre deneyler 24 kuyulu plaklarla gerçekleştirildi. Deney boyunca kültür plakları; hücre canlılığı, hücre proliferasyonu ve kültür kontaminasyonu açısından invert mikroskopla belirli aralıklarla incelendi. 120 sa sonra plaktaki hücre kültür süpernatantları (500 μL) toplanarak -80°C derin dondurucuda saklandı. Sitokin ölçümleri süpernatantlar kullanılarak ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi.

3 gruptan alınan ve 3 inkübasyon koşulunda kültüre edilen kuyulardaki hücreler, flow-cell tüplerine toplanıp Akan Hücre Ölçer tamponu ile yıkandı ve ölü hücrelerden,

hücre artıklarından arındırıldı. 120 sa sonunda hücreler 0. gündeki gibi; CD4, CD25, CD127 hücre yüzey moleküllerine karşı florokrom işaretli monoklonal antikorlar kullanılarak işaretlendi. Bu amaçla, tüp içindeki hücrelerin üzerine ilgili antikorlar eklenerek 20 dak karanlıkta inkübe edildi ve ardından Akan Hücre Ölçer tamponu ile 1500 rpm'de 10 dak yıkama yapılarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Akan Hücre Ölçer ile T hücre alt gruplarının proliferatif kapasiteleri incelendi. Sonuçlar proliferasyon yüzdesi olarak değerlendirildi.

Sonuç olarak çalışma 3 hasta grubu ve 3 inkübasyon koşuluna göre,

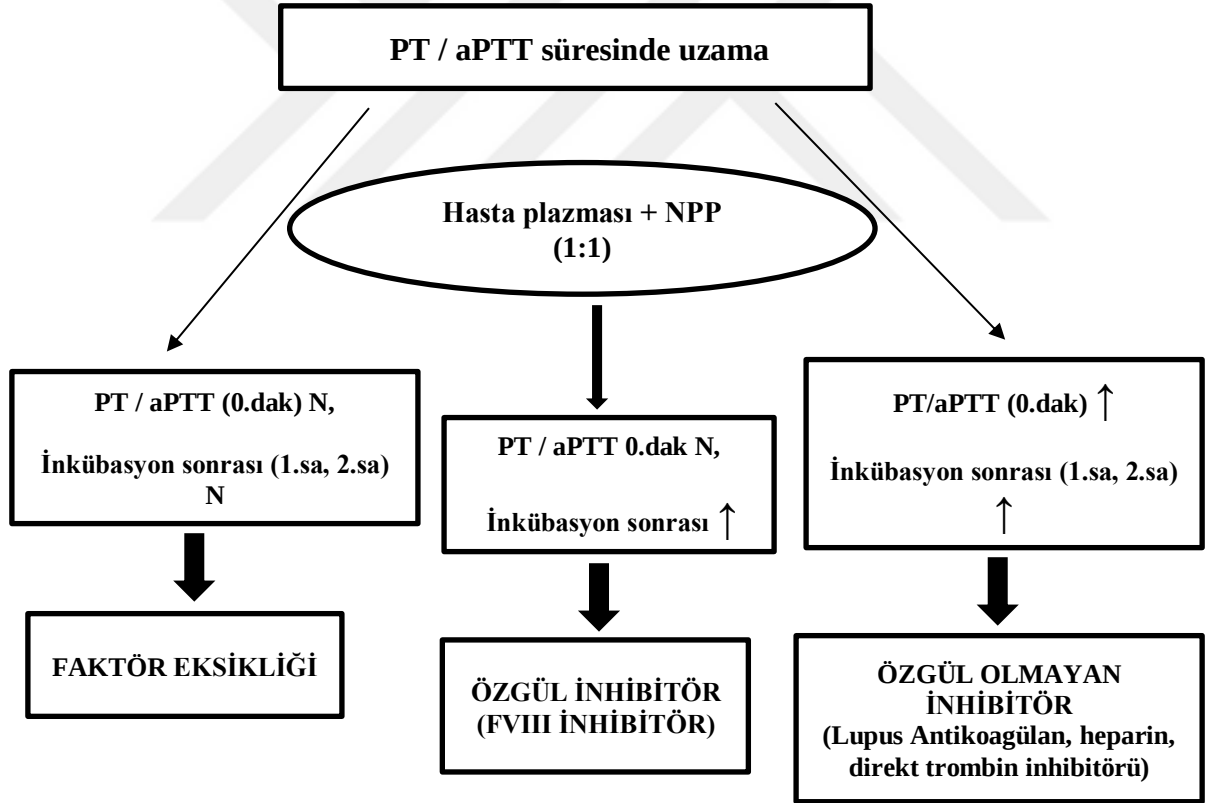
1. **Sağlıklı Kontrol grubu (KONTROL) / Unstimüle Koşul (US):** Sağlıklı kontrol grubundan elde edilen PKMH'lerin inkübe edilmesi,
2. **Sağlıklı Kontrol grubu (KONTROL) / Fitohemaglutinin ile İnkübasyon (PHA):** Sağlıklı kontrol grubundan elde edilen PKMH'lerin pozitif kontrol olarak 5 µg/mL fitohemaglutininle inkübe edilmesi,
3. **Sağlıklı Kontrol grubu (KONTROL) / rFVIII ile İnkübasyon (rFVIII):** Sağlıklı kontrol grubundan elde edilen PKMH'lerin 1 mg/mL rFVIII ile inkübe edilmesi,
4. **İnhibitör Gelişmiş Hemofili A hasta grubu (İNH(+)) / Unstimüle Koşul (US):** Hemofili A hastası ve inhibitör gelişmiş gruptan elde edilen PKMH'lerin inkübe edilmesi,
5. **İnhibitör Gelişmiş Hemofili A hasta grubu (İNH(+)) / Fitohemaglutinin ile İnkübasyon (PHA):** Hemofili A hastası ve inhibitör gelişmiş gruptan elde edilen PKMH'lerin pozitif kontrol olarak 5 µg/mL fitohemaglutininle inkübe edilmesi,
6. **İnhibitör Gelişmiş Hemofili A hasta grubu (İNH(+)) / rFVIII ile İnkübasyon (rFVIII):** Hemofili A hastası ve inhibitör gelişmiş gruptan elde edilen PKMH'lerin 1 mg/mL rFVIII ile inkübe edilmesi,
7. **İnhibitör Gelişmemiş Hemofili A hasta grubu (İNH(-)) / Unstimüle Koşul (US):** Hemofili A hastası ve inhibitör gelişmemiş gruptan elde edilen PKMH'lerin inkübe edilmesi,
8. **İnhibitör Gelişmemiş Hemofili A hasta grubu (İNH(-)) / Fitohemaglutinin ile İnkübasyon (PHA):** Hemofili A hastası ve inhibitör gelişmemiş gruptan elde edilen PKMH'lerin pozitif kontrol olarak 5 µg/mL fitohemaglutininle inkübe edilmesi,
9. **İnhibitör Gelişmemiş Hemofili A hasta grubu (İNH(-)) / rFVIII ile İnkübasyon (rFVIII):** Hemofili A hastası ve inhibitör gelişmemiş gruptan PKMH'lerin 1 mg/mL FVIII ile inkübe edilmesi ile yapıldı.

3.3. Plazmada Yapılan Ölçümler

Plazmada yapılan koagülasyon testlerinden primer tarama testleri (PLT sayı ve işlevi, KZ, TT, PT, aPTT) ve sekonder tanı testleri (FVIII aktivitesi, Bethesda testi) sodyum sitratlı tüplere alınan kan örneklerinde Sysmex CN-6000 koagülasyon otoanalizöründe (Norderstedt, Almanya) çalışıldı.

a) Karışım testi:

Primer tarama testlerinde uzamış izole PT ya da aPTT olan hastalarda PT / aPTT karışım testi yapılır. Karışım testinin yapılaş amacı, esas olarak izole PT / aPTT uzamasında, sebebin faktör eksikliğine mi, yoksa inhibitör varlığına mı bağlı olduğunu ayırt edebilmektir. Bu testin uygulanmasında; ilk aşamada, hasta örneği eşit hacimdeki normal havuz plazma (NPP) ile karıştırılır. 0. dak ve 37°C gerçekleşen inkübasyonun 1. ve 2. sa sonunda PT/aPTT ölçülerek sonuçlar değerlendirilir.



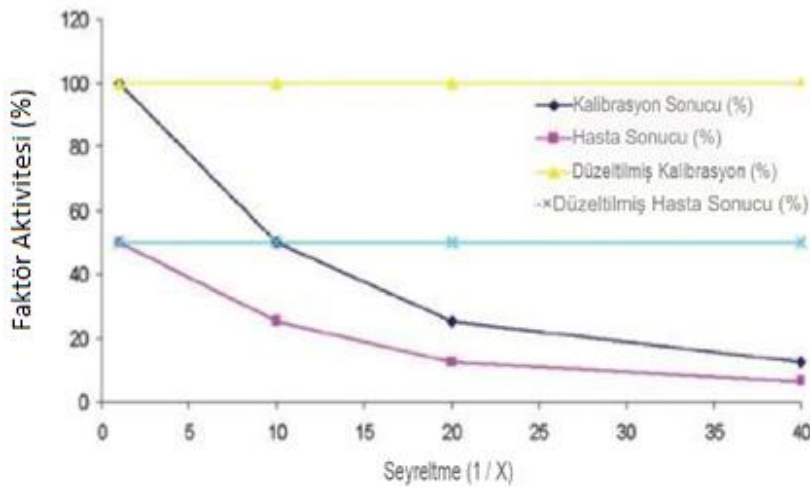
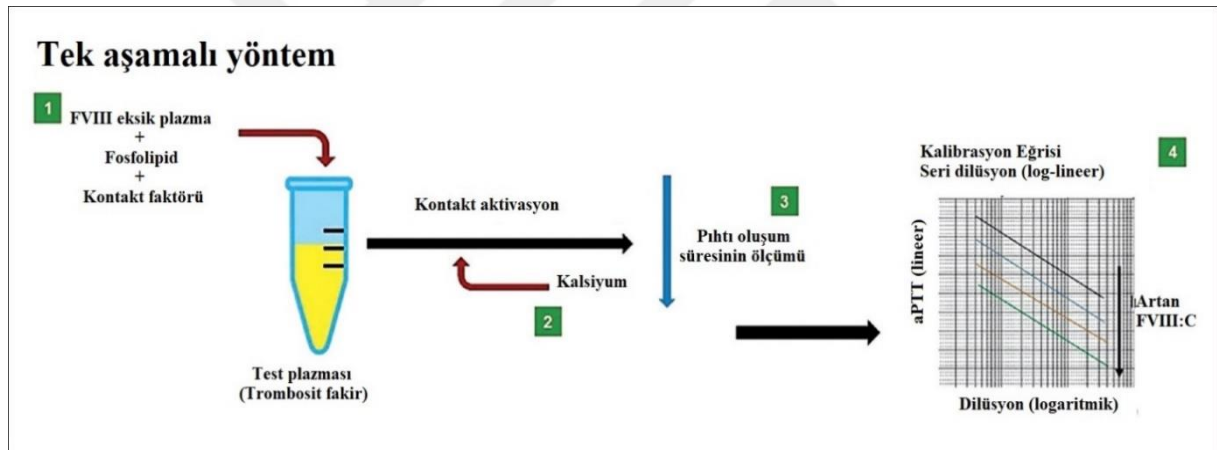
Şekil 3.3.A. İzole PT / aPTT uzamasında uygulanan karışım testinin yorumlanması.

b) Faktör VIII aktivitesi:

Sodyum sitratlı tüplere alınan kan örneklerinde Sysmex CN-6000 koagülasyon otoanalizöründe (Norderstedt, Almanya) “% aktivite” olarak tek aşamalı aPTT bazlı faktör ölçümü (one-stage clotting) yöntemiyle çalışıldı.

Tek aşamalı aPTT bazlı faktör testi; ölçülmek istenen test plazmasının, ölçülecek özgül pıhtılaşma faktörü eksik plazmaya eklenmesini takiben aPTT süresini kısaltması temeline dayanır. aPTT süresindeki düzelme derecesi, test plazmasındaki faktör aktivitesi ile direkt olarak ilişkilidir. Ölçüm, dilüe referans plazmaya karşı kalibre edilir. Özgül pıhtılaşma faktörü eksik plazma ve pıhtılaşma sistemine eklendiğinde ölçüm değeri % 100 olduğu kabul edilen ticari referans plazma standartları kullanılır (1,0 IU/ml). FVIII ölçümü için kullanılan faktör eksik plazma, Hemofili A'lı hastadan elde edilen plazma veya vWF antijen düzeyi ve aktivitesi yeterli olup immünolojik olarak FVIII düzeyi baskılanmış plazmadır.

Bizim çalışmamızda Sysmex CN-6000 koagülasyon otoanalizöründe tek aşamalı aPTT bazlı FVIII ölçümü için Siemens aktin FSL reaktifi, bir yüzey aktivatörü olan ellagik asit ve FVIII-eksik plazma (Siemens, Marburg Almanya) kullanıldı. Bunlara ek olarak Owren'in veronal tamponu ve kalsiyum klorür (CaCl_2) 25 mM kullanıldı.



Şekil 3.3.B. Tek aşamalı aPTT bazlı faktör ölçümü (one-stage clotting yöntemi).

Referans eğriyi oluşturmak üzere, her dilüsyon için normal referans plazma eşit miktarda faktör eksik plazma ile karıştırılarak seri dilüsyonları hazırlanıp; her dilüsyon seviyesinin aPTT süreleri ölçülür. Logaritmik-Lineer grafik kullanılarak, aPTT sonuçları (lineer) y eksenine, dilüsyonlar (logaritmik) x eksenine yerleştirilir. Hasta plazmaları da aynı referans plazmada olduğu gibi eşit hacimde faktör eksik plazma ile karıştırılarak seri dilüe edilip, aPTT ölçümüyle dilüsyonlar grafiğe yerleştirilir. Hasta eğrisinin referans eğriye paralel olması veya ilk eğri üzerinde olması beklenir, paralel olmaması halinde inhibitör varlığı düşünülür.

İnhibitör olması halinde, artan dilüsyonlar ile inhibitör de dilüe olacağından, aPTT'de kısalma beklenir. Ancak bütün dilüsyonlarda pıhtılaşma zamanı uzun bulunursa ve dilüsyonlar da sonucu değiştirmese, FVIII düzeyinin % 1'in altında olduğu düşünülmelidir.

Hasta FVIII aktivitesini hesaplamak için iki eğri kullanılır. Örneğin, normal plazmanın 1:20 dilüsyonu, faktör eksik plazma pıhtılaşma süresini hasta plazmasının 1:5 oranında dilüsyonu ile eşit miktarda kısaltıyorsa, hasta plazması normal aktivitenin % 25'ine sahiptir. Ölçüm sonuçları “% aktivite” olarak ifade edilir.

c) Faktör VIII inhibitör düzeyi:

Sodyum sitratlı tüplere alınan kan örneklerinde Sysmex CN-6000 koagülasyon otoanalizöründe (Norderstedt, Almanya) klasik Bethesda yöntemiyle çalışıldı.

