



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Prof. Dr. R. Kaan KAVAKLI

**AĞIR HEMOFİLİ A HASTALARINDA İMMÜN
DÜZENLEYİCİ SİTOKİNLERİ KODLAYAN GEN
POLİMORFİZMLERİNİN İNHİBİTÖR GELİŞİMİ İLE
İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Humay MEHDİYEVA

Tez Danışmanı

Doç.Dr. Tahir ATİK

İZMİR, 2021



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini aktararak yetişmemde büyük emekleri olan, sabır, özveri ve hevesle tezimin her aşamasında benden yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam, Ege Üniversitesi Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı Öğretim üyesi Doç. Dr. Tahir ATİK'e,

Asistanlık süreci boyunca bana mesleğimi öğreten, başta kliniğimiz Ege Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Kaan KAVAKLI olmak üzere tüm Öğretim Üyeleri ve uzman doktorlarımıza,

Her zaman yanımda olan ve ilgisini benden esirgemeyen, tezimin her satırında emeği olan Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı Uzm. Dr. Esra IŞIK'a,

Bu dört yıllık zorlu eğitim sürecinde nöbetlerde yorulmadan birlikte çalışarak uykusuz kaldığım ve çok şey paylaştığım, tüm bu süreçte bir aile gibi olduğumuz tüm asistan arkadaşlarıma, hemşirelerimiz ve personellerimize,

Tez çalışmam sırasında benden yardımlarını esirgemeyen laborant Şükrü ÇELEN ve Moleküler Biyolog Dr. Başak DURMUŞ ÖZEN'e,

Yaşamım boyunca her an ve her koşulda yanımda olmaya çalışan, hiçbir zaman desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen, bugüne dek elde ettiğim başarılarımın tek mimarı olan sevgili annem Ulviye MEHDİYEVA ve sevgili babam Ali MEHDİYEV'e, canım kardeşim Vefa JAFARLI ve abim Celal MEHDİYEV'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca tüm sıkıntı ve zorluklarımda hep yanımda olan ve ailemin uzaklığını hissettirmeyen, sevgisi ve desteğiyle beni ayakta tutan, varlığıyla daima, bugün ve ömür boyu bana güç vereceğine inandığım sevgili erkek arkadaşım Uz. Dr. Selim ÖZDOĞAN'a

Sevgi, hürmet ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Humay MEHDİYEVA

İzmir, Ocak 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Tanım.....	4
2.2 Tarihçe.....	4
2.3 Epidemiyoloji.....	4
2.4 Genetik.....	5
2.5 Klinik.....	6
2.5.1 Komplikasyonlar.....	7
2.5.2 Tanı, laboratuvar.....	9
2.5.3 Tedavi.....	11
2.5.4 Hemofilide çocuklarda profilaksi tedavisi.....	14
2.6 Hemofilide inhibitör sorunu.....	17
2.6.1 Tanım.....	17
2.6.2 Tanı ve testler.....	17
2.6.3 Klinik ve laboratuvar göstergeler.....	18
2.6.4 İnhibitörlü hastalarda hemostazın sağlanması.....	19
2.6.5 İnhibitör eradikasyonu.....	20
2.6.6 Patofizyoloji ve immün yanıt.....	20
2.6.7 İnhibitör gelişimine etki eden faktörler.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1 Tasarım ve metod.....	30
3.1.1 Hastaların seçimi.....	31
3.1.2 Moleküler çalışmalar.....	32

4. BULGULAR.....	43
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇLAR.....	59
7. KAYNAKLAR.....	60
8. EKLER.....	70
8.1 Etik kurul onayı.....	70
8.2 Benzeşi raporu.....	72

ÖZET

Amaç: Faktör VIII replasmanına karşı inhibitör adı verilen nötralize edici antikorların gelişmesi, hemofili A (HA) hastalarında en zorlu tedavi komplikasyonudur. İnhibitör gelişimi için risk faktörleri değiştirilebilir (çevresel) ve değiştirilemez (genetik) olmakla iki grupta sınıflandırılır. Mutasyon türü dışındaki genetik faktörleri arasında aile öyküsü, etnik köken, insan lökosit antijen haplotipi ve immün sistem ile ilgili genlerdeki bir dizi polimorfizm yer almaktadır. Bu çalışmada, intron 22 inversiyon mutasyonu olan ağır HA hastalarından oluşan bir kohortta iki gendeki üç varyant (c.-318C> T; rs5742909 ve c.49A>G; rs231775 *CTLA-4* ve c.-308G> A; rs1800629 *TNF- α*), aynı zamanda aile hikayesi, replasman öyküsü, profilaksi tedavisi gibi değiştirilebilir faktörler ve inhibitör gelişimi arasındaki ilişkiyi analiz etmeyi amaçladık.

Yöntem: Çalışmaya intron 22 inversiyonu olan 94 ağır HA hastası dahil edildi. İnhibitör durumuna göre iki grup oluşturuldu: inhibitör pozitif ve inhibitör negatif. Çalışmaya dahil edilen olgular iletişim bilgileri yoluyla aranarak değerlendirildi. Görüşmeler sırasında hastaya ait demografik verileri, anamnez bilgileri (hastalığın başlangıç yaşı, başlangıç bulgusu, tanı yaşı, ilk tedavi seçimi, kullanmakta olduğu tedavi modeli vb.) ve aile ağacı (etkilenmiş başka birey varsa o bireyde inhibitör gelişip gelişmediği vb.) değerlendirmeleri yapıldı. Bu değerlendirmeler sonucunda belirtilen demografik ve klinik özelliklerin her iki hasta grubunda inhibitör gelişimi ile ilişkisini istatistiksel olarak analiz ettik. Her iki grup aile hikayesi, replasman ve profilaksi tedavisi özelliklerine göre birbiri ile karşılaştırıldı. Aynı zamanda her iki grupta da dizi analizi ile *CTLA-4*'te iki (c.-318C> T; rs5742909 ve c.49A> G; rs231775) ve *TNF- α* 'da bir (c.-308G> A; rs1800629) SNP'yi (single nucleotide polymorphism) ve bu polimorfizmlerin inhibitör gelişim riski ile ilişkisini araştırdık.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 94 ağır HA hastalarının hepsi erkekti. Yirmi beş hastada (%26,6) inhibitör pozitif, 69 hastada (%73,4) inhibitör negatif olarak değerlendirildi. Hastaların güncel yaş ortalaması 215,6 ay $\pm$ 155,9 ay idi. Hastaların FVIII düzeyi ortalama % 0,51 $\pm$ 0,77 [ortanca %0,3 (min %0,01 - max %5,83)] olarak görüldü. Aile öyküsü karşılaştırıldığında her iki grup arasında ailesinde akrabalık veya ailede hemofilik bireyin olmasının inhibitör gelişimi ile herhangi bir ilişkisi olmasa da, ailesinde inhibitör öyküsü olan hastaların inhibitör gelişim riski ile anlamlı ilişkili olduğu görüldü. Replasman öyküsü açısından her iki grup karşılaştırıldığında ilk faktör replasman yaşı ile inhibitör gelişim riski arasında ilişki olmadığı, her iki grupta benzer zamanlarda ilk kez replasman tedavisi verildiği görüldü. Replasman hikayesi, verilen faktör konsantrasyonunun tipi ve dozu, uygulama süresi karşılaştırıldığında her iki grupta benzer sonuçlar bulundu ve bu iki grupta inhibitör gelişimi açısından risk olabilecek anlamlı fark yoktu. Profilaksi alan ve almayan hastalar karşılaştırıldığında inhibitör gelişimi açısından anlamlı bir fark görülmedi. Genetik açıdan incelendiğinde ise intron 22 inversiyon mutasyonu olan ağır HA hastalarında *CTLA-4* geni polimorfizmleri ile inhibitör gelişimi arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi. Bununla birlikte, *TNF- α* 'daki c.-308G> A varyantı için A allelinin, bu hastalarda inhibitör gelişimi için artmış risk ile ilişkili olduğu bulundu.

Sonuç: İtron 22 inversiyon mutasyonu olan ağır HA hastalarında demografik ve klinik özelliklerinin inhibitör gelişimi ile ilişkisi saptanmazken, ailesinde inhibitör gelişim öyküsünün olması inhibitör gelişiminde risk ile ilişkili bulunmuştur. Genetik risk faktörleri incelendiğinde *CTLA-4* genindeki c.-318C>T ve c.49A>G varyantları inhibitör gelişimi ile ilişkili değilken, *TNF- α* 'da c.-308G>A varyantı için A alleli inhibitör gelişme riskiyle ilgilidir.

Anahtar Kelimeler: Hemofili; İnhibitör; *CTLA-4*; *TNF- α* ; intron 22 inversiyon

ABSTRACT

Objective: The development of neutralizing antibodies against infused factor VIII called inhibitor is the most challenging treatment complication in hemophilia A (HA) patients. Risk factors for inhibitor development are classified into two groups: modifiable (environmental) and non-modifiable (Genetic). Genetic factors other than mutation type include family history, ethnicity, human leukocyte antigen haplotype, and a number of polymorphisms in immune system related genes. In this study, we aimed to analyze the association between three variants in two genes (c.-318C>T; rs5742909 and c.49A>G; rs231775 in *CTLA-4* and c.-308G>A; rs1800629 in *TNF- α*) and inhibitor development, also modifiable factors such as family history,

infusion history, prophylaxis treatment in a cohort of severe HA patients with intron 22 inversion mutation.

Method: The study included 94 severe HA patients with intron 22 inversion. Two groups were established according to the inhibitor status: inhibitor positive and inhibitor negative. The cases included in the study were evaluated by calling their contact information. During the interviews, the demographic data of the patient, anamnesis information (age of onset of the disease, initial finding, age of diagnosis, first treatment choice, treatment model used, etc.) and family tree (if there is another affected individual, whether inhibitor developed in that individual, etc.) were evaluated. As a result of these evaluations, we analyzed statistically the relationship between the demographic and clinical characteristics and inhibitor development in both patient groups. Both groups were compared with each other according to family history, replacement and prophylaxis treatment properties. We also investigated two SNPs in *CTLA-4* (c.-318C>T; rs5742909 and c.49A>G; rs231775) and one in *TNF- α* (c.-308G>A; rs1800629) using Sanger sequencing in both groups.

Results: All 94 severe HA patients included in the study were male. It was evaluated as inhibitor positive in 25 patients (26.6%) and inhibitor negative in 69 patients (73.4%). The average age of the patients was 215.6 ± 155.9 months. The average FVIII level of the patients was $0.51 \pm 0.77\%$ [median 0.3% (min 0.01% - max 5.83%)]. When family history was compared, it was seen that the family history of both groups was significantly related to the risk of inhibitor development in patients with a family history of inhibitors, although the presence of a family member with hemophilia was not related to inhibitor development. When the two groups were compared in terms of replacement history, it was observed that there was no relationship between the age of first factor replacement and the risk of inhibitor development, and both groups were given replacement therapy for the first time at similar times. When the history of replacement, the type and dose of the factor concentrate administered, and the duration of administration were compared, similar results were found in both groups, and there was no significant difference in these two groups that could be a risk for inhibitor development. When the patients who received prophylaxis treatment and those who did not, there was no significant difference in terms of inhibitor development. When inhibitor positive and inhibitor negative patient groups were compared, there was no significant difference in the relationship between the initiation period of the prophylaxis treatment and the treatment model with the inhibitor development. In this study, no significant correlation between *CTLA-4* polymorphisms

and inhibitor development was observed in severe HA patients with intron 22 inversion mutation. However, the A allele for c.-308G>A variant in *TNF-α* was found to be associated with the increased risk for inhibitor development in those patients.

Conclusion: In Turkish patients with severe HA with intron 22 inversion mutation, demographic and clinical features are not related to inhibitor development, whereas a family history of inhibitor development is associated with a risk of inhibitor development. When genetic risk factors are examined, c.-318C>T and c.49A>G variants in the *CTLA-4* gene are not associated with inhibitor development, while the A allele for c.-308G>A variant in the *TNF-α* is related to the risk of inhibitor development.

Keywords: Hemophilia; Inhibitor; CTLA-4; TNF-α; intron 22 inversion

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Hemofilide görülen kanama bulguları ve komplikasyonlar.....	8
Tablo 2. Kanama yerine göre Hemofili A’da yerine koyma tedavisinin doz ve süresi.....	12
Tablo 3. Ülkemizde piyasada mevcut olan faktör konsantreleri.....	13
Tablo 4. Uygulanan tedavi modeline göre profilaksi tanımları.....	16
Tablo 5. By-pass edici ilaçlar ve özellikleri.....	19
Tablo 6. HA hastalarında inhibitör gelişimine etki eden faktörler.....	24
Tablo 7. F8 gen mutasyonu tiplerine göre inhibitör gelişmesi riskleri klasifikasyonu.....	25
Tablo 8. Bu çalışmada kullanılmış primerler.....	36
Tablo 9. Kütüphane hazırlığı inkübasyon protokolü.....	38
Tablo 10. Çalışmaya dahil edilen hastaların tanı alma nedenleri.....	43
Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen hastaların temel klinik verileri ve özellikleri.....	45
Tablo 12. Çalışmaya dahil edilen hastaların aile hikayesinin inhibitör gelişimi ile ilişkisi.....	49

Tablo 13. Çalışmaya dahil edilen hastaların ilk replasman öyküsünün inhibitör gelişimi ile ilişkisi.....	49
Tablo 14. Çalışmaya alınan hastaların profilaksi tedavisi öyküsünün inhibitör gelişimi ile ilişkisi.....	51
Tablo 15. İnhibitör pozitif ve inhibitör negatif hastalarda genotip ve allel frekansları arasındaki ilişki.....	52

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Hemofili A hastalarında görülen <i>F8</i> geni mutasyon tipleri.....	6
Şekil 2. Hemofili A moleküler tanı planı.....	10
Şekil 3. Hemofilide inhibitör gelişiminde primer immün yanıt.....	21
Şekil 4. Hemofilide inhibitör gelişiminde sekonder immün yanıt.....	22
Şekil 5. Faktör VIII'in ana yapısını Gösteren Şematik Model ve FVIII antikorlarının ana bağlanma epitoplarının lokalizasyonu.....	23
Şekil 6. Illumina Miseq cihazı.....	40
Şekil 7. CTLA4 -318C>T polimorfizmi için homozigot TT (a) ve heterozigot CT (b) dizi analizi görüntü örneği.....	41
Şekil 8. CTLA4 +49A>G polimorfizmi için homozigot AA (a) ve heterozigot AG (b) dizi analizi görüntü örneği.....	42
Şekil 9. TNF alfa -308G>A polimorfizmi için homozigot GG dizi analizi görüntü örneği....	42

KISALTMALAR LİSTESİ

HA: Hemofili A

FVIII: Faktör VIII

SNP: Single nucleotide polymorphism

İVS: İntron 22 inversiyon

IL10: İnterlökın-10

TNF- α : T   r Nekrotizan Faktörü alfa

CTLA4: Sitotoksik T-Lenfosit Antijen 4

HLA: İnsan Lökosit Antijenleri (Human Leukocyte Antigens)

HAMSTeRS: Hemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource site

PT: Protrombin zamanı

aPTT: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı

KZ: Kanama zamanı

TT: Trombin zamanı

TDP: Taze donmuş plazma

UG: Uygulama günü

İTT: İmmun tolerans tedavisi

APC: Antijen Sunan Hücreler (Antigen Presenting Cells)

MHC-II: Majör Histokompatibilite kompleksi- II

TCR: T-hücre reseptörü

vWF: Von Willebrand faktör

NK: Natural killer hücresi

rFVIII: Rekombinant FVIII

pdFVIII: Plazma kaynaklı FVIII

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yaklaşık son dört dekadtdır Hemofili A tanılı (HA) hastaların tedavisi mümkün olmaktadır. Tedavi tipik olarak haftada 2-3 gün eksik olan faktörün yerine konulması şeklindedir. Uygulanan faktör replasman tedavileri sayesinde hayat beklentisi ve fiziksel yeterlilikte belirgin bir iyileşme söz konusudur. Günümüzde artık, HA olgularının hayat kalitesi genel popülasyon ile benzerdir ve bu hedef ancak yeterli faktör replasman tedavisi ile mümkün olabilmektedir (34,35).

Tedavi amacıyla HA hastasına uygulanan F8'e karşı oluşan alloantikörler (inhibitör), tedavinin etkinliğini bozmaktadır ve bu durum günümüzde hemofili hastalarının tedavisi sırasında karşılaşılan en ciddi ve zorlayıcı komplikasyon olarak kabul edilmektedir. Ağır HA olgularının hayatı boyunca inhibitör geliştirme insidansı yaklaşık %20-30 arasındadır. Neden bazı hastalar uygulanan bu yabancı proteine karşı tolerans gösterirken, bazılarının antikör geliştirdiği hala tam olarak anlaşılamamıştır (36).

İnhibitör gelişimine etki eden faktörleri belirlemek amacıyla gerçekleştirilen araştırmalarda öne sürülen iki grup sebep olduğu bilinmektedir: Genetik, yani modifiye edilemeyen ve çevresel, yani modifiye edilebilir sebepler.

HA, X'e bağlı bir tek gen hastalığı olup, *F8* geni üzerindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu gende hastalığa yol açan mutasyonlar "büyük yeniden düzenlenmeler", "büyük delesyon/duplikasyonlar" ve "nokta mutasyonlar"dan oluşmaktadır. Büyük yeniden düzenlenmelerden "intron 22 inversiyon" (İVS22) mutasyonu ağır HA olgularında en sık karşılaşılan mutasyon tipidir (5).

F8 mutasyon tipi HA olgularında inhibitör gelişimine predispozan faktörler arasında en önemlilerinden birisidir. İnhibitörlerin büyük çoğunluğu, *F8* proteininin A2 ve C2 domainlerine karşı oluşmaktadır. Bu nedenle bu domainlerde değişikliğe yol açan spesifik bazı varyantlarda risk oldukça artmaktadır. Diğer taraftan, mutasyon nedeniyle hiç *F8* üretemeyen olgularda, yabancı proteine karşı immün sistem daha aktif çalışmakta ve bu mutasyonlarda daha yüksek inhibitör riski beklenmektedir. Bunu destekleyecek şekilde, missense mutasyonlarda inhibitör riski %5 civarında beklenirken, "null" mutasyonlarda bu oran %24-71 arasında verilmektedir. İVS22 mutasyonunda bu riskin %20-30 arasında olduğu düşünülmektedir (19,21)

Otoimmün hastalıklarda görüldüğü gibi, sitokinler veya bunların reseptörlerinin fonksiyonlarını kontrol eden genlerdeki değişiklikler, immün yanıtta dengesizliklere sebep olabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar F8 proteinine karşı inhibitör gelişimi ile interlökin-10 (*IL10*), doku nekrozis faktörü alfa (*TNF-α*) ve sitotoksik T-lenfosit antijen 4 (*CTLA4*) genlerindeki bazı polimorfizmlerin güçlü ilişkisinin olduğunu göstermişlerdir. Bu genler antikor yanıtının düzenlenmesinde rolü bilinen genler olup bu yüzden inhibitör gelişiminde majör önemi olabilir (6-12).

CTLA4 proteini, aktive T hücrelerde ifade edilen bir yüzey molekülü olup T hücre aktivasyonunun negatif bir düzenleyicisi olarak kritik bir role sahiptir. CTLA4 genindeki bazı polimorfizmler (promoter -318C/T ve ekzon 1 +49 A/G) hücre yüzeyinde bu molekülün ekspresyonunun farklı düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur. İnhibitör gelişimi ile -318T alleli arasında anlamlı koruyucu ilişki bulunmuşken, +49 A/G polimorfizminde tespit edilmemiştir (10,11).

IL10, immünsüpresif, anti-inflamatuvar ve B hücre stimulan özelliklere sahip önemli bir sitokindir. HA hastalarında IL10'un promoter mikrosatellit polimorfizminin artmış inhibitör riski ile ilişkisi bildirilmiştir (10).

TNF-α bir proinflamatuvar sitokin olup birçok inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalığın patogeneğinde anahtar rol oynamaktadır. Çok sayıda araştırmada özellikle otoimmün hastalıklarla bu gendeki polimorfizmlerin ilişkisi araştırılmıştır. Özellikle -308A alleli artmış ve stimüle TNF-α üretimi ile ilişkili bulunmuştur. Ağır HA olgularında bu polimorfizmin inhibitör varlığı ile ilişkisi gösterilmiştir (10,11).

ABO kan grubu inhibitör gelişimi konusunda araştırılmıştır ve 0 grubunda hafif bir risk artışı belirtilmiştir. HLA lokusu da önemli olabilecek bir genetik belirleyici olarak araştırılmış ve özellikle HLA sınıf II molekülleri ile inhibitör ilişkisi saptanmıştır. Bununla beraber bu ilişkinin gücü, hastanın genetik kökeni ve bulunduğu popülasyona bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (10).

Aynı zamanda inhibitörler daha önce tedavi edilmemiş hastalar arasında daha sık ortaya çıkmakta ve faktör replasmanına maruziyet günü arttıkça, inhibitör riski azalmaktadır. Ayrıca, inhibitör gelişimi sıklıkla travmatik bir hasar ya da cerrahi girişim nedeniyle uzamış veya

yüksek dozda faktör konsantranesine maruziyetle de ilişkili bulunmuştur (34). Yapılmış çalışmalarda plazma derive ürünlerin aksine rekombinan ürünler kullanan olgularda daha yüksek inhibitör riski olduğunu göstermiştir (8,10).

Ülkemizde HA hastalarında inhibitör gelişimi ile ilgili risk faktörlerini belirlemeye yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada amacımız, ülkemizde HA tanısı ile izlenen olgulardaki inhibitör gelişimine immün düzenleyici sitokinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin etkisini değerlendirmek ve elde edilen veriler ışığında, inhibitör gelişimini öngörmede kullanılacak bir skorlama sistemi geliştirilmesi açısından yapılacak ileri çalışmalara ön veri sağlamaktır. Bu amaçla ülkemizde Hemofili Genetiği alanında önemli bir referans merkezi olan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı tarafından genetik analizi tamamlanan olgulardan “intron 22 inversiyon” saptananlar bu açıdan çalışmaya dahil edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım:

Hemofili A, hemostazı sağlayan koagülasyon Faktör VIII eksikliği sonucunda gelişen, X'e bağlı resesif geçiş gösteren kalıtsal kanama bozukluğu olup, eklem içi (hemartroz) ve kas içi (hematom) kanamalarla kendini göstermektedir (14,28).

2.2. Tarihçe:

Hemofilinin geçmişi milattan sonra 2. yüzyıla kadar uzanmaktadır. Hemofilinin ilk modern tanımının ise 1803 yılında Amerikalı doktor John Conrad Otto tarafından yalnızca erkeklerin etkilendiği birkaç ailede yaptığı gözlemlerini tanımladığı zaman yapıldığı düşünülmektedir (26). "Hemofili" kelimesi ise ilk kez 1828 yılında Alman hekim Johann Lukas Schönlein ve öğrencisi Friedrich Hopff tarafından İsviçrede Zürih Üniversitesinde "Hemofili veya ölümcül kanamaya kalıtsal yatkınlık hakkında" ("About haemophilia or the hereditary predisposition to fatal bleeding") isimli tez sunumunda kullanılmıştır. Hemofilinin genetiğinin ilk tanımları ise 1820'de Nasse tarafından yayınlanmıştır ve hemofilinin hasta olmayan kadınlardan oğullarına geçtiğini belirterek Nasse yasası olarak tanımlamıştır. Hemofili ile eklem hastalığının gelişmesi arasındaki bağlantıyı ise ilk kez 1890'da König bildirmiştir (26).

Hemofili genellikle "kraliyet hastalığı" olarak adlandırılır. Bunun nedeni Avrupa kraliyet ailesinden bir kaç üyenin bu hastalıktan etkilenmesinin tespit edilmesidir. İngiltere Kraliçesi Kraliçe Victoria (1837–1901) hemofili taşıyıcısıydı ve onun oğlu Leopold 31 yaşında beyin kanaması geçirerek ölmüştü. Kraliçe Victoria'nın iki kızının taşıyıcı olması nedeni ile bu hastalık Almanya, İspanya ve Rusya'daki diğer kraliyet ailelerine de yayılmıştır. Günümüzde ise artık Avrupa'daki bu "kraliyet hastalığı"nın aslında hemofili B olduğunu biliyoruz (27).

2.3. Epidemiyoloji:

Hemofili A yaklaşık olarak 5.000-10.000 erkek doğumunda bir olarak ortaya çıkar. Hastalık insidansı tüm coğrafyalarda aynı olmakla beraber ırksal farklılık göstermemektedir (1,3,28). Hastalık çoğunlukla taşıyıcı kadınlardan, erkek çocuklarına geçmekle beraber, olguların yaklaşık 1/3 kadarında aile öyküsü yokken hastalığın spontan *de-novo* mutasyonlar ile ortaya çıktığı bilinmektedir. Çok nadir olmakla birlikte kız çocuklarda da klinik bulgular görülebilir (3,28).

