

HEMOFİLİ

Kaan Kavaklı

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı, İzmir

Bu yazıda hemofili hastalığının toplumda taşıdığı önem vurgulandıktan sonra hastalığın tedavisi hakkındaki en son gelişmeler ve güncel bilgiler aktarılmaktadır.

Hemofili hastalığının tarihsel ve günümüzdeki önemi

Hemofili hastalığı çok uzun yıllardır insanlığın sorunu olan ciddi bir kalıtsal kan hastalığıdır. Hemofili MÖ 10.000 yıllarından beri nesilden nesile iletilerek bugünlere ulaşmıştır. Tüm dünyada ve tüm ırklarda eşit oranda görülebilen bu hastalığın toplumdaki prevalansının yaklaşık 10.000/1 olduğu bildirilmektedir (1-4). Hastaların en az yarısında yeni mutasyonların söz konusu olması önümüzdeki yıllarda gen tedavisi kalıcı başarılar sağlasa bile hemofilinin soruna devam edeceğini göstermektedir. Çünkü günümüzde X-resesif geçişli bu hastalıkta her 10.000 doğumda bir veya başka bir deyişle her 5.000 erkek bebek doğumunda 1 yeni hemofili hastası dünyaya gelmektedir (1-4). Dünya Hemofili Federasyonu (WFH) verilerine göre yaklaşık 500.000 hemofili hastası olduğu tahmin edilmekle birlikte tedavi merkezlerine resmi olarak kayıtlı hasta sayısı ancak 120.000'i aşmaktadır. Yurdumuzda ise Türk Hematoloji Derneği (THD) –Hemofili Alt Komitesinin resmi verilerine bakıldığında 2430 hemofili-A, 606 hemofili-B hastasının tanı aldığı izlenmektedir. Ancak 2004 yılı sonunda Sağlık Bakanlığı tarafından verilen hemofili karnesi sayısına göre bir değerlendirme yapıldığında 1538 hemofili-A ve 309 hemofili-B hastası olduğu görülmektedir (3-4). Aradaki fark sosyal güvencesi olmayan ve henüz hemofili karnesi çıkaramayan hastaları göstermektedir. Ancak 2006 yılı sonu itibarıyla hasta sayısının 2500'ü aştığı gözlenmektedir. Toplam hasta sayısına göre yapılacak değerlendirmeler hemofili hastalığının aslında bir toplum sağlığı problemi yaratacak düzeyde bir hastalık olmadığı gibi hatalı bir izlenime neden olabilir. Ancak nesilden nesile geçen ciddi bir kanama diyatezi olan hemofili hastalığı gelişmekte olan ülkelerde özürü genç nüfusun önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Tedavi açısından yurt dışından ithal edilen pahalı kan ürünlerinin mutlak gerekli

olması tedavi maliyetini oldukça arttırmaktadır. Genç nüfusun kanamalarla hayatlarının tehdit edilmesine ve sakat kalmasına yol açan bu hastalık bir toplum sağlığı sorunu olarak değerlendirilmedikçe üstesinden gelmek olası değildir. Kişiye yani hastaya, ailesine ve topluma ciddi yükler bindiren hemofili hastalığı önemli sağlık sorunlarımızdan biri olarak kabul edilmelidir (3,4).

Hemofilide multidisipliner yaklaşımın önemi

Hemofili hastalarının bizzat kendilerinin “bir hekim kadar kendi hastalıklarını tanımaları” ve “bir hemşire gibi gerektiğinde kendilerine intra-venöz infüzyon yapabilmeleri” bu hastalıkla baş edebilmenin kilit noktasını oluşturmaktadır (3,4). Bu nedenle hemofili hastalarının sıradan bir hastanede uzman olmayan kişiler tarafından takip ve tedavi edilmeleri kesinlikle uygun değildir. Gelişmiş ülkelerde “Hemofili Merkezleri” hemofili hastalarının takip ve tedavisinde olduğu kadar hemofili hastaları ve aileleri yanında konuyla ilgili sağlık personelinin eğitimini sağlamak açısından büyük önem taşımaktadır.