Klasik Bethesda testi

% 100 olan FVIII aktivitesini, % 50'ye düşüren inhibitör düzeyi 1 Bethesda Ünitesi (BU) olarak tanımlanmıştır. Bethesda testi ile; inhibitör içeren hasta plazmasının, FVIII ile inkübe edilmesiyle belli bir zaman içinde nötralize edilen rezidüel FVIII düzeyinin ölçülmesi amaçlanır. Eklenen ve nötralize edilen FVIII ölçülürse plazmada bulunan FVIII inhibitör titresi BU olarak saptanır. Klasik Bethesda yönteminde hasta plazmasının imidazol tamponla artan dilüsyonları (1:2-1:32) yapılır ve eşit hacimde en az 20 sağlıklı bireyden FVIII kaynağı olarak elde edilen NPP ile karıştırılır.

FIX'a karşı gelişen inhibitörler hemen etkiliyken FVIII inhibitörleri zamana bağımlı inhibitörler olduğundan, inhibitörün FVIII'i nötralize etmesi için gerekli olan 2 sa sürede 37°C'de inkübe edilir. FVIII inhibitörü varlığında, “hasta plazması + NPP karışımı”nı takiben hemen ölçülen aPTT değeri (0.dak) normal referans aralığındayken, 2 sa inkübasyon sonrası aPTT süresi tekrar uzar.

Kontrol karışımı (NPP + tampon), FVIII labilitesini kompanse eder. Daha sonra FVIII aktiviteleri ölçülür ve rezidüel faktör aktivitesi hesaplanır. Eklenen FVIII miktarı ve inkübasyon süresinin standardize edilmesiyle, eklenen FVIII'in ne miktarda ortamdan uzaklaştırıldığı hesap edilerek inhibitör miktarı hesaplanır.

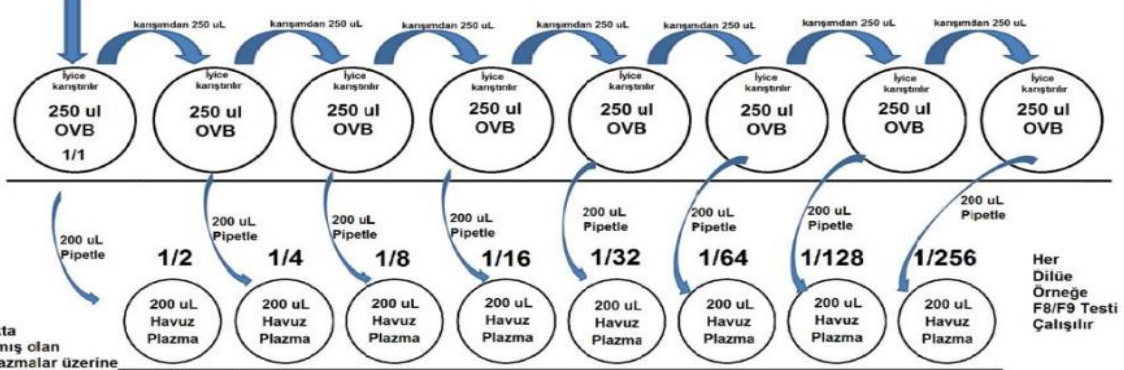
a.

1 8 Adet Eppendorf hazırlanır ve her birine 200er uL Havuz Plazma Pipetlenir



2 8 Adet Daha Eppendorf hazırlanır ve her birine 250 uL OVB Pipetlenir

250 uL Çalışılacak hasta

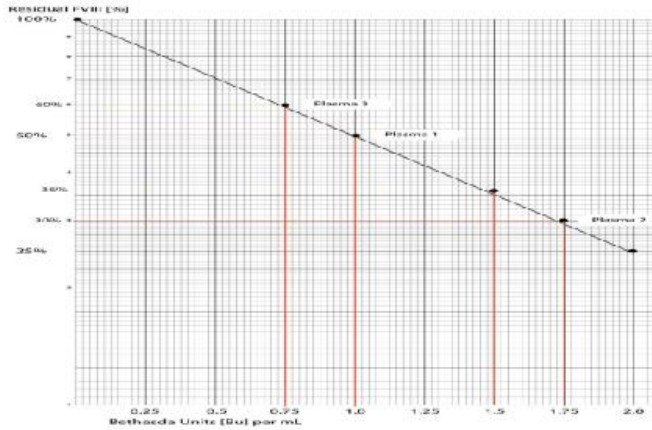


3

Birinci Basamakta Hazırlanmış olan Havuz Plazmalar üzerine

2. Basamakta hazırlanan hasta dilüsyonlarından sırayla 200 er uL pipetlenir ve son dilüsyonlar elde edilir.

b.



Rezidüel Faktör Aktivitesi (%)	Bethesda Ünitesi (BU/mL)	Rezidüel Faktör Aktivitesi (%)	Bethesda Ünitesi (BU/mL)
15	2,76	42	1,25
18	2,50	43	1,22
19	2,42	44	1,19
20	2,35	45	1,16
21	2,27	46	1,12
22	2,19	47	1,09
23	2,12	48	1,06
24	2,06	49	1,03
25	2,00	50	1,00
26	1,95	51	0,97
27	1,89	52	0,94
28	1,84	53	0,92
29	1,79	54	0,89
30	1,74	55	0,86
31	1,69	56	0,84
32	1,65	57	0,81
33	1,60	58	0,78
34	1,56	59	0,76
35	1,51	60	0,73
36	1,48	61	0,71
37	1,44	62	0,69
38	1,40	63	0,66
39	1,36	64	0,64
40	1,32	65	0,62
41	1,29	66	0,60

Şekil 3.3.C. a. Klasik Bethesda testi çalışma ve seri dilüsyon basamakları **b.** Klasik Bethesda testi hesaplama aşamasında kullanılan grafik ve inhibitör titrajını hesaplama tablosu.

Rezidüel Faktör aktivitesi = (Hasta FVIII düzeyi / Kontrol tüp FVIII düzeyi) x 100 formülüyle hesaplanır ve aktivitesi % 50'ye en yakın dilüsyona sahip tüp, inhibitör hesaplanması için kullanılır (% 30-60 aralığında). İnhibitör konsantrasyonu; y ekseninde rezidüel FVIII aktivitesi, x ekseninde inhibitör seviyeleri (BU) bulunan grafik kullanılarak dilüsyon kat sayısı ile çarpılıp inhibitör titresi hesaplanır.

3.4. Hücre Kültür Süpernatantlarında ELISA Yöntemiyle Sitokin Düzeyi Ölçümü

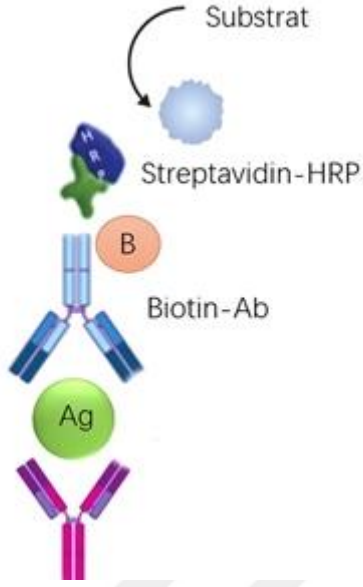
120 sa inkübasyon sonrası elde edilen hücre kültürü süpernatantları -80°C'de saklandı ve sonrasında IL-2, IL-10, IL-13, TNF- α , TGF- β ve IFN- γ sitokinleri Diaclone Research ELISA kitleri ile çalışıldı.

ELISA antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırma temeline dayanan kantitatif bir ölçüm yöntemidir. ELISA yönteminde bir enzim ile işaretli antijen veya antikorlar ölçülecek maddenin tayininde kullanılır. Bu teknik antijenin özgül antikoru bağlaması temeline dayanır. ELISA'da kullanılan enzimler genellikle glukoz oksidaz, alkali fosfataz veya bu çalışmada olduğu gibi peroksidazdır. Serum, plazma ve biyolojik sıvılardaki peptit, hormon veya protein gibi moleküller ELISA yöntemiyle ölçülebilir.

ELISA ile antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aramak mümkündür. Bu çalışmada olduğu gibi antijen aramak için bilinen bir yakalama antikoru plastik bir yüzeye yapıştırılır. Mikro-ELISA sisteminde bu antikor her hasta için kullanılmak üzere oluşturulan çukurların yüzeyine kaplanır. Antijen aranacak hasta serumu bu çukurlara konularak bir süre beklenip yıkanır. Eğer serumda uygun antijen varsa antikorla birleşir. Bir enzim ile işaretlenmiş insan globülin antiserumu (saptama antikoru) eklenip bir süre beklenerek yıkanır. İncelenmekte olan serumda antikora uygun antijen varsa antikora bağlanmış olacağından, bu son eklenen enzim ile işaretlenmiş insan antiglobülini de bağlanacak ve yıkama ile uzaklaştırılamayacaktır. Enzime uygun bir kromojen substrat eklenir. Sisteme bağlanmış enzim bu substratı parçaladığında ortaya çıkan renk, yapılacak kolorimetrik yöntemlerle ölçülerek bağlanmış olan enzim ve dolayısıyla bağlanmış olan antijen düzeyi hakkında fikir verecektir.

Direkt, indirekt, sandviç ve yarışmalı olmak üzere 4 ELISA tekniği mevcuttur. Bu çalışmada sitokin ölçümleri sandviç ELISA yöntemiyle yapıldı. Bu yöntemde biyolojik sıvı içerisindeki antijen, yakalama ve saptama antikorları şeklinde iki tabaka arasında

kaldığından “sandviç” yöntem olarak isimlendirilmiştir. Sandviç ELISA’da yakalama antikorları mikrotitre kabının kuyucuklarının katı fazına immobilize edilir. Bu işlemde, yakalama antikoru plaklara koyulduktan sonra gece boyunca 4°C’de inkübe edilir. Kaplama işlemi tamamlandıktan sonra plaklar PBS ile yıkanır ve BSA ile tamponlanır. Antijen eklemeyen plaklar PBS ile tekrar yıkanır.



Şekil 3.4. Sandviç ELISA yöntemi.

Antijenin eklenmesiyle plaklarda bağlı bulunan yakalama antikorunu antijenin bağlayabilmesi için 37°C’de 90 dak inkübe edilerek antijen-antikor kompleksinin oluşumu sağlanır. İnkübasyon sonrası plaklar yıkanarak bağlanmayan antijenler uzaklaştırılır. Örneklerdeki ve standarttaki sitokinler yakalama antikorlarına bağlanır, yakalanan protein yapıdaki sitokin tespit edilmesi için kuyucuklara özgül saptama antikoru eklenip oda ısısında 1-2 sa tekrar inkübasyon yapılır.

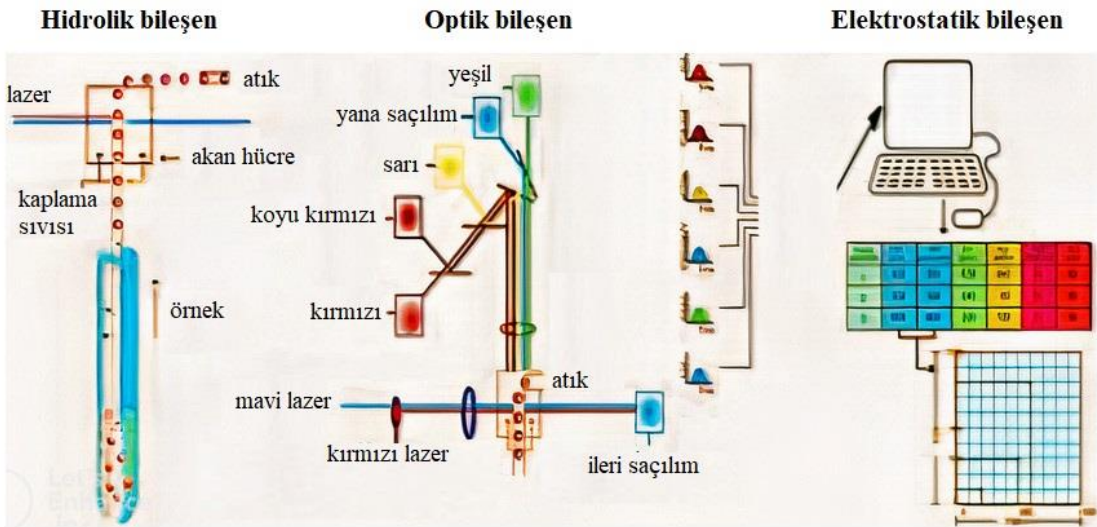
İnkübasyon sonrası tamponla yıkanır ve sekonder enzim-konjuge antikor ortama eklenip yakalama antikoruna bağlanmış antijene farklı bir epitopundan bağlanması sağlanır: Bu çalışmada saptama antikoru tarafından tanınan antijene, yine bu antikor sayesinde biyotinile edilmiş sekonder anti-sitokin antikoru bağlanır ve Horseradish peroksidaz (HRP) enzimi daha sonra kuyulara eklenir. İnkübasyon sonrası plaklar yıkanır ve renklendirme için ortama substrat (TMB substrat) eklenir. Substrat saptama antikoruna bağlı enzimle reaksiyona girerek renk değişimine neden olur. Renk değişimi durdurma solüsyonu olarak sülfürik asit (H_2SO_4) ilavesiyle sonlandırılır ve spektrofotometre ile ölçülür. Hasta örneklerindeki sitokin konsantrasyonu bağlanan streptavidin-HRP kompleksi ve substrattan oluşan ürünün absorptivitesi ile doğru orantılıdır.

3.5. Akan Hücre Ölçer Cihazıyla T Hücre Analizleri

- a) **Akan Hücre Ölçer ile 0.gün T hücre oranlarının ölçümü:** Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından kan alınmasını takiben, 2 sa içinde aktive T ($CD4^+CD25^+$ T) hücre ve Treg ($CD4^+CD25^+CD127^-$) hücre oranları Acea Biosystems Novocyte Akan Hücre Ölçer cihazı (San Diego, ABD) ile ölçüldü.
- b) **Akan Hücre Ölçer ile kültür sonrası T hücre proliferasyon yüzdelerinin ölçümü:** Hücre kültürleri, steril koşullarda, 120 sa, $37^\circ C$ 'de % 5 CO_2 içeren hücre kültürü inkübatöründe gerçekleştirildi. T hücre alt grup (Total PKMH, Total Th hücre, Aktive T hücre, Treg hücre) analizleri Acea Biosystems Novocyte Akan Hücre Ölçer cihazı (San Diego, ABD) ile proliferasyon yüzdesi olarak yapıldı.

Akan Hücre Ölçer (Flow Sitometri)

Akan Hücre Ölçer yöntemi, Türkçe karşılığının ifade ettiği gibi akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi için kullanılır. Akan Hücre Ölçer'in temel yaklaşımı; hücrelerin boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granülarite, yüzey molekülleri, sitoplazmik moleküller açısından değerlendirilmesidir. Bu amaçla hedeflenen yapı ya da hücre önce floresan madde ile işaretli bir antikor veya özel bir boya kullanılarak işaretlenir.



Şekil 3.5.A. Akan Hücre Ölçer cihazının temel bileşenleri.