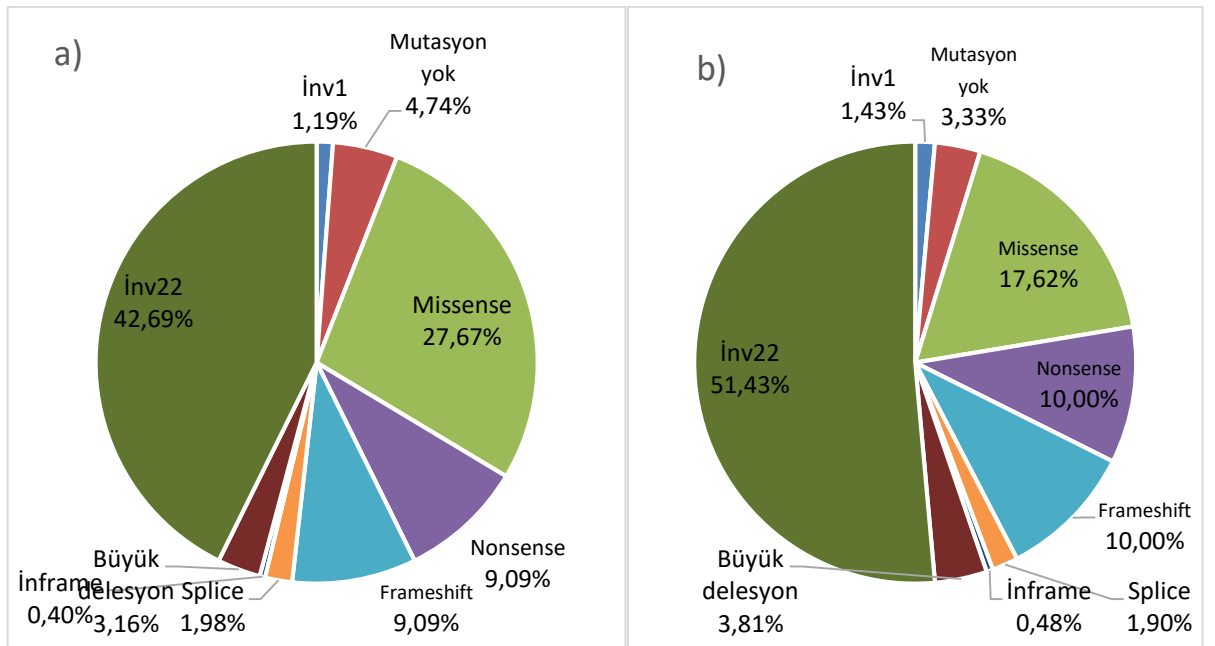
2.4. Genetik:

F8 geni Xq28'de lokalize 26 ekzondan oluşan ve toplamda 186 kb (kilobaz)'lık genomdaki en büyük genlerden bir tanesidir. Toplam 26 ekzonun 24'ü 69bç (baz çifti) ile 262bç arasında değişmekte iken, geri kalan iki ekzon 14 ve 26. ekzonlar sırasıyla 3106 ve 1958bç'den oluşmaktadır. Splice (kırılma) işleminden sonra oluşan FVIII mRNA yaklaşık 9 kb uzunluğunda olup, 2351 aminoasitlik bir prekürsör proteini kodlamaktadır. FVIII proteini kompleks glikoprotein yapısındadır. En büyük boyuttaki ve en az süre stabil olan koagülasyon faktörüdür. Plazma yarı ömrü yaklaşık 12 saat kadardır.

Bugüne kadar HAMSTeRS veri tabanında Hemofili A'ya sebep olan 2000'den fazla *F8* gen mutasyonu tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar 3 grupta sınıflandırılmıştır:

- Büyük gen yeniden düzenlemeleri
- Intragenik delesyon veya insersiyonlar
- Tek nükleotid değişimleri (missense, nonsense, splice bölge mutasyonu)

Bütün Hemofili A olgularının yaklaşık %47'sinden nokta mutasyonları sorumludur. Tüm olguların yaklaşık %2-3'ünde herhangi bir mutasyon saptanamamaktadır. Ağır klinik tablo gösteren hastaların yaklaşık %30-50'sinde *F8* intron 22 inversiyonu tespit edilirken, diğer mutasyonları büyük delesyon/duplikasyonlar, intron 1 inversiyonu ve çoğunluğu missense mutasyonların meydana getirdiği nokta mutasyonlar oluşturmaktadır (19,21).



Şekil 1. Hemofili A hastalarında görülen F8 geni mutasyon tipleri : a) tüm HA hastaları , b) ağır HA hastaları (75).
Atik T., Işık E., et al. Factor 8 Gene Mutation Spectrum of 270 Patients with Hemophilia A: Identification of 36 Novel Mutations., Turk J Hematol 2020;37:145-153

İnv1: İnversiyon 1

Frameshift: Çerçeve kayması

Splice: Splice bölge mutasyonu

İnframe: Çerçeveiçi

İnv22: İnversiyon 22

2.5. Klinik:

Sağlıklı bireylerde normal FVIII düzeyi 50-150 IU/dL'dir. Sağlıklı insanlarda ölçülen normal aralıkta faktör seviyesi % 50-150 arasında olup ortalama % 100 civarındadır. Faktör VIII seviyesi %1 den az ise “ağır hemofili-A”, %1-5 arasında ise “orta derecede hemofili-A”, %5’den büyükse “ılımlı yani hafif” hemofili olarak tanımlanır (25). Taşıyıcı kadınların %30’unda faktör aktivitesi %40’ın altındadır. Erken çocukluk döneminde kolay ekimoz oluşumu, eklem içi ve kas içi spontan kanamaların varlığı ve girişimler, travma sonrası beklenenden uzun süren kanama öyküsü hemofiliyi akla getirmelidir. Kanama bulgularının ağırlığı Faktör VIII’in eksiklik derecesi ile ilişkilidir. Faktör aktivitesi <%1 olan hastalar “ağır hemofili” kliniği, %1-5 arasında olanlar “orta hemofili” ve >%5 olanlar “hafif hemofili” kliniği gösterirler (5,14,28).

Ağır hemofili hastalarında spontan olarak ağır eklem içi, intrakranial kanamalar görülürken, hafif hemofili hastalarında cerrahi veya travma sonrası uzun süren kanamalar görülür. Bebek emeklemeye ve yürümeye başladığında hareketlerin artmasına bağlı hastalığın klinik bulguları ortaya çıkar. Hastaların büyük bir kısmı da sünnet sonrası olan kanamalar nedeniyle tanı almaktadır. Hastalığın ağırlık derecesi arttıkça, tanı yaşı erkene kayar ve klinik bulgular daha şiddetli görülür (19,28). Eklem boşluğuna olan kanama (hemartroz) ve kas içine olan kanama (hematom) hastalığın tipik klinik bulgularıdır. Hemofilide her eklem kanaya bildiği gibi en sık kanama görülenler diz, dirsek ve ayak bileği eklemleridir. Kanayan eklemden ağrı, şişlik, kızarıklık, ısı artışı ve hareket kısıtlılığı görülür. Kas içine olan kanamalar da %10-20 civarında görülür ve ilgili kasta şişlik, ısı artışı, ağrı ve kızarıklık görülür. Özellikle iliopsoas kasına olan kanama, atlanma olasılığı ve kanama miktarının fazla olabilmesi açısından

önemlidir. Hastada karın ağrısı ile beraber, dik yürüyememe, kalçada fleksiyon, kalça ve dizin pasif ekstansiyonunun ağrılı ve kısıtlı olması, femoral sinire bası nedeniyle uyuşma, karıncalama, duyu kaybı hissi önemli klinik özelliklerdir. El, el bileği, ön kol, anterior ve ya posterior tibial boşluklara kanama sonrası kompartman sendromu görülebilir ve hastada ağrı, ödem gibi başlangıç bulguların sonrasında distal nabızların kaybı, etkilenen ekstremitede güç kaybı, uyuşma görülebilir. Genellikle travma sonrasında görülen intrakranial kanamalar ise acil durum olarak hemen faktör yerine koyma tedavisine başlanmalı, faktör aktivitesi %80-100 düzeyine yükseltilmeli ve yakın izleme alınarak görüntüleme yöntemleri ile ilerleme olup olmadığı takip edilmelidir (25,28).

2.5.1. Komplikasyonlar:

“Kronik hemofilik artropati” hemofilinin en sık rastlanan kronik komplikasyonudur. Eklem boşluğuna kanamaların olması sonucunda sinovyal membranda enflamasyon (sinovit) gelişir. Tekrarlayan kanamalar sonucu gelişen kronik sinovit ile sinoviyal membran kalınlaşarak kan içindeki proteolitik enzimler nedeniyle eklem kıkırdağının dejenerasyona uğraması sonucunda eklem boşluğunda daralma oluşur. Hedef eklemlerde (altı aylık süre içinde üç kez ya da daha fazla sayıda kanayan eklemler) bu olumsuz gelişmeler çok daha hızlı yaşanır. Eğer bu sürecin gelişmesine karşı gerekli önlemler alınmaz ise eklem hareket açıklığının tamamen kaybolması (ankiloz) ile kalıcı sakatlıkların gelişmesi sonucunda kronik hemofilik artropati gelişir (28).

Tablo 1. Hemofilide görülen kanama bulguları ve komplikasyonlar

KANAMA BULGULARI	
<i>Ciddi kanama-Sıklık</i>	<i>Yaşamı tehdit eden kanamalar-Sıklık</i>

Hemartroz-%70-80 Eklemelerdeki 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 Hematüri Diğer kanamalar-%5-10		Merkezi sinir sistemi-%5 Sindirim sistemi Boyun/boğaz Ciddi travma
KRONİK KOMPLİKASYONLAR		
<i>Kas-İskelet</i>	<i>İnhibitör gelişimi</i>	<i>Transfüzyonla ilişkili enfeksiyöz hastalıklar</i>
Kronik hemofilik artropati Kronik sinovit Kalıcı sakatlıklar-Kontraktür Psödötümör Kırıklar	Alloantikör özelliğinde zamana ve sıcaklığa duyarlı inhibitör Tip1 inhibisyon kinetiği gösterir	HIV Hepatit B virüsü Hepatit C virüsü Hepatit A virüsü Parvovirüs B19 Diğerleri

Selim Hematoloji Ulusal Tanı ve Tedavi Kılavuzu Çalışma Grubu. Hemofili Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Türk Hematoloji Derneği. Ankara 2011; 1:5-7 (28).

Psödötümörler hemofilide nadir görülen bir kronik komplikasyon olup, hematoma henüz emilmeden içine yeni oluşan kanamalar sonucunda gelişir. Genelde kemik içinde oluşan kistik yapılardır. Subperiosteal, kemik içi veya periosteal bağlantıları bozacak kadar kas içi kanamalarla da oluşabilir. Kanamalar, kemikte destrüksiyon ve yeni kemik oluşumunu hızlandırarak kemik içinde geniş kistlerin oluşumuyla sonlanırlar. Nörovasküler yapılar etkilendiğinde ve kemiklerde patolojik kırıklar oluştuğunda dikkate alınmalıdır. Günümüzde faktör tedavisinde olan gelişmeler sonucunda bu komplikasyonun görülme sıklığı oldukça azalmıştır. Hemofilinin tekrarlayan FVIII infüzyonları sonrasında gelişen diğer en önemli ve en sık rastlanan komplikasyonlarından biri de alloantikör özelliğinde olan zamana ve sıcaklığa duyarlı inhibitör gelişmesidir. İnhibitör gelişmesi birçok genetik ve çevresel faktörlere dayalı bir komplikasyon olup “Hemofilide inhibitör sorunu” başlığında detaylı bahsedilecektir.

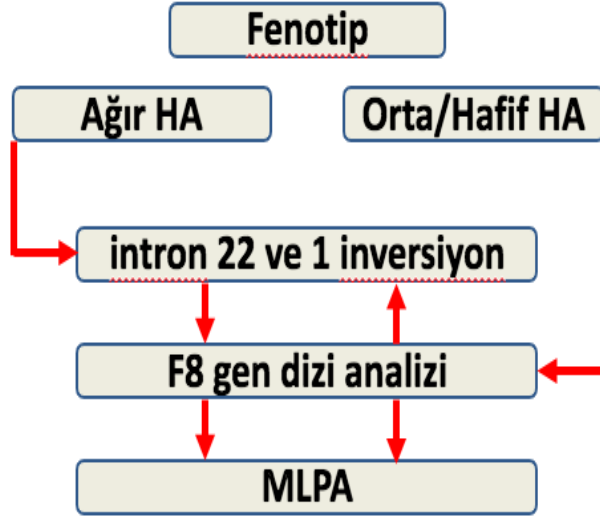
2.5.2. Tanı, Laboratuvar:

Hemostaz bozukluklarını incelemek ve ayırıcı tanı amacıyla periferik kan yaymasının analizi, tam kan tetkikinde trombosit sayısı ve ayrıca protrombin zamanı (PT veya PZ), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT veya aPTZ), kanama zamanı (KZ) ve trombin zamanı (TT veya TZ) test edilir. Tam kanda trombosit sayımı ve periferik yayma değerlendirilerek primer hemostaz, aPTT ve PT kullanılarak ise sekonder hemostaz (pıhtılaşma) değerlendirilir. Faktör VIII eksikliğinde bakılan koagülasyon testlerinde aPTZ uzaması görülür. Normal plazma ile yapılan 1/1 oranındaki karışım testi ile aPTZ süresinin %50'den fazla normale yaklaşması tanıyı doğrular. Hemofilide trombosit sayısı, kanama zamanı, protrombin zamanı ve trombin zamanı testleri normaldir. Bakılan tetkikler ile aPTZ'deki uzama görüldükten sonra da kesin tanı için faktör VIII veya IX aktivitesi çalışılması gereklidir. FVIII düzeyi düşük saptanan hastalarda ise aynı zamanda hem de ayırıcı tanı nedeniyle von Willebrand Hastalığı dışlanmalıdır. Bunun aksine faktör aktivitesi >%30 saptananlarda genellikle aPTZ süresi normal aralıkta görülür (19).

HA'da alta yatan *F8* gen mutasyonunun belirlenmesi, hem taşıyıcılarda prenatal tanı için, hem de hasta bireylerde tedaviye karşı inhibitör gelişim riskinin ve replasman tedavisine bağlı anafaktik reaksiyon gelişiminin öngörülmesinde oldukça önemlidir (7). Bu olgularda mutasyonun tespiti, inhibitör gelişen olgularda, immun tolerans tedavisine yanıtın öngörülmesinde ve hatta gelecekte ortaya çıkacak genetik temelli tedavilere uygunluğun saptanmasında rol oynayabilir (80).

Ağır HA olgularının yaklaşık %45'inde intron 22'deki spesifik bir intrakromozomal inversiyon belirlenmektedir. Bu mutasyon, *F8* geninin yaklaşık 450 kb upstream (ön) bölgesinde bulunan 2 homolog diziden biri ile intron 22 arasındaki spontan rekombinasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (76,77). Bu inversiyon erkek germ hücrelerindeki mayoz sırasında kendiliğinden oluşmaktadır (78). Benzer şekilde *F8* geninin 140 kb upstream (ön) bölgesindeki homolog dizi ile intron 1 arasında meydana gelen bir diğer inversiyon mutasyonu da (intron 1 inversiyon) ağır HA olgularının yaklaşık %1-2'sinde saptanmaktadır (79). Belirtilen bu mutasyon dağılımı özellikleri nedeniyle, hastada sorumlu *F8* varyantının belirlenmesi için analiz istenirken, hastalığın ağırlık derecesi göz önüne alınmaktadır. Ağır HA olgularında tipik olarak öncelikle intron 22 inversiyon ve intron 1 inversiyon analizleri gerçekleştirilmekte, bu testler ile mutasyon belirlenemeyen olgularda *F8* geninin kodlayıcı bölgelerinin dizi analizi yapılmaktadır. Bu yöntemler, özellikle diğer büyük intragenik duplikasyonların

belirlenmesinde yeterli olmadığından, son olarak delesyon duplikasyon analizi (çoğunlukla Subtelomerik Delesyon-Duplikasyon Analizi (MLPA) ile) gerçekleştirilmektedir. Hemofili A olgularında uygulanan tanısal algoritma Şekil 2’de gösterilmektedir.



Şekil 2. Hemofili A moleküler tanı planı.

Günümüzde yukarıda belirtilen moleküler tanı algoritması sayesinde, HA olgularının yaklaşık %95’inde hastadaki sorumlu patojenik varyant tespit edilebilmektedir (81). Geri kalan %5’lik bölümde kalan olgularda klinisyenin öncelikle hastanın ön tanısını yeniden gözden geçirmesi önerilmektedir. Özellikle vWH Tip 2N olgularının, hafif/orta HA klinik tablosu ile benzerlik gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle mutasyon negatif hafif/orta HA olgularında bu açıdan vWH için moleküler analiz yapılmalıdır. Bir başka olasılık ise doku ya da germlinal mozaiklik. Mutasyon negatif HA olgularının çok az bir kısmında da olsa, özellikle ailede başka HA olgusu yoksa, bu durum gözardı edilmemelidir. Ayrıca, FV ve FVIII’in endotel hücreleri ve hepatositlerden salınımını düzenleyen *MCFD2* ve *LMAN1* genlerindeki patojenik varyantların, kombine FV/FVIII eksikliği ile ilişkisi bilinmektedir (82). Son olarak, *F8* geni kodlayıcı bölgeleri dışındaki az sayıda bazı varyantların da literatürde hastalık yapıcı olarak bildirildiği unutulmamalıdır. Bu açıdan yeni nesil dizi analizi ile derin intronik varyantların belirlenmesi amacıyla tüm genin (tüm intronik bölgeleri de içerecek şekilde) dizi analizi yapılabilir (83-85).

2.5.3. Tedavi:

Ağır Hemofili A hastalarında kullanılan tedaviler faktör düzeyini artırmaya yönelik olarak öncelikle spontan kanamaların ortaya çıkmasını önlemeyi hedeflemektedir. Tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi sonucunda hemofili artık ağır bir hastalıktan iyi bir yaşam kalitesine sahip bir duruma dönüşmüştür (14). FVIII ürünlerinin etkinlik ve güvenliğindeki büyük ilerlemeler ve tedavi stratejileri bunu mümkün kılmıştır.

Hemofili hastalarının tedavisinde kanamanın önlenmesi amaç olmakla beraber sonrasında uygun olan hastalar profilaksi programına alınmalıdır. Akut kanamalar en kısa zamanda tedavi edilmeli, tüm ciddi kanamalar hastane ortamında izlenmeli ve tedavisi uygulanmalıdır. Uygun dozda verilen faktör konsantrisine rağmen kanamaya hakim olunmadığında akla inhibitör varlığı gelmeli, faktör düzeyi ölçülmeli ve inhibitör varlığı araştırılmalıdır (25). Herhangi bir girişimsel işlem veya cerrahi planlandığında uygun faktör düzeyi sağlanmalıdır. Kas içi girişimlerden kaçınılmalıdır. Hastanın aktif yaşam şartlarını engellemeyecek şekilde olabildiğince travmadan uzak kalması sağlanmalıdır. Koruma ve hafif/orta kanamaların tedavisini anne ve babaya ev koşullarında yapması için yeterli eğitim verilmesi sağlanmalıdır.

Tablo 2. Kanama yerine göre Hemofili A'da yerine koyma tedavisinin doz ve süresi

<i>Kanamanın tipi</i>	<i>İstenen düzey</i>	<i>Gün sayısı</i>
Hemartroz	%40-60	1-2 gün, yanıt yeterli değilse daha uzun
Kas içi kanama (iliopsoas hariç)	%40-60	2-3 gün, yanıt yeterli değilse daha uzun
İliopsoas kanaması		
Başlangıç	%80-100	1-2 gün
Devam	%30-60	

		7-10 gün, bazen sekonder profilaksi olarak fizyoterapide daha uzun
MSS/Kafa travması		
Başlangıç	%80-100	1-7 gün
Devam	%50	8-21 gün
Boğaz/boyun		
Başlangıç	%80-100	1-7 gün
Devam	%50	8-14 gün
Sindirim sistemi		
Başlangıç	%80-100	1-6 gün
Devam	%50	8-14 gün
Üriner sistem	%50	3-5 gün
Derin laserasyon	%50	5-7 gün
Cerrahi (majör)		
İşlem öncesi	%80-100	1-3 gün
İşlem sonrası	%60-80	1-3 gün
	%40-60	4-6 gün
	%30-50	7-14 gün

Selim Hematoloji Ulusal Tanı ve Tedavi Kılavuzu Çalışma Grubu. Hemofili Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Türk Hematoloji Derneği. Ankara 2011; 1:5-7 (28).

Faktör VIII konsantreleri plazma ürünleri ve rekombinant ürünler olarak ayrılmaktadır. Kan ürünleri binlerce kişinin kanından elde edilen plazmalardan hazırlanmaktadır. Kan ürünleri hazırlanırken donörlerin bulaşıcı virüsler açısından kontrol edilmesi ve saptanan kandaki virüslere yönelik temizlik işlemlerin yapılması sonucunda oldukça güvenilirdir (25). Faktör VIII 1 İÜ/kg verildiğinde, plazma FVIII düzeyi %2 artar, yarılanma ömrü ise 8-12 saattir (28). Rekombinant ürünler ise genetik mühendisliği yoluyla insan kanı kullanılmadan üretilen suni FVIII ilaçlarıdır. İnsan kanı kullanılmadığı için kan yoluyla bulaşan mikrop ve virüslerin bulaşma riski yoktur (25,28). Rekombinant ürünlerin doz hesaplamaları plazma ürünlerinin aksine farklılıklar gösterebildiğinden kullanılan ilacın ürün bilgilerine bakılarak doz ayarlanması yapıldıktan sonra uygulanmalıdır.

Tablo 3. Ülkemizde piyasada mevcut olan faktör konsantreleri

PLAZMA KAYNAKLI FVIII KONSANTRELERİ	1.OCTANATE (Octapharma-Avusturya) 2.FACTANE (LFB-Fransa)
--	---

		3.HAEMOCTİN (Biotest-Almanya) 4.BERİATE (Behring-Almanya) 5.HEMOFİL-M (Baxter-Amerika) 6.EMOCLOT (Kedrion-İtalya) 7.FANHDI (Grifols-İspanya)
REKOMBİNAN KONSANTRELERİ	FVIII	1.RECOMBİNATE (Baxter-Amerika) 2.KOGENATE-FS (Bayer-Almanya) 3.REFACTO-AF (Pfizer-Amerika) 4.ADVATE (Baxter-Amerika) 5.NOVOEİGHT (Novo Nordisk-Amerika)

Balkan C. Hemofilide profilaksi. In: Kavaklı K. ed. Hemofili Rehberi 2014. 1st ed. Meta Basım 2014:35- 53 (25).

Genellikle orta ağırlıkta olan kanama ataklarında (hemartroz, ilerlemiş yumuşak doku kanaması) FVIII 20-25 İÜ/kg uygulanır ve kliniğe göre eğer 12-24 saat içinde bulgular devam ediyorsa tedaviye devam edilmelidir. Ağır kanamalarda (intrakranial, cerrahi, ciddi travma) başlangıç doz 50 İÜ/kg, sonra 12 saat arayla 25 İÜ/kg olarak uygulanır. Ortalama tedavi süresi klinik duruma göre ayarlanmakla birlikte genellikle 10-21 gündür (28). Artık çok kullanılmayan sürekli infüzyon yöntemi de mevcut olup günlük verilmesi gereken faktör saat başına verilecek kadar hesaplanarak 24 saat içinde uygulanır.

Faktör konsantreleri dışındaki tedavi seçenekleri olarak taze donmuş plazma (TDP) günümüz koşullarında önerilmese de faktör konsantresi yoksa ya da henüz kesin tanı konulamayan hastaların acil tedavi gereksinimi varsa verilebilir. Tedavi sürecinde gerekli faktör konsantresine ulaşıncaya TDP verilmesi kesilir. 1 ml TDP’de 1 Ü FVIII olduğu kabul edilmektedir ve başlangıç dozu 15-20 ml/kg olarak uygulanmaktadır.

Diğer bir tedavi seçeneği olan Desmopressin (1-deamino-8-D-arginine vasopressin) ise antidiüretik hormonun sentetik analogudur. Hafif hemofililerde ve basit kanamaların tedavisinde kullanılır. Tek doz uygulamada FVIII düzeyini 2-6 kat oranında yükseltir, ancak ağır hemofilinin tedavisinde yeri yoktur. Hızlı infüzyonla taşikardi, flushing, abdominal rahatsızlık, titreme ve taşiflaksi gelişme riski gibi yan etkileri mevcuttur. Su birikimi ve hiponatremi, özellikle iki yaşından küçük çocuklarda ve postpartum dönemde hiponatremi ve konvulziyon riski en ciddi yan etkileri arasındadır. Kan ürünü olmaması ve ucuz olması en önemli avantajıdır.