Hemofili hastalarında hematolog yani kan hastalıkları uzmanının rolü çok önemli olmasına karşın multi-disipliner bir yaklaşım gerektiren hemofili bakımında her uzmanlık dalının hayati önemi vardır. Hematoloji yanında Ortopedi ve Fizik Tedavi disiplini hemofili bakımı açısından çekirdek grubu oluşturmaktadır. Son yıllarda ön plana çıkan Radioizotop Sinovektomi tedavisi nedeniyle Nükleer Tıp uzmanları da hemofili ailesine katılmışlardır. Hemofili hemşiresi hemofili hastası ve yakınlarıyla en uzun süre muhatap olan sağlık personeli olması nedeniyle takip ve tedavi yanısıra self-infüzyon eğitimi vermesi açısından da ciddi önem taşımaktadır. Hemofili hastalarının hemofili merkezi fonksiyonu yürüten bölgesel hastanelerde takip ve tedavi olmasında büyük yararlar vardır. Konu hakkında deneyimli hekim ve sağlık personelinin tedaviyi üstlenmesiyle tedavi maliyeti de sakatlık oranı da azalacaktır (5-11).



Hemofili tedavisi olmayan bir hastalık değildir!

Yanlış bilindiği aksine hemofili hastalığı "tedavi edilebilen" bir hastalıktır. Nesilden nesile aktarılan ve hayat boyu süren bir kanama eğilimi olması ve kanamalarla hayatın kaybedilebileceği gerçeği ve gelişebilecek yüksek sakatlık oranlarının bile uygun tedavi yaklaşımlarıyla üstesinden gelinmektedir. Hemofili hastalarına hep söylediğimiz bir cümle vardır: "Faktör uygulaması hemofili hastaları için hayat su-yudur". Gerçekten de kanamaların gerek korunmasında gerek tedavisinde uygun doz ve sürede faktör kullanımı söz konusu olduğunda hemofili hastaları da sağlıklı akranları gibi normal hayat sürebilirler. Ancak bunun için hemofili hastasının ve ailesinin bilinçli olması ve ülkemiz koşullarında "sosyal güvencesinin olması" zorunludur. Hemofili hastalığının genetik bir hastalık olması nedeniyle radikal tedavisinin gelecekte başarıya ulaşması beklenen "gen tedavisi" olacağı kuşkusuzdur. Ancak X kromozomundaki mutasyon nedeniyle defektif veya yetersiz FVIII proteinine sahip bu hastalarda gerektiğinde bu açığın dışardan verilecek faktör konsantreleri ile kapatılması zor değildir. Son yıllarda inhibitör tedavisinde ulaşılan aşamalar sayesinde de inhibitörlü hastaların kendilerine uygun spesifik faktör konsantreleri (rFVIIa ve APCC) kullanmalarıyla sorunlarının üstesinden gelmeleri mümkün olabilmektedir (1-11).

Radyoizotop sinovektomi'nin hemofili tedavisindeki yeri

Hemofili hastalığında erken çocukluk yaşlarında başlayan ve yineleyen eklem içi kanamalar ileri yaşlarda ciddi eklem sakatlıklarıyla karşımıza çıkmaktadır. Özellikle faktör düzeyi <2 olan ağır hemofili A ve B hastalarının en önemli kronik sorunu "kronik hemofilik artropati" şeklinde adlandırılan kalıcı eklem patolojisidir (1-4). Hemofili hastalarındaki eklem patolojilerinin tam olarak önlenmesinin tek yolu uzun süreli primer profilaksi uygulamasıdır. Episodik olarak yani kanama olduktan sonra yapılan faktör uygulamalarının eklem patolojisinin gelişmesini yeterince önleyemediği açıkça gösterilmiştir (1-4). Yurdumuzda hemofili hastalarının sosyal güvence sorunu ve güvencesi olanların da çoğunu kapsayan kısıtlı olarak faktör konsantresi uygulaması nedeniyle hemofilili hasta çocuklarımızda daha erken yaşlarda bile hemofilik artropati gelişmektedir. Primer profilaksi Türkiye'de son 10 yıldır oldukça kısıtlı olarak uygulanmaktadır ama söz konusu uygulamayla az sayıda hastada da olsa Batı ülkeleri düzeyinde sekelsiz bir eklem koruması elde edilebilmiştir. Yineleyen eklem kanamalarının erken dönemde ve yeterince faktör konsantresiyle tedavi edilmesi büyük önem taşımaktadır. Türkiye'de kullanımın güvenceli hastalarda bile kısıtlı olması nedeniyle yineleyen kanamalar sonrası "kronik sinovitis" olayı gelişmesi sıklıkla rastlanmaktadır. Sinovit olayı progresif artropati açısından kritik noktadır. Çünkü sinovyal dokudan salgılanan bir çok mediatör kıkırdak ve eklem harabiyetini hızlandırmaktadır (1-4). Bu aşamadan sonra si-