(Kaynak: <http://www.saujs.sakarya.edu.tr/tr/download/article-file/193275>)

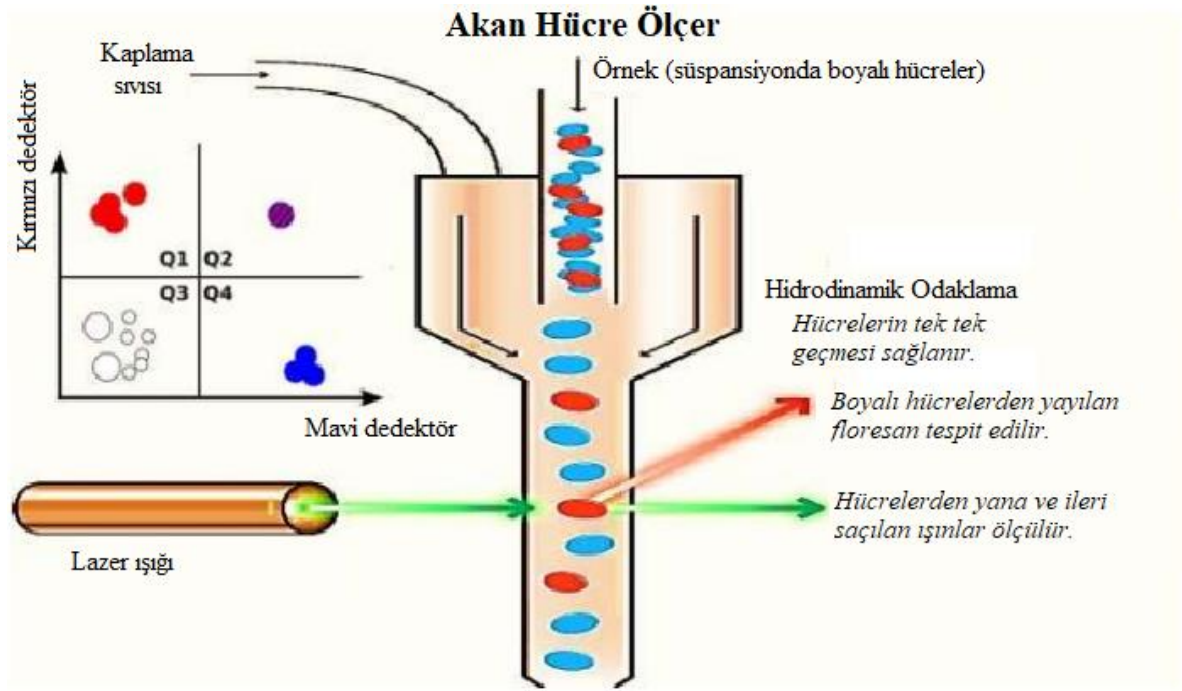
Akan Hücre Ölçer cihazı; akış (sıvı) sistemi, ışık kaynağı (lazer ışını), filtreler, sinyal dedektörleri, bilgisayar ve yazılım programları bileşenlerinden oluşmaktadır. Temel olarak bir Akan Hücre Ölçer cihazında üç temel bileşen bulunur:

1. Hidrolik bileşen, akış sistemidir ve partiküllerin lazer önünden geçişi için taşıyıcı sistem olarak görev almaktadır.
2. Optik bileşen lazer önünden geçen hücrelerden açığa çıkan floresan saçılımının çapraz ve silindirik filtreler ile toplanarak düzgün bir şekilde fotodedektöre aktarılmasında görev almaktadır.
3. Elektrostatik bileşen ise elde edilen optik sinyalin fotomultiplier tüp (PMT) ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çevriminden ve analiz için bilgisayara aktarımından sorumludur.

Hidrolik akış sistemi bir merkezi kanaldan oluşur ve örnek buradan cihaza verilir. Merkezdeki örneği içeren sıvı (laminar akım) ve çevreleyen sıvı birbirine karışmadan ilerler. Bu etkiyle partiküller tek bir sıra şeklinde dizilirler ve bu “*hidrodinamik odaklanma*” olarak isimlendirilir. Böylece lazer ışını aynı anda tek hücreye düşer ve tek hücrenin analizi yapılır. Işın öne doğru yayıldığında tipik olarak lazer ile aynı yönde 20° etrafa yayılan ışınlar ileri saçılım kanal (Forward Scatter Chanel - FSC) dedektörü denilen bir lens yardımıyla toplanır. FSC dedektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi verir. Eksitasyon çizgisine yaklaşık 90° açıyla yayılan ışının ölçülmesi ise yana saçılım kanal (Side Scatter Chanel - SSC) dedektörü ile yapılır. SSC dedektörü partiküllerin granüler içerikleri ve iç yapısı hakkında bilgi verir. Akan Hücre Ölçer floresan yoğunluğuna bağlı olarak süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklüğüne ve granüleritesine göre tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapan bir sistemdir. Süspansiyon halindeki hücreler hava basıncı ile sıvı içinden geçirilir. Sıvının çok hızlı akışı yüksek bir hidrostatik basınç oluşturur ve bu basınçla hücreler cam veya quartzdan yapılmış akış kabine (flow-cell) gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı hücrelerin tek bir sıra halinde lazer kaynağı önünden geçişini sağlar. Hücrelerin analizi için Akan Hücre Ölçer sisteminde FSC, SSC dedektörlerinin yanı sıra floresan (FL-1, FL-2, FL-3 vb.) dedektörler de bulunur.

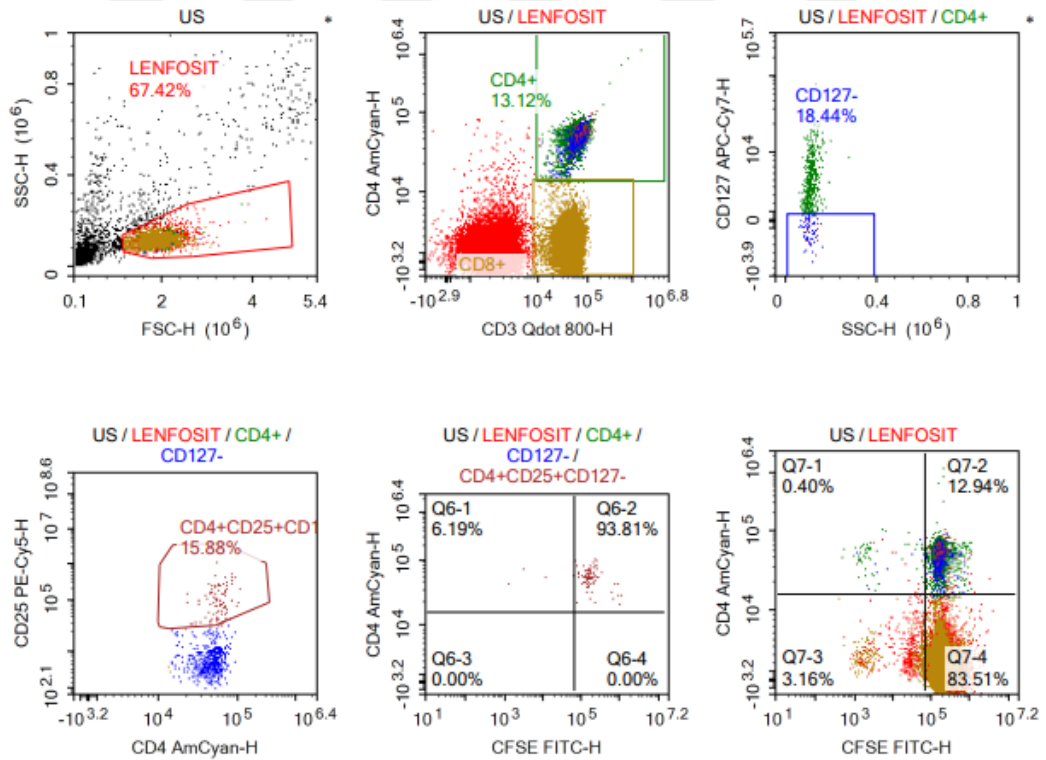
Özetlemek gerekirse temel olarak bir Akan Hücre Ölçer cihazından;

- ileri saçılma grafiği (Forward scatter) ile hücrelerin yaklaşık büyüklüğü,
- yana saçılma grafiği (Side scatter) ile hücrelerin yaklaşık granüleritesi (yoğunluğu),
- floresan grafiği (belli dalga boyuna özgü ışımaya eldesi) ile yaklaşık floresan miktarı hakkında bilgi ediniriz.



Şekil 3.5.B. Akan Hücre Ölçer'in çalışma prensibi.

(Kaynak: <http://www.saujs.sakarya.edu.tr/tr/download/article-file/193275>)



Şekil 3.5.C. Akan Hücre Ölçer ile T hücrelerinin proliferatif yanıt analizleri için bir örnek.

3.6. İstatistiksel Analiz

Yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen sonuçlar ortalama (ort) $\pm$ standart sapma (SD), ortanca / minimum- maksimum (min-maks) ve çeyrekler açıklığı (Interquartile aralık / Q1-Q3) olarak değerlendirildi. Bir parametre verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Gruplar arası karşılaştırmalar, normal dağılım gösteren değişkenlerde one-way ANOVA testi ve post-hoc Tukey/Tamhane testleri ile, normal dağılım göstermeyen değişkenlerde ise Kruskal-Wallis testi ile; koşullar arası karşılaştırmalar, normal dağılım gösteren değişkenlerde paired-T test, normal dağılım göstermeyen değişkenlerde ise Wilcoxon testi ile yapıldı. Korelasyona normal dağılım gösteren parametrelerde Pearson, normal dağılmayan parametrelerde Spearman testi ile bakıldı.

4. BULGULAR

Hasta ve kontrol gruplarındaki olgulardan elde edilen veriler;

- Demografik ve Klinik Özelliklerle İlgili Bulgular,
 - Koagülasyon Testlerinden Elde Edilen Bulgular,
 - Kültür Öncesi Akan Hücre Ölçer Analizlerinden Elde Edilen Bulgular,
 - Kültür Sonrası Akan Hücre Ölçer Analizlerinden Elde Edilen Bulgular,
 - ELISA ile Yapılan Sitokin Düzeylerinin Analizinden Elde Edilen Bulgular,
 - Korelasyon Analizleri
- şeklinde sunuldu.

4.1. Demografik ve Klinik Özelliklerle İlgili Bulgular

Çalışmamıza 10 inhibitör gelişmiş ağır Hemofili A hastası (İNH(+)), 10 inhibitör gelişmemiş ağır Hemofili A hastası (İNH(-)) ve 10 sağlıklı kontrol (KONTROL) katıldı.

Tablo.4.1. Hasta gruplarının demografik ve klinik özellikleri.

Hasta Grubu	İNH(+)	İNH(-)	KONTROL
Hasta Sayısı (n)	10	10	10
Yaş (yıl) (Ortalama $\pm$ SD)	34,7 $\pm$ 18,3	19,8 $\pm$ 14,8	34 $\pm$ 7,39
Tanı Yaşı (ay) (Ortanca / Min-Max)	12 / 1-120	9 / 1-84	-
İnhibitör Saptandığındaki Hasta Yaşı	11 / 1-38	-	-
Ailede Hemofili A Öyküsü	6/10	5/10	-
Ailede İNH(+) birey varlığı	0/10	0/10	-
Hayati organ kanama öyküsü	1/10	0/10	-
Yürüme Bozukluğu	9/10	4/10	-
Yoğun FVIII maruziyet öyküsü	8/10	4/10	-
Devam eden mevcut tedavi	4 fitusiran, 2 rFVIIa, 1'er hasta emicizumab, aPCC, marstacimab, concizumab	FVIII	-

Hastaların yaş ortalaması $29,2 \pm 15,8$ 'dir. İNH(+) grubun yaş ortalaması $34,7 \pm 18,3$; İNH(-) grubun yaş ortalaması $19,8 \pm 14,8$; KONTROL grubunun yaş ortalaması $34 \pm 7,39$ bulundu. Gruplar arasında yaş ortalamaları bakımından anlamlı bir fark yoktur ($p = 0,064$).

**One-way ANOVA / post-Hoc Tukey*

Hastalardan İNH(+) grupta 6'sının İNH(-) grupta 5'inin ailesinde Hemofili A öyküsü varken; hiçbir hastanın ailesinde inhibitör gelişmiş birey yoktur. İNH(+) grupta bir hastanın inhibitör gelişiminden bugüne birkaç yıl geçmişken diğer hastalarda en az 15 yıllık inhibitör geçmişi vardır.

4.2. Koagülasyon Testlerinden Elde Edilen Bulgular

4.2.1. FVIII aktivite düzeyleri

İNH(+) ve İNH(-) Hemofili A hastalarının takipleri sırasında en düşük FVIII aktivitesi düzeyleri sırasıyla $0,34 \pm 0,3$ ve $0,27 \pm 0,18$ bulundu ve gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p = 0,796$). Her iki hasta grubu da ağır Hemofili A olarak sınıflandırılabilir.

4.2.2. FVIII inhibitör titreleri

İNH(+) grup için FVIII inhibitör titresi pik düzeyleri ortanca değeri 20,8 (min 4, maks 114) BU bulundu.

Tablo.4.2. Hasta gruplarının FVIII düzeyleri ve inhibitör titreleri.

FVIII düzeyi	Ortalama ± SD		p
İNH(+)	0,34 ± 0,3		0,796
İNH(-)	0,27 ± 0,18		
İnhibitör titresi	Ortanca	Min-Maks	
İNH(+)	20,8	4-114	

**Mann Whitney U*

4.3. Kültür Öncesi Akan Hücre Ölçer Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

Hasta serumlarından elde edilen PKMH'lerinin kültür öncesi CD4, CD25 ve CD127 moleküllerine karşı florokrom işaretli monoklonal antikorlar ile işaretlenmesi sonucu Aktive T (CD4⁺CD25⁺ T) ve Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T) hücre oranları Akan Hücre Ölçer cihazıyla analiz edildi.

i. Aktive T hücre oranları:

İNH(+) grupta % $1,21 \pm 0,63$; İNH(-) grupta % $1,99 \pm 0,98$; KONTROL grubunda ise % $0,58 \pm 0,24$ bulundu. İNH(-) grupta İNH(+) gruba göre daha yüksek bulunmasına rağmen anlamlı fark saptanmadı ($p = 0,224$). İNH(-) grupta KONTROL grubuna göre anlamlı yüksek bulundu (% $1,99 \pm 0,983$ vs % $0,58 \pm 0,24$; $p < 0,001$). İNH(+) grupta KONTROL grubuna göre yüksek olmasına rağmen anlamlı değildi ($p = 0,068$). *Kruskal Wallis*

ii. Treg hücre oranları:

arasındaysa anlamlı fark saptanmadı ($p = 0,795$). *Kruskal Wallis*

Tablo 4.3. Kültür öncesi 0. gün Akan Hücre Ölçer analizleri ile Aktive T ve Treg hücre oranları (%).