Mukozal kanamalarda çok etkin olan antifibrinolitik tedavi (Traneksamik asit) plazminojen aktivasyonunu yarışmalı olarak inhibe eden sentetik bir antifibrinolitik ilaç olup, fibrin stabilitesine destek olan yardımcı bir tedavidir. Tablet formunda 15-25 mg/kg/doz, 8 saat arayla, oral, 5-10 gün kullanılacak şekilde önerilir. Genellikle dental ve jinekolojik girişimlerde, burun kanamalarında, menorajide destek tedavisi olarak kullanılır. Özellikle cerrahi operasyonlarda kesi yerinin daha çabuk iyileşmesine katkıda bulunmak için FİBRİN GLUE (Fibrin Yapıştırıcısı) kullanılabilir. Günümüzde hemofilili çocukların sünnet operasyonunda fibrin yapıştırıcı sıklıkla kullanılmaktadır. (25,28)

Yardımcı tedaviler olarak eklem kanamalarının önlenmesine yönelik yapılması gereken genel uygulamalar PRICE başlığı altında tanımlanıyor (Protection=koruma, Rest=istirahat, Ice=buz, Compression=kompresyon, Elevation=yukarıda tutma). Bunun yanı sıra eklem kanamalarında ağırlığına ve kliniğine göre ilk kanamada uygun faktör doz konsantreleri seçilmeli ve verilmeli, daha sonrasında hasta yakın takip edilerek bir sonraki doz uygulamaları planlanmalıdır. Buz uygulaması, geçici istirahat ve elevasyon destek tedavilerini oluşturarak ağrının azalmasına ve kanamanın gerilemesine yararlı olur (25).

2.5.4. Hemofilide çocuklarda profilaksi tedavisi:

Günümüz klasik tedavi protokollerinde ağırlıklı olarak kanama sonrasında faktör infüzyonu (kanadıkça tedavi) uygulanması ve sonrasında tekrarlayan her eklem içi kanama sonrası ağır kalıcı hasarlar görüldüğünden çocuklarda profilaksi kavramı ortaya çıkmıştır ve faktör konsantreleri ile profilaktik faktör tedavilerinin yararlı olduğu gösterilmiştir (32). Bugüne kadar yapılmış olan pek çok gözlemsel çalışma profilaktik tedavinin epizodik tedaviye (kanama olunca yapılan tedavi) üstünlüğünü göstermiştir (30,31,32).

Bilindiği gibi hafif hemofili hastalarında eklem problemleri görülememekle beraber bunun aksine, orta ve ağır derecede klinikle seyreden hastalarda ciddi problemler oluşmaktadır. Bu nedenle 1950’li yılların sonlarında hemofilide kanamaların önlenmesi yani “Profilaksi” kavramı Nilsson ve ark. tarafından ortaya atılmıştır. İsveç’te başlayan profilaksi uygulamasının başarıya ulaşması sonucunda 1990’lı yıllarda tüm batı ülkelerinde yaygın kullanılmaya başlanmıştır. Sonuç olarak, profilaksi tedavisi hem Dünya Hemofili Federasyonu (WFH) hem de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ağır hemofili hastalarındaki hemofilik artropatinin

önlenmesi konusunda “birinci seçenek” tedavi olarak önerilmektedir (29). Günümüzde profilaksi tanımı yaşa ve/veya ilk kanama atağına göre yapılmaktadır (Tablo 4).

Profilaktik tedavinin amacı ‘hemofilik artropati’ olarak adlandırılan en önemli morbidite nedeni olan kalıcı eklem hasarlarını önlemek, yaşamı tehdit eden ve olası ağır kanamaların sayısını azaltmak, hemofili hastasının ve ailesinin hayat kalitesini artırmaktır. Günümüzde bu hastalar için “primer profilaksi” en etkin ve güvenilir tedavi modeli olarak görünmektedir (33).

Optimal profilaktik tedavi rejiminin hangisinin olduğuna dair yüksek derecede güvenilir klinik kanıtlar bulunmaması yanı sıra pek çok yapılan klinik çalışmalarda elde edilen sonuçlarla erken yaşlarda başlayan profilaksi önerilmektedir. Ayrıca son yıllarda hastanın klinik kanama özellikleri doğrultusunda yaş ve vücut ağırlığı esaslı, yaşam tarzı/fizik aktivite düzeyi, kas-iskelet sistemi durumu, hastanın tedaviye uyumu, hedef eklem varlığı yaklaşımlarını da içeren “bireyselleştirilmiş profilaksi” yönünde de yayınlar bulunmaktadır. Bu konu ile ilgilenen değişik ülkelerde pratikte farklı dozlardaki profilaksi rejimleri uygulanmaktadır (29). Ülkemizde profilaksi programına alınacak hastalarda klinik ve laboratuvar olarak “ağır hemofili” grubunda olması, kalıcı sakatlık gelişmeden önceki çocuk hasta olması, ailesinin ve hastanın tedaviye tam uyumlu olması, uygulama öncesinde ve sonrasında belirli aralıklarla inhibitör taraması yapılmış olması, programa izin veren sosyal güvenceye sahip olması gibi kriterleri göz önüne alınmaktadır.

Tablo 4. Uygulanan tedavi modeline göre profilaksi tanımları

TEDAVİ MODELİ	TANIM
<i>Kanadıkça tedavi (epizodik veya on-demand)</i>	Klinik olarak kanama bulgusu varlığında uygulanan tedavi

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 düzenli ve devamlı* tedavi
Sekonder profilaksi	2 ya da daha fazla sayıda gerçekleşen büyük eklem** kanamasından sonra, ancak fizik muayene ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile ‘eklem hasarının’ oluşmasından önce başlanan düzenli ve devamlı* tedavi
Tersiyer profilaksi	Fizik muayene ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile etkilenen eklemlerde eklem hasarının başladığının gösterilmesinden sonra uygulanan düzenli ve devamlı* tedavi
İntermittan (periyodik) profilaksi	Kanamaların önlenmesi amacıyla bir yıllık sürede toplam 45 haftayı aşmayan kısa süreli tedavi uygulanması

Kavaklı K, Unuvar A, et al. Turkish PUP study. *Haemophilia* 2014; 20(suppl.3): 33. *WFH Congress, Melbourne 2014* (29).

*Bir yıllık sürede (52 hafta) en az 45 hafta boyunca (%85) düzenli tedavi uygulanması

**Büyük eklemler = diz, dirsek, ayak bileği, kalça ve omuz eklemleri

Ülkemizde haftada 2 veya 3 kez 20-40 IU/kg dozlarda uygulanacak olan “sekonder/tersiyer profilaksi” yanı sıra uygun olan çocuklarda “Primer profilaksi”nin de başlanması önerilmektedir. Primer profilaksiye haftada bir infüzyon ile başlanıp, kanama halinde zaman kaybetmeden haftada 2 ve gerektiğinde 3’e çıkarılması önerilir. Uygulama sıklığına göre doz da değişecektir. Primer profilaksiye haftada bir başlanacaksa 30-50 U/kg/doz uygulanması ve profilaksi amacıyla bir defada verilecek dozun 50 IU/kg’ı aşmaması önerilir ve profilaksinin 18 yaşına kadar sürdürülmesine çalışılmalıdır (25,29,33).

Son yapılan çalışmalar profilaksi tedavisinin inhibitör gelişmesine karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir (64,71,72). Profilaksi tedavisi alan hastalar da diğer ağır HA hastaları gibi en az 3 aylık aralarla rutin kontrollerde görülerek klinik olarak değerlendirilmeli,

hedef eklemlerin gelişmesi yönünden, kanama sayıları ve tüketilen ekstra faktör miktarları bakımından izlenmelidir.

2.6. Hemofilide inhibitör sorunu:

2.6.1. Tanım

Hemofili-A hastalarında tedavide uygulanan FVIII proteinine karşı “antikor” gelişmesi sonucu oluşan, en sık rastlanan ve en ciddi tedavi komplikasyonudur (2,8,21). Bu antikorların tedavide kullanılan faktör proteininin işlevini engellemesi nedeniyle “inhibitör” olarak tanımlanır.

FVIII antikorları, ağır hemofili A (HA) hastalarının yaklaşık % 25’inde gelişir, bununla da kanama yönetimini zorlaştırırlar ve daha yüksek tedavi maliyetleri ve artmış morbidite, mortalite ile sonuçlanırlar (6). İnhibitör gelişimi için ilk 5 yaş ve ilk 50 faktör uygulama gün sayısı en riskli dönemdir (1,2,3,19). Ağır HA’da inhibitörler FVIII ile 10 ila 15 günlük bir tedavi sürecinden sonra gelişir. Bunun ardından 50 ila 75 tedaviye maruz kalma gününden sonra, inhibitörlerin kümülatif insidansı platoya ulaşır ve bundan sonra inhibitörlerin oluşumu nadirdir. İnhibitörlü hastalarda kanamalar sırasında hemostaz yeterli sağlanamadığından, bu hastalarda ağır kanamalarda yaşam tehlikesinin olmasının yanı sıra, eklem morbiditesi ve sakatlık gelişme oranında risk belirgin olarak yüksektir (1,2,8,11,19). İnhibitör gelişiminin bu hastalarda tedavi maliyetini 5 kata kadar yükselttiği bilinmektedir.

2.6.2. Tanı ve testler

İnhibitör şüphesi varlığında inhibitör tarama testi yapılır. Tarama testi pozitif olanlarda kesin tanı ve inhibitörün titresini saptamak için modifiye Bethesda testi kullanılır. Hastanın %100 olan FVIII aktivitesinin %50’sini inaktive eden inhibitör aktivitesi 1 Bethesda Ünitesi (BÜ/ml) olarak tanımlanır. Bu test sonucunda $\geq 0,6$ BÜ/ml olarak sonuçlanan titreler pozitif olarak kabul edilir (19). İzlem sırasında titre 5 BÜ/ml’yi aşmazsa, “Düşük Titrele İnhibitör” olarak tanımlanır. Verilen FVIII tedavisine rağmen titre bu seviyeyi aşmıyorsa düşük yanıtlı inhibitör (Low responder-LR) olarak belirlenir. Düşük titreli hastaların yaklaşık olarak yarısında izlemde inhibitör kendiliğinden kaybolduğu görülür (geçici inhibitör). Tam tersi titre > 5 BÜ/ml olarak görülüyorsa, yüksek yanıtlı inhibitör (High responder-HR) olarak belirlenir.

En çok klinik sorun yaratan hasta grubu HR tipteki hastalardır. Bu hasta grubunda geçici inhibitör görülmesi çok nadirdir (16,19).

Tüm hemofili hastalarında en az yılda 1 kez tarama testi olarak inhibitör bakılması gerekmektedir. Bebeklik döneminde risk yüksek olduğundan her beş FVIII kullanım günü sonrası tarama yapılması, 20 uygulama günü (UG) tamamlandıktan sonra 10 UG sonrası kontrol yapılması uygundur. İlk 50 UG tamamlandıktan sonra riskin azalması sebebiyle 6 ayda bir bakılması yeterlidir. İlk 150 UG sonrası ise inhibitör gelişmesi çok nadir olarak görülür. Uzun süreli profilaksi alan hastalarda risk belirgin azaldığından dolayı yılda 1 kez yapılacak kontrol yeterli kabul edilir. Aynı zamanda yoğun veya uzun süreli FVIII kullanımlarından 7-10 gün sonra, günlük uygulamada alışılmış dozlara rağmen FVIII tedavisine klinik yanıt alınmadığı zaman, ayrıca tüm cerrahi girişimlerden (diş çekimi ve sünnet dahil) önce mutlaka inhibitör tarama testi yapılmalıdır. İnhibitörün hangi hastalarda olabileceğine dair bazı klinik ve laboratuvar göstergeler bulunmaktadır.

2.6.3. Klinik ve laboratuvar göstergeler

Uygulanan yeterli dozda profilaksi programına rağmen kanamalar halen devam ettiğinde, rutin alışılmış FVIII uygulanmasına rağmen kanamalar eskisi ile kıyasta rahatlıkla durmadığında ve daha uzun süreli veya yüksek dozlarda FVIII tedavisi ile hemostaz sağlandığında inhibitör gelişmiş olabileceği klinik gösterge olarak akla gelmelidir. Yeterli dozda uygulanan FVIII tedavisine rağmen, aPTZ testinde beklenen kısalmanın görülmemesi, tedavi sonrası FVIII aktivitesi ölçüldüğünde hedeflenen düzeylere ulaşmaması yanı sıra, <%1 gibi çok düşük sonuçların elde edilmesi inhibitör gelişmiş olabileceğinin laboratuvar göstergeleridir.

2.6.4. İnhibitörlü hastalarda hemostazın sağlanması

İnhibitörlü hastalarda kanamayı durduran temel tedavi yaklaşımı baypas edici ilaçların kullanılmasıdır. Söz konusu ilaçlar FVIII veya FIX'a gereksinim göstermeden FXa aktivitesi oluşturduklarından dolayı inhibitörlü hastalarda kanamaların durdurulabilmesi mümkün olmaktadır. İnhibitör titresinin bilinmediği durumlarda sadece baypas edici ilaçlardan

(rekombinant FVIIa veya activePCC) biri kullanılmalıdır. Düşük titreli (<5 BU/ml) hastalarda 8-12 saat aralarla inhibitörsüz dönemde kullanılan FVIII dozundan 2-3 kat yüksek dozlarda (genellikle 50-100 IU/kg) FVIII uygulanmalıdır. FVIII tedavisiyle kanamalar duruyor ve inhibitör titresi <5 BU/ml’de seyrediyorsa kanamalarda FVIII kullanılmaya devam edilebilir, aksi takdirde tedavi bırakılmalıdır. Tedaviler sırasında FVIII ölçümleriyle izlem yapılabilir. Yüksek titreli (≥ 5 BU/ml) hastalarda ise kesinlikle by-pass edici ilaçlardan biri tercih edilmelidir (19). (Tablo 5)

Tablo 5. By-pass edici ilaçlar ve özellikleri

By-pass edici ilaçlar	Rekombinant FVIIa	Aktive PCC kompleksi
Ticari ismi	NOVOSEVEN (NovoNordisk)	FEIBA (Baxter)
Geri ödemesi (2011)	Hastane şartlarında/günübirlik	Ayaktan ve hastanede
Kaynağı	Rekombinant	Plazma kaynaklı
Etki mekanizması	rFVIIa ile Doku Faktörü veya aktive trombositte	FXa ve protrombin ile
Hazırlanması	1 mg/1 cc ; 2 mg/1 cc	500 IU/20 cc
Uygulama süresi	2-5 dakikada bolus	15-30 dakika yavaş infüzyon
Doz ve günlük üst sınır dozları	90 µg/kg 2-3 saat aralarla 2 veya 3 kez veya 1x 270µg/kg	50-100 IU/kg 6-12 saat aralarla (maksimum tek doz 100 IU/kg, en yüksek günlük doz 200 IU/kg)
Yaşamsal önemi olan kanamalarda	Her 2 saatte bir 90 µg/kg hemostaz sağlanana kadar	8-12 saatlik aralarla 50-100 IU/kg, en yüksek doz 200 IU/kg hemostaz sağlanana kadar
Tromboz riski	Olası	Olası (en üst sınır dozlar aşılırsa çok yüksek)
Başarı şansı	%79-92	%64-91
Anamnestik yanıt	Yoktur	%30 risk vardır
Laboratuvar izlemi	Tromboelastografi (TEG) ve trombin ölçümü ile deneyimli merkezlerde	TEG ve trombin ölçümü ile deneyimli merkezlerde
Traneksamik asit ile birlikte kullanım	Gereğinde birlikte kullanılması önerilir	Birlikte kullanılması önerilmez

Balkan C. Hemofilide profilaksi. In: Kavaklı K. ed. Hemofili Rehberi 2014. 1st ed. Meta Basım 2014:35- 53 (25).

2.6.5. İnhibitör eradikasyonu

İnhibitör eradikasyonu, FVIII ürününe karşı immün sistemde tolerans kazandırmak amacıyla düzenli FVIII ürünü uygulandığı immün tolerans terapisi ile sağlanabilir. Bununla birlikte, hastaların %10 ila 20'sinin bağıışıklık toleransına ulaşmadığı bildirilmiştir (14). İmmün

Tolerans Tedavisinin (İTT) temel mantığı belli aralarla ve düzenli olarak FVIII uygulayarak hastanın immün açıdan “toleranslı” hale getirilmesidir. HR tipte inhibitörü olan hastalarda İTT öncelikle denenmelidir. LR tipte inhibitörlerin kendiliğinden veya FVIII tedavisine devam edilmesi ile yok olması mümkün olduğundan 6 aylık izlem süresi sonrası değerlendirilmeli, uygulanan FVIII tedavisiyle hemostaz sağlanamıyorsa ve 6 aylık izlemde inhibitör kaybolmamışsa İTT uygulanması önerilir. İnhibitör titresi <10 BÜ olduğunda İTT başlanması önerilir. Bu titreye genellikle ilk 12 ay içinde ulaşılır. Bu dönemde kanama ataklarının tedavisi baypas edici ilaçlarla yapılmalıdır.

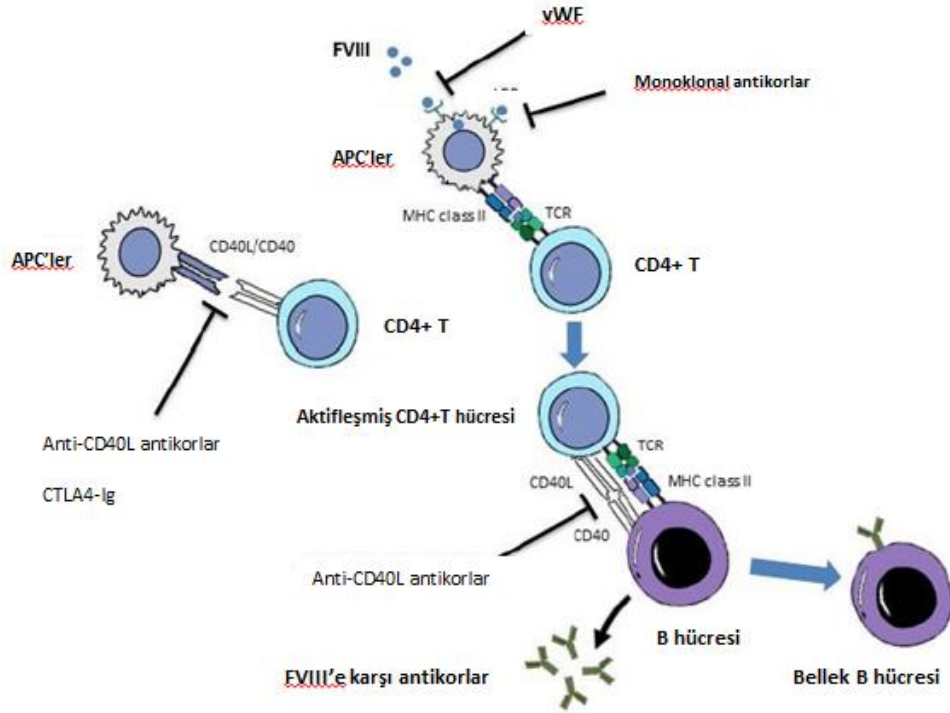
2 farklı İTT yaklaşımı mevcuttur: a) *Bonn protokolü*: 100 İÜ/kg FVIII dozu 12 saat aralarla kullanılarak inhibitörün 1-6 ay sürede kaybolması beklenir. Maliyeti yüksek bir tedavi protokolüdür. Başarı oranı %50-80 civarındadır. b) *Düşük doz yaklaşımı*: 20-50 İÜ/kg dozlarda haftada 2-3 gün FVIII kullanılır. Başarı oranı %20-70 civarındadır. Ülkemizde bu protokolün uygulanması önerilir (19).

2.6.6. Patofizyoloji ve immün yanıt

İnhibitör gelişimi kompleks ve multifaktöriyel bir süreçtir (1,3,8,9). Bu inhibitörlerin neden sadece hastaların bir bölümünde ortaya çıktığına dair kesin bir açıklama olmasa da, mevcut araştırmalar inhibitör gelişiminin çok faktörlü bir immün yanıt olduğunu göstermektedir (1,8,9).

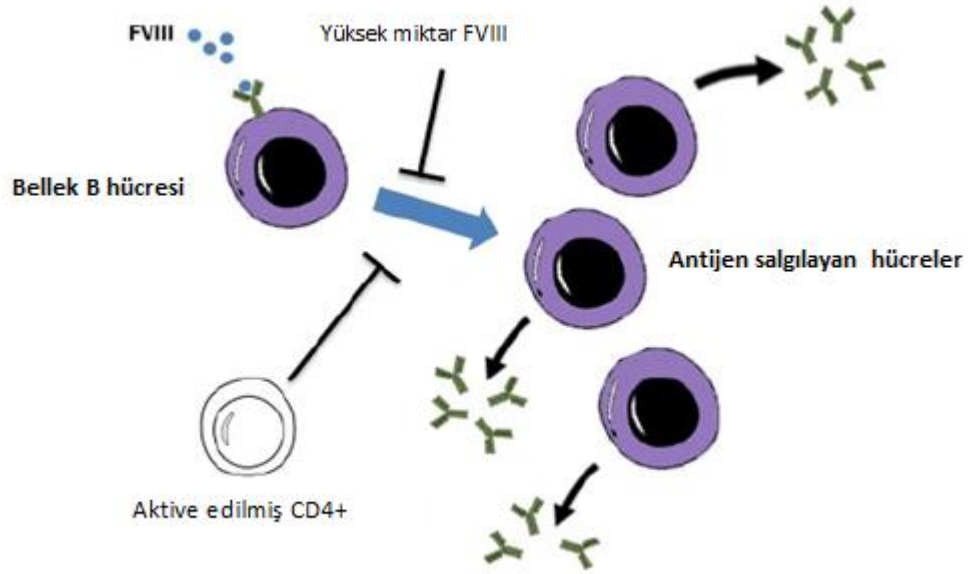
Anti-FVIII immün cevabın başlatılmasında çeşitli hücre tipleri gösterilmiştir. Yüksek afiniteli IgG antikorları olan inhibitörlerin sentezi, FVIII'ye özgü spesifik T folliküler yardımcı hücrelerinde CD4+T (T-helper) hücrelerinin aktivasyonunu gerektirir (16). T lenfositlerinin uyarılması, antijen sunan hücrelerde (APC'ler) aktivasyon sinyallerinin oluşmasını tetikler. FVIII'e yanıt olarak bu immün yanıt tetiklendiğinde, protein APC'ler tarafından endositozlanır ve antijenik epitoplar, hücre yüzeyinde majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II molekülü olan bir kompleks halinde sunulur (1,16). APC'ler MHC-II aracılığı ile FVIII antijenik peptid kompleksini CD4+T lenfositlerine sunarlar. MHC-II/peptid kompleksinin T hücre reseptörlerine (TCR) bağlanması ile T hücreler aktive edilir. Bu aktivasyon da efektör ve hafıza T hücrelerinin çoğalmalarıyla sonuçlanır. Bunun sonucunda CD80/86 ve CD28 bağlantısı ikincil T hücre uyarısına sebep olur ve T hücrelerden çeşitli sitokinlerin (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5 ve TNF) salınımı gerçekleşir. Salınan sitokinler B lenfositleri uyararak plazma

hücrelerine dönüşmelerini ve antikor sentezini tetikler. Aynı zamanda FVIII'e özgü bellek B hücreler oluşur. Bu hücreler antikor sentezlemez, dalağa veya kemik iliğine yerleşerek tekrarlayan FVIII maruziyeti sonrası hızlıca plazma hücrelerine dönüşür (43). Ekzojen FVIII'e karşı oluşan antikorlar genellikle immunglobulin (Ig) G1 ve IgG4 alt tipine aittir (1,16). Ayrıca T lenfositlerden salınan CTL4 T hücrelerinde negatif sinyal oluşturarak ortaya çıkan immün reaksiyonu sınırlandırır (1,16). Tüm bu yanıt mekanizması primer immün yanıt olarak bilinir (Şekil 3).