novit tedavi edilemediği takdirde çok genç yaşta bile kalıcı eklem sakatlığı kaçınılmaz olacaktır. Sinovit tedavisinde tıbbi tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır. Benzer kronik sinovit tablosuyla kalıcı sakatlık oluşturan Romatoid Artrit hastalarında 50 yıldır uygulanan "radyoaktif sinovektomi" tedavisinden elde edilen deneyimlerin hemofili sahasındaki uygulamaları ile elde edilen sonuçlarla 2000 yılından itibaren çok güncel bir tedavi şekli olarak tanıtılmaya başlamıştır(11). Artık bilimsel dergilerde çocukluk yaşlara kadar inerek kronik sinovitisli hemofili hastalarında eklem içi radyoizotop madde uygulaması ile çok başarılı uzun dönem takipli çalışmalar bildirilmektedir: Çocuğun yaşı kaç olursa olsun kronik sinovit mevcutsa rahatlıkla uygulanabilmektedir.

Radyoizotop Sinovektomi, Radyoaktif Sinovektomi, Radyonüklid Sinovektomi ve Radyoizotop Sinovortezis terimleri birbirleri yerine kullanılmaktadır. İşlemin temel mantığı eklem içi "sinovyal aralığa "radyoaktif izotop" enjekte ederek sık kanamalara neden olan frajil ve hipertrofik durumdaki sinovyal dokunun belli bir süreçte fibrozise uğratılmasıdır. Eklem patolojisine götüren kıkırdak yıkımına yol açan çeşitli enzimlerin salgılandığı kaynak sinovyal doku ve sıvısı olduğundan söz konusu bölgenin fibrozise uğratılması tedavide primer etkili olmaktadır (11). Önceki yıllarda romatoid artrit-ten elde edilen deneyimler hemofili hastalarında kullanılırken sadece erişkin hastalarda uygulama alanı bulabilmişti. Halbuki zaten artropatisi ileri düzeye erişmiş erişkin hastalarda radyoizotop uygulamasının yeterince etkin olması olası değildi. Son 10 yılda elde edilen deneyimler, etkinlik ve güvenilirlik çalışmaları ile 10 yaşın altındaki çocuklarda çok daha etkin ve güvenilir bir tedavi şekli olduğu kanıtlanmıştır. Böylece ilk kez 30 yıl önce hemofili hastalarına uygulamaya başlanan bu benzersiz yöntem artık dünya çapında bir önem kazanmıştır. Radyoaktif ajan olarak Batı Avrupa ülkelerinde İtrium 90 ve Rhenium 186 kullanılmaktadır. Kullanılan izotop maddelerin oldukça güvenilir ve emniyetli oldukları gösterilmiştir (11). Yurdumuzda ise çok sayıda merkezde başarılı uygulamalar yapılmaktadır (11). Bu merkezler uygulama sayısı açısından sıralandığında Ege Üniversitesi ön sıradadır. Söz konusu merkezde 2007 yılı itibarıyla tam 206 eklem radioizotop sinovektomi işlemi yapılmıştır.