T hücre grubu	Hasta grubu	Ortalama $\pm$ SD	Ortanca	Q1-Q3	Min-Maks
Aktive T hücre (CD4 ⁺ CD25 ⁺ T)	İNH(+) (n=10)	$1,21 \pm 0,63$	1	0,85-1,24	0,5-2,4
	İNH(-) (n=10)	$1,99 \pm 0,98^*$	1,7	1,35-2,3	0,9-4,1
	KONTROL (n=8)	$0,58 \pm 0,24$	0,52	0,4-0,75	0,31-1
Treg hücre	İNH(+) (n=10)	$14,27 \pm 4,46$	14,7	9,29-18,3	8,5-19,7
	İNH(-) (n=10)	$14,85 \pm 8,95$	12,3	7,23-23,12	4,5-32
	KONTROL (n=8)	$12,89 \pm 6,87$	12	10-12,7	5-28,7

*kontrol grubuna göre anlamlı yüksek ($p < 0,001$) *Kruskal Wallis*

4.4. Kültür Sonrası Akan Hücre Ölçer Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

İlk gün elde edilen PKMH'lerin US, rFVIII ve PHA ile 3 koşulda 120 sa inkübe edilip CD4, CD25 ve CD127 moleküllerine karşı florokrom işaretli monoklonal antikorlar ile işaretlenmesi sonucu Total PKMH hücre, Total Th (CD4⁺ T) hücre, Aktive T (CD4⁺CD25⁺ T) hücre ve Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T) hücre proliferasyon yüzdeleri Akan Hücre Ölçer cihazıyla analiz edildi.

i. Unstimüle koşulda gerçekleşen kültür ortamında;

Total PKMH hücre proliferasyon yüzdeleri en fazla İNH(+) grupta saptanmasına rağmen anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,788$). *Kruskal Wallis*,

Total Th hücre proliferasyon yüzdeleri İNH(-) grupta KONTROL grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($0,72 \pm 0,38$ vs $0,31 \pm 0,24$; $p = 0,023$). *Kruskal Wallis*,

Aktive T hücre proliferasyon yüzdeleri İNH(-) grupta, İNH(+) gruptan anlamlı yüksek bulundu ($3,82 \pm 1,9$ vs $1,99 \pm 0,93$; $p = 0,01$). Ayrıca İNH(+) grupta KONTROL grubuna göre anlamlı yüksekti ($1,99 \pm 0,93$ vs $1,52 \pm 0,76$; $p = 0,001$). *One-way ANOVA/ Tukey*,

Treg hücre proliferasyon yüzdeleri İNH(-) grupta KONTROL grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($4,1 \pm 7,5$ vs $6,66 \pm 3,74$; $p = 0,032$). *Kruskal Wallis*.

ii. rFVIII ile uyarılmış kültür ortamında;

Total PKMH hücre proliferasyon yüzdelerinde gruplar arası anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,664$). *Kruskal Wallis*,

Total Th hücre proliferasyon yüzdeleri İNH(-) grupta KONTROL grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($0,64 \pm 0,32$ vs $0,29 \pm 0,19$; $p = 0,005$). İNH(+) grupta KONTROL grubuna göre yüksek olmasına rağmen anlamlı değildi ($p = 0,081$). İNH(+) ve İNH(-) arasındaysa anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,46$). *One-way ANOVA/ Tukey*,

Aktive T hücre proliferasyon yüzdeleri İNH(-) grupta, İNH(+) gruptan anlamlı yüksek bulundu ($3,53 \pm 1,85$ vs $1,68 \pm 0,88$; $p = 0,04$). Ayrıca İNH(-) grupta KONTROL grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($3,53 \pm 1,85$ vs $1,57 \pm 0,96$; $p = 0,031$). *One-way ANOVA/ Tamhane*,

Treg hücre proliferasyon yüzdelerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,371$). *Kruskal Wallis*.

iii. PHA ile uyarılmış kültür ortamında;

Total PKMH hücre proliferasyon yüzdelerinde gruplar arası anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,191$). *Kruskal Wallis*,

Total Th hücre proliferasyon yüzdeleri hem İNH(+) hem de İNH(-) grupta KONTROL grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($34,9 \pm 9,0$ vs $21,2 \pm 5,9$; $p = 0,023$ ve $33,6 \pm 15,2$ vs $21,2 \pm 5,9$; $p = 0,041$). İNH(+) ve İNH(-) grupları arasındaysa anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,963$). *One-way ANOVA/ Tukey*,

Aktive T hücre proliferasyon yüzdelerinde, hem İNH(+) hem de İNH(-) grupta KONTROL grubuna göre yüksek olmasına rağmen anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,064$ ve $p = 0,11$). *One-way ANOVA/ Tamhane*,

Treg hücre proliferasyon yüzdelerinde gruplar arası anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,247$). *Kruskal Wallis*.

Tablo 4.4. Kültür sonrası Akan Hücre Ölçer analizleri ile T hücre proliferasyon yüzdeleri (%).

Koşul	T hücre alt grubu	Hasta grubu (n=10)	Ortalama $\pm$ SD	Ortanca	Q1-Q3	Min-Maks
US	Total PKMH	İNH(+)	$5,25 \pm 6,32$	3,4	1,78-4,99	1,46-22,6
		İNH(-)	$2,88 \pm 1,26$	2,62	2,01-3,32	1,48-5,87
		KONTROL	$3,28 \pm 2,58$	2,38	1,92-3,97	1,36-10,1
	Total Th hücre ($CD4^+$ T)	İNH(+)	$0,62 \pm 0,44$	0,43	0,39-0,69	0,31-1,75
		İNH(-)	$0,72 \pm 0,38^{*a}$	0,68	0,65-0,83	0,17-1,52
		KONTROL	$0,31 \pm 0,24$	0,25	0,2-0,33	0,07-0,91
	Aktive T hücre ($CD4^+CD25^+$ T)	İNH(+)	$1,99 \pm 0,93^{*a}$	2,3	0,9-2,67	0,55-3,03
		İNH(-)	$3,82 \pm 1,9^{*b}$	4,1	2,56-5,03	0,23-6,69
		KONTROL	$1,52 \pm 0,76$	1,51	0,87-2,22	0,58-2,79
	Treg	İNH(+)	$3,1 \pm 2,73$	2,63	1,09-4,61	0-8,42
		İNH(-)	$4,1 \pm 7,5^{*c}$	0,69	0-1,85	0-19,9
		KONTROL	$6,66 \pm 3,74$	6,11	4-10,5	1,41-11,6
rFVII	Total PKMH	İNH(+)	$5,32 \pm 5,75$	3,6	1,75-5,71	1,54-20,9
		İNH(-)	$2,96 \pm 1,2$	2,72	2,08-3,9	1,41-5,32
		KONTROL	$3,04 \pm 1,62$	2,62	1,83-4,02	1,38-6,93
	Total Th hücre ($CD4^+$ T)	İNH(+)	$0,41 \pm 0,13$	0,39	0,35-0,5	0,25-0,64
		İNH(-)	$0,64 \pm 0,32^{*a}$	0,63	0,43-0,67	0,25-1,32
		KONTROL	$0,29 \pm 0,19$	0,26	0,18-0,32	0,04-0,73

PHA	Aktive T hücre (CD4 ⁺ CD25 ⁺ T)	İNH(+)	1,68 ± 0,88	1,73	0,93-2,12	0,48-3,11
		İNH(-)	3,53 ± 1,85 ^{*a,b}	3,78	2,64-5,19	0,35-5,96
		KONTROL	1,57 ± 0,96	1,6	0,88-2,28	0,19-3,03
	Treg	İNH(+)	5,71 ± 3,92	5,99	3,16-7,55	0-12,5
		İNH(-)	4,61 ± 7,68	1,45	0-2,5	0-22
		KONTROL	6,65 ± 5,41	7,36	1,32-11	0-15,4
	Total PKMH	İNH(+)	83,8 ± 8,6	86,5	76,0-90,6	69-93,5
		İNH(-)	75,6 ± 26,5	84,5	81-89,8	5,48-91,8
		KONTROL	77,2 ± 9,0	75,9	68,7-85,2	66,5-90,3
	Total Th hücre (CD4 ⁺ T)	İNH(+)	34,9 ± 9,0 ^{*a}	32,9	31,8-41,4	20-49
		İNH(-)	33,6 ± 15,2 ^{*a}	33,6	27,5-41,4	2,2-61,2
		KONTROL	21,2 ± 5,9	19,7	16,9-25,8	14,8-33,5
	Aktive T hücre (CD4 ⁺ CD25 ⁺ T)	İNH(+)	23,8 ± 10,4	26,5	12,2-30,7	7,08-40,3
		İNH(-)	26,8 ± 15,9	25,7	13,1-37	7,14-59,2
		KONTROL	14,2 ± 5,3	13,0	12-17,8	6,21-23,1
	Treg	İNH(+)	86,5 ± 8,6	89,8	76,7-92,9	72,7-94,7
		İNH(-)	76,2 ± 24,5	84,1	80,4-88,5	11,2-91,4
		KONTROL	78,5 ± 13,6	80,2	65,8-90,8	55,4-92,7

^{*a}, kontrol grubuna göre yüksek ($p < 0,05$),

^{*b}, İNH(+) grubu göre yüksek ($p < 0,05$),

^{*c}, kontrol grubuna göre düşük ($p < 0,05$),

US koşuldaki hücre oranları ile kıyaslandığında;

i. Kültür ortamına rFVIII eklenmesi,

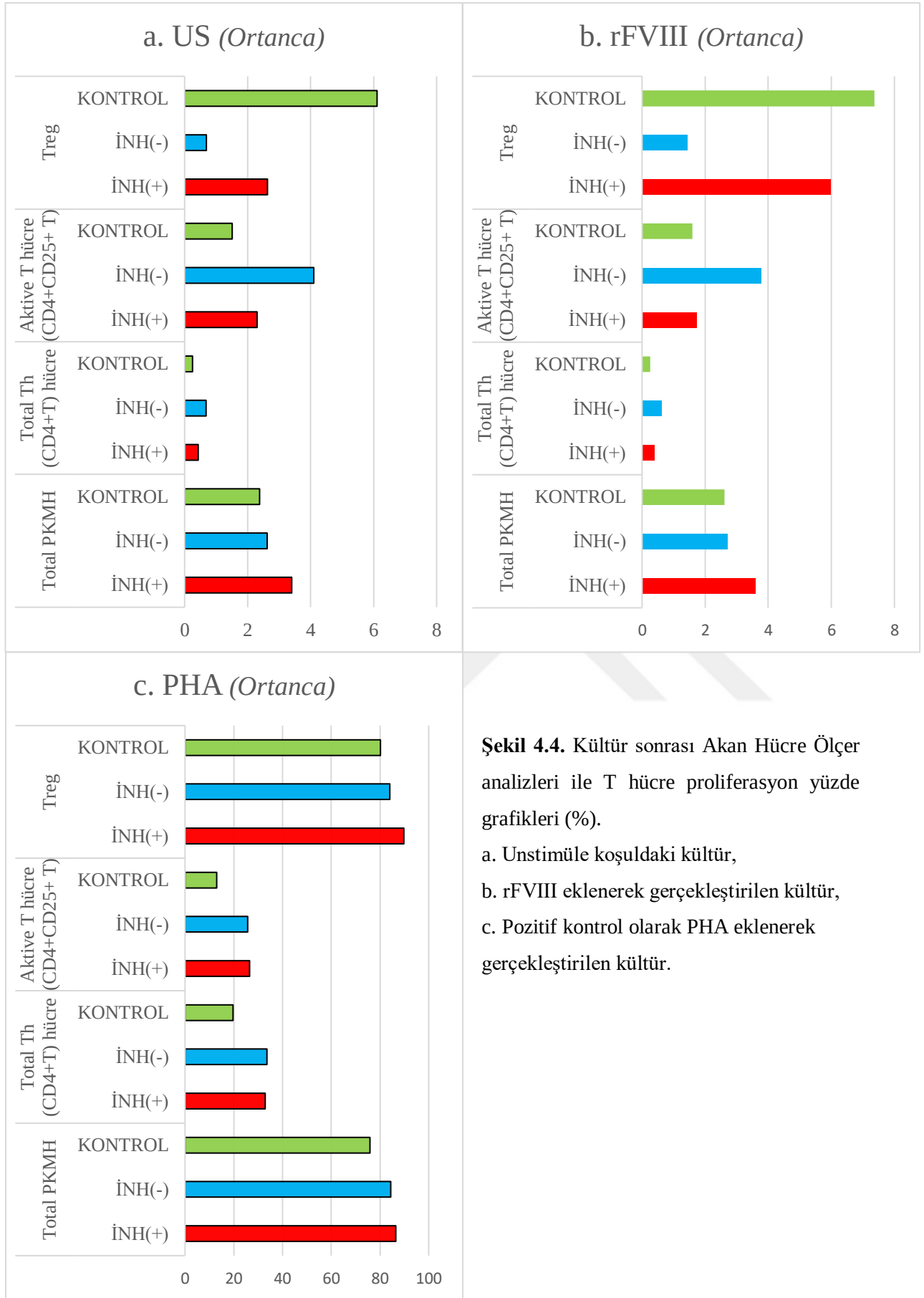
Total PKMH hücre proliferasyon yüzdelerinde anlamlı bir değişime neden olmadı ($p = 0,651$),

Total Th hücre proliferasyon yüzdelerinde anlamlı olmamasına rağmen İNH(+) ve İNH(-) gruplarında azalma olurken ($p = 0,102$ ve $p = 0,202$) kontrol grubunda değişim olmadı ($p = 0,721$). *Wilcoxon*,

Aktive T hücre proliferasyon yüzdelerini İNH(+) grupta anlamlı olarak azaltırken ($1,99 \pm 0,93$ vs $1,68 \pm 0,88$; $p = 0,032$), İNH(-) ve KONTROL gruplarında anlamlı değişime neden olmadı,

Treg hücre proliferasyon yüzdelerini İNH(+) grupta anlamlı olarak arttırırken ($3,1 \pm 2,73$ vs $5,71 \pm 3,92$; $p = 0,05$), İNH(-) ve KONTROL gruplarında anlamlı değişime neden olmadı,

ii. Kültür ortamına PHA eklenmesi ise beklendiği gibi tüm hasta gruplarında ve tüm T hücre alt gruplarında proliferasyonu uyardı ($p < 0,001$).