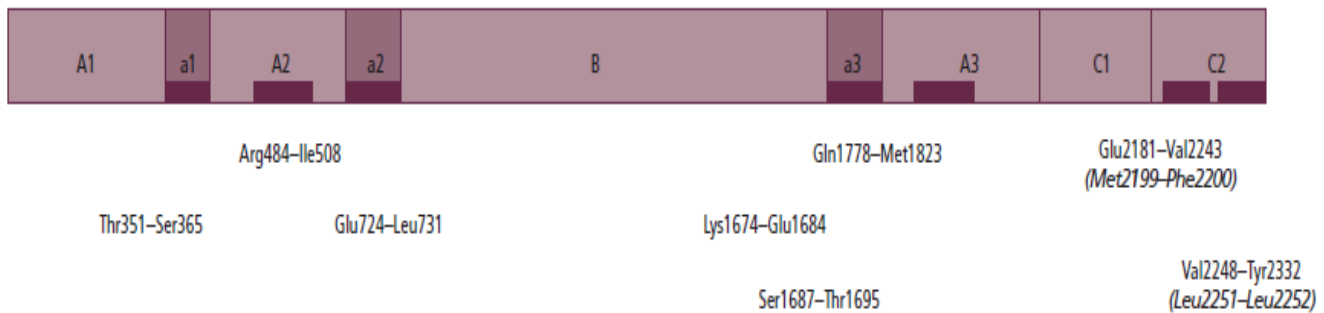
Şekil 3. Hemofilide inhibitör gelişiminde primer immün yanıt (43). *Matino, D., Tieu, P., & Chan, A. (2020). MOLECULAR MECHANISMS OF INHIBITOR DEVELOPMENT IN HEMOPHILIA. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases, 12(1), e2020001.*

Sekonder immün yanıt sırasında ise primer immün cevap zamanı oluşan FVIII'e özgü bellek B hücreleri APC'ler gibi davranır ve FVIII'e özgü CD4+ T hücrelerini aktifleştirdir. Bununla da bu hücrelerin yardımıyla yeni B hücreleri etkinleşir ve antikor sentezleyen yeni plazma hücrelerine dönüşür. Aynı zamanda yeni FVIII proteininin dendritik hücreler gibi bilinen başka APC'ler tarafından alınması yeni FVIII'e özgü bellek B hücrelerin oluşmasına, bu da sonradan plazma hücrelerine farklılaşmasına neden olur (43). (Şekil 4)



Şekil 4. Hemofilide inhibitör gelişiminde sekonder immün yanıt (43). *Matino, D., Tieu, P., & Chan, A. (2020). MOLECULAR MECHANISMS OF INHIBITOR DEVELOPMENT IN HEMOPHILIA. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases, 12(1), e2020001.*

Çalışmalar, FVIII antikorlarının, FVIII'nin normal fonksiyonuna müdahale etmek için esas olarak A2, A3 ve C2 bölgelerine bağlanarak etki ettiğini göstermiştir (16). FVIII'in antikor bağlanma bölgesi, A2 alanı içinde Arg484-Ile508 kalıntılarını ve A3 alanı içinde Gln1778-Met1823'ü içerir. A2 bölgesini ve kalıntılarını çevreleyen asidik a1 ve a2 bölgelerinde epitoplara bağlanan antikorlar a3'deki Lys1674 – Glu1684 ve Ser1687- Thr1695'in a3 içindeki proteolitik bölünmesini ve ayrıca von Willebrand faktörünün (VWF) bağlanmasına sonucunda oluşan aktif pıhtılaşma faktörü X (FXa) üretmesini engeller. C2 alanı içindeki antikorların hidrofobik uzantılara (Glu2181-Val2243 ve Val2303-Tyr2332) bağlanması ise FVIII'nin fosfolipitlere ve VWF'ye bağlanmasını önler (1). (Şekil 5)



Şekil 5. Faktör VIII'in ana yapısını Gösteren Şematik Model ve FVIII antikorlarının ana bağlanma epitoplarının lokalizasyonu (1). David Keeling And Cindy Lee(2008) *Coagulation Disorders Haemophilia 2008: 28-33 Immunological Aspects Of Inhibitor Development In Haemophilia*.

Sonuç olarak, ağır HA'da inhibitör gelişiminin altında yatan immünolojik mekanizmalar önemli bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. Her ne kadar faktör replasman tedavisine karşı inhibitör gelişimini etkileyen immünojenetik ve tedaviyle ilgili faktörler hakkında bilgi mevcut olsa da, FVIII inhibitör gelişiminin immünolojisine ilişkin güncel veriler büyük ölçüde temelde kalmaktadır (1).

2.6.7. İnhibitör gelişimine etki eden faktörler

İnhibitör gelişimini etkileyen faktörler modifiye edilebilir ve modifiye edilemez olarak gruplandırılabilir. Modifiye edilebilen faktörler hastaya bağımlı olmayan, çevresel etkenler sonucunda ortaya çıkan durumlardır. Bunlar; tedavi rejimi, tedavi yoğunluğu, tedavi başlangıç zamanı, tedavinin profilaktik olarak veya hasta kanayınca verilmesi, ekzojen FVIII'in rekombinant veya plazma kaynaklı olması gibi etkenlerdir. Modifiye edilemeyen faktörler hastaya bağımlı olan genetik değişikliklerdir. *F8* mutasyonunun tipi, aile hikayesi, ırk ve immün sistem gen polimorfizmleri inhibitör oluşumunu etkileyen genetik faktörlerdir (2,3,8). Bu genetik belirleyicilere ek olarak, monozygotik ikizlerde uyumsuz inhibitör durumunun gözlemlenmesi, çevresel risk faktörlerinin de inhibitör gelişimini etkilediğini göstermektedir (11).

Tablo 6. HA hastalarında inhibitör gelişimine etki eden faktörler

Genetik faktörler	Genetik olmayan faktörler
-------------------	---------------------------

<i>F8</i> mutasyon tipi	İmmünolojik faktörler
HLA sınıf II polimorfizmleri	Cerrahi veya travma
Etnik köken	Transfüzyon ilişkili faktörler:
İmmün sistem gen polimorfizmleri	• İlk transfüzyon yaşı • Tedavi şekli (sürekli infüzyon veya profilaksi) • Tedavi yoğunluğu ve dozu • FVIII konsantresi tipi
Ailede inhibitör öyküsü	

Tantawy, A. A. G. (2010). *Molecular genetics of hemophilia A: Clinical perspectives. Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 11(2), 105–114 (44).

2.6.7.1. Genetik risk faktörleri:

F8 gen mutasyonunun tipi inhibitör gelişiminde en önemli faktördür (7,8). Ağır hemofili A hastalarında protein sentezini tamamen ortadan kaldıran veya kırılmış protein oluşumuna sebep olan “null” mutasyonların (intron 22 ve intron 1 inversiyonu, büyük delesyonlar, stop kodon mutasyonları, delesyon ve splice bölge mutasyonları) varlığında inhibitör sıklığı %20-80 olarak bildirilmiştir (5,14). Bütün null mutasyonlarda protein sentezi hiç yapılamamasına rağmen mutasyonun tipine göre inhibitör oluşum sıklığı değişmektedir. Ağır hemofili A hastalığının yaklaşık yarısından sorumlu olan intron 22 inversiyonu varlığında inhibitör sıklığı %21 iken, büyük multidomain delesyonlarında %80, nonsense mutasyonlarda %31’dir (16). Tamamen protein yokluğuna neden olması beklenen mutasyonlar, daha yüksek inhibitör riski ile ilişkilendirilirken, kısmi protein sentezlerine neden olabilecek mutasyonlar daha düşük inhibitör gelişme riski ile ilişkilendirilmiştir (5). İnhibitör gelişimi için predispozan faktörlerin sorunu hala büyük ölçüde çözülememiştir. Şimdiye kadar, en önemli faktör, altta yatan genetik kusur olmuştur. Çoğu çalışmada, intron 22 inversiyonu gibi büyük delesyonlar ve intrakromozomal sapmalar, inhibitörlerin insidansındaki artış ile ilişkili bulunmuştur (4). Sonuç olarak, tamamen protein ekspresyonu eksikliğine neden olan *F8* gen mutasyonları, inhibitör gelişme riskinin en yüksek olması ile ilişkilidir (16).

Tablo 7. *F8* gen mutasyonu tiplerine göre inhibitör gelişmesi riskleri klasifikasyonu

Yüksek risk	Orta risk	Düşük risk
-------------	-----------	------------

Büyük insersiyon/delesyon (multiple ekzonlar)	Büyük insersiyon/delesyon (tek ekzon)	Küçük insersiyon/delesyon Missense mutasyon
Hafif zincirde nonsense mutasyonlar	Ağır zincirde nonsense mutasyonlar	Splice bölge mutasyonları
	İntron 22 ve intron 1 inversiyon	

Garagiola, I., Palla, R., & Peyvandi, F. (2018). Risk Factors For İnhibitor Development İn Severe Hemophilia A. *Thrombosis Research*, 168, 20–27 (16) .

İnhibitör formasyonu üzerinde büyük etkisi olan ilk genetik faktörler , 1990'larda keşfedilen *F8* gen kusurlarıydı. Daha yakın zamanlarda, majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II sistemini, tümör nekroz faktörü- α (*TNF- α*), interlökin 10 (*IL 10*) ve sitotoksik T lenfosit antijeni 4'ü (*CTLA-4*) kodlayan genleri içeren immün sistem genlerinin polimorfizmleri inhibitör riskini belirleyen faktörlere katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (6,16,18).

FVIII inhibitörlerinin üretilmesi, antijen sunumunu, T lenfositlerin aktivasyonunu, sitokin sekresyonunu ve B lenfositlerinin FVIII'ye özgü antikor salgılayan plazmositlere farklılaşmasını içeren bir CD4 + T hücrelerine bağımlı bir işlemdir. Bu işlemde, HLA sınıf II molekülleri, FVIII türevi peptitlerin T hücrelerine sunulmasında önemli bir rol oynar. Belirli bir hastanın immün sisteminin ekzojen terapötik FVIII'e tolerans derecesinin *F8* gen mutasyonunun tipine ve bununla ilişkili endojen FVIII üretimine veya yokluğuna bağlı olduğu bilinmektedir. Buna göre, altta yatan genetik değişiklik, inhibitör gelişimi için majör risk faktörlerinden biri olarak tanımlanmıştır (18).

İnsan Lökosit Antijenleri (HLA), FVIII peptidlerinin CD4 + T hücrelere sunulmasında önemli rol almaktadır. HLA'nın oluşması, MHC gen bölgesinin kontrolü altındadır. MHC gen bölgesi 3 sınıfa ayrılır ve her lokusta her biri farklı HLA antijenlerinden sorumlu allel genler bulunur. Özellikle, HLA sınıf II alelleri *DRB1 * 15* ve *DQB1 * 0602*'nin inhibitör gelişimi üzerinde etkisi olduğu bildirilmiştir (3,4,16,18). İnhibitör gelişim riskinde artışın en çok intron 22 inversiyon defekti olanlarda belirgin olduğu görülmüştür (4). İnhibitörlü hastalarda, inhibitörsüz olanlara göre daha yüksek bir *DRB1 * 01*, *DRB1 * 01: 01* ve *DQB1 * 05: 01* alelleri bulunmuştur. Öte yandan, HLA *DRB1 * 11*, *DRB1 * 11: 01*, *DQB1 * 03*, *DQB1 * 03: 01* alelleri ve *DR101 DRB1 * 11 / DQB1 * 03: 01* haplotiplerinin inhibitör gelişiminden koruyucu olabildiği gösterilmiştir (9). *HLA sınıf I*, *A3*, *B7* ve *C7* alelleri ve *sınıf II*, *DQA0102*, *DQB0602*

ve *DR15* alellerinin inhibitör gelişimi için daha yüksek riskle ilişkili olabildiği, *C2*, *DQA0103*, *DQB0603* ve *DR13* alellerinin koruyucu olabildiği görülmüştür (7).

IL-10 önemli bir immün düzenleyici sitokindir. B lenfosit proliferasyonu, farklılaşması ve antikor üretimini uyarır. IL-10, sistemik inflamatuvar immün yanıtların güçlü bir bastırıcısı olarak etki edebilen, immünglobulinleri salgılamak için aktif B lenfositlerini teşvik eden bir sitokindir. Ayrıca, doğuştan gelen immünite (NK hücre aktivitesi, fagositozu uyararak partiküllerin, hücrelerin ve mikropların inflamatuvar olmayan şekilde uzaklaştırılması) ve Th2 ile ilişkili immünitenin inflamatuvar olmayan şekilde uzaklaştırılmasını sağlar. IL-10 promotöründeki üç bölgede bulunan -1082 (G>A), -819 (C>T) ve -592 (C>A) polimorfizmleri *IL-10* geninin ekspresyonunu değiştirebilir. İn vitro çalışmalar, -1082G alelinin daha yüksek IL-10 üretimi, -1082A alelinin ise tam tersi daha düşük IL-10 üretimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Ek olarak, GCC haplotipinin IL-10'un daha yüksek sentezi, ACC haplotipi ve ATA haplotipinin ise düşük IL-10 üretimi ile ilişkili olduğu görülmüştür (9). Aynı zamanda, çalışmalarda *IL-10* geninin promotor bölgesinde yer alan 134 baz çiftlik CA mikrosatellit tekrar bölge polimorfizminin (IL-10G) hemofili A hastalarında inhibitör gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (16,17,18).

6p21.3 kromozomu üzerindeki MHC lokusu, HLA-B ve HLA-DR lokusları ile çevrili TNF- α (*TNF- α*) ve lenfotoksinlerin α ve β genlerini içerir. TNF- α güçlü proinflamatuvar ve immünomodülatör fonksiyonları olan önemli bir sitokindir ve bu gendeki polimorfizmler otoimmün antikor aracılı hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Patofizyolojik etkileri olan en kapsamlı çalışılmış polimorfizm, promallör bölgesinde HLA A1, B8 ve DR3 alelleri ile güçlü bir şekilde ilişkili olan biallelik TNFA -308G>A polimorfizmidir. *TNF- α* gen polimorfizmlerinin sistemik lupus eritematozus, inflamatuvar barsak hastalığı ve myastenia gravis gibi otoimmün hastalıklar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (7). Bu bilgilerden yola çıkılarak *TNF- α* gen polimorfizmlerinin HA hastalarında inhibitör oluşumu üzerine olan etkisi pek çok çalışmada araştırılmıştır. Genin promotor bölgesinde yer alan biallelik -308G>A polimorfizminin inhibitör gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (16,17,18,20).

CTLA4 proteini, aktive edilmiş T hücrelerinde eksprese edilen bir yüzey molekülüdür ve T hücre aktivasyonunun negatif regülatörü olarak immün yanıtta yer alır ve bir CD28 homologudur (17,18). B7 molekülü ile yarışarak CD28'e bağlanır ve T hücre aktivitesini down

regüle eder. Bunun üzerine yapılan çalışmalarda, *CTLA4* genin promotor bölgesinde yer alan -318C>T polimorfizminin inhibitör oluşumuna karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (16).

Sonuç olarak, bir hastanın bireysel genetik risk faktörleri, inhibitör geliştirme eşiğini oluşturur. Büyük delesyonları, anlamsız mutasyonları ve *F8* gen inversiyonları olan hastalar nispeten düşük inhibitör eşiğine sahipken, missense mutasyonları olanlar nispeten yüksek inhibitör eşiğine sahiptir. Benzer şekilde, interlökin-10 (*IL-10*) ve tümör nekroz faktörü- α (*TNF- α*) genlerinde görülen bazı polimorfizmler inhibitör oluşumu için eşiği azaltırken, sitotoksik T lenfosit antijeni 4 (*CTLA-4*) polimorfizmi varlığı, inhibitör eşiğini artırır (14).

2.6.7.2. Çevresel faktörler:

Verilen faktör yoğunluğu ve tedavi dozunun inhibitör gelişim riski karşılaştırıldığında, yüksek dozda yoğun FVIII konsantrasyonunun kanama veya cerrahi tedavi nedeniyle verilmesinin inhibitör gelişimi için artan risk ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak, profilaktik FVIII tedavisi, inhibitör gelişimi için azalmış bir risk ile ilişkilendirilmiştir (8,10). Daha önce tedavi edilmemiş ağır HA hastalarında, yüksek doz yoğun faktör VIII tedavisinin bir yandan inhibitör gelişim riskini arttırdığı, aynı zamanda özellikle düşük inhibitör riskli *F8* mutasyonu olan hastalarda profilaktik faktör VIII tedavisinin inhibitör gelişim riskini azalttığı gösterilmiştir (8,10).

Verilen faktör konsantrasyonunun tiplerine göre bakıldığında, Von Willebrand faktörü içeren plazma kaynaklı faktör VIII ile tedavi edilen hastaların rekombinant faktör VIII ile tedavi edilenlere göre daha düşük inhibitör insidansına sahip olduğu görülmüştür (10). Sadece rekombinant FVIII (rFVIII) ile tedavi edilen HA hastalarında, inhibitörlerin kümülatif insidansının, sadece plazma türevli FVIII (pdFVIII) ile tedavi edilenlere göre 2 kat daha fazla olduğu vurgulanmıştır (13). Hasta çalışmalarına ek olarak, *in vitro* veriler, çoğu pdFVIII ürününde büyük miktarlarda bulunan, ancak rFVIII'de bulunmayan FVIII'nin taşıyıcı proteini olan von Willebrand faktörünün, profesyonel antijen sunmasına engel olarak FVIII'nin immünojenikliğini azalttığı iddiasını desteklemektedir. Bu nedenle rFVIII ile tedavi edilen hastalarda, inhibitör gelişim oranı, pdFVIII ile tedavi edilenlere göre anlamlı derecede yüksek görülmüştür (13).

İnhibitörlerin gelişme riskinin ailede inhibitör öyküsü pozitif olan hastalarda negatif aile öyküsü olanlara göre 3 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir (11,14). Etnik kökenin inhibitör gelişme riskiyle ilişkisine bakıldığında, birçok çalışmada, Afrika, Amerikalı ve Latin kökenli ağır hemofili hastalarında inhibitörlerin görülme sıklığının, Kafkasyalılarından iki kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (14,21). FVIII mutasyon spektrumu farklı ırklarda farklılık göstermediğinden, farklı ırklar arasında gözlenen bu değişkenlik, esas olarak immün cevap belirleyicilerindeki genetik varyasyona bağlanır.

Düşük doz profilaktik FVIII infüzyonları eklem ve doku hasarı yokluğunda verilir. APC'ler FVIII antijeninin epitoplarını T lenfositlerine sunarlar. Bu, folliküler T hücrelerinden yardımcı T hücrelerinin üretilmesi ile immün toleransın indüklenmesine veya daha önce hazırlanmış T hücrelerinin anerjisine neden olabilir. Profilaksinin inhibitör gelişim riskinin azalması ile ilişkili olduğu gözlemleri bu hipotezi desteklemektedir. Düzenli profilaksi, talep üzerine tedaviye kıyasla, % 60 oranında azaltılmış bir inhibitör gelişme riski ile ilişkili bulunmuştur (10). Bununla birlikte, profilaksi başlanması zamanının ve profilaktik FVIII infüzyonlarının dozu ve sıklığının inhibitör gelişim riskini etkileyip etkilemediği henüz tam açık değildir (8).

Yoğun kanamalar veya ameliyatlar doku hasarı ve iltihabına neden olduğu için hastaların yoğun tedavi dönemlerinde inhibitör gelişimine daha yatkın oldukları görülmektedir. Hasar görmüş hücrelerden salınan tehlike sinyalleri, APC'leri aktive eder ve daha sonra faktör VIII antijenini T lenfositlere sunar. Bu hücreler daha sonra B lenfositlerinde antikor oluşumunu artırır. Bu nedenle de, kanama veya cerrahi tedavi zamanı uygulanan yüksek dozda yoğun FVIII tedavisinin inhibitör gelişimi için artan risk ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Tam tersi profilaktik FVIII tedavisi ise inhibitör gelişimi için azalmış bir risk ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle kanamaların ve eklem hasarının önlenmesi olan asıl amacına ulaşmak için öncelikle profilaksinin başlangıç, sıklık ve doz ayarını yapmak öneriliyor. Mevcut kılavuzlara göre, profilaksi en azından ilk eklem kanamasının ortaya çıkması kadar erken başlamalıdır. İnhibitör gelişme riskini en aza indirmek için, profilaksi dozu ve sıklığı yoğun FVIII kanama tedavisini önlemek için ayarlanabilir (8). Birinci tedavi bölümünde hemen ardışık 5 günde (majör pik tedavi anı) kanama veya ameliyat için faktör VIII alan hastaların tek bir günde veya ardışık 2 günde tedavi alan hastalara göre 3.3 kat daha fazla inhibitör gelişme riskine sahip olduğu gösterilmiştir (10).

Ardışık 5 maruz kalma gününde 35 IU / kg'dan az faktör VIII dozu ile inhibitör gelişimi arasındaki risk bakıldığında, ortalama doz 35 ila 50 IU / arasında olduğunda klinik olarak inhibitör geliştirme riski 1.4 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, ortalama doz 50 IU / kg'dan fazla olduğunda inhibitör gelişme riski 3.3 kat daha yüksek olduğu görülmüştür (10).

FVIII konsantrasi ile ilk tedavi sırasındaki yaş inhibitör oluşumunu etkileyen diğer önemli bir faktördür. Genç yaşta ilk olarak VIII faktörüne maruz kalma artan bir inhibitör gelişme riski ile ilişkili bulunmuştur. İnhibitör gelişimi için risk tedavinin ilk 50 günü içinde en yüksektir, reaksiyonlar 200 gün sonra nadir görülür. Bununla birlikte, bu ilişki tedavi yoğunluğunun ayarlanması sonrasında büyük ölçüde ortadan kalkmıştır (21).

Sonuç olarak, inhibitör gelişimi kompleks ve multifaktöriyel bir süreçtir. Tüm bu genetik ve genetik olmayan risk faktörlerini kullanarak inhibitör gelişimini öngörürücü çeşitli skorlama sistemleri önerilmiştir. Kullanılan parametrelerden en güçlüsü mutasyon tipi olsa da inhibitör gelişiminde hastanın immünolojik yanıtını düzenleyen genler de önemli bir role sahiptir. Bu çalışmada bugüne kadar inhibitör gelişiminde etkisi olduğu belirlenen farklı immün sistem genlerindeki çeşitli polimorfizmlerin ve çeşitli ailesel ve çevresel risk faktörlerinin intron 22 inversiyonu pozitif olan ağır hemofili A hastalarında, inhibitör oluşumunu üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Dünya Hemofili Federasyonu kılavuzlarına göre Ağır Hemofili A tanısı konulmuş olup Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı'nda yapılan moleküler analizler sonrasında "intron 22 inversiyon" mutasyonu belirlenmiş 94 ağır HA olgusu dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar inhibitör varlığına göre iki gruba ayrıldılar. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı tarafından Hemofili A Genetik Analizi amacıyla yönlendirilmesi nedeniyle takibe alınmış olguların analiz sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi. Yapılan değerlendirme sonrasında çalışmaya dahil edilen olgular, iletişim bilgilerinden aranarak geriye dönük klinik bilgileri öğrenildi. İletişim numarasından ulaşılamayan olguların Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı polikliniğinde olan takip dosyalarından klinik bilgilerine retrospektif olarak ulaşıldı.

Bu çalışma Helsinki Bildirgesi prensiplerine göre ve yerel kurumsal etik kurulun onayı ile yapılmıştır (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, onay no: 18-10 / 11).

3.1. Tasarım ve Metod:

- Hemofili A klinik tanısı ile moleküler analizleri yapılmış olan hastaların laboratuvar sonuçları retrospektif olarak taranarak, "intron 22 inversiyon" mutasyonu saptanmış olan 94 olgu iletişim bilgileri yoluyla aranarak değerlendirildi.
- Görüşmeler sırasında hastaya ait demografik verileri, anamnez bilgileri (hastalığın başlangıç yaşı, başlangıç bulgusu, tanı yaşı, ilk tedavi seçimi, kullanmakta olduğu tedavi modeli vb.) ve aile ağacı (etkilenmiş başka birey varsa o bireyde inhibitör gelişip gelişmediği vb.) değerlendirmeleri yapıldı.
- Hastalar, inhibitör pozitif (n=25) ve negatif (n=69) olarak iki gruba ayrıldı.
- Hastalardan alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı.
- İzole edilen DNA'larda *CTLA4* ve *TNF- α* gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesi amacıyla hedeflenen bölgelerin dizi analizi gerçekleştirildi.
- İnhibitör pozitif ve negatif hastalar arasında araştırılan polimorfizmlerin inhibitör pozitifliği ile ilişkisi istatistiksel olarak analiz edildi.

3.1.1. Hastaların Seçimi:

Hemofili A klinik tanısı olup *F8* geni moleküler analizi yapılmış olan olgular, laboratuvar dosyalarından retrospektif olarak değerlendirildikten sonra, “intron 22 inversiyon” mutasyonu saptanmış olan 94 erkek olgu çalışmaya dahil edildi. “intron 22 inversiyon” mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan kadın olgular çalışmaya dahil edilmedi. Sağlıklı kontrol grubu oluşturulmadı.