Inhibitör sorunu ve hemofili bakımındaki önemi:

Güncel viral inaktivasyon metodlarının plazma kaynaklı faktör konsantrelerinde yaygın olarak uygulanması ve son yıllarda uygulamaya giren rekombinant faktör konsantreleri sayesinde Hemofili tedavisinin "en sık" rastlanan ve "en ciddi" komplikasyonu inhibitör gelişimi olarak değerlendirilmektedir. Tedavi amacıyla uygulanan faktör konsantresini inaktive eden blokan antikorlar nedeniyle kanamanın durdurulması zorlaşmakta hatta imkansızlaşmaktadır. Bu durumda hastaları hayata bağlayan faktör konsantreleri etkisiz kaldığından özel inhibitör ilaçları kullanmak gerek-

mektedir. İnhibitörlü olgularda sanıldığı gibi aksine kanama sıklığı artmamaktadır. Ağır bir hemofili hastasında ortalama 2 ayda bir ciddi ve tedavi gerektiren hemartroz olmaktadır. İnhibitör gelişen hemofili hastalarında da benzer sıklıkta hemartroz gelişmektedir. İnhibitör gelişen hastalardaki temel sorun hemostazın sağlanmasında önemli zorluklar yaşanmasıdır. Bu zorluklar hem hastada sakatlık gelişme riskini arttırmakta, hastanın hayat kalitesini düşürmekte hem de tedavi maliyetini inanılmaz düzeyde arttırmaktadır (13). Türkiye marketinde inhibitör tedavisinde kullanılan 2 ürün de mevcuttur (NovoSeven ve FEIBA).

Rekombinant ve plazma kaynaklı faktör konsantreleri

Yurdumuzda faktör konsantrelerinin piyasaya çıkması ve hemofili hastalarında kullanılabilmesi 1980'li yılların başındaki serbest piyasa ekonomisi ve ilaç ithalatının kolaylaştırıldığı dönemde başlamıştır. 15 yıllık bir geçmişi olması nedeniyle bu imkandan faydalanamayan yaşı 15 den büyük olan Türk hemofili hastalarının hemen hemen büyük bir çoğunluğunda farklı oranlarda eklem sakatlığı mevcuttur. Yurdumuzdaki hemofili hastalarının günümüzde % 90'ının sosyal güvencesi vardır ve gerektiğinde hastane şartlarında faktör alabilme şanslarına kavuşmuşlardır. Ancak söz konusu yüz güldürücü tabloya ancak son 3-5 yılda ulaşabildiğimiz unutulmamalıdır. Son yıllarda hematolog sayısının hızla artarak yurdun dört bir yanındaki Anadolu Üniversitelerinde hizmet vermeleri ile hemofili hastalarımızın kaderi olarak bildikleri sakatlık tablosu değişmeye başlamıştır. Bununla birlikte ülkemizde farklı tipte sosyal güvence kurumlarına sahip olan hemofili hastalarının aynı kalitede hizmet aldıkları söz edilemez. Bundan 10 yıl önce, ülkemizdeki hemofili hastalarının önceliği acil ve ciddi kanamalarda tedavi amacıyla kullanmaları gereken faktöre ulaşabilmektir. Artık günümüzde önemli bir çoğunluk bu imkana kavuşmuş olup küçümsemeyecek sayıda çocuk ve genç hemofili hastası da "profilaksi" imkanından faydalanabilmektedir. Bunca yıldır hastalarımızda kullandığımız plazma kaynaklı faktör konsantrelerinden çok faydalandığımızı, hastalarımızın ciddi ve sakat bırakıcı birçok kanamasının tedavi edildiğini, eski yıllarda akla bile gelmeyecek düzeyde operasyonun bu hastalarda yapılabildiğini üstelikte viral bulaş açısından oldukça emniyetli olduğunu söyleyebiliriz. Ege Hemofili Merkezinin deneyimlerine göz attığımızda son 10 yılda plazma kaynaklı ithal faktör kullanılan 100'den fazla hemofili hastasının hiçbirine -Parvovirus hariç tutulursa- virus bulaşmadığı dikkat çekicidir. Buna karşın aynı merkezde daha önceki yıllarda tedavilerinde TDP kullanan hastaların yaklaşık 1/3'ünde kronik hepatit-C saptanması hala bu yetersiz ve sakıncalı tedavi şeklini uygulayan hekimlere bir ders olması açısından önem taşımaktadır. (12). Aynı merkezin plazma kaynaklı ürün kullanımı ile inhibitör gelişme prevalansının % 16, insidansının % 4 olduğu hatırlandığında söz konusu faktör konsantreleri-