4.5. ELISA ile Yapılan Sitokin Düzeylerinin Analizinden Elde Edilen Bulgular

3 koşulda gerçekleştirilen kültür ortamlarından elde edilen süpernatantlardan sitokin düzeyleri sandviç ELISA yöntemiyle analiz edildi. Sağlıklı kontrol (KONTROL) grubunda 10 örneğin hepsi çalışılmadı. IL-2 ve IFN- γ sitokin düzeyi analizleri ile; PHA eklenerek yapılan kültür ortamında IL-13 ve TNF- α sitokin düzeyi analizlerinden güvenilir veriler elde edilemediği için çalışma dışı bırakılıp istatistiklere dâhil edilmedi.

i. Unstimüle koşulda gerçekleşen kültür ortamında;

TGF- β sitokin düzeyleri İNH(+) grupta İNH(-) gruba göre anlamlı düşük bulundu ($136,8 \pm 8,7$ vs $147,7 \pm 8,6$; $p < 0,05$). *One-way ANOVA/ Tukey*,

IL-10 sitokin düzeyleri İNH(+) grupta KONTROL grubuna göre düşük olmasına rağmen anlamlı değildi ($4,31 \pm 6,69$ vs $20,6 \pm 17,6$; $p = 0,141$). İNH(-) grupta KONTROL grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($2,78 \pm 5,46$ vs $20,6 \pm 17,6$; $p = 0,008$). *Kruskal Wallis*,

IL-13 ve TNF- α sitokin düzeylerinde ise gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,944$, $p = 0,901$) *Kruskal Wallis*.

ii. rFVIII eklenerek gerçekleşen kültür ortamında;

TGF- β sitokin düzeylerinde, gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,626$, $p = 0,583$, $p = 0,987$). *One-way ANOVA/ Tukey*,

IL-10 sitokin düzeyleri İNH(+) grupta KONTROL grubuna göre düşük olmasına rağmen anlamlı değildi ($3,94 \pm 6,11$ vs $22 \pm 19,8$; $p = 0,057$). İNH(-) grupta KONTROL grubuna göre ise anlamlı düşük bulundu ($3,29 \pm 6,5$ vs $22 \pm 19,8$; $p < 0,05$). *Kruskal Wallis*,

IL-13 ve TNF- α sitokin düzeylerinde ise gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,061$, $p = 0,863$) *Kruskal Wallis*.

iii. Pozitif kontrol olarak PHA ilavesi ile gerçekleşen kültür ortamında;

TGF- β sitokin düzeylerinde, gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p = 0,784$; $p = 0,105$; $p = 0,298$). *One-way ANOVA/ Tukey*,

IL-10 sitokin düzeyleri hem İNH(+) grupta hem de İNH(-) grupta KONTROL grubuna göre anlamlı düşük bulundu ($86,4 \pm 84$ vs $209,1 \pm 77$; $p = 0,016$ ve $58,4 \pm 42,2$ vs $209,1 \pm 77$; $p = 0,007$). *Kruskal Wallis*.

Tablo 4.5. Kültür sonrası süpernatantlardaki sitokin düzeyleri (pg/mL).

Koşul	Sitokin (pg/mL)	Hasta Grubu	Ortalama $\pm$ SD	Ortanca	Q1-Q3	Min-Maks
US	IL-10	İNH(+) (n=10)	4,31 $\pm$ 6,69	0,71	0,3 $\pm$ 6,61	0,3-20,4
		İNH(-) (n=10)	2,78 $\pm$ 5,46 ^{*a}	0,3	0,3 $\pm$ 0,37	0,3-16,1
		KONTROL (n=5)	20,6 $\pm$ 17,6	12,2	7,36 $\pm$ 32,4	5,25-45,5
	IL-13	İNH(+) (n=10)	3,65 $\pm$ 2,45	2,62	1,98 $\pm$ 4,28	1,56-9,61
		İNH(-) (n=10)	9,62 $\pm$ 14,1	2,9	1,57 $\pm$ 6,18	1,41-39,2
		KONTROL (n=7)	12,5 $\pm$ 18,2	3,88	1,4 $\pm$ 14,8	1,31-51,8
	TNF- α	İNH(+) (n=10)	96 $\pm$ 88,5	75,2	48,3 $\pm$ 83,6	29,7-330,8
		İNH(-) (n=10)	187,7 $\pm$ 259,5	53	34,4 $\pm$ 291	24,2-808,6
		KONTROL (n=7)	171,9 $\pm$ 296,8	36	31,3 $\pm$ 119,4	29,8-838,8
	TGF- β	İNH(+) (n=10)	136,8 $\pm$ 8,7	138,6	133,1 $\pm$ 141,4	116-148,2
		İNH(-) (n=10)	147,7 $\pm$ 8,6 ^{*b}	149,6	141,6 $\pm$ 151,3	134,3-164,5
		KONTROL (n=7)	145,5 $\pm$ 11,1	140,2	136,2 $\pm$ 155,5	134,6-163,4
rFVII	IL-10	İNH(+) (n=10)	3,94 $\pm$ 6,11	0,3	0,3 $\pm$ 7,5	0,3-18,8
		İNH(-) (n=10)	3,29 $\pm$ 6,5 ^{*a}	0,3	0,3 $\pm$ 0,3	0,3-18,6
		KONTROL (n=5)	22 $\pm$ 19,8	16,3	4,8 $\pm$ 37	3,92-48,1
	IL-13	İNH(+) (n=10)	3,13 $\pm$ 1,84	2,75	1,72 $\pm$ 4,47	1,13-6,89
		İNH(-) (n=10)	6,45 $\pm$ 7,42	3,26	1,5 $\pm$ 6,34	1,37-23,5
		KONTROL (n=6)	11,9 $\pm$ 8,74	10,7	4,58 $\pm$ 18,4	2,11-24,9
	TNF- α	İNH(+) (n=10)	39,8 $\pm$ 11,2	41,2	27,6 $\pm$ 47,3	24,8-58,2
		İNH(-) (n=10)	125,5 $\pm$ 251,4	44	32,3 $\pm$ 65	24,1-838,8
		KONTROL (n=6)	224,1 $\pm$ 332,1	37,4	28,3 $\pm$ 381	22,1-838,8
	TGF- β	İNH(+) (n=10)	138,6 $\pm$ 7,5	138,7	130,8 $\pm$ 143,2	128,4-152,6

PHA		İNH(-) (n=10)	134,5 ± 10,5	134,5	124,4 ± 143	120-148,4
		KONTROL (n=7)	133,8 ± 11,1	136,4	122 ± 140,4	115,3-146,7
		İL-10				
	İL-10	İNH(+) (n=10)	86,4 ± 84 ^{*a}	39,7	23,5 ± 186,3	14,9-218,2
		İNH(-) (n=10)	58,4 ± 42,2 ^{*a}	51,4	35,3 ± 85,5	0,56-146,5
		KONTROL (n=7)	209,1 ± 77	246,6	124,5 ± 260,5	74-262,9
	TGF-β	İNH(+) (n=10)	144,9 ± 9,1	145	137,3 ± 151,4	133,4-159
		İNH(-) (n=10)	148,7 ± 9,2	149,5	139,6 ± 153,9	137,4-165,2
		KONTROL (n=7)	158 ± 19,2	152,7	143,5 ± 170,7	136,5-192,5

^{*a}, kontrol grubuna göre düşük ($p < 0,05$),

^{*b}, İNH(+) gruba göre yüksek ($p < 0,05$),

US koşuldaki sitokin düzeyleri ile kıyaslandığında,

i. Kültür ortamına rFVIII eklenmesi;

TGF-β sitokin düzeylerini İNH(+) grupta değiştirmeyenken, İNH(-) grupta ($147,7 \pm 8,6$ vs $134,5 \pm 10,5$; $p = 0,007$) ve KONTROL grubunda ($145,5 \pm 11,1$ vs $133,8 \pm 11,1$; $p = 0,031$) anlamlı olarak azalttı. *Paired T test*,

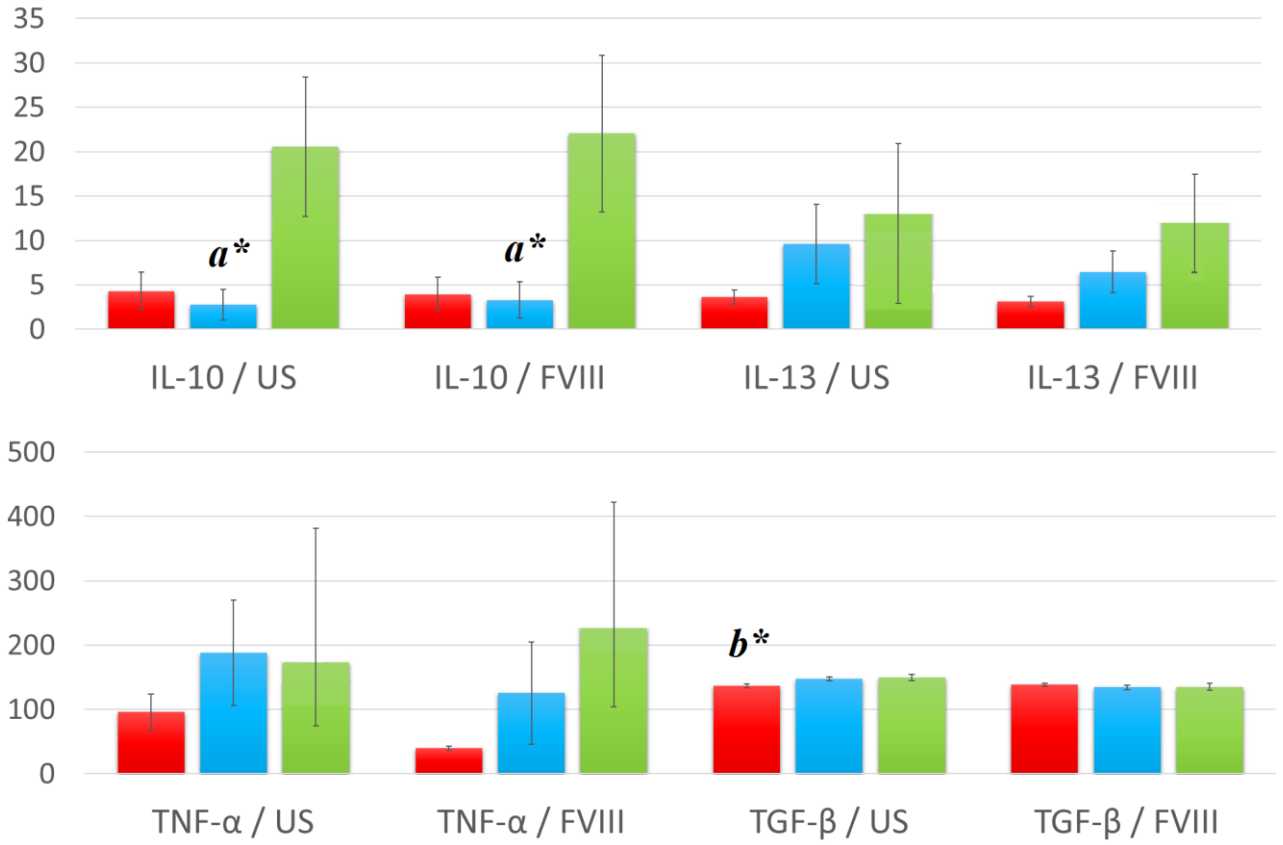
TNF-α sitokin düzeylerini İNH(+) grupta anlamlı olarak azaltırken ($96 \pm 88,5$ vs $39,8 \pm 11,2$; $p = 0,007$), İNH(-) grupta ve KONTROL grubunda anlamlı değişime neden olmadı. *Wilcoxon*

İL-10 ve IL-13 sitokin düzeylerinde anlamlı değişime neden olmadı ($p = 0,733$; $p = 0,657$). *Wilcoxon*.

ii. Kültür ortamına PHA eklenmesi;

İL-10 sitokin düzeylerini tüm gruplarda anlamlı arttırdı ($p < 0,05$). *Wilcoxon*,

TGF-β düzeyini anlamlı olmamakla birlikte arttırdı ($p = 0,918$). *Paired T test*.



Şekil 4.5. Kültür sonrası süpernatantlardaki sitokin düzeylerinin hasta grupları arası karşılaştırması.

■ İNH(+) grup
■ İNH(-) grup
■ KONTROL grubu

a*: KONTROL grubuna göre anlamlı düşük $p < 0,05$;

b*: İNH(-) gruba göre anlamlı düşük $p < 0,05$.

4.6. Korelasyon Analizleri

Hem US hem de rFVIII eklenerek gerçekleştirilen kültür ortamlarında Treg hücre oranları; IL-10, IL-13, TNF- α sitokin düzeyleriyle korele bulundu ($p < 0,05$). *Spearman*.

TGF- β sitokin düzeyleriyse T hücre alt gruplarından herhangi birisiyle korele bulunmadı. *Pearson*.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hemofili A hastalarında replasman tedavisinin en önemli komplikasyonu, tedaviyi etkisizleştirerek kanamaların tekrarlamasına sebep olan, morbidite ve mortaliteyi arttıran, aynı zamanda tedavi maliyetlerini yükselten inhibitör antikor gelişimidir. Bu inhibitörler FVIII aktivitesini nötralize ederek tedaviyi inefektif hale getirir. İnhibitör antikorların oluşumunda tedaviye başlama yaşı, hastalığın ciddiyeti, inflamatuvar olaylar, tedavi dozu, genetik faktörlerle ilgili bir grup çalışma ve görüş mevcuttur (55, 119). Son yıllarda, Treg hücreler aracılığıyla düzenlenen sitotoksik aktivitenin düzenlenmesinden sorumlu IL-2, IL-10, TGF- β , TNF- α , CTLA-4 ve bunları kodlayan genlerdeki polimorizmlerin inhibitör gelişimini hazırlayan risk faktörleri arasında olduğu gösterilmiştir (115). İnhibitör gelişiminin en az 4-5 kez FVIII uygulamasını takiben geliştiğini gösteren deneysel hemofili çalışmalarının tümünün amacı, yaşamları boyunca tekrarlayan FVIII enjeksiyonları yaptırmak zorunda olan hemofili hastalarında inhibitör gelişimini önleyecek veya geciktirecek alternatif immünoterapilere katkıda bulunmak ve hastaların yaşam kalitesini arttırmaktır (120).

FVIII inhibitör antikorların, genellikle IgG4 alt grubunda bazen de IgG1 ve IgG2 alt gruplarında olduğu gösterilmiştir (104). İnhibitör antikor gelişen hastalara bu komplikasyonun sonuçlarını ortadan kaldırmak üzere aylar süren immün tolerans tedavisi uygulanır (90). Ancak immün tolerans tedavisi bu hastaların ancak % 70'inde başarılı sonuç vermektedir (121, 122). Son yıllarda, inhibitör gelişen Hemofili A hastalarında FVIII'in daha düşük dozda ve daha az sıklıkla uygulanmasını sağlayan, aktif FIX ve aktif FX karşı etkili ve FVIII fonksiyonunu taklit eden monoklonal bispesifik antikor emisizumab, FVIII tedavisine alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır (123, 124). Ayrıca bu hastalar için FVIII gen tedavisi ile ilgili gelişmeler de sürmektedir. Ancak tüm bu gelişmelere rağmen inhibitör antikorların oluşum mekanizmasını ortaya koyacak ve bu antikorların oluşumunun önlenmesini sağlayacak çalışmalar önemini korumaktadır.