Çalışmaya alınma kriterleri:

- *F8* geni mutasyon analizi yapılmış ve “intron 22 inversiyon” mutasyonu tespit edilmiş olmak

Dışlanma kriterleri:

- *F8* geni mutasyon analizinde “intron 22 inversiyon” dışında bir mutasyon belirlenmiş olmak
- “intron 22 inversiyon” mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan kadın olgular

Olguların klinik bulguları hastane dosyaları incelenerek ve aileler ile telefon ile görüşmeler yapılarak elde edildi. Yapılan dosya taramaları ve görüşmeler sonucunda demografik veriler, anamnez bilgileri (hastalığın başlangıç yaşı, başlangıç bulgusu, tanı yaşı, ilk tedavi seçimi, kullanmakta olduğu tedavi modeli vb.) ve aile ağacı (ailede etkilenmiş başka birey varsa o bireyde inhibitör gelişip gelişmediği vb.) olgu rapor formuna kaydedildi. Seçilen olgular ayrıntılı olarak bilgilendirildi ve aydınlatılmış gönüllü olur formları onaylatılarak çalışmaya dahil edildi.

İnhibitör düzeyleri hastane kayıtlarından elde edildi. Standart Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Derneği tanımlarına göre, inhibitör düzeyinin Bethesda testinin Nijmegen modifikasyonu kullanılarak mL başına 0.6 Bethesda ünitesi (BU) seviyesi ve üzerinde olan hastalar “inhibitör pozitif”, mL başına 0.6 Bethesda ünitesi (BU) seviyesi altında olan hastalar “inhibitör negatif” olarak sınıflandırıldı. İnhibitörün ilk ortaya çıkma zamanı kaydedildi.

Klinik veriler IBM SPSS 21 programı kullanılarak inhibitör gelişimi ile ilişkisi istatistiksel olarak analiz edildi. Her iki grup aile hikayesi, replasman ve profilaksi özelliklerine göre birbiri ile karşılaştırıldı.

3.1.2. Moleküler çalışmalar:

3.1.2.1. DNA izolasyonu:

Çalışmaya dahil edilen hastalardan EDTA'lı tüpe 2cc kan örneği alındı. EDTA'lı tüpteki kan örneklerinden “QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)” kiti ve kiti ait protokol kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'ların kalite ve konsantrasyonu “NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer” kullanılarak ölçüldü. Uygun kalite ve konsantrasyondaki DNA örnekleri çalışmaya alındı.

3.1.2.2. Dizi Analizi:

DNA örneklerinde *CTLA-4* (c.-318C>T; rs5742909 ve c.49A>G; rs231775) ve *TNF- α* (c.-308G>A; rs1800629) polimorfizmlerinin belirlenebilmesi için Sanger dizi analizi ve yeni nesil dizi analizi yöntemleri kullanıldı.

Sanger dizi analizi aşağıda belirtilen basamaklar izlenerek yapıldı:

- Hedeflenen bölgelerin amplifikasyonu için uygun primerlerin seçimi
- Hedeflenen bölgelerin PCR ile çoğaltılması
- Çoğaltılan bölgelerin jel elektroforezi ile doğrulanması
- Saflaştırma (1)
- Sonlandırıcı nükleotidler ile PCR
- Saflaştırma (2)
- Dizi analizi
- Sonuçların analizi

Hedeflenen bölgelerin amplifikasyonu amacıyla uygun primerlerin seçimi:

CTLA4 ve *TNF- α* gen polimorfizmlerini kapsayacak şekilde 300-500 bp'lık bir bölgeyi çoğaltmaya uygun primerlerin seçimi için web tabanlı ücretsiz “Primer3” programı kullanıldı. Tasarlanacak primerlerin her birinin 18-24 bp uzunlukta, GC oranının %30-50 olması, DNA'da tek bir bölgeye yapışması ve Tm'sinin 58-62°C olması hedeflendi.

Hedeflenen bölgelerin PCR ile çoğaltılması:

Primerlerin Sulandırılması:

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda ddH₂O eklenerek, 100 pikomol / mikrolitrelik stok çözeltiler hazırlandı. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 10 pikomol/mikrolitrelik konsantrasyonlu 100 mikrolitrelik sulandırılmış primerler hazırlandı.

PCR Reaksiyon Karışımı:

Her bir örnek için hazırlanan total PCR reaksiyon karışımı 25 mikrolitre oldu. H₂O, 10X buffer, MgCl₂ (25Mm), dNTP, primerler ve Taq Polimerazdan oluşan karışım her bir reaksiyon tüpüne dağıtıldı ve en son DNA örnekleri eklendi. Amplifikasyon ürünleri PCR programı bittikten sonra +4°C de saklandı.

Çoğaltılan bölgelerin jel elektroforezi ile doğrulanması:

PCR ürünüde amplifikasyon olup olmadığının kontrolü için, %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü. 100 ml'lik erlen içine, 2 gr agaroz ve 100 ml 0.5XTBE konulup mikrodalga fırında ısıtılarak eritildi. Berrak görünüm sağlanınca, 16 mikrolitre etidyum bromür eklenip karıştırılıp hazırlanan tabağa döküldü. Jel donması için beklenerek donduktan sonra örnekler jele yüklenirken, bir parça parafilm üzerine 5 mikrolitre orange G ve 5 mikrolitre PCR ürünü karıştırılıp, jeldeki kuyucuklara yüklendi. Elde edilen PCR ürünlerinin doğru amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için, her jele marker yüklenerek 120 volt akımda yürüdükten sonra jel görüntüleme sistemi ile incelendi.

Saflaştırma (1):

Bu işlem PCR sonrası yapılıp ve PCR ürünün içerisindeki fazla PCR bileşenlerinden ayrılmasını sağlar. Herhangi bir ticari purifikasyon kiti ile yapılabilir. Purifikasyon için FERMENTAS GENEJET PCR PURIFICATION KIT kullanılarak, Purifikasyon işlemi kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Sonlandırıcı nükleotidler ile PCR:

En çok kullanılan yöntem dideoksi metodudur. Buna zincir sonlandırma metodu da denir. PCR işlemi sonrasında elde edilen ürünler birinci saflaştırma işlemi sonrasında aşağıdaki maddeler ile karıştırılarak cyle sequencing miksi hazırlanır.

1. Primer: DNA tek zincirine bağlanan kısa dizidir.
2. Normal (deoksi) nükleotidler: dNTP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP
3. Dideoksi nükleotidler: ddNTP; ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP
4. DNA Polimeraz (enzim)

DNA, 4 deoksiribonukleotid trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) molekülünün birbirine bağlanmasıyla oluşan dev bir polimerdir. Her yeni nükleotid bir önceki nükleotidin 3' OH ucuna eklenir. Dideoksinukleotid trifosfat (ddNTP) ise 3' OH ucu içermez. Dolayısıyla böyle bir molekül zincir uzamasını durdurur ve zincirin son nükleotidini oluşturur. Dizisi saptanacak DNA tek dizi halinde hazırlanır. Bu kalıp DNA yanına 4 deoksiribonukleotidden de (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) bol miktarda içeren bir karışım; her biri ayrı fluoressan molekülle işaretlenmiş ve dolayısıyla ayrı renkler veren 4 dideoksiribonukleotid trifosfat (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) içeren bir karışım ve DNA Polimeraz eklenir. Deoksiribonukleotidler bağlandıkça zincir uzamaya devam eder. Rastlantısal olarak dideoksiribonukleotid bağlandığında zincir uzaması durur. Bu yolla farklı boyutlarda birçok DNA parçası elde edilir. Sonraki aşamada karışım, molekülleri boylarına göre ayıran jel elektroforezi ile birbirlerinden ayrılır. Jel üzerindeki değişik fluoressan renkler veren bantlar izlenerek dizi analizi gerçekleştirilir. Daha sonraki aşama ise analiz edilen dizilerin okunması aşamasıdır. Uzun dizi bilgisi elde edebilmek için, kısa okumaların birbiriyle birleştirilmelerinde bilgisayara gereksinim duyulur. Bu işlem bir kit yardımı ile yapılmaktadır ve bu kit içerisinde sonlandırıcı nükleotitler içermektedir.

Bu aşamada;

- 8 µl Big Dye PCR tüplerine dağıtılır
- Her tüp için 7,5 µl ultra saf su
- 0.5 µl Forward veya Reverse primer kullanılır
- 4 µl purifiye PCR ürünü kullanılır
- Total volume 20 µl dir.

Bu PCR miksi ABI PRİSM 9700 PCR cihazının perkin elmer Big Dye Terminator programı ile başlatıldı.

- İzlenen PCR programı
- Denatürasyon 96°C 10 saniye
- Bağlanma 50°C 5 saniye 25 döngü
- Uzama 60°C 4 dakika
- Bekleme 4°C

Saflaştırma (2):

Bu işlem cycle sequencing aşamasından sonra yapılır. Ortaya çıkan PCR ürününün içerisindeki florasan işaretli ddNTP'leri ve diğer PCR bileşenlerini ortamdan uzaklaştırmak amacıyla yapılır. Herhangi bir ticari purifikasyon kiti kullanılabilir. Bu işlem için Zymo Research DNA Sequencing Clean Up Kit kullanıldı. Pürifikasyon işlemi kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Sanger Dizi Analizi:

Dizi analizi örneklerinin yürütülmesi için ABI 3130 cihazı kullanıldı. 10 mikrolitre pürifiye olmuş ürün kullanıldı. Alete yüklemeden önce 5 dakika denatürasyon yapılarak 2 dakika buzda bekletilen örnekler alete yüklendi.

SNP	Forward Primer	Reverse Primer
CTLA4:c.-318C>T	AAATGAATTGGACTGGATGGT	TTACGAGAAAGGAAGCCGTG
CTLA4:c.49A>G	AACACATTTCAAAGCTTCAGGA	AACAAATGAAACCCAGGTAGGA
TNF:c.-308G>A	CTGAAGCCCCTCCCAGTT	AAAGTTGGGGACACACAAGC

SNP: single nucleotide polymorphism

Sonuçların analizi:

CLC Bio programı kullanılarak sonuçlar analiz edilerek her bir hastada hedeflenen alleldeki bazlar not edildi.

Yeni Nesil Dizi Analizi:

Yeni nesil dizi analizi aşağıda belirtilen basamaklar izlenerek yapıldı:

- Hedeflenen bölgelerin amplifikasyonu için uygun primerlerin seçimi
- Hedeflenen bölgelerin PCR ile çoğaltılması
- Çoğaltılan bölgelerin jel elektroforezi ile doğrulanması
- **Nextera XT kiti ile kütüphane hazırlığı**
- **Örneklerin Illumina MiSeq platformunda yürütülmesi**
- **Sonuçların analizi**

Hedeflenen bölgelerin çoğaltılması için uygun primerlerin seçilmesi, hedef bölgelerinin PCR ile çoğaltılması ve çoğaltılan bölgelerin jel elektroforezi ile doğrulanması basamakları Sanger dizi analizinde anlatılan aynı yöntem ile yapılmıştır. Hedef bölge amplifikasyonu sonrasındaki ortaya çıkan her örneğe ait ampliconlar konsantrasyonlarına göre, eşit kütlede birleştirilmiştir. Sonrasında, Nextera XT kiti ile dizi analizi işlemine hazırlanmıştır. Son olarak örnekler, yeni

nesil dizi analizi (Illumina MiSeq) sisteminde 300 cycle yürütülmüştür. Yürütmeler havuzlanarak gerçekleştirilecektir. Aşağıdaki protokol izlenecektir:

Kütüphane hazırlığı ve örneklerin cihazda yürütülmesi:

Fermantas ile pürifikasyon

- 1) 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne birleştirilmiş 60 µl amplikon eklendi.
- 2) Bunun üstüne, 60 µl Binding Buffer ve 60 µl izopropanol eklendi.
- 3) Bu karışım pipetaj yapılarak spin kolona aktarıldı.
- 4) 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 5) Ardından spin kolonun dışındaki tüp atılarak, 2ml'lik yeni toplama tüpü takıldı.
- 6) Spin kolona 700 µl Wash Buffer eklendi.
- 7) 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 8) Spin kolonun dışındaki tüp atılarak, 2ml'lik yeni toplama tüpü takıldı.
- 9) 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- 10) Spin kolonun dışındaki tüp atıldı ve spin kolon 1,5 ml'lik steril Eppendorf tüpü üstüne yerleştirildi.
- 11) Spin kolona 50 µl Elution Buffer eklendi.
- 12) Sonrasında 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir ve spin kolon atıldı.
- 13) Bu işlem sonrasında pürifiye PCR amplikonları elde edildi.
- 14) Konsantasyon ölçünü Qubit ile yapıldı.

DNA tegmentasyonu

- 1) Her örnek için 1 ng birleştirilmiş pürifiye amplikon, total volümü 5 µl olacak şekilde nuclease free su ile tamamlanarak, 0.2 ml'lik eppendorf tüpe alındı.
- 2) Üzerine 5 µl Tagment DNA (TD) Buffer ve 5 µl Amplicon Tagment Mix (ATM) eklenip 5 kez pipetej yapıldı.
- 3) 280 g hızda 20oC'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 4) Daha sonra PCR tüpleri thermocyclera yerleştirilerek aşağıda verilen koşullarda inkübasyon sağlandı.

55°C'de 5 dakika

10°C'de ∞

Tegmente DNA'nın temizlenmesi

- 1) İnkübasyon işleminden sonra örneklerle 5 µl Neutraline Tagment Buffer (NT) eklenip 10 kez pipetaj yapıldı.
- 2) Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.

PCR amplifikasyonu

- 1) Önceki basamakta elde edilen 20 µl ürüne aşağıdaki oranlarda hazırlanan mix eklendi.
15 µl Nextera PCR Master Mix (NPM)
5 µl Index1
5 µl Index 2
- 2) 280 xg hızda 20°C'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 3) Daha sonra PCR tüpleri thermal cycler'a yerleştirilerek Tablo 9'da belirtilen koşullarda inkübasyon sağlanır.

Tablo 9. Kütüphane hazırlığı inkübasyon protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
72°C	3 dakika	1
95°C	30 saniye	12
95°C	10 saniye	
55°C	30 saniye	
72°C	30 saniye	
72°C	5 dakika	1

PCR temizleme

- 1) Ürün thermocyclerdan çıkarılarak 280 xg hızda 20°C’de 1 dakika santrifüj edildi.
- 2) Üzerine 90 µl AMPure XP Bead eklenecektir ve 10 kez pipetaj yapıldı.
- 3) Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi
- 4) Manyetik standde 2 dakika bekletildi.
- 5) Supernatant kısmı atıldı.
- 6) Manyetik standden kaldırmadan 190 µl taze hazırlanmış %80’lik etanol eklendi ve 30 saniye beklendi.
- 7) Supernatant kısmı atıldı.
- 8) 6 ve 7. basamaklar tekrarlandı.
- 9) Manyetik stand’tan kaldırmadan oda ısısında 15 dakika kurumaya bırakıldı.
- 10) Manyetik stand’tan kaldırılıp 52,5 µl Resuspension Buffer (RSB) eklendi ve 10 kez pipetaj yapıldı.
- 11) 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 12) Manyetik stand’a alınıp 2 dakika inkübe edildi.
- 13) 40 µl supernatant yeni bir tüpe 0.2ml’lik Eppendorf tüpe’e alındı.
- 14) Bütün ürünlerin DNA konsantrasyonu Qubit DNA konsantrasyon ölçüm cihazı ile ölçüldü.
- 15) Her bir pool 100 ng DNA içerecek şekilde birleştirildi.
- 16) Birleştirilen pool’ların DNA konsantrasyonu tekrar Qubit DNA konsantrasyon ölçüm cihazı ile ölçüldü.
- 17) Son üründen 15 ng DNA içerecek şekilde uygun koşullarda kite yüklendi.
- 18) Kartuş yeni nesil dizi analizi cihazına yerleştirilip uygun program seçilerek çalıştırıldı.

Sonuçların analizi

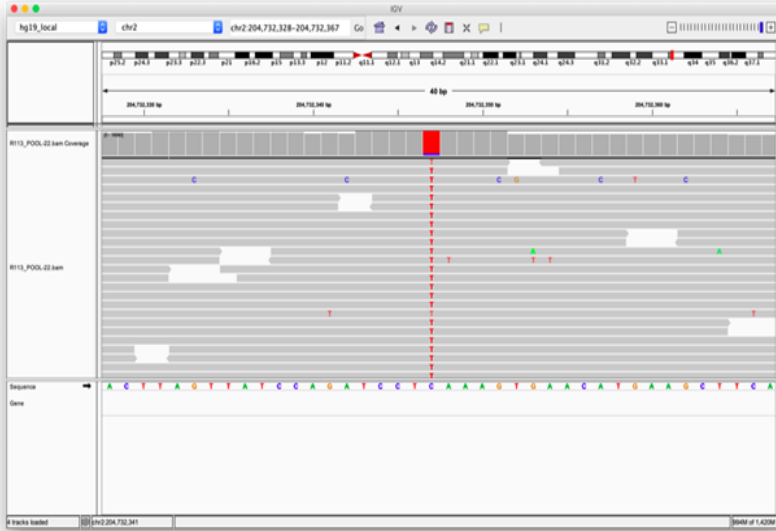
Yeni nesil dizi analizi platformundan elde edilen .bam dosyaları IGV programı kullanılarak analiz edildi.

İstatistiksel analizler:

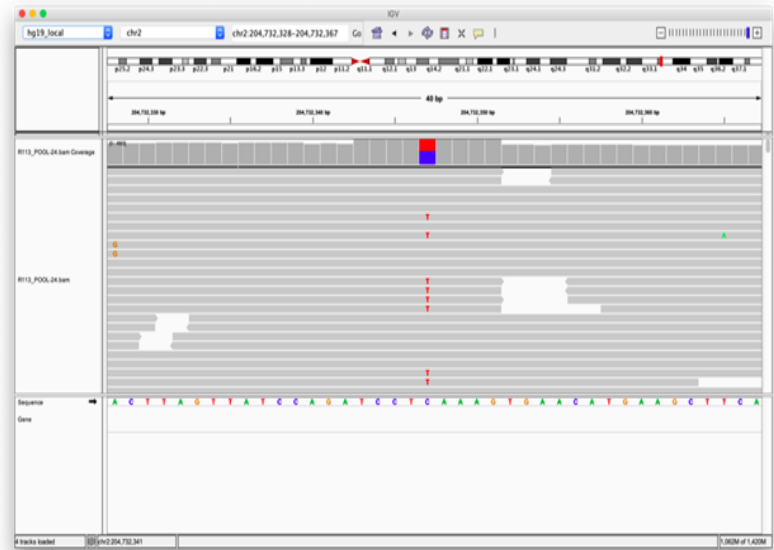
Tüm bu aşamalardan sonra IBM SPSS version 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) programı kullanılarak araştırılan alleller ile inhibitör gelişimi arasındaki ilişki istatistiksel olarak analiz edildi. Belirlenen veriler medyanlar, ortalama $\pm$ SD ve aralıklar olarak sunuldu. İnhibitör pozitif ve inhibitör negatif hastalar arasındaki demografik ve klinik özellikler, genotipler ve alleller arasındaki farklılıkları karşılaştırmak için Ki-kare testi kullanıldı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 6. Illumina Miseq cihazı



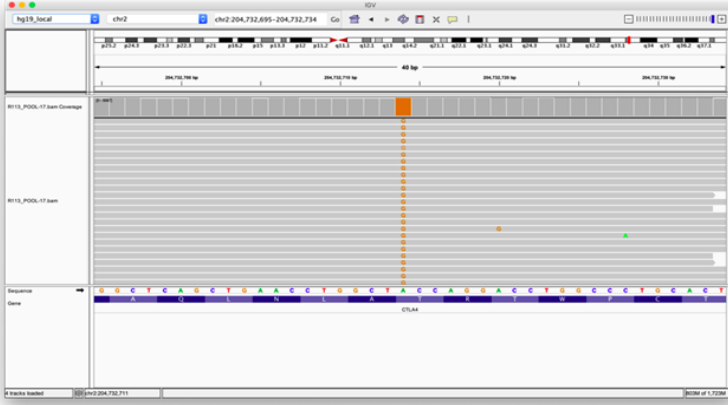
a)



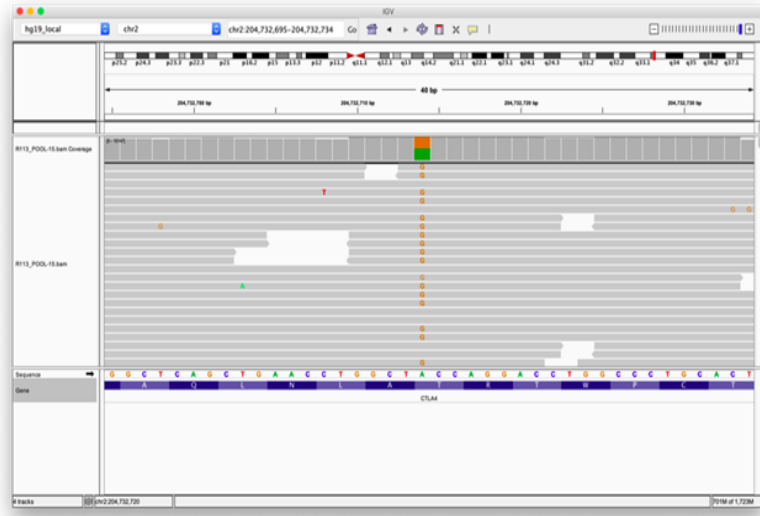
b)

CTLA4 -318C>T

Şekil 7. CTLA4 -318C>T polimorfizmi için homozigot TT (a) ve heterozigot CT (b) dizi analizi görüntü örneği.



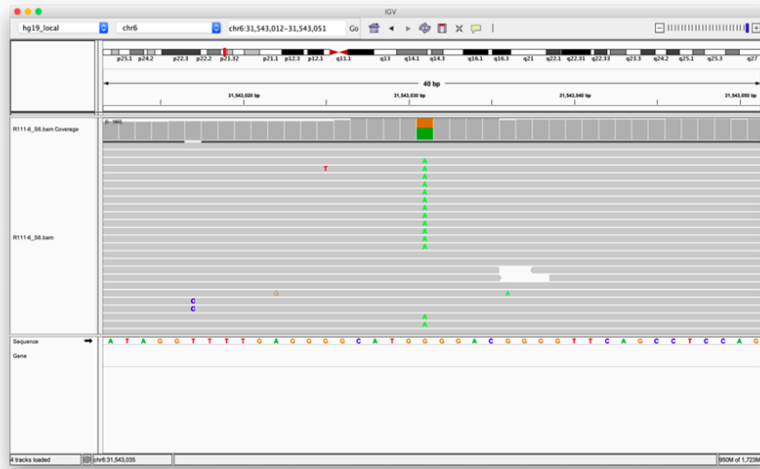
a)



b)

CTLA4 +49A>G

Şekil 8. CTLA4 +49A>G polimorfizmi için homozigot AA (a) ve heterozigot AG (b) dizi analizi görüntü örneği.



TNF alfa -308G>A

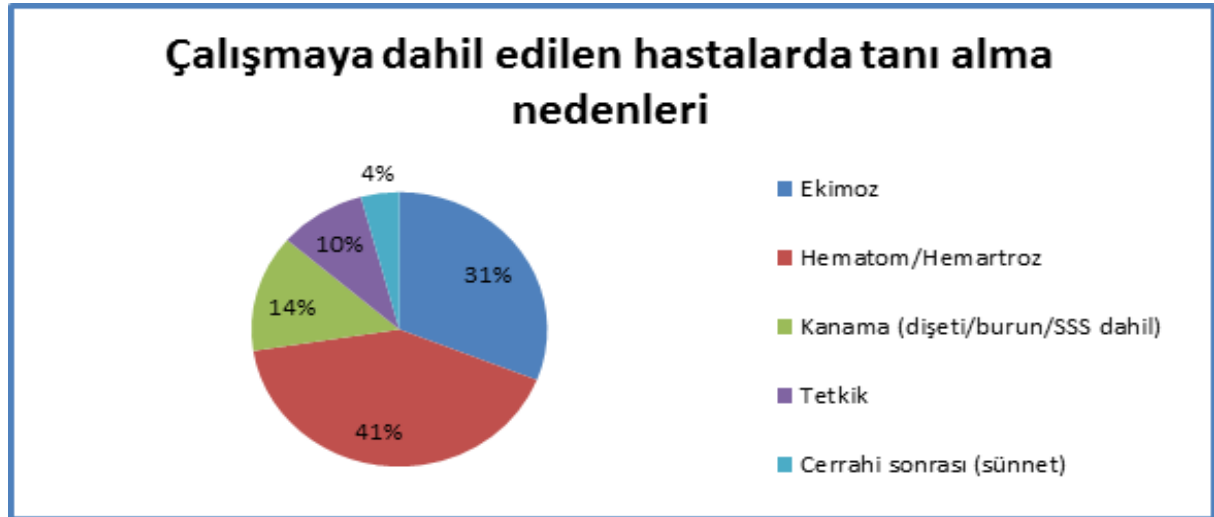
Şekil 9. TNF alfa -308G>A polimorfizmi için heterozigot GA dizi analizi görüntü örneği.