Tablo 1. Rekombinant faktör VIII ve faktör IX konsantrelerinin özellikleri (14-16)*

<p>1. nesil rekombinant FVIII konsantreleri: RECOMBIMATE (Baxter-ABD) Hem üretim aşamasında hem son üründe stabilizör olarak bovin albumin kullanılır. Viral inaktivasyon metodu olarak sadece kromatografi kullanılır.</p>
<p>2. nesil rekombinant FVIII konsantreleri: KOGENATE-FS (Bayer-ABD) ve HELIXATE-FS (Behring – Almanya) Üretim aşamasında kullanılan albumin son üründe yoktur. Stabilizör fruktoz'dur. Viral inaktivasyon metodu olarak solvent-deterjan + ultrafiltrasyon kullanılır. REFACTO (Wyett- ABD) B-domain bölümü iptal edilmiş FVIII yapısında üretilmektedir. Stabilizör olarak sukroz kullanılır. Viral inaktivasyon metodu olarak solvent-deterjan + nanofiltrasyon kullanılır.</p>
<p>3. nesil rekombinant FVIII konsantreleri: ADVATE (Baxter- ABD) Ne üretimde ne de son üründe albumin kullanılmamaktadır. Stabilizör olarak Trehaloz kullanılır. Viral inaktivasyon metodu olarak solvent-deterjan + kromatografi kullanılır.</p>
<p><u>Rekombinant FIX konsantrisi:</u> BENEFIX (Wyett- ABD) Ne üretimde ne de son üründe albumin kullanılmamaktadır. Viral inaktivasyon olarak Solvent-deterjan işlemi yoktur ultrafiltrasyon mevcuttur.</p>
<p><u>Rekombinant FVIIa konsantrisi:</u> NOVO SEVEN (Novo Nordisk- Danimarka) İnhibitör tedavisinde kullanılan bu ürün 2001 yılından beri Türkiye'de ruhsatlıdır. Stabilizör olarak mannitol kullanılmakta olup herhangi bir plazma ürünü içermez. Saflaştırma işlemi olarak kromatografi uygulanmaktadır.</p>

rinin etkin olması yanısıra güvenilir de oldukları izlenmektedir (13). Ancak günümüzde Batı ülkelerinde rekombinant faktör konsantreleri uygulanması oranı %90'ı aşmış durumdadır. Rekombinant ürünler ile sağlanan deneyim 10 yılı aşmış ve pazar paylarında üst dilimlere ulaşmıştır. Batı ülkeleri 1980'li yılların başında yaşadıkları AIDS faciasını ve 2000'li yıllarının hemen öncesindeki Delidana hastalığı korkusu nedeniyle plazma kaynaklı faktörlerden rekombinant faktörlere hızlı bir geçiş yapmaktadırlar. Bu geçiş döneminde rekombinant faktörler açısından tek olumsuz nokta inhibitör gelişme sıklığının artmış olmasıdır (14-16). Tablo 1'de dünya ilaç piyasasında en az 10 yıldır başarıyla kullanılan rekombinant FVIII ve FIX konsantreleri hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir. Son yıllarda Kore'de Green Cross'un yeni bir FVIII konstantresi, Japonya'da ise bir japon firması rekombinant FVIIa+FX kombinasyonu üretmek için çalışmalar yapmaktadır (17). Türkiye'de ise Rekombinant faktörlere (Rekombinate ve Kogenate-FS) 2006 yılında Sağlık Bakanlığı ruhsat ve-



Tablo 2. Hemofili-A hastalarında uygulanan gen tedavilerinin sonuçları**TRANKARYOTİK TEDAVİ ÇALIŞMASI** (ABD'deki ilk gen tedavisi çalışması)