Hemofili A hastalarında inhibitör antikorların oluşumu, esas olarak doğal immün sistemin desteği ile klasik T hücre bağımlı adaptif immün cevaba bağlı gelişir. CD4⁺ T hücrelerini kapsayan birbirini uyaran bir dizi olaylar zinciri; CD4⁺ T hücrelerinin FVIII ile uyarımını, foliküler CD4⁺ T hücreleri aracılığı ile B hücre matürasyonunu, bu hücrelerden sitokin sekresyonunu, B hücrelerin plazma hücrelerine diferansiyasyonunu ve FVIII'e özgül antikor sentezini içerir (125). İnsan kan örnekleri ve hemofili hayvan modelleri

üzerinde FVIII'e özgül CD4⁺ T hücre cevaplarını araştıran birçok çalışma yapılmıştır (126, 127). Hemofilide olduğu gibi terapötik amaçla kullanılan diğer proteinlere karşı antikor oluşumunda da, Th hücrelerine bağımlı mekanizma ile immün cevabın başlatıldığı ve T hücrelerin aktivasyonunu takiben Treg hücrelere geçişin aktif süpresyon ile immün toleransın stimülasyonu için esas olduğu gösterilmiştir. Antijenle uyarımı takiben CD4⁺ T hücreleri, başta Th1 ve Th2 hücreleri olmak üzere farklı gruplara farklılaşır ve bu hücreler sekrete ettikleri sitokinlerle fonksiyonlarını gerçekleştirir (128).

Treg hücreleri, immün tolerans gelişiminde vücuda giren yabancı antijenlere karşı dengeli otoimmün ve alloimmün cevabın gelişiminde kritik önemi olan hücrelerdir (129). Bu hücreler sentezledikleri sitokinler ile immün cevabın düzenlenmesine katılırlar. Silveira ve ark., Th1 hücrelerinin FVIII'e karşı gelişen immün cevapta başlangıçta etkili rol oynadığını, Th2 hücrelerinin ise güçlü inhibitör antikor cevabından sorumlu olduğunu bildirilmişlerdir (110). Th1 hücreleri IFN- γ , IL-2 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinleri sentezleyerek ASH aktivasyonunu sağlar ve immün cevabın oluşumunu hızlandırırlar. Bu sitokinlerin ayrıca IgG1 ve IgG2 gibi antikorları sentezleyen B hücrelerini stimüle edici etkileri de vardır. Th2 hücreleri ise, IL-4 ve IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinleri eksprese ederek, aktive olan Th1 hücrelerini ve ASH'leri baskılayıcı etki gösterir. Hu ve ark., terapötik olarak kullanılan FVIII'in öncelikle Th1 hücrelerini sensitize ettiğini ve Th2 hücrelerinin aktivasyonu için de Th1 hücrelerinden sekrete edilen sitokinlere bağlı proinflamatuvar etkiye gereksinim olduğunu göstermişlerdir (120). Kan ürünlerinin kullanımına bağlı HIV ile infekte olan hemofili hastalarında, CD4⁺ T hücre sayılarının baskılanmasının inhibitör titre düzeylerinde azalmaya sebep olması, ancak etkin bir antiviral tedaviyi takiben bu hastalarda inhibitör düzeylerinin tekrar arttığının gösterilmesi, inhibitör oluşumundaki CD4⁺ T hücrelerinin kritik önemini vurgulayan önemli bir çalışmadır (101). Ancak hemofili hastalarında inhibitör gelişiminde proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin, hücre içi sinyal yollarının, patogenezdaki rollerini araştıran çalışmaların sonuçları halen tartışmalıdır (130). Normal fetal ve neonatal gelişim sırasında kendi dokusuna tolerans geliştirerek, kendi antijenini tanıyan birçok T hücresinin timusta yok edildiği veya anerjik hale geldiği bilinmektedir. Ancak sağlıklı kişilerin kanlarında az miktarda da olsa FVIII'e reaktif T hücrelerinin saptanması, timik medullar hücrelerin gerçekleştirdiği negatif seleksiyonunun tam olmadığını ortaya koymaktadır (131). Hemofili hastalarında, FVIII replasman tedavisinin bu hastaların immün profillerinde değişikliklere sebep olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (132). Ayrıca son yıllarda; düzensiz, aralıklı FVIII

uygulamasının, T hücre aktivasyonunu bozarak atipik Treg hücre aktivitesine ve inhibitör oluşumuna sebep olabileceği gösterilmiştir (120).

İnhibitör gelişen hemofili hastalarının inflamatuvar durumu, doğal immün cevabın düzenlenmesinde hastaların tedaviye cevabını etkileyen önemli faktörlerden biridir. Kanama bölgesinde tehlike sinyallerinin varlığı, ASH matürasyonunu uyarır ve anti-FVIII immün cevabın oluşumu için gereklidir. Mikro-ortamda bu sinyallerin bulunması, immün sistemi nötralize edici immün cevabı başlatır veya reglatuvar mekanizmayı aktive eder. Ciddi FVIII eksikliğine bağlı eklemlerde gelişen, aktif veya sessiz kanamalarla ortaya çıkan patofizyolojik olayların; kanama olan dokudan salgılanan TNF- α , IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinler ve diğer inflamatuvar mediatörler aracılığıyla düzenlenlendiği gösterilmiştir. Zhang ve ark., hemartrozu takiben 3-30 gün içinde ciddi TNF- α up-regülasyonunu ve eklemde TNF- α birikimini saptamışlardır (133). Yapılan çalışmalar Th1 hücrelerinden sekrete edilen TNF- α 'nın, FVIII'e karşı gelişen immün cevapta başlatıcı rol oynadığını ve yüksek inhibitör titresi oluşumundan ise Th2 hücrelerinin sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (120, 134). Chaves ve ark. yaptıkları çalışmada, inhibitör antikor gelişiminden antiinflamatuvar ve reglatuvar ortamı sağlayan sitokinlerin sorumlu oldukları görüşünü savunmuşlardır (132). Ancak prokoagülan etkisi olduğu bilinen FVIII'in, tehlike sinyali oluşturarak mı anti-FVIII immün cevabı başlattığı tam olarak açıklanamamıştır. Ciddi kanamalar veya cerrahi girişimler nedeniyle yoğun FVIII tedavisi alan hemofili hastalarında, FVIII'e karşı inhibitör gelişme prevalansının arttığını gösteren çalışmalar vardır (55).

Bizim çalışmamızda, total Th (CD4⁺ T) hücre, aktive T (CD4⁺CD25⁺ T) hücre ve Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T) hücre oranlarının ve bu hücrelerden eksprese edilen proinflamatuvar ve antiinflamatuvar/reglatuvar sitokin düzeylerinin, inhibitör gelişimindeki rollerinin incelenmesi amacıyla, PKMH hücre kültüründe, 3 grup ve 3 çalışma koşulunda inceleme yapıldı. Çalışmamızın sonuçlarına göre, aktive T (CD4⁺CD25⁺ T) hücre düzeyleri kültür öncesi ve sonrası inhibitör gelişmiş ve gelişmemiş hasta gruplarında sağlıklı kontrol grubuna göre artmış bulundu. Bu hücre grubu hem 0. günde hem de unstimüle koşuldaki kültür ortamında inhibitör gelişmemiş grupta gelişmiş gruba göre yüksek saptandı. Ayrıca aktive T hücrelerin mutajene (PHA eklenen kültür koşulu) yanıtları, hasta gruplarında sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksekti. Treg hücre oranları kültür öncesi en düşük sağlıklı kontrol grubunda bulunurken, unstimüle ve rFVIII eklenerek oluşturulan kültür ortamlarında Treg proliferasyon yüzdeleri hasta gruplarına (özellikle inhibitör gelişmemiş hemofili olgularında daha belirgin olmak üzere) göre

sağlıklı kontrol grubunda yüksek bulundu. Total Th ($CD4^+$ T) hücre proliferasyon yüzdeleri özellikle inhibitör gelişmemiş hemofili olgularında daha belirgin (anlamli) olmak üzere hasta gruplarında kontrol gruplarına göre yüksekti. Total PKMH proliferasyon yüzdeleri ise özellikle inhibitör gelişmiş hemofili olgularında tüm koşullarda sağlıklı kontrolden daha yüksekti. Tüm bunların yanında ortama rFVIII eklenmesinin diğer 2 grupta anlamli bir değişime neden olmazken inhibitör gelişmiş grupta proliferasyon yüzdeleri aktive T ($CD4^+$ $CD25^+$ T) hücrelerde anlamli olarak azaltırken, Treg hücrelerde anlamli olarak arttırması dikkat çekiciydi.

Hemofili A'da, FVIII'e karşı immün cevabın aktivasyonundaki olası farklılıkları araştırmak için proinflamatuvar ve antiinflamatuvar / düzenleyici sitokinlerin, toplu olarak plazma düzeylerinin ölçüldüğü sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu konudaki eski çalışmalardan birinde Treg hücrelerin aktivasyonlarını takiben IL-10, TGF- β , IL-5, IFN- γ , GM-CSF düzeylerinin arttığı; IL-2 ve IL-4 düzeylerinin ise azaldığı gösterilmiştir (135). Bizim çalışmamızda da, unstimüle koşulda, TGF- β ve IL-10 sitokin düzeylerinin gruplar arasında anlamli farklılıklar gösterdiği; inhibitör gelişmiş Hemofili A hastalarında TGF- β düzeyinin inhibitör gelişmemiş gruptan anlamli olarak düşük olduğu, IL-10 düzeylerinin 3 koşul için de iki hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olduğu halde sadece inhibitör gelişmemiş hastalarda düşüklüğün anlamli olduğu gösterildi. Özellikle unstimüle koşulda IL-10 düzeyleri, inhibitör gelişmiş grupta gelişmemiş gruba göre yüksekti. Kültürün rFVIII eklenerek yapılması, inhibitör gelişmiş grupta diğer 2 gruptan farklı olarak; TGF- β düzeyini değiştirmezken, TNF- α düzeyini anlamli olarak azalttı. Özellikle inhibitör gelişmiş grupta total Th ($CD4^+$ T) hücre ve aktive T ($CD4^+$ $CD25^+$ T) hücrelerinden sekrete edilen antiinflamatuvar / reglatuvar karakterdeki IL-10 sitokininin düzeyindeki azalmanın rFVIII inkübasyonu ile daha belirginleşmesi, süpresif etkinin azalmasına bağlı inhibitör antikor gelişiminin sebeplerinden biri olabileceğini düşündürmektedir. Hasta gruplarında özellikle Treg hücreler tarafından sentezlenen regülasyonda etkili IL-10 ve özellikle Th2 hücreleri tarafından sentezlenen IL-13 sitokin düzeylerinin sağlıklı kontrol grubundan düşük; özellikle Th1 tarafından sentezlenip inflamasyon yönünde etki gösteren TNF- α sitokinin ise daha yüksek düzeyde olması da dikkat çekiciydi. Bizim çalışmamıza benzer şekilde PKMH kültür süpernatatlarında IL-10, IFN- γ ve TGF- β 1 düzeylerinin incelendiği Towfighi ve ark.'larının çalışmasında, Hemofili A hastalarında IFN- γ düzeyi normal bireylere göre anlamli düşük bulunmuş, TGF- β 1 ve IL-10 düzeyleri ise sağlıklı bireylerden anlamlilik oluşturmaya da yüksek bulunmuştur.

Aynı çalışmada inhibitör gelişen ve gelişmeyen gruplar arasında sitokin düzeyleri arasında anlamlı fark gözlenmemiş, ayrıca FVIII ile inkübasyon uygulamasının sitokin konsantrasyonlarında değişime sebep olmadığı saptanmıştır (113). Towfighi ve ark. tarafından saptanan, PHA uygulamasının 3 sitokini de stimüle etmesi bizim çalışmamızda da özellikle IL-10 sitokini için gözlemlendi (113). Chaves ve ark., hücre içi nötrofil TNF- α ve monosit IL-10 düzeylerindeki değişimlerini değerlendirdikleri çalışmalarında, bizim bulgularımıza benzer şekilde rFVIII ve pd-FVIII stimülasyonu ile inhibitör gelişen hemofili grubunda monosit IL-10 düzeylerinin inhibitör gelişmeyen gruba ve kontrol grubuna göre azalmış olduğunu, farklı olarak hücre içi nötrofil TNF- α düzeylerinin de azaldığını göstermişlerdir (132). Bu çalışma sonuçları ile inhibitör gelişen olgularda antiinflamatuvar / regulatuvar immün cevaba geçişi vurgulamışlar, ayrıca IL-10'un T-B hücre etkileşimini takiben humoral immün cevap oluşumundaki ve IgG4 sekresyonun artmasındaki rolünü göstermişlerdir (132). Oliveira ve ark., proinflamatuvar sitokin düzeylerinin ve antiinflamatuvar sitokinlerden IL-5 düzeyinin inhibitör gelişen Hemofili A hastalarında gelişmeyenlere göre daha düşük olduğunu; diğer antiinflamatuvar karakterdeki sitokinlerden IL-4 ve IL-10 düzeylerinin ise gruplar arasında farklı olmadığını göstermişlerdir (109). Silveira ve ark. inhibitör gelişen Hemofili A hastalarında daha düşük TNF- α ve IL-5 düzeyleri saptamışlardır (110). Bizim çalışmamızda inhibitör gelişmiş 10 olgumuzdan 9'u 15 yıldan daha fazla inhibitör pozitifliği nedeniyle takip edilmektedir. Karim ve ark. inhibitör gelişen grubu yeni ve uzun süreli inhibitör gelişmiş şeklinde ayrı değerlendirdikleri çalışmalarında, bizim bulgularımızın aksine FVIII maruziyetini takiben 16., 24. ve 48. saatlerde IL-1 β , TNF- α düzeylerinin yeni inhibitör gelişmiş hastalarda arttığını; bizim bulgularımıza paralel olarak IL-10 ekspresyonunun tüm gruplarda artarken sadece uzun süredir inhibitörü olan grupta artmadığını bildirmişlerdir (136). Çalışmamızda nispeten yeni inhibitör gelişmiş tek olguda TNF- α düzeyi, diğer inhibitör gelişmiş hastaların ortalama TNF- α düzeyinden 3 kat fazla; IL-10 düzeyi ise grup ortalamasından daha düşük olduğu bulundu ve TNF- α konsantrasyonunda FVIII uygulaması ile yaklaşık % 85 baskılanma izlendi. Hu ve ark., Th (CD4⁺ T) hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, hastanın immün durumuna göre proliferen olan CD4⁺ T hücrelerinin farklı fenotipik özellik gösterdiğini ortaya koymuşlar ve inhibitör gelişen hastalardan elde edilen T hücre blastlarının IL-4 artışı ile Th2 yolağına ve IFN- γ artışı ile Th1 yolağına polarize olduğunu; inhibitör gelişmeyen hastalardan elde edilen T hücre blastlarının ise, IFN- γ artışı ile Th1 ve TGF- β üreten hücrelerin yönünde geliştiğini saptamışlardır (120). Yine aynı çalışma, endojen veya tedavi amaçlı kullanılan FVIII'in

farklı CD4⁺ T hücre alt gruplarını aktive ettiğini ve immünomodülatör rolü olan TGF- β 1 sentezleyen CD4⁺ T hücrelerinin ancak uzamış FVIII'e maruz kalma sonucu aktive olabileceğini ortaya koymuştur (120). Ciddi Hemofili A hastalarında kalıcı FVIII düzeyinin olmamasının FVIII'e özgül Th hücre aktivitelerinin bozulmasına sebep olarak antikör oluşumuna zemin hazırladığı hipotezi kurulmuştur (120).