4. BULGULAR

Çalışmaya HA genetik tanısı için değerlendirilen ve *F8* geninde intron 22 inversiyon mutasyonu pozitif olarak belirlenmiş olan 94 ağır HA hastası çalışmaya dahil edildi. Geriye dönük incelenen hasta dosyalarından, hastane bilgi erişim sisteminden ve telefon ile aranarak hastaların klinik ve demografik verilerine ulaşıldı.

Çalışmaya dahil edilen hastaların hepsi erkekti. Hastaların güncel yaş ortalaması 215,6 ay $\pm$ 155,9 ay idi. Hastaların ortalama FVIII düzeyi % 0,51 $\pm$ 0,77 [ortanca %0,3 (min %0,01 - max %5,83)] olarak görüldü. Olguların 39'u (% 41,5) hematom/hemartroz, 29'u (%31) spontan ekimozlar, 13'ü (%13,8) dişeti/burun/SSS kanaması, dokuzu (%9,5) aile öyküsü veya preop yapılan tetkiklerde rastlantısal olarak kanama profilinde bozukluk saptanması nedeniyle ve dördü de sünnet sonrası durdurulamayan kanama şikayeti ile başvurmuştu (Tablo 10). Hastaların tanı alma yaşının ortalama 21,68 ay $\pm$ 30,51 ay [ortanca 10 ay (min 0 ay-max 171 ay)] olduğu görüldü.

Tablo 10. Çalışmaya dahil edilen hastaların tanı alma nedenleri.



Hastaların soygeçmiş hikayeleri değerlendirildiğinde 24 (%25,5) hastanın anne ve babası arasında akrabalık olduğu, 70'inde ise (%74,5) akrabalık olmadığı görüldü. Aynı zamanda bu hastaların 50'sinde (%53) ailede başka hemofili hastası bireyin olduğu, 43'ünde (%46) olmadığı öğrenildi, bir hastada (%1) ise kesin bilgiye ulaşılamadı. Hastaların 12'sinde (%13)

ailede inhibitör gelişim öyküsü olduğu, 74'ünde (%79) olmadığı görüldü. Sekiz (%8) olguda ise ailede inhibitör varlığı hakkında kesin bilgilere ulaşamadı.

Çalışmaya dahil edilen olgular inhibitör gelişimine göre pozitif ve negatif olarak iki gruba ayrıldı. Yirmi beş hastada (%26,6) inhibitör pozitif, 69 hastada (%73,4) inhibitör negatif olarak değerlendirildi. İnhibitör negatif olan hastalarda FVIII düzeyi ortalama $0,55 \pm 0,85$ [ortanca $0,3$ (min $0,01$ - max $5,83$)] idi. İnhibitör pozitif olan hastaların bakılan FVIII düzeyi ise ortalama $0,42 \pm 0,45$ [ortanca $0,25$ (min $0,01$ - max $1,8$)] idi. İnhibitör pozitif grupta bakılan inhibitör düzeyi ortalama $14,6 \pm 26,42$ BÜ/ml [ortanca $5,4$ BÜ/ml (min $0,7$ BÜ/ml-max 117 BÜ/ml)] olarak görüldü. İnhibitör pozitif olan hasta grubunun tanı alma yaşı ortalama $23,96 \pm 34,81$ ay [ortanca 10 ay (min 0 ay-max 164 ay)], inhibitör negatif hasta grubunun tanı alma yaşı ise ortalama $20,85 \pm 29$ ay [ortanca 10 ay (min 0 ay-max 171 ay)] idi. ($p > 0,05$)

Aile hikayesi açısından her iki grup birbiri ile karşılaştırıldı. İnhibitör pozitif grupta 10 (%40) hastada ailede arabalık, 15 (%60) hastada ailede başka hemofili hastası birey ve dokuz (%36) hastada ailede inhibitör gelişim öyküsü olduğu görüldü. İnhibitör negatif grupta ise 14 (%20) hastada ailede arabalık, 35 (%51) hastada ailede başka hemofili hastası birey ve üç (%4) hastada ailede inhibitör gelişim öyküsü mevcuttu.

İlk yapılan replasman tedavisinin özellikleri açısından her iki grup birbiri ile karşılaştırıldı. Çalışmaya alınan hastaların ilk kez faktör replasman yaşının ortalama 60 ± 103 ay [ortanca 19 ay (min 1 ay-max 567 ay)] idi. İnhibitör pozitif grupta ilk kez faktör replasman yaşı ortalama $59,16 \pm 109,73$ ay [ortanca 16 ay (min 2 ay-max 527 ay)] idi. İlk replasman 13 (%52) hastada hematoma/hemartroz nedeniyle, dokuz (%36) hastada travmaya sekonder, bir (%4) hastada cerrahi girişim ve bir (%4) hastada kanamalar (SSS kanaması dahil) nedeniyle yapılmıştı. Replasman zamanı on bir (%44) hastaya pdFVIII, 10 (%40) hastaya rFVIII verilmişti. İlk faktör konsantresi, dokuz (%36) hastaya 10 , altı (%24) hastaya üç ve altı (%24) hastaya beş gün süre ile intravenöz bolus şeklinde hastaneye yatırılarak verilmişti. Faktör dozu 12 (%48) hastada 45 Ü/kg, sekiz (%32) hastada 25 Ü/kg, bir (%4) hastada $25-45$ Ü/kg idi. İnhibitör pozitif grupta ilk faktör replasmanından sonra ortalama $48,5 \pm 99,4$ ay [ortanca 12 ay (min 1 ay-max 432 ay)] sonra inhibitör gelişmiş olduğu belirlendi. İnhibitör negatif grupta ise ilk kez faktör replasman yaşı ortalama $57 \pm 99,7$ ay [ortanca 24 ay (min 1 ay-max 587 ay)] ay idi. İlk replasman 31 (%45) hastada travmaya sekonder, 20 (%29) hastada hematoma/hemartroz nedeniyle, 11 (%16) hastada cerrahi girişim nedeniyle, yedi (%10) hastada kanamalar nedeniyle yapılmıştı. Verilen ilk faktör konsantresi 21 (%30) hastada üç, 21 (%30)

hastada beş gün boyunca, 13 (%19) hastada ise 10 gün boyunca intravenöz bolus şeklinde hastaneye yatırılarak verilmişti. Yirmi dokuz (%42) hastaya pdFVIII, 27 (%39) hastaya rFVIII verilmişti. Verilen faktörün 30 (%43) hastada 25 Ü/kg, 22 (%32) hastada 45 Ü/kg, üç (%4) hastada 25-45 Ü/kg dozunda olduğu görüldü.

İleri izleminde 70 (%74) hastada profilaksi tedavisine başlanmış, sekiz (%9) hasta ise profilaksi tedavisi almamıştı, 16 (%17) hastanın ileri tedavisi ile ilgili net bilgi yoktu. Hastalarda profilaksiye başlama yaşı ortalama 135 ay $\pm$ 156 ay [ortanca 72 ay (min 5 ay-max 684 ay)] idi. İnhibitör pozitif grupta 17 (%68) hastaya profilaktik tedavi verilmişti ve profilaksiye başlama yaşı ortalama 118 ay $\pm$ 155 ay [ortanca 70 ay (min 6 ay-max 636 ay)] idi. Profilaksi tedavisi alan 12 (%70) hastanın standart (haftada 2 kez), 5 (%30) hastanın modifiye (haftada 3 kez) profilaksi tedavisi aldığı görüldü. İnhibitör negatif grupta 53 (%77) hastaya profilaktik tedavi verilmişti ve profilaksiye başlama yaşı ortalama 140 ay $\pm$ 157 ay [ortanca 84 ay (min 5 ay-max 684 ay)] idi. Bu grupta profilaksi tedavisi alan 27 (%51) hasta standart (haftada 2 kez) ve 26 (%49) hasta modifiye (haftada 3 kez) profilaksi tedavisi almıştı.

Çalışmaya alınan hastaların özellikleri ve her iki hasta grubu arasındaki inhibitör gelişim riski ile ilişkilendirilen klinik veriler aşağıdaki Tablo 11’de özetlenmiştir.

Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen hastaların temel klinik verileri ve özellikleri

	Tüm hastalar (n=94)	İnhibitör negatif (n=69)	İnhibitör pozitif (n=25)	p değeri
Tanı alma yaşı (ay) ortalama sd ve ortanca	21,68 $\pm$ 30,51 [ortanca 10 (min 0 - max 171)]	20,85 $\pm$ 29 [ortanca 10 (min 0 - max 171)]	23,96 $\pm$ 34,81 [ortanca 10 (min 0 - max 164)]	
FVIII aktivitesi (%) ortalama sd ve ortanca	0,51 $\pm$ 0,77 [ortanca 0,3 (min 0,01 - max 5,83)]	0,55 $\pm$ 0,85 [ortanca 0,3 (min 0,01 - max 5,83)]	0,42 $\pm$ 0,45 [ortanca 0,25 (min 0,01 - max 1,8)]	

Tanı alma nedeni				
● ekimoz	29 (31)	23 (33)	6 (24)	
● hematoma/hemartroz	39 (41,5)	28 (41)	11 (44)	
● kanama (dişeti/burun/SSS dahil)	13 (13,8)	7 (10)	6 (24)	
● tetkik	9 (9,5)	7 (10)	2 (8)	
● cerrahi sonrası (sünnet)	4 (4,2)	4 (6)	0 (0)	
Ailede hemofili öyküsü				0.765
● var	50 (53)	35 (51)	15 (60)	
● yok	43 (46)	33 (48)	10 (40)	
● bilinmiyor	1 (1)	1 (1)	0 (0)	
Ailede akrabalık öyküsü				0.153
● var	24 (25,5)	14 (20)	10 (40)	
● yok	70 (74,5)	55 (80)	15 (60)	
Ailede inhibitör öyküsü				0.000
● var	12 (13)	3 (4)	9 (36)	
● yok	74 (79)	58 (84)	16 (64)	
● bilinmiyor	8 (8)	8 (12)	0 (0)	
İlk faktör replasman yaşı (ay) ortalama sd ve ortanca	60 ± 103 [ortanca 19 (min 1 - max 567)]	57 ± 99,7 [ortanca 24 (min 1 - max 587)]	59,16 ±109,73 [ortanca 16 (min 2 - max 527)]	
İlk faktör replasman yaşı				
● 18 aydan büyük	48 (51)	35 (51)	13 (52)	
● 13-18 ay	10 (11)	7 (10)	3 (12)	

• 7-12 ay	20 (21)	14 (20)	6 (24)	0.876
• 0-6 ay	16 (17)	13 (19)	3 (12)	
İlk replasman sebebi				0.416
• hematoma/hemartroz	33 (35)	20 (29)	13 (52)	
• cerrahi	12 (13)	11 (16)	1 (4)	
• kanama (SSS dahil)	8 (8,5)	7 (10)	1 (4)	
• travma	40 (42,5)	31 (45)	9 (36)	
• bilinmeyen	1 (1)	0 (0)	1 (4)	
Replasman günü				0.390
• 3 gün	27 (29)	21 (30)	6 (24)	
• 5 gün	27 (29)	21 (30)	6 (24)	
• 10 gün	22 (23)	13 (19)	9 (36)	
• bilinmeyen	18 (19)	14 (21)	4 (16)	
Replasman dozu				0.766
• 25 Ü/kg	38 (40)	30 (43)	8 (32)	
• 25-45 Ü/kg	4 (4)	3 (4)	1 (4)	
• 45 Ü/kg	34 (36)	22 (32)	12 (48)	
• bilinmeyen	18 (20)	14 (21)	4 (16)	
FVIII konsantrisi				0.962
• pdFVIII	40 (43)	29 (42)	11 (44)	
• rFVIII	37 (39)	27 (39)	10 (40)	
• bilinmeyen	17 (18)	13 (19)	4 (16)	

Profilaksi tedavisi				0.120
• evet	70 (74)	53 (77)	17 (68)	
• hayır	8 (9)	4 (6)	4 (16)	
• bilinmeyen	16 (17)	12 (17)	4 (16)	
Profilaksi alanların tedaviye başlama yaşı (ay) ortalama sd ve ortalama	135 ± 156 [ortalama 72 (min 5 -max 684)]	140 ± 157 [ortalama 84 (min 5 -max 684)]	118 ± 155 [ortalama 70 (min 6 -max 636)]	
Profilaksi tedavi modeli				0.156
• standart (haftada 2 kez)	39/70 (56)	27/53 (51)	12/17 (70)	
• modifiye (haftada 3 kez)	31/70 (44)	26/53 (49)	5/17 (30)	

Çalışmamızda hastaların klinik ve demografik verileri üzerinden aile hikayesi, replasman öyküsü ve uygulanan profilaksi tedavisi açısından inhibitör pozitif ve inhibitör negatif hasta grupları incelenerek her iki grup arasında inhibitör gelişim riski karşılaştırıldı.

Aile öyküsü karşılaştırıldığında her iki grup arasında ailesinde akrabalık ve ya ailede hemofili bireyin olmasının inhibitör gelişimi ile herhangi bir ilişkisi olmasa da, ailesinde inhibitör öyküsü olan hastaların inhibitör gelişim riski ile anlamlı ilişkili olduğu görüldü.

Tablo 12. Çalışmaya dahil edilen hastaların aile hikayesinin inhibitör gelişimi ile ilişkisi

	İnhibitör negatif, n (%)	İnhibitör pozitif, n (%)	p değeri
Ailede akrabalık öyküsü			0.052
• Var	14/24 (58)	10/24 (42)	
• Yok	55/70 (79)	15/70 (21)	
Ailede hemofili öyküsü			0.465
• Var	35/50 (70)	15/50 (30)	
• Yok	33/43 (77)	10/43 (23)	
Ailede inhibitör öyküsü			0.000
• Var	3/12 (25)	9/12 (75)	
• Yok	58/74 (78)	16/74 (22)	

Replasman öyküsü açısından her iki grup karşılaştırıldığında ilk faktör replasman yaşı ile inhibitör gelişim riski arasında ilişki olmadığı, her iki grupta benzer zamanlarda ilk kez replasman tedavisi verildiği görüldü. Replasman sebebi olarak inhibitör negatif hastalarda esas olarak travmaya sekonder nedenlerle, inhibitör pozitif hastalarda ise hematoma/hemartroz nedeniyle ilk replasman tedavisinin verildiği görüldü. Replasman hikayesi, verilen faktör konsantrasyonunun tipi ve dozu, uygulama süresi karşılaştırıldığında her iki grupta benzer sonuçlar bulundu ve bu iki grupta inhibitör gelişimi açısından risk olabilecek anlamlı fark yoktu.

Tablo 13. Çalışmaya dahil edilen hastaların ilk replasman öyküsünün inhibitör gelişimi ile ilişkisi

	İnhibitör negatif, n (%)	İnhibitör pozitif, n (%)	p değeri
İlk faktör replasman yaşı (ay)			0.876
• 18 aydan büyük	35/48 (73)	13/48 (27)	
• 13-18 ay	7/10 (70)	3/10 (30)	
• 7-12 ay	14/20 (70)	6/20 (30)	
• 0-6 ay	13/16 (81)	3/16 (19)	

İlk replasman sebebi			0.108
• hematoma/hemartroz	20/33 (61)	13/33 (39)	
• cerrahi	11/12 (92)	1/12 (8)	
• kanama (SSS dahil)	7/8 (88)	1/8 (12)	
• travma	31/40 (78)	9/40 (22)	
Replasman günü			0.255
• 3 gün	21/27 (78)	6/27 (22)	
• 5 gün	21/27 (78)	6/27 (22)	
• 10 gün	13/22 (59)	9/22 (41)	
Replasman dozu			0.399
• 25 Ü/kg	30/38 (79)	8/38 (21)	
• 25-45 Ü/kg	3/4 (75)	1/4 (25)	
• 45 Ü/kg	22/34 (65)	12/34 (35)	
FVIII konsantrisi			0.962
• pdFVIII	29/40 (73)	11/40 (27)	
• rFVIII	27/37 (73)	10/37(27)	

İleri izleminde profilaksi tedavisi verilen hastalar incelendiğinde her iki grupta da benzer zamanlarda profilaksi tedavisine başlandığı ve benzer şekilde tedavi şeması uygulandığı görüldü. Profilaksi alan ve profilaksi almayan hastalar karşılaştırıldığında inhibitör gelişimi açısından anlamlı bir fark görülmedi. Profilaksi tedavisine başlanan inhibitör pozitif ve inhibitör negatif hasta grupları karşılaştırıldığında uygulanan profilaksi tedavisinin başlanma döneminin ve tedavi modelinin inhibitör gelişimi ile ilişkisinde anlamlı fark yoktu.

Tablo 14. Çalışmaya alınan hastaların profilaksi tedavisi öyküsünün inhibitör gelişimi ile ilişkisi

	İnhibitör negatif, n (%)	İnhibitör pozitif, n (%)	p değeri
Profilaksi tedavisi			
• evet	53/70 (76)	17/70 (24)	0.120
• hayır	4/8 (50)	4/8 (50)	
Profilaksi alanlarda tedavi modeli			
• standart	27/39 (69)	12/39 (31)	0.156
• modifiye	26/31 (84)	5/31 (16)	
Profilaksi alanların tedaviye başlama yaşı (ay), ortalama sd ve ortanca	140 ± 157 [ortanca 84 (min 5 -max 684)]	118 ± 155 [ortanca 70 (min 6 -max 636)]	

4.1. CTLA-4 genotip dağılımı

CTLA-4 geninde, c.-318C>T için T allel frekansı, inhibitör negatif hastalarda %9,4 ve inhibitör pozitif hastalarda %10 olarak bulundu. İnhibitör negatif hastalardan biri (%1,5) T aleli (TT) için homozigot, 57'si (%82,6) C aleli (CC) için homozigot ve 11'i (%15,9) heterozigot (CT) olarak bulundu. İnhibitör-pozitif hasta ile karşılaştırıldığında sırasıyla 0 (%0), 20 (%80) ve 5 (%20) olarak görüldü. Allel frekansı veya genotipe göre iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu.

CTLA-4 genindeki c.49A> G varyantı için G allel frekansı, inhibitör negatif hastalarda %31,2 ve inhibitör pozitif hastalarda %24 olarak bulundu. İnhibitör negatif hastalardan altısı (%8,7) G alleli (GG) için homozigot, 32'si (%46,4) A alleli (AA) için homozigot ve 31'i (%44,9) heterozigot (AG) idi. İnhibitör pozitif hastalar ile karşılaştırıldığında sırasıyla 0 (%0), 13 (%52) ve 12 (%48) olarak bulundu. Allel frekansı veya genotipe göre iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu.

4.2. TNF- α genotip dağılımı

TNF- α geninde, c.49A>G için, A allel frekansı inhibitör negatif hastalarda %0 ve inhibitör pozitif hastalarda %10 olarak bulundu. İnhibitör negatif hastaların tümü G alleli (GG) için homozigot olarak tanımlandı, hiçbir hasta A alleli (AA) için homozigot veya heterozigot (GA)

değildi, İnhibitör pozitif hastalar ile karşılaştırıldığında sırasıyla 20 (%80), 0 (%0) ve 5'i (%20) olarak bulundu. Bununla da her iki grup arasında anlamlı fark vardı.

İnhibitör pozitif ve inhibitör negatif hastalarda genotip ve allel frekansları ve bu iki grup arasındaki ilişki Tablo 15'da gösterilmiştir.

Tablo 15. İnhibitör pozitif ve inhibitör negatif hastalarda genotip ve allel frekansları arasındaki ilişki.

SNP	Genotip	İnhibitör negatif, n (%)	İnhibitör pozitif, n (%)	p değeri
CTLA-4 (49A>G)	AA	32 (46,4)	13 (52)	0,311
	AG	31 (44,9)	12 (48)	
	GG	6 (8,7)	-	
	A	95 (68,8)	38 (76)	0,340
	G	43 (31,2)	12 (24)	
CTLA-4 (-318C>T)	CC	57 (82,6)	20 (80)	0,758
	CT	11 (15,9)	5 (20)	
	TT	1 (1,5)	-	
	C	125	45 (90)	0,905
	T	13 (9,4)	5 (10)	
TNF (-308G>A)	GG	69 (100)	20 (80)	0,000
	GA	-	5 (20)	
	AA	-	-	
	G	138 (100)	45 (90)	0,000
	A	-	5 (10)	

SNP: single nucleotide polymorphism

Sonuç olarak, çalışmamıza dahil edilen ağır HA hastalarının demografik, klinik ve genetik verileri incelenerek inhibitör gelişiminde *TNF- α* geninde -308G>A polimorfizminin anlamlı ilişkisi olduğu belirlendi.

5. TARTIŞMA

HA tedavisi sırasında en zorlu komplikasyon, FVIII proteinine karşı nötralize edici antikorların gelişmesidir. İnhibitör oluşumu halen HA hastalarının yönetimi ve tedavisinin planlanmasında önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Hangi HA hastalarının inhibitör gelişimi için risk altında olduğunu tahmin etmek ve inhibitör oluşumuna yol açan duyarlılık faktörlerini tanımlamak, uygun tedavilerin kullanımına izin verecektir. Bilindiği üzere, bu komplikasyon kompleks ve multifaktöriyel bir süreç olup, birçok genetik (ailede inhibitör gelişim öyküsü, *F8* geni mutasyon tipleri ve immün süreç ile ilişkili genler) ve çevresel (uygulanan ilk faktör dozu ve tipi, uygulama zamanı) faktörlerin birlikte etki etmesi sonucunda oluşmaktadır. Bu araştırmada, özellikle intron 22 inversiyon mutasyonu olan ağır HA hastalarına odaklandık ve çevresel faktörlerin yanı sıra, uygulanan profilaktik tedavinin, aile öyküsünün ve immün sistem ile ilgili 2 gendeki (*CTLA-4* ve *TNF-α*) 3 farklı polimorfik varyant ile inhibitör gelişimi arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

Genetik risk faktörlerinden *F8* gen mutasyonunun tipi inhibitör gelişiminde en önemli faktördür. HA hastalığı, büyük ve küçük delesyonlar, nonsense ve missens mutasyonlar veya splice bölge mutasyonları gibi birçok genetik mutasyonla ilişkili heterojen bir genetik hastalıktır. Bu hastalıkta intron 22 inversiyon % 45-50 ve intron 1 inversiyon %1-6 sıklıkta en çok görülen mutasyonlardan ikisidir (46). Birçok yapılan çalışmada genellikle farklı mutasyon tiplerinin inhibitör gelişiminde farklı boyutlarda risk oluşturduğu belirlenmiştir (48). *F8* gen mutasyonunun tipi ve inhibitör oluşumu riski, son yıllarda kapsamlı bir şekilde tartışılmıştır. 1995'te Schwaab ve ark. (45), büyük delesyonlar, nonsense mutasyonlar ve intron 22 inversiyon mutasyonlarını (sırasıyla % 35.7, % 38.4 ve % 34.4) taşıyan ağır HA hastalarında inhibitör insidansının küçük delesyon/ insersiyon (% 7.4) ve missense mutasyon (% 4.3) taşıyan hastalara göre 7-10 kat daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu daha sonra, HA'nın tüm ağırlık tiplerine sahip hastaları içeren Hemofili Mutasyon Veritabanında (HAMSTeRS veritabanı) bildirilen veriler de dikkate alınarak doğrulanmıştır (46). Oldenburg ve ark. tarafından 2002'de yayınlanan bir çalışmada (47), *F8* geni mutasyon tiplerinden büyük delesyonlar, nonsense mutasyonlar ve intron 22 inversiyonlarından oluşan grupta % 30'un üzerinde bir inhibitör prevalansı görülürken, küçük delesyonlar/ insersiyonlar, missense ve splice bölge mutasyonlarından oluşan grupta % 10'nun altında bir inhibitör prevalansı görüldü. Birkaç yıl sonra aynı grup, Bonn Merkezi'nin genetik verilerini ve HAMSTeRS veri tabanını oluşturan HA hastalarının mutasyonlarının tipi, boyutu ve konumuna dayalı bir sınıflandırma kullanarak, FVIII proteininin birden fazla alanını etkileyen büyük delesyonlara sahip hastaların, tek alanı

etkileyen delesyonu olan hastalardan (~% 25) daha yüksek bir inhibitör geliştirme riskine (~% 88) sahip olduğunu gösterdi. Hafif zincirdeki nonsense mutasyonların ağır zincirde bulunanlardan (% 17) daha yüksek bir risk (% 40) taşıdığı görüldü (48). Samanta C.Gouw vd (2012), meta-analizinde 30 seçilmiş çalışmadan 5383 ağır hemofili A hastasının verilerini *F8* mutasyon tipine göre inhibitör gelişiminin risklerini öngörmek için birleştirdi. Bu çalışmaya göre, intron 22 inversiyonlu hastalar ile karşılaştırıldığında, büyük delesyon ve nonsense mutasyonlara sahip hastaların riski inhibitör gelişimi açısından daha yüksekti. Aynı zamanda intron 1 inversiyonları ve splice bölge mutasyonları olan hastaların inhibitör gelişim riski eşit görünmüşken, küçük delesyonlar ve insersiyonlar ve missense mutasyonları olan hastaların riski daha düşüktü (5). Tüm bu çalışmaların sonuçları doğrultusunda FVIII protein ekspresyonunun tamamen eksikliğine neden olan *F8* gen mutasyon tiplerinin en yüksek inhibitör gelişme riski ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Bizim çalışmamızda sadece ağır HA tanısı konulmuş, intron 22 inversiyon mutasyonu olan hastalar seçilerek homojen bir hasta grubu üzerinden inhibitör gelişim riskleri araştırılmıştır.