Uygulayan merkez: Transkaryotic therapy-Cambridge / Harvard (ABD)
Sorumlu Araştırmacı: Dr. David Roth
Uygulamanın başlangıç tarihi: 1998
Kullanılan vektör: "Non-viral" plazmid vektör
Vektör yerleştirme metodu: Hastanın derisinden alınan otolog fibroblastlara ex-vivo kültür ortamında ve elektroforez yardımıyla sağlıklı FVIII geninin aktarılması
Uygulanan hasta grubu: Ağır tipte erişkin hemofili-A hastaları
Hastaya gen ürününün uygulanması: Laparoskopi ile omentuma
Transgenik ekspresyon (oluşan FVIII aktivitesi): %4 düzeyine kadar ancak geçici (10 ay)
Yan Etkiler (Güvenlilik): Önemli yan etki olmadı. İnhibitör gelişmedi.
Çalışmanın sonuç raporu: 12 hastanın katıldığı Faz-I çalışma tamamlandı ancak Faz-II aşamasına geçilemeden çalışma kapatıldı (25)

CHIRON ÇALIŞMASI

Uygulayan merkezler: Pittsburgh, Chapel Hill, Boston, Detroit, California, Seattle
Sorumlu Araştırmacılar: J. Lusher, G. White, B. Ewenstein
Başlangıç tarihi: 1999
Kullanılan vektör: İn vivo Retroviral vektör
Vektör yerleştirme: Tüm hücre tiplerine yönelik
Hasta grubu: Ağır tip erişkin hemofili –A hastaları (HCV negatif olanlar)
Gen ürününün uygulanması: IV infüzyonla
Transgenik ekspresyon: Ancak ölçülebilecek limitlere yakın FVIII aktivitesi saptandı. Hasta mononükleer kan hücrelerinde FVIII ekspresyonu 6 ay sürdü.
Yan etkiler: 1 hastanın semen analizinde endojen vektör geçişi saptandı (26).
Sonuç raporu: 12 hastada uygulanan çalışma sonlandırıldı. Devamı planlanmıyor.

GENSTAR ÇALIŞMASI

Kullanılan vektör: Adenovirus (gutless)(Daha az toksik olması amacıyla dilimlenmiş tipte viral vektör kullanılmıştır)
Hasta grubu: Ağır tip erişkin hemofili-A hastaları (kanlarında düşük düzeyde anti-adenovirus antikor olanlar seçildi)
Gen ürününün uygulanması: Periferik IV infüzyon
Transgenik ekspresyon: Hastada %3 civarında "geçici" FVIII aktivitesi ölçüldü.
Yan Etkiler: Katılan tek hastada karaciğer fonksiyon testlerinde anormal yükselmeler izlendi (Adenovirus hepatiti ?)
Sonuç Raporu: Yan etkiler ciddi bulunarak çalışma kapatıldı. 1 hastada kullanılabilirdi.

rilmesine rağmen 2007 yılında BUT sorunları nedeniyle Türk hemofili hastalarında kullanılamamaktadır.

Hemofilide gen tedavisi

Hemofili "tek gen hastalığı" olması açısından genetik tedavi yaklaşımı için ideal hastalıklardan biri olarak görünmektedir. Üstelik hemofili hastalarının klinik bulgularında anlamlı bir düzeltme yaratmak için söz konusu gen tedavisi ile kusurlu faktör düzeylerinde % 100 fonksiyonel düzeltme yapılması da gerekmemektedir. Klinikte kullanılan profilaksi programlarından çok iyi gözlemlendiğimiz gibi faktör düzeylerinin

Tablo 3. Hemofili-B hastalarında gen tedavisi çalışmaları ve sonuçları (27-29)**ÇİN ÇALIŞMASI** (Literatürdeki ilk gen tedavisi çalışması)

Uygulayan merkez: Fudan Üniversitesi (Beijing- Çin)
Kullanılan vektör: Retrovirus
Hasta grubu: Orta düzeyde (F-IX=%2) hemofili-B tanılı 2 kardeş hasta
Vektörün yerleştirilmesi: Ex-vivo olarak modifiye edilmiş otolog fibroblastlar
Gen Ürününün uygulanması: Enjeksiyonlarla
Transgenik ekspresyon: 16 aydan kısa süren ve %4'e kadar ulaşabilen F-IX artımı
Yan etkiler: Rapor edilmedi
Sonuç: Çalışma kapatıldı ve başka hasta alınmadı.