Yapılan çalışmalar arasındaki farklılıklar kültür süpernatantları veya intrasellüler sitokin düzeylerinin ölçümünden kaynaklanan yöntem farklılığı, hastaların inhibitör pozitiflik süresi, uygulanan FVIII tedavisinin tipi ve kullanılan doz değişikliklerinden kaynaklanabilir. Karim ve ark., yeni inhibitör olgularında proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α , eski inhibitörlü olgularda ise TGF- β konsantrasyonundaki değişimleri vurgulamışlardır. Bizim inhibitör gelişmiş 10 olgumuzdan sadece tek bir hastanın inhibitörü yeni gelişmiş olup, diğer olgular en az 15 yıl ve üzerinde inhibitör pozitifliği nedeniyle takip edilen ve zaman zaman immün tolerans tedavisi alan hastalardır. Bu nedenle bu çalışmada uzun süredir inhibitörü pozitif hastalarda; Th1 hücrelerinin dominans gösterdiği proinflamatuvar sitokin aşamasının izlenemediği, Th2 hücre hakimiyetinin olduğu ve bu hücrelerden sekrete edilen IL-10 ve TGF- β sitokinlerindeki değişimlerin uzun süreli inhibitör varlığına bağlı immün cevaptaki değişimi açıkladığı düşünülmektedir.

Çalışmamızın sonuçları inhibitör antikör gelişiminde literatürde bu konuda yapılan çalışmaları destekleyen proinflamatuvar ortamdan reglatuvar / antiinflamatuvar immün ortama geçişin izlendiği, primer ve sekonder immün cevabın birbiri içine girdiği bir mekanizmaya işaret etmektedir. İnhibitör gelişiminin önlenmesi ve geciktirilmesini amaçlayan deneysel ve klinik çalışmaların birarada yürütülmesiyle, birtakım önlemlerin zamanında alınması sağlanarak çocukluk çağından itibaren FVIII tedavisi almak zorunda olan ve tedavinin komplikasyonlarına bağlı risklerle karşı karşıya kalan hastaların yaşam kalitelerinin artması sağlanacak, aynı zamanda tedavi maliyetlerinin kontrolü de gerçekleştirilecektir. Bu çalışmayı takiben planlanacak çalışmalarda, farklı FVIII tedavi tipleri ve inhibitör gelişimi açısından farklı sürelerde pozitifliği olan hastaların ayrı gruplar halinde değerlendirilmesinin daha aydınlatıcı olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- 1- <http://www.geocities.ws/drhakkiacikalinupto/makcoytiptter2.htm>
- 2- Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**. 1964; 145:1310–1312.
- 3- Robers HR, Monroe DM, Escobar MA. Current concepts of hemostasis. *Anesthesiology* 2004;100:722-730. <http://dx.doi.org/10.1097/00000542-200403000-00036>
- 4- Schenone M, Furie BC, Furie B. The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol* 2004;11:272-277. <http://dx.doi.org/10.1097/01.moh.0000130308.37353.d4> PMID:15314527
- 5- Atalan N. Derleme Hemostaz. Göğüs Kalp Damar Anestezi Derneği Dergisi. Cilt 19. sf 109-112, 2013.
- 6- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373–376.
- 7- Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014 Sep-Oct; 58(5): 515–523.doi: 10.4103/0019-5049.144643.
- 8- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91:3527–61. [PubMed] [Google Scholar]
- 9- Triplett DA. Coagulation and bleeding disorders: Review and update. *Clin Chem*. 2000;46:1260–9. [PubMed] [Google Scholar]
- 10- Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Research*. 2004; 114:447-53. [PubMed] [Google Akademik]
- 11- Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology: Enhanced E-Book. 11th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2010. Hemostasis and blood coagulation; pp. 457-9.
- 12- Monroe DM, 3rd, Hoffman M, Roberts HR. Williams Hematology. 8th ed. New York NY: McGraw-Hill Professional Publishing; 2010. Molecular biology and biochemistry of the coagulation factors and pathways of hemostasis; pp. 614–6.
- 13- Manly DA, Boles J, Mackman N. Role of tissue factor in venous thrombosis. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:515–25.
- 14- Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É (July 2011). "Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions". *Physiological*

Reviews. 91 (3): 931–72.

- 15- Cesarman-Maus, G, Hajjar KA. Molecular basis of fibrinolysis. *British Journal of Haematology* 2005;129:307-321.
- 16- Cesarman-Maus G, Ríos-Luna NP, Deora AB, Huang B, Villa R, del Cravioto MC, et al. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood* 2006; 107(11):4375–4382.
- 17- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM (November 1984). "Characterization of the human factor VIII gene". *Nature*. 312 (5992): 326–30. Bibcode:1984 Natur.312-326G. doi:10.1038/312326a0. PMID 6438525
- 18- Sudhakar K, PJ Fay. Effects of Copper on the Structure and Function of Factor VIII Subunits: Evidence for an Auxiliary Role for Copper Ions in Cofactor Activity. *Biochemistry* 1998, 37, 19, 6874–6882. Publication Date: April 28, 1998. <https://doi.org/10.1021/bi980084c>
- 19- von Willebrand EA (1926). Hereditary pseudohaemophilia. *Haemophilia*. May 1999. 5 (3): 223–31, discussion 222. doi:10.1046/j.1365-2516.1999.00302.x
- 20- Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1989; 264:19514–19527.
- 21- Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV (March 2015). "von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends". *Blood*. 125 (13): 2019–28. doi:10.1182/blood-2014-06-528406. PMID 25712991.
- 22- Purvis AR, Sadler JE. A covalent oxidoreductase intermediate in propeptide-dependent von Willebrand factor multimerization. *J Biol Chem* 2004; 279:49982–49988.
- 23- Vischer UM, Wagner DD. von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies. *Blood* 1994; 83:3536–3544.
- 24- Johnsen J, Lopez JA. VWF secretion: what's in a name? *Blood* 2008; 112:926–927.
- 25- Giblin JP, Hewlett LJ, Hannah MJ. Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood* 2008; 112:957–964.
- 26- Zhou YF, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA (12 July 2012). "Sequence and structure relationships within von Willebrand factor". *Blood*. 120 (2): 449–58. doi:10.1182/blood-2012-01-405134.
- 27- R. Kulkarni, J.M. Soucie. Pediatric hemophilia: a review. *Semin Thromb Hemost*, 37

(2011), pp. 737-744.

- 28- G.R. Jayandharan, A. Srivastava, A. Srivastava. Role of molecular genetics in hemophilia: from diagnosis to therapy. *Semin Thromb Hemost*, 38 (2012), pp. 64-78.
- 29- P.M. Mannucci. Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. *Haemophilia*, 14 (Suppl. 3) (2008), pp. 10-18.
- 30- G.C. White, C.W. McMillan, H.S. Kingdon, C.B. Shoemaker. Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia. *N Engl J Med*, 320 (1989), pp. 166-170.
- 31- M. Franchini, G. Lippi. Recombinant FVIII products. *Semin Thromb Hemost*, 36 (2010), pp. 537-549.
- 32- Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia*. 2020; 26:1-158.
- 33- Ar MC, Balkan C, Kavaklı K. Extended Half-Life Coagulation Factors: A New Era in the Management of Hemophilia Patients. *Turk J Hematol* 2019;36:141-154.
DOI: 10.4274/tjh.galenos.2019.2018.0393.
- 34- M W Hilgartner, G L Knatterud. The use of factor eight inhibitor by-passing activity (FEIBA immuno) product for treatment of bleeding episodes in hemophiliacs with inhibitors. *Blood*, 1983 Jan;61(1):36-40.
- 35- M. Franchini. The use of desmopressin as a hemostatic agent *Am J Hematol*, 82 (2007), pp. 731-735.
- 36- P. Das, M. Carcao, J. Hitzler. DDAVP-induced hyponatremia in young children. *J Pediatr Hematol Oncol*, 27 (2005), pp. 330-332.
- 37- Callaghan MU, Negrier C, Paz-Priel I, Chang T, Chebon S, Lehle M, et al. Long-term outcomes with emicizumab prophylaxis for hemophilia A with or without FVIII inhibitors from the HAVEN 1-4 studies. *Blood*. 2021 Apr 22;137(16):2231-2242.
doi: 10.1182/blood.2020009217.
- 38- Shapiro AD, Angchaisuksiri P, Astermark J, Benson G, Castaman G, Chowdary P, et al. Subcutaneous concizumab prophylaxis in hemophilia A and hemophilia A/B with inhibitors: phase 2 trial results. *Blood*. 2019;134(22):1973-1982.
- 39- Chowdary P. Inhibition of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) as a treatment for haemophilia: rationale with focus on Concizumab. *Drugs*. 2018;78(9):881-890.
- 40- Leebeek FWG, Miesbach W. Gene therapy for hemophilia: a review on clinical benefit, limitations, and remaining issues. *Blood*. 2021 Sep 16;138(11):923-931.

doi: 10.1182/blood.2019003777.

- 41- Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, Seehafer J, Kirchgesser M, Haack A, Olek K, Tuddenham EG, Oldenburg J. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost.* 1995;74:1402–1406. doi: 10.1055/s-0038-1649954.
- 42- J. Astermark. Overview of inhibitors. *Semin Hematol*, 43 (2 Suppl. 4) (2006), pp. S3-S7.
- 43- Whelan SF, Hofbauer CJ, Horling FM, Allacher P, Wolfsegger MJ, Oldenburg J, Male C, Windyga J, Tiede A, Schwarz HP, Scheiflinger F, Reipert BM. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood.* 2013;121:1039–1048. doi: 10.1182/blood-2012-07-444877.
- 44- Hofbauer CJ, Whelan SF, Hirschler M, Allacher P, Horling FM, Lawo JP, Oldenburg J, Tiede A, Male C, Windyga J, Greinacher A, Knobl PN, Schrenk G, Koehn J, Scheiflinger F, Reipert BM. Affinity of FVIII-specific antibodies reveals major differences between neutralizing and nonneutralizing antibodies in humans. *Blood.* 2015;125:1180–1188. doi: 10.1182/blood-2014-09-598268.
- 45- Türk Hematoloji Derneği Ulusal Hemofili Tanı ve Tedavi Kılavuzu 10 Mayıs 2021.
- 46- Alencar JBD, Macedo LC, Barros MFD, Rodrigues C, Cadide RC, Sell AM, Visentainer JEL. Importance of immune response genes in hemophilia A. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013; 35(4): 280–286. doi: 10.5581/1516-8484.20130095.
- 47- Garagiola I, Palla R, Peyvandi F. Risk factors for inhibitor development in severe hemophilia A. *Thrombosis Research* Vol 168, August 2018, Pages 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.05.027>.
- 48- J. Oldenburg, J.K. Picard, R. Schwaab, H.H. Brackmann, E.G. Tuddenham, E. Simpson, HLA genotype of patients with severe haemophilia a due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII, *Thromb. Haemost.* 77 (1997) 238–242.
- 49- J. Astermark, J. Oldenburg, A. Pavlova, E. Berntorp, A.K. Lefvert, MIBS Study Group, Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A, *Blood* 107 (2006) 3167–3172.
- 50- J. Astermark, J. Oldenburg, J. Carlson, A. Pavlova, K. Kavakli, E. Berntorp, A.K. Lefvert, for the MIBS Study Group. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A, *Blood* 108 (2006) 3739–3745.
- 51- Aledort LM, Dimichele DM. Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino haemophiliacs. *Haemophilia.* (1998) 4:68. doi: 10.1046/j.1365-

2516.1998.0146c.x

- 52- Lochan A, Macaulay S, Chen WC, Mahlangu JN, Krause A. Genetic factors influencing inhibitor development in a cohort of South African haemophilia A patients. *Haemophilia*. (2014) 20:687–92. doi: 10.1111/hae.12436.
- 53- Flora Peyvandi, Pier M. Mannucci, Isabella Garagiola, Amal El-Beshlawy, Mohsen Elalfy, Vijay Ramanan, et al. A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A. *N Engl J Med* 2016; 374:2054-2064. SIPPET doi: 10.1056/NEJMoa1516437.
- 54- P.M. Mannucci. Plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates for the treatment of haemophilia A: plasma-derived is better. *Blood Transfus*, 8 (2010), pp. 288-291.
- 55- Gouw SC, van den Berg HM, le Cessie S, van der Bom JG. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2007;5:1383–90.
- 56- T.R. Mosmann, R.L. Coffman. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7 (1989), pp. 145-173, 10.1146/annurev.iy.07.040189.001045.
- 57- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151–1164.
- 58- Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev.* 2014 May;259(1):88-102. doi: 10.1111/imr.12160. PMID: 24712461 a
- 59- S. Dias, A. D'Amico, E. Cretney, Y. Liao, J. Tellier, C. Bruggeman, et al. Effector regulatory T cell differentiation and immune homeostasis depend on the transcription factor myb. *Immunity*, 46 (2017), pp. 78-91, 10.1016/j.immuni.2016.12.017.
- 60- M. Panduro, C. Benoist, D. Mathis. Tissue Tregs. *Annu. Rev. Immunol.* 34 (2016), pp. 609-633, 10.1146/annurev-immunol-032712-095948.
- 61- M. Franchini. Plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates for the treatment of haemophilia A: recombinant is better. *Blood Transfus*, 8 (2010), pp. 292-296.
- 62- D. Kolodin, N. van Panhuys, C. Li, A.M. Magnuson, D. Cipolletta, C.M. Miller, et al. Antigen- and cytokine-driven accumulation of regulatory T cells in visceral adipose tissue of lean mice. *Cmet*, 21 (2015), pp. 543-557, 10.1016/j.cmet.2015.03.005.

- 63- M. Sebastian, M. Lopez-Ocasio, A. Metidji, S.A. Rieder, E.M. Shevach, A.M. Thornton. Helios controls a limited subset of regulatory T cell functions. *J. Immunol.* 196 (2015), pp. 144-155, 10.4049/jimmunol.1501704.
- 64- J.M. Weiss, A.M. Bilate, M. Gobert, Y. Ding, M.A. Curotto de Lafaille, C.N. Parkhurst, et al. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* 209 (2012), pp. 1723-1742, 10.1084/jem.20120914.
- 65- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330–336.
- 66- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057–1061.
- 67- Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006; 118: 240–249.
- 68- Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol* 2008; 180: 5916–5926.
- 69- Sarris M, Andersen KG, Randow F, Mayr L, Betz AG. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 2008; 28: 402–413.
- 70- A. Liston, D.H.D. Gray. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014), pp. 154-165, 10.1038/nri3605.
- 71- Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998; 188: 287–296.
- 72- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007; 204: 1257–1265.
- 73- Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after *in vivo* transfer of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med* 2005; 202: 1539–1547.
- 74- Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194: 629–644.