Aile öyküsü araştırıldığında esas olarak ailede hemofilik birey olan olguların inhibitör gelişimi açısından pozitif öyküye sahip olması da inhibitör gelişimi açısından riskli olması ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çok merkezli çalışmada, ailede inhibitör gelişim öyküsü olan olguların da inhibitör gelişimi açısından riskli olduğu görülmüştür (11). Astermark ve ark. (2005), önceden ailesinde inhibitör gelişme öyküsü olan olguların inhibitör gelişim riskinin üç kat fazla olduğunu bildirmişlerdir (4). Bu bulgular kendisinden önce yapılan birçok çalışmaların da sonuçlarını doğrulamıştır (73,74). Bizim çalışmada olguların geriye dönük aile öyküsüne ilişkin verilerini incelediğimizde, ailesinde hemofilik birey olan olgularda inhibitör öyküsü pozitif olanların olmayanlara göre inhibitör gelişim riski arasında anlamlı fark bulduk. Tüm bu bulgular inhibitör gelişiminde genetik etkenlerin anlamlı rolü olduğunu düşündürmekle beraber, çalışmamızın inhibitör pozitif kohortundaki hasta sayısı, ailede inhibitör öyküsü olanlarla olmayanları karşılaştırmaya müsait değildi. Bu açıdan daha ileri araştırmalara gerek olduğu düşünülmektedir.

FVIII peptitlerinin CD4+ T-Yardımcı hücrelere sunulmasında rol alan HLA sınıf II molekülleri ve pro- ve anti-inflamatuar sitokinler (örn. IL-1, IL-2, IL-10, TNF- α ve CTLA4) gibi *F8* geni dışındaki genlerde doğal olarak oluşan varyasyonlar da artmış inhibitör riski ile ilişkilendirilmiştir (49-51). Hay ve ark. (1997), moleküler tabanlı HLA tiplleme yöntemlerini kullanarak sınıf II HLA sistemindeki tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP'ler) değerlendirdi (49). İnhibitör gelişme riskinin, Sınıf II HLA ile ilişkili üç SNP'nin (HLA-DRB * 1501, DQB1 * 0602 ve DQA1 * 0102), özellikle DQA1 * 0102 ile ilişkili olduğunu gösterdi. Bu 3 SNP'nin

sıklığının DQA1 * 0102 ile birlikte inhibitörü ve intron 22 inversiyon mutasyonu olan hastalarda yüksek olduğu bildirilmiştir (49).

HA hastalarında FVIII proteinine yönelik inhibitörlerin gelişimi, antijen sunan hücrelerin (APC'ler) ve B lenfositlerinin de rol oynadığı bir T yardımcı (Th) hücreye bağımlı süreçtir. APC'ler, T hücre reseptörüne bağlanmış FVIII proteininin peptitlerini sunar. İkinci sinyal aynı zamanda APC'lerdeki CD80 / 86 molekülleri ile Th hücrelerindeki CD28 arasındaki etkileşimle üretilir. CTLA-4, T hücrelerinde ekspres edilen bir reseptördür ve CD80/86 molekülleri ile etkileşim için CD28 ile rekabet eder. Bu mekanizma, T hücresi aktivitesinde bir azalmaya yol açar. Bu CTLA-4 etkileşimi bloke edilirse, T hücresi proliferasyonu ve B hücresi aktivitesi artar (4-7).

CTLA-4 genindeki c.-318C>T varyantının artmış promoter aktivitesi ile ilişkili olduğu, APC'ler ve Th hücresi arasındaki etkileşim üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu bildirilmiş, bu nedenle daha düşük bir inhibitör gelişimi riski ile ilişkili olabildiği düşünülmüştür (37,38). Astermark ve ark. 2007'de ağır HA olan 123 kardeşten (63 inhibitör hasta) oluşan bir kohortta *CTLA-4*'teki c.-318C>T varyantı ile inhibitör gelişimi arasında önemli bir koruyucu ilişki bildirmiştir (39). Marchione ve ark. 2017'de bu bulguyu, büyük bir ağır HA hastalarından oluşan kohortunda intron 22 inversiyonu ve diğer tip mutasyonlarla birlikte ayrı ayrı doğrulamıştır (40). Astermark ve Marchione'nin çalışmalarının aksine, Pinto ve ark. 2012'de Hindistan'da ağır HA hastalarından oluşan bir kohortta *CTLA-4*'te c.-318C> T ile inhibitör gelişimi arasında bir ilişki bildirmemiştir (15). Pinto'nun araştırmasına benzer şekilde, Agostini ve ark. (2012) ağır HA olan Brezilyalı hastalarda anlamlı bir ilişki göstermemiştir (23). Çalışmamızda Marchione ve ark. (2017) çalışmasına benzer şekilde olarak, intron 22 mutasyonu olan hastalara odaklandık. Bizim kohortumuzda, *CTLA-4*'te c.-318C>T polimorfizmi ile inhibitör gelişimi arasında önemli bir koruyucu ilişki saptanmadı.

CTLA-4 genindeki c.49A> G varyantı endoplazmik retikulumda eksik glikolizasyona neden olur ve proteinin yüzey / toplam oranını azaltır. Bu da onun işlevini etkileyebilir (37,41). *CTLA-4* proteininin aktive edilmiş T hücreleri üzerindeki inhibitör etkisi, G alleli taşıyan örneklerde daha az etkilidir. Astermark ve ark. (2007), kohortunda *CTLA-4* genindeki c.49A>G varyantı ile inhibitör gelişimi arasında anlamlı bir ilişki göstermemiştir (39). Astermark ve diğerlerinin aksine, Marchione ve ark. (2017), intron 22 inversiyon mutasyonlu Arjantin kohort çalışmasında, G allelinin inhibitör gelişimi için önemli ölçüde daha yüksek riskle ilişkili olduğunu göstermiştir (40). Bu çalışmada, biz bu varyantın inhibitör oluşumu açısından ilişkili olduğunu saptamadık.

APCs-Th hücre sinyali ile etkileşimi sağlayan immün sistem ile ilgili genlere ek olarak, sitokinler, antikor aracılı immün etkileşime az ve ya çok derecede doğrudan katılırlar. Bu nedenle, bazı sitokin genlerindeki SNP'ler de inhibitör oluşumunda rol oynayabilir. $TNF-\alpha$, güçlü bir proinflatuar ve immünomodülatör etkiye sahip önemli bir sitokindir ve bu gendeki SNP'lerin otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (16). Pavlova ve ark. (2006), inhibitör gelişimi üzerindeki etkisini değerlendirmek için HA hastalarında $TNF-\alpha$ 'da c.-308G>A polimorfizmini analiz etmiştir. Yazarlar, A alleli için homozigot (AA) olan bireylerin ağır HA'da daha yüksek bir inhibitör gelişme riski olduğunu göstermiştir (18). Zhang ve ark. (2011) tarafından bu SNP, HA olan 140 Çinli Han hastasında analiz edilmiş ve kohortlarında aynı sonucu doğrulamışlar (42). Bizim çalışmamızda, intron 22 inversiyon mutasyonlu tüm inhibitör negatif HA hastalarının homozigot olarak G alleli olduğu saptanırken, inhibitör pozitif vakaların % 80'inin GG genotipine sahip olduğu görülmüştür. İnhibitör pozitif grubumuzda da AA genotipi yoktu, ancak inhibitör pozitif grubun % 20'sinin A aleli için heterozigot olduğu bulundu. Bu sonuca göre, intron 22 inversiyon mutasyonu olan ağır HA hastalarında A allelinin artmış inhibitör gelişimi riski ile ilişkili olduğunu gösterdik. Çalışmamız, intron 22 inversiyon mutasyonu olan ağır HA hastalarından oluşan grupta *CTLA-4* ve $TNF-\alpha$ gen polimorfizmlerinin inhibitör gelişimi üzerindeki etkisini analiz eden ülkemizde gerçekleştirilmiş ilk çalışmadır. Bu çalışmadaki ana zayıf nokta az sayıda hastanın olmasıdır. Bunun sebebi sadece intron 22 inversiyon mutasyonu olan hastaların seçilmesidir. Bu kohortda böyle seçimin amacı, daha homojen bir grup sağlamaktır. Sonuç olarak, intron 22 inversiyon mutasyonu olan ağır HA hastalarında, *CTLA-4* genindeki c.-318C>T ve c.49A>G varyantları inhibitör gelişimi ile ilişkili değildir. $TNF-\alpha$ 'nın bir varyantı olan c.-308G>A için A aleli, inhibitör gelişme riski ile ilgilidir.

B-lenfositlerinin regülasyonunda yer alan IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β 1 ve IFN- γ gibi interlökin ve sitokinler inhibitör gelişimi ile ilişkili olabilecek diğer genetik risk faktörleri arasında bilinmektedir. Otoimmün hastalıklarda antikor üretimini etkilediği bilinen IL-10 sitokinini kodlayan gen polimorfizmlerinin inhibitör gelişimi ile ilişkisi birçok literatür verilerinde karşılaştırılsa da, bu ilişkiyi kanıtlamak için yeterli sayıda çalışmalara ihtiyaç vardır. Hoda Sadek ve ark. (2017), Mısırlı HA hastalarında IL10-1082A/G gen polimorfizminin inhibitör gelişimi ile ilişkisinde anlamlı fark bulmamıştır (88). Bafunno ve ark. (2010), İtalyan HA hastalarında benzer olarak inhibitör gelişimi ile IL-10 gen polimorfizmleri arasında anlamlı ilişki göstermemiştir (17). Bunun aksine, Malmö Uluslararası Kardeş Çalışma Grubu (2005), HA olan 164 hastadan oluşan bir grupta IL10 geninin promoter bölgesinde bulunan CA tekrar mikrosatellitlerinden biri olan IL10G'deki 134 bp'lik bir alel ile inhibitör gelişimi arasında güçlü

bir ilişki olduğunu gösterdi (4). Daha ileri dönemlerde ağır HA hastalarından oluşan 2 kohortda IL10 -1082A / G polimorfizminin G allelinin inhibitör oluşumu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (6,87). H.Çağlayan ve ark. (2014), 103 ağır HA hastalarından oluşan çalışma grubunda IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β 1 ve IFN- γ genlerinde bulunan 9 SNP bölgesi için araştırmıştır. İntron 22 inversiyon mutasyonu bulunan ve inhibitör pozitif olarak ayrılan hasta grubunda IL-5 geni promotör bölgesinde yer alan rs2069812'nin T-aleli ile inhibitör gelişimi arasında önemli bir ilişki bulunmuştur. TT genotipinin de inhibitör pozitif grubu ile ilişkili olması T-allelinin yatkınlık aleli ve C-allelinin baskın koruyucu allel olduğunu düşündürmüştür (86).

HA hastalarında inhibitör gelişimi ile ilişkili olan, genetik olmayan çevresel faktörler araştırıldığında özellikle son on yıllar boyunca, ilk kez verilen FVIII konsantresinin tipi, dozu, uygulama sayısı, uygulama günü, ilk uygulama zamanında hastanın yaşı ve cerrahi, enfeksiyon, ciddi kanamalar ve başka sebepler sonucunda verilmesi gibi, bir çok etkenler araştırılmıştır. Uygulanan FVIII konsantresinin pdFVIII ve ya rFVIII olmasının inhibitör gelişiminde önemli risk faktörü olduğu görülmüştür. 2003 yılında Wight ve Paisley (52), araştırmalarında plazma kaynaklı FVIII konsantrelerinin rekombinant FVIII'den daha az immünojenik olduğunu bildirdi. 2006'da Goudemand ve arkadaşları (53), aynı şekilde rekombinant türevli FVIII konsantreleri ile tedavinin plazma kaynaklı FVIII ürünleri ile karşılaştırıldığında üç kat daha fazla inhibitör riski oluşumu ile ilişkili olduğunu buldu. Geriye dönük bakıldığında CANAL çalışması ve prospektif RODIN çalışması, ağır HA hastalarında FVIII ürününün kaynağı ile inhibitör gelişimi arasında bir ilişki olmadığını bildirmiştir (11,54). Bu sonuçlar daha sonraki dönemlerde Fransız ve İngilterede yapılan kohort çalışmalarında da doğrulanmıştır (55-57). Tüm bu veriler FVIII ürünlerinin farklı sınıflarını karşılaştıran ilk randomize klinik çalışma olan SIPPET çalışmasının da yapılmasına olanak sağlamıştır (59). Ek olarak, belirtilen çalışmada rekombinant ve plazma kaynaklı FVIII ürünleri ile en yüksek inhibitör gelişme oranının ilk 10 uygulama gününde gerçekleştiğini göstermiştir. Karşılaştırma sonucunda, ilk 5 uygulama günü sonrasında rekombinant ürünler ile tedavi edilen hastaların plazma türevli FVIII konsantreleri ile tedavi edilen hastalara göre 3 ila 4 kat daha fazla inhibitör gelişme riskine sahipti (59). Ek olarak Franchini ve ark. (2013), plazma kaynaklı veya rekombinant FVIII ürünleri alan daha önce tedavi görmemiş 1421 ağır hemofili A hastalarında inhibitör insidansını değerlendiren 28 prospektif çalışmaların sistematik bir incelemesini ve meta-analizini gerçekleştirdi. Değerlendirmeler sonucunda farklı FVIII ürün sınıfları arasında inhibitör gelişim riskinde anlamlı fark gözlenmedi (12). Bizim çalışmamızda da intron 22 inversiyon mutasyonu olan ağır HA hastaları inhibitör pozitif ve inhibitör negatif grup olarak karşılaştırıldı. Gruplar karşılaştırıldığında hastaların ilk replasman zamanında plazma ve ya

rekombinant kaynaklı ürünlerle tedavi edilmesinin inhibitör gelişimi açısından ilişki göstermediğini saptadık. Yine de daha yüksek hasta sayıları ile yapılacak araştırmada bu verinin yeniden incelenmesi uygun olacaktır.

İlk faktör replasmanı zamanındaki yaş, tedavi rejimi türü, profilaksi tedavisinin kullanımı ve ilk tedavinin yoğunluğu gibi diğer çevresel risk faktörlerinin inhibitör gelişimi riski ile ilişkisi birçok çalışmada tartışılrsa da, ancak ne yazık ki birbiri ile sonuçları uyumsuzdur. Tek ortak sonuç ilk faktör maruziyetinde 5 ardışık tedavi gününün ve ilk faktör tedavisi zamanı yoğun tedavi maruziyetinin artmış bir inhibitör riski ile ilişkili olduğudur (60-62). Çok merkezli CANAL kohort çalışmasında (11), en az 50 uygulama gününde faktör VIII ile tedavi edilen ağır HA tanısı alan 366 hasta arasında, faktör VIII'e ilk maruziyette hastanın yaşı ile inhibitör gelişimi riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, bu çalışmada ilk FVIII replasmanı zamanı yoğun yapılan tedavi (erken cerrahi prosedürler, ve yüksek faktör VIII dozu) daha yüksek bir riskle ilişkili olduğu bulunmuştur. Yapılan birçok diğer çalışmada, faktör VIII'e ilk maruz kalma yaşı ile inhibitör gelişimi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (67-70). İlk maruziyet yaşının inhibitör gelişimi ile ilişkili olduğu da ancak bu ilişkinin tedavi yoğunluğu ile açıklandığını göstermektedir. .

Son yapılan araştırmalar ağır HA tanısı alan çocuklarda erken yaşta başlanan profilaksi tedavisinin ileri inhibitör gelişim riskinin azalmasında pozitif etkisi olduğunu göstermektedir. Eklem hasarının ve bunun sonrasında progressifleşen artropatinin önlenmesinde profilaksi tedavisinin önerilmesinin bilindiği yanı sıra, ileri izlemde inhibitör gelişiminde riskin azalmasına ilişkin profilaksi tedavisinin yararları birçok kontrollü prospektif çalışmalarda tartışılmıştır (65,66). Vaka kontrollü bir İtalyan çalışmasında (64), profilaksi tedavisinin kanadıkça tedaviye göre karşılaştırıldığında inhibitör gelişimi üzerindeki etkilerini karşılaştırmıştır. Bunun sonucunda ortalama profilaksi tedavisine başlangıç yaşı 35 ay olan çocuklarda inhibitör gelişiminde %70 oranında bir azalma olduğu görülmüştür. Benzer sonuçlar çok merkezli olarak yapılan daha geniş çaplı bir çalışmada da gösterilmiştir (11). Bu çalışmaya göre erken başlangıçlı ve düzenli profilaksi, kanadıkça yapılan tedaviyle karşılaştırdığında inhibitör gelişimini %60 oranında azaltan bir etkiye sahiptir. Bu da profilaktik tedavinin koruyucu etkisine ilişkin önceki önerileri açıkça doğrulamıştır (64,71,72).

Son birkaç yıl içinde, çevresel faktörler ile ilişkili inhibitör riskinin yaygın olarak önerilen bir açıklaması tehlike sinyali etkisidir. Bu model, patojenlere, toksinlere ve mekanik hasara maruz kalan hasarlı hücrelerden gelen tehlike sinyalleri tarafından immün sistemin etkinleştirildiğini iddia ediyor. Hemofilide FVIII infüzyonu sırasında mevcut olan endojen veya eksojen hasar sinyalleri tarafından tehlike sinyali aktive olur. Bu nedenle, operasyon, şiddetli

kanamalar, aşılar ve enfeksiyonların tümü, hemofiliden etkilenen bireylerde tehlike sinyalini başlatan ve uygulanan FVIII'e karşı immün sistemin cevabı ile sonuçlanan etkenler olabilir. Özellikle, hemofili hastalarında şiddetli eklem kanamaları, lokal bir proinflatuar yanıtı uyarır ve antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından FVIII'in CD4+ T hücrelerine sunumu gerçekleşir (16,63). Bizim çalışmamızda da, benzer çalışmalarda olduğu gibi, intron 22 inversiyon mutasyonu olan ağır HA hastalarında ilk FVIII replasmanı zamanı kullanılan ürünün tipinden, dozundan, uygulama gününden ve ilk kez kullanım sebebi karşılaştırıldığında inhibitör pozitif ve negatif gruplar arasında inhibitör gelişimi açısından herhangi risk olmadığı görüldü. Sonuç olarak tüm bu konuda yapılan belirli çalışmalar incelendiğinde benzer sonuçların ve bazı belirsizliklerin olması nedeniyle, hem de birden çok çevresel risk faktörünün etkisi çeşitli olduğundan ve bu faktörler genellikle birbiriyle ilişkili olduğundan, her bir faktörün inhibitör gelişiminde göreceli katkısını belirlemek zordur.

6. SONUÇLAR

1. Tedavi amacıyla HA hastasına uygulanan FVIII'e karşı oluşan inhibitörler tedavinin etkinliğini bozmaktadır ve günümüzde hemofili hastalarının %20-30'unda tedavisi sırasında karşılaşılan en ciddi ve zorlayıcı komplikasyon olarak kabul edilmektedir. İnhibitör gelişimine etki eden faktörleri belirlemek amacıyla gerçekleştirilen araştırmalarda öne sürülen iki grup sebepler olduğu biliniyor: Genetik, yani modifiye edilemeyen ve çevresel, yani modifiye edilebilir sebepler. Bu amaçla ülkemizde Hemofili Genetiği alanında önemli bir referans merkezi olan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı tarafından genetik analizi tamamlanan "intron 22 inversiyon" mutasyonu saptanan 94 ağır HA hastası bu açıdan çalışmaya dahil edilmiştir.
2. Hastaların klinik ve demografik verileri üzerinden aile hikayesi, replasman öyküsü ve uygulanan profilaksi tedavisi açısından inhibitör pozitif ve inhibitör negatif hasta grupları incelenerek her iki grup arasında ailesinde akrabalık ve ya ailede hemofili bireyin olmasının inhibitör gelişimi ile herhangi bir ilişkisi olmasa da, ailesinde inhibitör öyküsü olan hastaların inhibitör gelişim riski ile anlamlı ilişkisi olduğu görüldü.
3. İlk faktör replasman yaşı ile inhibitör gelişim riski arasında ilişki yoktu, her iki grupta benzer zamanlarda ilk kez replasman tedavisi verilmişti. Replasman hikayesi, verilen

faktör konsantrasyonunun tipi ve dozu, uygulama süresinin her iki grupta benzer olduğu ve bu iki grupta inhibitör gelişimi açısından risk olabilecek anlamlı farkının olmadığı görüldü. Profilaksi alan ve profilaksi almayan hastalar arasında uygulanan tedavi modelinin ve tedaviye başlanma zamanının inhibitör gelişimi açısından riskli olmadığı bulundu.