AVİGEN ÇALIŞMASI

Uygulayan merkez: Philadelphia Children's Hospital (Dr. Katherine High)
Kullanılan vektör: Adenovirus associated virus (AAV virus)(CMV promotörü ile)
Hasta grubu: Erişkin ağır hemofili-B hastaları (n=8)
Gen Ürününün uygulanması: Çok sayıda (100'den fazla) iskelet kası içine enjeksiyonlarla
Transgenik ekspresyon: Geçici olarak % 1-6 düzeyde F-IX üretimi sağlanabildi.
Yan Etkiler: Yok, inhibitör saptanmadı.
Sonuç: Çalışma kapatıldı ve başka hasta alınmadı. Köpek modellerinin aksine iskelet kası enjeksiyonlarıyla vektörün yeterince aktarılamadığı düşünüldü.

YENİ AVİGEN ÇALIŞMASI

Uygulayan merkez: Philadelphia Children Hospital (Dr. Katherine High)
Kullanılan vektör: Adenovirus associated virus (AAV virus)(Karaciğere spesifik promotörü ile)
Hasta grubu: Erişkin ağır tip hemofili-B hastaları (n=7)
Gen Ürününün uygulanması: Hepatik artere yönelik olarak kullanılan bolus infüzyon
Transgenik ekspresyon: Geçici olarak 6 olgunun 2'sinde % 1-10 düzeyde F-IX üretimi
Yan Etkiler: Gen naklinden 3 ay içinde tüm hastalarda semen analizinde vektör sekansları izole edildi. 1 hastada 4 hafta süren karaciğer fonksiyon testleri yüksekliği izlendi.
Sonuç: Çalışma kapatıldı ve başka hasta alınmadı. Köpekte çok başarılı olmasına karşın insanda AAV virusuna karşı aşırı immün reaksiyon gözlemlendiği düşünüldü.

>%5 seviyelerine ulaşması bile hayat kalitesini önemli ölçüde artırmaktadır (18-24).

Gerçekten de 1998 yılından itibaren ABD'de 4 ayrı gen tedavisi faz-1 aşamasıyla devreye girmişti. Yaklaşık 2-4 yıllık bir zaman diliminde farklı yaklaşımların ve farklı viral vektörlerin kullanıldığı bu çalışmalarda maalesef kalıcı ve tatmin edici düzeyde başarı elde edilemedi. Faktör aktivitelerinin ekspresyonunun uzun süre tatmin edici düzeyde kalmaması yeterince immunojenik açıdan tolere edilebilecek düzeyde FVIII üretimi yapılamadığını düşündürmektedir. Bu çalışmalarda 60 civarında Amerikalı erişkin hemofili hastasına farklı gen tedavisi protokolleri uygulanmıştır. Tablo-2'de hemofili-A, tablo-3'de hemofili-B hastalarında bugüne kadar uygulanan gen tedavisi sonuçları özetlenmiştir (18-24).

Yukarıda söz edilen ardısıra denemeler sonrası somut bir sonucun çıkmaması 2 nedene bağlanabilir. Bunlardan birincisi gen tedavisiyle elde edilen FVIII aktivitesinin kalıcı olamaması diğeri ise uygulanan gen tedavisi sonrası gelişen bazı yan etkilerdir.