- 75- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007; 450: 566–569.
- 76- Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2020 Jun;20(6):375-388. doi: 10.1038/s41577-020-0285-6.
- 77- Paul Tieu, Anthony Chan, Davide Martino. Molecular Mechanisms of Inhibitor Development in Hemophilia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2020; 12(1): e2020001. Published online 2020 Jan 1. doi: 10.4084/MJHID.2020.001.
- 78- Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, Caligiuri G, Christophe OD, Bayry J, Nicoletti A, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1816–1823. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03571.x.
- 79- Qian J, Burkly L, Smith E, Ferrant J, Hoyer L, Scott D, Haudenschild C. Role of CD154 in the secondary immune response: the reduction of pre-existing splenic germinal centers and anti-factor VIII inhibitor titer. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2548-54.
- 80- Feuerer M, Beckhove P, Garbi N, Mahnke Y, Limmer A, Hommel M, Hammerling GJ, Kyewski B, Hamann A, Umansky V, Schirmacher V. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med.* 2003;9:1151–1157. doi: 10.1038/nm914.
- 81- White GC, Kempton CL, Grimsley A, Nielsen B, Roberts HR. Cellular immune responses in hemophilia: why do inhibitors develop in some, but not all 79 hemophiliacs? *J Thromb Haemost.* 2005;3:1676–1681. doi: 10.1111/j.1538- 7836.2005.01375.x.
- 82- Celli S, Lemaitre F, Bousso P. Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions *in vivo* reveals the importance of prolonged contacts for CD4+ T cell activation. *Immunity.* 2007;27:625–634. doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.018.
- 83- Pfistershammer K, Stockl J, Siekmann J, Turecek PL, Schwarz HP, Reipert BM. Recombinant factor VIII and factor VIII-von Willebrand factor complex do not present danger signals for human dendritic cells. *Thromb Haemost.* 2006;96:309–316. doi: 10.1160/TH05-11-0729.
- 84- Marcucci M, Mancuso ME, Santagostino E, Kenet G, Elalfy M, Holzhauer S, Bidlingmaier C, Escuriola EC, Iorio A, Nowak-Gottl U. Type and intensity of FVIII exposure on inhibitor development in PUPs with haemophilia A. A patient-level meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2015;113:958–967. doi: 10.1160/TH14-07-0621.
- 85- Bovenschen N, Mertens K, Hu L, Havekes LM, van Vlijmen BJ. LDL receptor cooperates

- with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII *in vivo*. *Blood*. 2005;106:906–912. doi: 10.1182/blood-2004-11-4230.
- 86- Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Mertens K. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1257–1265. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01389.x.
- 87- Dasgupta S, Navarrete AM, Bayry J, Delignat S, Wootla B, Andre S. A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:8965–8970. doi: 10.1073/pnas.0702120104.
- 88- Qadura M, Waters B, Burnett E, Chegeni R, Bradshaw S, Hough C, Othman M, Lillicrap D. Recombinant and plasma-derived factor VIII products induce distinct splenic cytokine microenvironments in hemophilia A mice. *Blood*. 2009;114:871–880. doi: 10.1182/blood-2008-09-174649.
- 89- Qian J, Collins M, Sharpe AH, Hoyer LW. Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. *Blood*. 2000;95:1324–1329. doi: 10.1182/blood.V95.4.1324.004k25_1324_1329.
- 90- Waters B, Lillicrap D. The molecular mechanisms of immunomodulation and tolerance induction to factor VIII. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1446–1456. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03538.x.
- 91- LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112:1570–1580. doi: 10.1182/blood-2008-02-078071.
- 92- van Helden PMW, van Haren SD, Fijnvandraat K, van den Berg HM, Voorberg J. Haemophilia. 2010 May;16(102):35-43. doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02215.x. Factor VIII-specific B cell responses in haemophilia A patients with inhibitors. PMID: 20536984. doi: 10.1111/j.1365-2516.2010.02215.x.
- 93- Huang CC, Shen MC, Chen JY, Hung MH, Hsu TC, Lin SW. Epitope mapping of factor VIII inhibitor antibodies of Chinese origin. *Br J Haematol*. 2001;113:915–924. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02839.x.
- 94- Scandella D, Gilbert GE, Shima M, Nakai H, Eagleson C, Felch M, Prescott R, Rajalakshmi KJ, Hoyer LW, Saenko E. Some factor VIII inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to C2 domain amino acids 2248 through 2312, which overlap a phospholipid-binding site. *Blood*. 1995;86:1811–1819. doi: 10.1182/blood.V86.5.1811.bloodjournal8651811.
- 95- Zhong D, Saenko EL, Shima M, Felch M, Scandella D. Some human inhibitor antibodies

- interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood*. 1998;92:136–142. doi: 10.1182/blood.V92.1.136.413k35_136_142.
- 96- Lollar P, Parker ET, Curtis JE, Helgersen SL, Hoyer LW, Scott ME, Scandella D. Inhibition of human factor VIIIa by anti-A2 subunit antibodies. *J Clin Invest*. 1994;93:2497–2504. doi: 10.1172/JCI117259.
- 97- Lacroix-Desmazes S, Bayry J, Misra N, Horn MP, Villard S, Pashov A, Stieltjes N, d'Oiron R, Saint-Remy JM, Hoebeke J, Kazatchkine MD, Reinbolt J, Mohanty D, Kaveri SV. The prevalence of proteolytic antibodies against factor VIII in hemophilia A. *N Engl J Med*. 2002;346:662–667. doi: 10.1056/NEJMoa011979.
- 98- Butenas S, Krudysz-Amblo J, Rivard GE, Mann G. Product-dependent anti-factor VIII antibodies. *Haemophilia*. 2013;19:619–625. doi: 10.1111/hae.12127.
- 99- Rossi G, Sarkar J, Scandella D. Long-term induction of immune tolerance after blockade of CD40-CD40L interaction in a mouse model of hemophilia A. *Blood*. 2001;97:2750–2757. doi: 10.1182/blood.V97.9.2750.
- 100- Qian J, Collins M, Sharpe AH, Hoyer LW. Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A. *Blood*. 2000;95:1324–1329. doi: 10.1182/blood.V95.4.1324.004k25_1324_1329.
- 101- Bray GL, Kroner BL, Arkin S, Aledort LW, Hilgartner MW, Eyster ME, Ragni MV, Goedert JJ. Loss of high-responder inhibitors in patients with severe hemophilia A and human immunodeficiency virus type 1 infection: a report from the Multi-Center Hemophilia Cohort Study. *Am J Hematol*. 1993;42:375–379. doi: 10.1002/ajh.2830420408.
- 102- Reding MT. Immunological aspects of inhibitor development. *Haemophilia*. 2006;12(Suppl 6):30–35. doi: 10.1111/j.1365-2516.2006.01363.x.
- 103- Whelan SF, Hofbauer CJ, Horling FM, Allacher P, Wolfsegger MJ, Oldenburg J, Male C, Windyga J, Tiede A, Schwarz HP, Scheifflinger F, Reipert BM. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood*. 2013;121:1039–1048. doi: 10.1182/blood-2012-07-444877.
- 104- Reding MT, Lei S, Lei H, Green D, Gill J, Conti-Fine BM. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb Haemost*. 2002;88:568–575. doi: 10.1055/s-0037-1613257.
- 105- Reding MT, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Anderson TA, Conti-Fine BM.

- Human CD4⁺ T-cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1777–1784. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00251.x.
- 106-** Reipert BM, van Helden PM, Schwarz HP, Hausl C. Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Br J Haematol.* 2007;136:12–25. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06359.x.
- 107-** Hausl C, Ahmad RU, Sasgary M, Doering CB, Lollar P, Richter G, Schwarz HP, Turecek PL, Reipert BM. High-dose factor VIII inhibits factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. *Blood.* 2005;106:3415–3422. doi: 10.1182/blood-2005-03-1182.
- 108-** Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol.* 2008;9:239–244. doi: 10.1038/ni1572.
- 109-** Oliveira CA, Velloso-Rodrigues C, Machado FCJ, Carvalho BN, Gentz SHL, Martins-Filho OA, Chaves DG. Cytokine profile and FVIII inhibitors development in haemophilia A. *Haemophilia*(2013),19, e139–e142. doi: 10.1111/hae.12096.
- 110-** Silveira AC, Santana MA, Ribeiro IG, Chaves DG, Martins-Filho OA. The IL-10 polarized cytokine pattern in innate and adaptive immunity cells contribute to the development of FVIII inhibitors. *BMC Hematol.* 2015 Jan 16;15(1):1. doi: 10.1186/s12878-014-0019-8. eCollection 2015. PMID: 25653866.
- 111-** Susanah S, Raspati H, Sari NM, Rakhmilla LE, Sribudiani Y, Moestopo O, Sinaga P, Idjradinata P, Maskoen AM. Serum TNF- α Level as a Possible Predictor of Inhibitor Levels in Severe Hemophilia A. *Biomed Res Int.* 2021 Nov 5;2021:6483490. doi: 10.1155/2021/6483490. eCollection 2021.
- 112-** Soori S, Dadashizadeh G, Dorgalaleh A, Tabibian S, Keramati MR, Alizadeh S, Hosseini MS, Zaker F, Shams M. Relationship Between Single-Nucleotide Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-10, Factor II and Factor V with Risk of Inhibitor Development in Patients with Severe Hemophilia A. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2019;19(3):228-232. doi: 10.2174/1871529X19666190206315.
- 113-** Towfighi F, Gharagozlou S, Kardar GA, Sharifian RA, Karimi K, Lak M, Pourfathollah AA, Soleimani S, Shokri F. Assessment of *in vitro* cytokine response in hemophilia A patients with or without factor VIII inhibitory antibody. *J Interferon Cytokine Res.* 2007 Aug;27(8):665-74. doi: 10.1089/jir.2006.0184. PMID: 17784818.

- 114- Chen AC, Cai X, Li C, Khoryati L, Gavin MA, Miao CH. A Treg-Selective IL-2 Mutein Prevents the Formation of Factor VIII Inhibitors in Hemophilia Mice Treated With Factor VIII Gene Therapy. *Front Immunol*. 2020 Apr 28;11:638. doi: 10.3389/fimmu.2020.00638. eCollection 2020.
- 115- Lu Y, Ding Q, Dai J, Wang H, Wang Y. Impact of polymorphisms in genes involved in autoimmune disease on inhibitor development in Chinese patients with haemophilia A. *Thromb Haemost*. 2012 Jan;107(1):30-6. doi: 10.1160/TH11-06-0425. Epub 2011 Nov 24.
- 116- Wadhwa M, Dilger P, Tubbs J, Mire-Sluis A, Barrowcliffe T, Thorpe R. Identification of transforming growth factor-beta as a contaminant in factor VIII concentrates: a possible link with immunosuppressive effects in hemophiliacs. *Blood*. 1994 Sep 15;84(6):2021-30. PMID: 8081003
- 117- Hodge G, Han P. Effect of intermediate-purity factor VIII (FVIII) concentrate on lymphocyte proliferation and apoptosis: transforming growth factor-beta is a significant immunomodulatory component of FVIII. *Br J Haematol*. 2001 Nov;115(2):376-81. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.03124.x.
- 118- Fidancı ID, Zülfikar B, Kavaklı K, Ar MC, Kılınç Y, Başlar Z, Çağlayan SH. A Polymorphism in the IL-5 Gene is Associated with Inhibitor Development in Severe Hemophilia A Patients. *Turk J Haematol*. 2014 Mar;31(1):17-24. doi: 10.4274/Tjh.2012.0197. Epub 2014 Mar 5.
- 119- Oldenburg J, Schroder J, Brackmann HH, et al. Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. *Semin Hematol* 2004; 41 (Suppl 1): 82–88.
- 120- Hu G, Guo D, Key NS, Conti-Fine BM. Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. *Thromb Haemost* 2007; 97:788–94.
- 121- Meeks SL, Chapman RL, Kempton C, Dunn AL. Late immune tolerance induction in haemophilia A patients. *Haemophilia*. (2013) 19:445–8. doi: 10.1111/hae.12077
- 122- Rivard GE, Rothschild C, Toll T, Achilles K. Immune tolerance induction in haemophilia A patients with inhibitors by treatment with recombinant factor VIII: a retrospective non-interventional study. *Haemophilia*. (2013) 19:449–55. doi: 10.1111/hae.12102.
- 123- Carcao M, Escuriola-Ettingshausen C, Santagostino E, Oldenburg J, Liesner R, Nolan B, et al. The changing face of immune tolerance induction in haemophilia A with the advent of emicizumab. *Haemophilia*. (2019) 25:676-84. doi: 10.1111/hae.13762

- 124- Batsuli G, Zimowski KL, Tickle K, Meeks SL, Sidonio RF. Immune tolerance induction in paediatric patients with haemophilia A and inhibitors receiving emicizumab prophylaxis. *Haemophilia*. (2019) 25:789-96. doi: 10.1111/hae.13819.
- 125- Lacroix-Desmazes S, Navarrete AM, Andre S, et al. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood* 2008; 15: 240–249.
- 126- Jing W, Chen J, Cai Y, Chen Y, Schroeder JA, Johnson BD, et al. Induction of activated T follicular helper cells is critical for anti-FVIII inhibitor development in hemophilia A mice. *Blood Adv.* (2019) 3:3099–110.
doi: 10.1182/bloodadvances.2019000650.
- 127- Lacroix-Desmazes S, Voorberg J, Lillicrap D, Scott DW, Pratt KP. Tolerating factor VIII: recent progress. *Front Immunol.* (2020) 10:2991.
doi: 10.3389/fimmu.2019.02991.
- 128- M. Santana, Y. Rosenstein. What it takes to become an effector T cell: The process, the cells involved, and the mechanisms. Published 1 June 2003. *Biology Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.10258 Corpus ID: 21954871.
- 129- Safinia N, Leech J, Hernandez-Fuentes M, Lechler R, Lombardi G. Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy. *Clin Exp Immunol.* (2013) 172:158–68. doi: 10.1111/cei.12052.
- 130- P. Wojdasiewicz, L. A. Poniatowski, P. Nauman et al., “Cytokines in the pathogenesis of hemophilic arthropathy,” *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 39, pp. 71-91, 2018.
- 131- Meunier S, Menier C, Marcon E, Lacroix-Desmazes S, Maillere B. CD4 T cells specific for factor VIII are present at high frequency in healthy donors and comprise naive and memory cells. *Blood Adv.* (2017) 1:1842–7.
doi: 10.1182/bloodadvances.2017008706.
- 132- Chaves DG, Velloso-Rodrigues C, Oliveira CA, Santoro MM, Martins-Filho OA. A shift toward a T-cell independent type 2 cytokine profile may enables the synthesis of anti-FVIII IgG4 inhibitors in Hemophilia A patients. *Clin Exp Immunol* 2010; 162: 425-37.
- 133- F. Zhang, M. Xu, Q. Yang et al., “A translational study of TNF-Alpha antagonists as an adjunctive therapy for preventing hemophilic arthropathy,” *Journal of Clinical Medicine*, vol. 9, no. 1, p. 75, 2020.
- 134- M. QADURA, B. WATERS, E. BURNETT et al., “Immunoglobulin isotypes and functional anti-FVIII antibodies in response to FVIII treatment in Balb/c and C57BL/6

haemophilia A mice,” *Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia*, vol. 17, no. 2, pp. 288–295, 2011.

- 135- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389:737-742.
- 136- Karim AF, Soltis AR, Sukumar G, Königs C, Ewing NP, Dalgard CL, Wilkerson MD and Pratt KP1. Hemophilia A Inhibitor Subjects Show Unique PBMC Gene Expression Profiles That Include Up-Regulated Innate Immune Modulators. *Front. Immunol.*, 12 June 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01219>.