4. İmmün sistem gen polimorfizmleri açısından incelendiğinde, *CTLA-4* geninde c.-318C>T ve c.49A>G varyantı için allel frekansı veya genotipe göre inhibitör pozitif ve inhibitör negatif gruplar arasında inhibitör gelişim riski açısından anlamlı fark yoktu. *TNF-α* geninde, c.49A>G için, A allel frekansı inhibitör negatif hastalarda %0 ve inhibitör pozitif hastalarda %10 olarak bulundu. İnhibitör negatif hastaların tümü G alleli (GG) için homozigot olarak tanımlandığında, hiçbir hasta A alleli (AA) için homozigot veya heterozigot (GA) değildi. Bununla da her iki grup arasında inhibitör gelişim riski açısından anlamlı fark vardı.
5. Çalışmamıza dahil edilen ağır HA hastalarının demografik, klinik ve genetik verileri incelenerek Türk ağır HA hastalarında inhibitör gelişiminin esas olarak genetik faktörlerle anlamlı ilişkisi olduğu belirlendi.
6. Ülkemizde HA hastalarında inhibitör gelişimi ile ilgili risk faktörlerini belirlemeye yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma sonucunda ülkemizde HA tanısı ile izlenen olgulardaki inhibitör gelişimine ailesel ve çevresel etkenlerin yanı sıra, genetik ve aynı zamanda immün düzenleyici sitokinleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin etkisini değerlendirmek ve elde edilen veriler ışığında, inhibitör gelişimini öngörmede kullanılacak bir skorlama sistemi geliştirilmesi açısından yapılacak ileri çalışmalara ön veri sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. David Keeling And Cindy Lee(2008) İmmunological Aspects Of İnhibitor Development İn Haemophilia. Coagulation Disorders Haemophilia 2008: 28-33
<https://touchoncology.com/immunological-aspects-of-inhibitor-development-in-haemophilia/>
2. Hashemi, S. M., Fischer, K., Moons, K. G. M., & Van Den Berg, H. M. (2014). Improved Prediction Of İnhibitor Development İn Previously Untreated Patients With Severe Haemophilia A. Haemophilia, 21(2), 227–233.
<https://onlinelibrary.Wiley.Com/Doi/Abs/10.1111/Hae.12566>

3. Kim, H.-Y., Cho, J.-H., Kim, H.-J., Chung, H.-S., Kim, S.-H., Lee, K.-O., ... Kim, H.-J. (2018). Ethnicity-Specific Impact Of Hla I/i Genotypes On The Risk Of Inhibitor Development: Data From Korean Patients With Severe Hemophilia A. *Annals Of Hematology*, 97(9), 1695–1700. <https://link.springer.com/article/10.1007%2fs00277-018-3358-X>
4. Astermark J, Oldenburg J, Escobar M, White Gc 2nd, Berntorp E (2005). The Malmo International Brother Study (Mibs). Genetic Defects And Inhibitor Development In Siblings With Severe Hemophilia A. *Haematologica* 90:924–931 <http://www.Haematologica.Org/Content/90/7/924.Long>
5. Gouw Sc, Van Den Berg Hm, Oldenburg J, Astermark J, De Groot Pg, Margaglione M, Thompson Ar, Van Heerde W, Boekhorst J, Miller Ch, Le Cessie S, Van Der Bom Jg (2012) F8 Gene Mutation Type And Inhibitor Development In Patients With Severe Hemophilia A: Systematic Review And Meta-Analysis. *Blood* 119:2922–2934. <https://ashpublications.Org/Blood/Article/119/12/2922/29862/F8-Gene-Mutation-Type-And-Inhibitor-Development-In>
6. Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, Fimmers R, Astermark J, Oldenburg J (2009) Impact Of Polymorphisms Of The Major Histocompatibility Complex Class II, Interleukin-10, Tumor Necrosis Factor-Alpha And Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 Genes On Inhibitor Development In Severe Hemophilia A. *J Thromb Haemost* 7:2006–2015. <https://onlinelibrary.Wiley.Com/Doi/Epdf/10.1111/J.1538-7836.2009.03636.X>
7. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, Lefvert Ak (2006) Polymorphisms In The Tnfa Gene And The Risk Of Inhibitor Development In Patients With Hemophilia A. *Blood* 108:3739–3745. <https://ashpublications.Org/Blood/Article-Lookup/Doi/10.1182/Blood-2006-05-024711>
8. Gouw Sc¹, Van Den Berg Hm, Fischer K, Auerswald G, Carcao M, Chalmers E, Chambost H, Kurnik K, Liesner R, Petrini P, Platokouki H, Altisent C, Oldenburg J, Nolan B, Garrido Rp, Mancuso Me, Rafowicz A, Williams M, Clausen N, Middelburg Ra, Ljung R, Van Der Bom Jg; Pednet And Research Of Determinants Of Inhibitor Development (Rodin) Study Group. *Blood*. 2013 May 16;121(20):4046-55. <https://ashpublications.Org/Blood/Article-Lookup/Doi/10.1182/Blood-2012-09-457036>
9. Pergantou, H., Varela, I., Moraloglou, O., Economou, M., Spanou, K., Kapsimali, Z., ... Platokouki, H. (2013). Impact Of Hla Alleles And Cytokine Polymorphisms On Inhibitors Development In Children With Severe Haemophilia A. *Haemophilia*, 19(5), 706–710. <https://onlinelibrary.Wiley.Com/Doi/Pdf/10.1111/Hae.12168>

10. Peyvandi, F., Mannucci, P. M., Garagiola, I., El-Beshlawy, A., Elalfy, M., Ramanan, V., ... Rosendaal, F. R. (2016). A Randomized Trial Of Factor VIII And Neutralizing Antibodies In Hemophilia A. *New England Journal Of Medicine*, 374(21), 2054–2064.
<https://www.Nejm.Org/Doi/Full/10.1056/Nejmoa1516437>
11. Gouw, S. C., Van Der Bom, J. G., & Marijke Van Den Berg, H. (2007). Treatment-Related Risk Factors Of Inhibitor Development In Previously Untreated Patients With Hemophilia A: The Canal Cohort Study. *Blood*, 109(11), 4648–4654.
<https://ashpublications.Org/Blood/Article/109/11/4648/23068/Treatmentrelated-Risk-Factors-Of-Inhibitor>
12. Coppola, A., Rocino, A., Santagostino, E., Tagliaferri, A., Zanon, E., ... Morfini, M. (2013). Systematic Review Of The Role Of FVIII Concentrates In Inhibitor Development In Previously Untreated Patients With Severe Hemophilia A: A 2013 Update. *Seminars In Thrombosis And Hemostasis*, 39(07), 752–766.
<https://www.thieme-Connect.De/Products/Ejournals/Abstract/10.1055/S-0033-1356715>
13. Iorio, A., Halimeh, S., Holzhauer, S., Goldenberg, N., Marchesini, E., Marcucci, M., ... Nowak-Göttl, U. (2010). Rate Of Inhibitor Development In Previously Untreated Hemophilia A Patients Treated With Plasma-Derived Or Recombinant Factor VIII Concentrates: A Systematic Review. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, 8(6), 1256–1265.
<https://onlinelibrary.Wiley.Com/Doi/Full/10.1111/J.1538-7836.2010.03823.X>
14. Gouw, S., & Van Den Berg, H. M. (2009). The Multifactorial Etiology Of Inhibitor Development In Hemophilia: Genetics And Environment. *Seminars In Thrombosis And Hemostasis*, 35(08), 723–734.
<https://www.Thieme-Connect.Com/Products/Ejournals/Abstract/10.1055/S-0029-1245105>
15. Pinto, P., Ghosh, K., & Shetty, S. (2012). Immune Regulatory Gene Polymorphisms As Predisposing Risk Factors For The Development Of Factor VIII Inhibitors In Indian Severe Haemophilia A Patients. *Haemophilia*, 18(5), 794–797.
<https://onlinelibrary.Wiley.Com/Doi/Abs/10.1111/J.1365-2516.2012.02845.X>
16. Garagiola, I., Palla, R., & Peyvandi, F. (2018). Risk Factors For Inhibitor Development In Severe Hemophilia A. *Thrombosis Research*, 168, 20–27.
[https://www.Thrombosisresearch.Com/Article/S0049-3848\(18\)30368-2/Fulltext](https://www.Thrombosisresearch.Com/Article/S0049-3848(18)30368-2/Fulltext)
17. Bafunno, V., Santacroce, R., Chetta, M., D'Andrea, G., Pisanelli, D., Sessa, F., ... Margaglione, M. (2009). Polymorphisms In Genes Involved In Autoimmune Disease And The Risk Of FVIII Inhibitor Development In Italian Patients With Haemophilia A. *Haemophilia*, (2010),16,469-473.

<https://onlinelibrary.Wiley.Com/Doi/Abs/10.1111/J.1365-2516.2009.02150.X>

18. Pavlova, A., Delev, D., Lacroix-Desmazes, S., Schwaab, R., Mende, M., Fimmers, R., ... Oldenburg, J. (2009). Impact Of Polymorphisms Of The Major Histocompatibility Complex Classâ Ii, İnterleukin-10, Tumor Necrosis Factor-Î± And Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 Genes On İnhibitor Development İn Severe Hemophiliaâ A. *Journal Of Thrombosis And Haemostasis*, 7(12), 2006–2015. <https://onlinelibrary.Wiley.Com/Doi/Full/10.1111/J.1538-7836.2009.03636.X>
19. Hemofilide inhibitör sorunu. Tanı ve tedavi kılavuzu (2011) Türk Hematoloji Derneği. <http://www.thd.org.tr/thdData/Books/119/bolum-iv-hemofilide-inhibitor-sorunu-tani-ve-tedavi-kilavuzu.pdf>
20. Naderi, N., Yousefi, H., Mollazadeh, S., Seyed Mikaeili, A., Keshavarz Norouzpour, M., Jazebi, M., ... Bolhassani, A. (2019). Inflammatory and immune response genes: A genetic analysis of inhibitor development in Iranian hemophilia A patients. *Pediatric Hematology and Oncology*, 1–12. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08880018.2019.1585503?journalCode=ipho20>
21. Ghosh, K., & Shetty, S. (2009). Immune Response to FVIII in Hemophilia A: An Overview of Risk Factors. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 37(2), 58–66. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12016-009-8118-1>
22. Sadek, H., Youssry, I., Ibrahim, N. S. E., Abou-Elalla, A. A., Atef, G., & Mousa, S. M. (2017). The Development of FVIII Inhibitors in Relation to IL10 Gene Polymorphism in Hemophilia A Egyptian Pediatric Patients. *Fetal and Pediatric Pathology*, 36(3), 184–189. <http://cel.webofknowledge.com/InboundService.do?customersID=atyponcel&smartRedirect=yes&mode=FullRecord&IsProductCode=Yes&product=CEL&Init=Yes&Func=Frame&action=retrieve&SrcApp=literatum&SrcAuth=atyponcel&SID=D5CIHd31FfL6tXvsbW2&UT=WOS%3A000402643500002>
23. Agostini, D., Rosset, C., Botton, M. R., Kappel, D. B., Vieira, I. A., Gorziza, R. P., ... Bandinelli, E. (2012). Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. *Haemophilia*, 18(6), e416-418. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/hae.12015>
24. LOZIER, J. N., ROSENBERG, P. S., GOEDERT, J. J., & MENASHE, I. (2011). A case-control study reveals immunoregulatory gene haplotypes that influence inhibitor risk in severe haemophilia A. *Haemophilia*, 17(4), 641–649. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2516.2010.02473.x>

25. Balkan C. Hemofilide profilaksi. In: Kavaklı K. ed. Hemofili Rehberi 2014. 1st ed. Meta Basım 2014;35- 53. http://egehemoder.org/Hemofili_Rehberi_2014.pdf
26. Wolfgang Schramm.(2014). The history of hemophilia-Short review. Thrombosis Research, Volume 134, Supplement 1, November 2014, Pages S4-S9. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049384813004908?via%3Dihub>
27. E.I. Rogaev, A.P. Grigorenko, G. Faskhutdinova, E.L.W. Kittler, Y.K. Moliaka. Genotype analysis identifies the cause of the “Royal Disease”. Science, 326 (2009), p. 817
28. Selim Hematoloji Ulusal Tanı ve Tedavi Kılavuzu Çalışma Grubu. Hemofili Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Türk Hematoloji Derneği. Ankara 2011; 1:5-7. <http://www.thd.org.tr/thdData/us6>.
29. Kavaklı K, Unuvar A, et al. Turkish PUP study. Haemophilia 2014; 20(suppl.3): 33. WFH Congress, Melbourne 2014.
30. Berntorp E, Astermark J, Bjorkman S, et al. Consensus perspectives on prophylaxis therapy for haemophilia: summary statement. Haemophilia 2003;9 (suppl 1):1-4.
31. Ewing NP, Pullens L, De Guzman C. Anamnesis in patients with hemophilia and inhibitors who receive activated prothrombin complex concentrates for prophylaxis. J Thromb Hemost 2007; 5(Suppl 2): (P_T_158).
32. Fischer K, van der Born JG, Mauser-Bunschoten EP, et al. The effects of postponing prophylactic treatment on long-term outcome in patients with severe haemophilia. Blood 2002; 99: 2337-41.
33. “Hemofilide Profilaksi Çalıştayı” Uzlaşısı Raporu. Türk Pediatrik Hematoloji Derneği (TPHD) Hemostaz-Tromboz-Hemofili alt Çalışma Grubu, 8 Temmuz 2010.
34. Remor E, Young NL, Von Mackensen S, Lopatina EG. Disease-specific quality-of-life measurement tools for haemophilia patients. Haemophilia. 2004;10 Suppl 4:30-34.
35. Margaglione M, Intriieri M. Genetic Risk Factors and Inhibitor Development in Hemophilia: What Is Known and Searching for the Unknown. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2018.
36. Dimichele D. The North American Immune Tolerance Registry: contributions to the thirty-year experience with immune tolerance therapy. Haemophilia. 2009;15(1):320-328.
37. Ligiers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. Genes Immun 2001;2:145-52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426323>

38. Wang XB, Zhao X, Giscombe R, Lefvert AK. A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes Immun.* 2002;3:233–4.
39. Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert A-K, MIBS Study Group. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 2007;5:263–5.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17269936>
40. Marchione VD, Zuccoli JR, Abelleiro MM, Radic CP, Neme D, Candela M, et al. A prevalent CTLA4 missense variant significantly associates with inhibitor development in Argentine patients with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2017;23:e166–9.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28220572>
41. Mäurer M, Loserth S, Kolb-Mäurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics.* 2002;54:1–8.
42. Zhang L, Yu Z, Zhang W, Cao L, Su J, Bai X, et al. [Relationship between factor VIII inhibitor development and polymorphisms of TNF α and CTLA-4 gene in Chinese Han patients with hemophilia A]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2011;32:168–72.
43. Matino, D., Tieu, P., & Chan, A. (2020). MOLECULAR MECHANISMS OF INHIBITOR DEVELOPMENT IN HEMOPHILIA. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 12(1), e2020001.
44. Tantawy, A. A. G. (2010). Molecular genetics of hemophilia A: Clinical perspectives. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 11(2), 105–114.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110863010000108>
45. R. Schwaab, H.H. Brackmann, C. Meyer, J. Seehafer, M. Kirchgesser, A. Haack, K. Olek, E.G. Tuddenham, J. Oldenburg. Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb. Haemost.*, 74 (1995), pp. 1402-1406
46. A.C. Goodeve, I. Williams, G.L. Bray, I.R. Peake. Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate). Recombinate PUP Study Group. *Thromb. Haemost.*, 83 (2000), pp. 844-848
47. J. Oldenburg, O. El-Maarri, R. Schwaab. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia*, 8 (Suppl. 2) (2002), pp. 23-29

48. J. Oldenburg, O. El-Maarri, R. Schwaab. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia*, 8 (Suppl. 2) (2002), pp. 23-29
49. C.R. Hay, W. Ollier, L. Pepper, A. Cumming, S. Keeney, A.C. Goodeve, B.T. Colvin, F.G. Hill, F.E. Preston, I.R. Peake. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb. Haemost.*, 77 (1997), pp. 234-237
50. 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), pp. 238-242
51. 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), pp. 3167-3172
52. J. Wight, S. Paisley. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*, 9 (2003), pp. 418-435
53. J. Goudemand, C. Rothschild, V. Demiguel, C. Vinciguerrat, T. Lambert, H. Chambost, A. Borel-Derlon, S. Claeysens, Y. Laurian, T. Calvez. FVIII-LFB and Recombinant FVIII study groups, Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood*, 107 (2006), pp. 46-51
54. S.C. Gouw, J.G. van der Bom, R. Ljung, C. Escuriola, A.R. Cid, S. Claeysens-Donadel, C. van Geet, G. Kenet, A. Mäkipernaa, A.C. Molinari, W. Muntean, R. Kobelt, G. Rivard, E. Santagostino, A. Thomas, H.M. van den Berg, PedNet and RODIN Study Group. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N. Engl. J. Med.*, 368 (2013), pp. 231-239
55. P.W. Collins, B.P. Palmer, E.A. Chalmers, D.P. Hart, R. Liesner, S. Rangarajan, K. Talks, M. Williams, C.R. Hay, UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. Factor VIII brand and the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated UK children with severe hemophilia A, 2000–2011. *Blood*, 124 (2014), pp. 3389-3397
56. T. Calvez, H. Chambost, S. Claeysens-Donadel, R. d'Oiron, V. Goulet, B. Guillet, V. Héritier, V. Milien, C. Rothschild, V. Roussel-Robert, C. Vinciguerra, J. Goudemand, FranceCoag Network. Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A. *Blood*, 124 (2014), pp. 3398-3408
57. T. Calvez, H. Chambost, R. d'Oiron, V. Dalibard, V. Demiguel, A. Doncarli, Y. Gruel, Y. Huguenin, P. Lutz, C. Rothschild, C. Vinciguerra, J. Goudemand, for FranceCoag

Collaborators. Analyses of the FranceCoag cohort support differences in immunogenicity among one plasma-derived and two recombinant factor VIII brands in boys with severe hemophilia A. *Haematologica*, 103 (2018), pp. 179-189

58. R.B. Hartholt, A.S. van Velzen, I. Peyron, A. Ten Brinke, K. Fijnvandraat, J. Voorberg. To serve and protect: the modulatory role of von Willebrand factor on factor VIII immunogenicity. *Blood Rev.*, 31 (2017), pp. 339-347

59. F. Peyvandi, A. Cannavò, I. Garagiola, R. Palla, P.M. Mannucci, F.R. Rosendaal, sippet study group. Timing and severity of inhibitor development in recombinant versus plasma-derived factor VIII concentrates: a SIPPET analysis. *J. Thromb. Haemost.*, 16 (2018), pp. 39-43

60. P.S. Maclean, M. Richards, M. Williams, P. Collins, R. Liesner, D.M. Keeling, T. Yee, A.M. Will, D. Young, E.A. Chalmers, Paediatric Working Party of UKHCDO. Treatment related factors and inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia*, 17 (2011), pp. 282-287

61. S.C. Gouw, H.M. van den Berg, S. le Cessie, J.G. van der Bom. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.*, 5 (2007), pp. 1383-1390

62. C.L. Eckhardt, J.G. van der Bom, M. van der Naald, M. Peters, P.W. Kamphuisen, K. Fijnvandraat. Surgery and inhibitor development in hemophilia A: a systematic review. *J. Thromb. Haemost.*, 9 (2011), pp. 1948-1958

63. K.M. Lövgren, H. Søndergaard, S. Skov, B. Wiinberg. Non-genetic risk factors in haemophilia A inhibitor management - the danger theory and the use of animal models. *Haemophilia*, 22 (2016), pp. 657-666

64. Santagostino, E., Mancuso, M. E., Rocino, A., Mancuso, G., Mazzucconi, M. G., Tagliaferri, A., ... Mannucci, P. M. (2005). Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *British Journal of Haematology*, 130(3), 422-427.

65. Santagostino, E. & Mannucci, P.M. (2000) Guidelines on replacement therapy for haemophilia and inherited coagulation disorders in Italy. *Haemophilia*, 6, 1-10.

66. National Hemophilia Foundation (2001) MASAC recommendation concerning prophylaxis (prophylactic administration of clotting factor concentrate to prevent bleeding), no. 117.

67. Chalmers EA, Williams MD, Richards M, et al. Early FVIII exposure and subsequent inhibitor development in children with severe haemophilia A [abstract]., *J Thromb Haemost*, 2005, vol. 3 Abstract OR092
68. Fontes E, Carvalho S, Amorim L. Age at the beginning of factor VIII replacement is not a risk factor for inhibitor development in hemophilia A [abstract]., *Haemophilia*, 2004, vol. 10 suppl 3pg. 14 Abstract 12 OC 14
69. Kreuz W, Auerswald G, Budde U, Lenk H. Inhibitor incidence in previously untreated patients (PUP) with hemophilia A and B - a 10-year follow up of the prospective multicenter study [abstract]., *Blood*, 2004, vol. 104 Abstract no. 3983
70. Kreuz W, Gill JC, Rothschild C, et al. Full-length sucrose-formulated recombinant factor VIII for treatment of previously untreated or minimally treated young children with severe haemophilia A: results of an international clinical investigation., *Thromb Haemost*, 2005, vol. 93 (pg. 457-467)
71. Morado M, Villar A, Jimenez Yuste V, Quintana M, Hernandez NF. Prophylactic treatment effects on inhibitor risk: experience in one centre., *Haemophilia*, 2005, vol. 11 (pg. 79-83)
72. Escuriola-Ettingshausen C, Zyschka A, Saguer IM, et al. The role of age at first exposure and therapy regimen on the development of neutralizing FVIII antibodies in hemophilia A [abstract]., *Blood*, 2004, vol. 104 Abstract no. 3082
73. Frommel D, Allain JP. Genetic predisposition to develop factor VIII antibody in classic hemophilia., *Clin Immunol Immunopathol*, 1977, vol. 8 (pg. 34-38)
74. Shapiro SS. Genetic predisposition to inhibitor formation., *Prog Clin Biol Res*, 1984, vol. 150 (pg. 45-55)
75. Atik T., Işık E., et al. Factor 8 Gene Mutation Spectrum of 270 Patients with Hemophilia A: Identification of 36 Novel Mutations., *Turk J Hematol* 2020;37:145-153
76. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet*. 1993 Nov;5(3):236–41
77. Rossetti LC, Radic CP, Abelleyro MM, Larripa IB, De Brasi CD. Eighteen years of molecular genotyping the hemophilia inversion hotspot: from southern blot to inverse shifting-PCR. *Int J Mol Sci*. 2011;12(10):7271–85
78. Rossiter JP, Young M, Kimberland ML, Hutter P, Ketterling RP, Gitschier J, et al. Factor VIII gene inversions causing severe hemophilia A originate almost exclusively in male germ cells. *Hum Mol Genet*. 1994 Jul;3(7):1035–9

79. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002 Jan;99(1):168–74
80. Coppola A, Margaglione M, Santagostino E, Rocino A, Grandone E, Mannucci PM, et al. Factor VIII gene (F8) mutations as predictors of outcome in immune tolerance induction of hemophilia A patients with high-responding inhibitors. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2009 Nov;7(11):1809–15
81. Pezeshkpoor B, Pavlova A, Oldenburg J, El-Maarri O. F8 genetic analysis strategies when standard approaches fail. *Hamostaseologie*. 2014;34(2):167–73
82. Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: diagnosis and treatment. *Blood*. 2015 Mar;125(13):2052–61
83. Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, D’Andrea G, Santacroce R, Sanna S, et al. Deep intronic variations may cause mild hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2011 Aug;9(8):1541–8
84. Pezeshkpoor B, Zimmer N, Marquardt N, Nanda I, Haaf T, Budde U, et al. Deep intronic “mutations” cause hemophilia A: application of next generation sequencing in patients without detectable mutation in F8 cDNA. *J Thromb Haemost*. 2013 Sep;11(9):1679–87
85. Bach JE, Wolf B, Oldenburg J, Müller CR, Rost S. Identification of deep intronic variants in 15 haemophilia A patients by next generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Thromb Haemost*. 2015 Oct;114(4):757–67
86. Değer Fidancı, İ., Zülfikar, B., Kavaklı, K., Ar, M. C., Kılınç, Y., Başlar, Z., & Çağlayan, S. H. (2014). A Polymorphism in the IL-5 Gene is Associated with Inhibitor Development in Severe Hemophilia A Patients. *Turkish Journal of Hematology*, 31(1), 17–24.
87. Ferrante A, Mosher B, Hoffman M. Immune-related gene polymorphisms as risk factors for the development of Factor VIII inhibitors in hemophilia A patients: a sibling-pair association analysis (HUM1P. 257). *J Immunol* 2015(May 1);194(1 Supplement):52–56.
88. Sadek, H., Youssry, I., Ibrahim, N. S. E., Abou-Elalla, A. A., Atef, G., & Mousa, S. M. (2017). The Development of FVIII Inhibitors in Relation to IL10 Gene Polymorphism in Hemophilia A Egyptian Pediatric Patients. *Fetal and Pediatric Pathology*, 36(3), 184–189.

8. EKLER

8.1. Etik kurul onayı



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ağır Hemofili A Hastalarında İmmün Düzenleyici Sitokinleri Kodlayan Gen Polimorfizmlerinin İnhibitör Gelişimi İle İlişkinin Belirlenmesi.				
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	2018-09-07-01				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Tahir ATIK				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Çocuk Genetik Hastalıkları				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Genetik Hastalıkları Bilim Dalı				
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI					
	DESTEKLEYİCİ	Bilimsel Araştırmalar Proje Fonu				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)	Tahir Atik				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☒ FAZ 2 ☐ FAZ 3 ☐ FAZ 4 ☐				
Gözlemsel İlaç Çalışması ☐ Tıbbi Cihaz klinik Araştırması ☐ In Vitro Tıbbi Tarama Cihazları İle Yapılan Performans Değerlendirme Çalışmaları ☐ İlaç Dışı Klinik Araştırma ☒ Diğer ise belirtiniz:						
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☒ ULUSLARARASI ☐					
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	25.07.2018	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	28.09.2018	-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐		
	OLGU RAPOR FORMU		-	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐		
	SİGORTA	☐				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	27.09.2018 Tarihli: 28.09.2018				
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 18-10/11	Tarih: 02.10.2018				
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelendi, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödendiği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Ayşe EROL				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Kabılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayşe EROL Başkan	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Mine HEKİMGİL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Patoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşe EROL		Araştırma Başvurusu Onay Belgesi		Çalışma Kodu	Rev. Tarihi / No.su	Sayfa
				22	30.04.2018/07	1/2



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ağır Hemofili A Hastalarında İmmün Düzenleyici Sitokinleri Kodlayan Gen Polimorfizmlerinin İnhibitor Gelişimi İle İlişkisinin Belirlenmesi.
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 18-10/11					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliliği	Uzmanlık Dalları	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Kabılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER Üye	Mikrobiyoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanı Dr. Ayça Arzu SAYINER	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Şebnem PIRILDAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Murat PEHLİVAN Üye	Biyofizik	E.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Mine DÜNDAR ÇÖMLEKOĞLU Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	
Prof. Dr. Nevin ORUÇ Üye	Gastroenteroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Gastroenteroloji BD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E.Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Sema KALKAN UÇAR Üye	Çocuk Metabolizma Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Aynur UYSAL TORAMAN Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	E.Ü. Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Yard. Doç. Dr. Candide ŞENTÜRK	Ceza ve Ceza Muhakemesi Hukuku	E.Ü. Hukuk Fakültesi Yazar Üniversitesi Hukuk Bölümü Halk Sağlığı AD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.Ü. Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	E.Ü. Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	

- * Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı'nın
Unvanı/Adı/Soyadı:
Prof. Dr. Ayşe EROL

Araştırma Başvurusu Onay Belgesi

Belge Kodu: Rev. Tarihi / No: 22 / 2011

8.2. Benzeşî raporu

AĞIR HEMOFİLİ A HASTALARINDA İMMÜN DÜZENLEYİCİ SİTOKİNLERİ KODLAYAN GEN POLİMORFİZMLERİNİN İNHİBİTÖR GELİŞİMİ İLE İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 17	% 15	% 3	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.thd.org.tr İnternet Kaynağı	% 6
2	thd.org.tr İnternet Kaynağı	% 3
3	Submitted to Adnan Menderes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
4	egehemoder.org İnternet Kaynağı	% 1
5	hemophiliacongressofturkey.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.turkhemoder.org İnternet Kaynağı	<% 1