Hemofilide henüz Faz-I çalışmaları sürdürülürken bir metabolizma hastalığı (ornitin transkarbamilaz) nedeniyle yapılan ve adenovirusların vektör olarak kullanıldığı bir gen tedavisi denemesi sırasında Jesse Gelsinger adındaki 18 yaşındaki bir hastada rastlanan ortaya çıkan ölüm öncelikle FDA tarafından gen tedavilerinin durdurulmasına ve hem bilimsel düzeyde hem de kamuoyunda ciddi tartışmaları beraberinde getirmiştir. Bu ölüm olayının önemi bugüne kadar doğrudan gen tedavisiyle ilişkilendirilen ilk ölüm olgusu olması nedeniyledir (30). Aslında bu yıla kadar yaklaşık 300 ayrı gen tedavisi çalışmasında 5000 civarında hasta yer almıştır. Bu kadar çalışma sırasında çok sayıda ölüm olmuştur. Ancak bunlar genellikle primer hastalıkla ilişkilendirildiği için bu kadar sorun yaratmamıştır. Söz konusu ölüm olayı viral vektör olarak kullanılan adenovirusa karşı gelişen hiperakut tipte bir immun reaksiyon olarak yorumlanmıştır. Gerçekten de bu hasta gen uygulamasından sonraki birkaç gün içinde kaybedilmiştir. Hiç bir hemofili gen tedavisinde adenovirus kullanılmamasına rağmen yukarıda izah edilen nedenlere bağlı olarak bu ölüm olayı hemofilideki klinik çalışmalarını da olumsuz olarak etkilemiştir.

Ayrıca X-geçişli SCID (ağır kombine immun yetmezlikli) tanısıyla retrovirusların vektör olarak kullanıldığı bir gen tedavisi çalışması uygulanan 2 hastada T hücreli akut lösemisinin gelişmesi uygulanan tedavinin mutajeniteye neden olması kuşkusunu beraberinde getirmiştir (31). Bu çalışmada hastaya infüze edilen otolog CD4 kök hücrelerine yerleştirilen retroviral gen aracılığı ile immun yetmezlik başarıyla düzeltilebilmiştir ancak 2 hastada lösemi gelişmesinin nedeninin hastadaki onkogenlerin gen tedavisiyle aktivasyonu olduğu anlaşılmıştır. Malignite gelişmesi bugüne kadar hiçbir hemofili gen çalışmasında olmamakla beraber potansiyel gen tedavisi çalışmalarına önemli bir darbe vurduğu kuşkusuzdur.

Adenovirusların viral vektör olarak kullanıldığı bir çok gen çalışmasında hepatoksisite bulguları dikkati çekmektedir. Hastalarda gen ürünü uygulamasından bir kaç gün sonra oluşan karaciğer fonksiyon testleri yükselmesi dikkat çekicidir. Olay spontan olarak düzelmekle birlikte söz konusu hastalara daha yüksek dozların uygulanmasını zora sokmaktadır (30). Gen tedavisiyle ortaya çıkan diğer risk ise uygulanan viral vektörün gonadal hücreleri de enfekte etmesi sonucu spermatogenezi olumsuz olarak etkileyerek fetusta bazı genetik değişiklikler oluşturması çekincesidir. Bu güne kadar uygulanan bazı gen tedavilerinde geçici de olsa semende gen ürünü saptanmış olmakla birlikte uzun vadeli

izlem sonuçları henüz ortaya konmamıştır. Tüm bu güvenilirlik kuşkuları Faz-I çalışmalarını tamamlamış gen tedavileri sonrası yüksek dozların kullanılacağı Faz-II gen çalışmalarının devamını engellemiştir. FDA artık yukarıda sayılan erken ve geç olası komplikasyonların göz ardı edilmediği ve tüm yan etkilerin sponsorlar tarafından karşılanacağı projeleri değerlendirmek istemektedir. ABD’de hemofili tedavisinde kullanılan rekombinant FVIII ve FX konsantrelerinin pazar payının %90'lara ulaşması sonrası hemofili hastaları plazma kaynaklı ürünlerden giderek uzaklaşmaya başlamıştır. Bazı otörler rekombinant faktör tedavisinin yoğun kullanımını bir bakıma “gen tedavisinin pratiğe girmesi” şeklinde yorumlamaktadır. Söz konusu araştırmacılar tıbbın temel noktalarından biri olan “önce zarar verme” prensibini hatırlatarak zaten “genetik bazlı ürün” kullanarak normale yakın bir hayat süren Amerikalı hemofilik hastalara henüz etkinliği ve güvenliliği yeterince kanıtlanmamış olan “gen tedavisi” uygulanmasını etik bulmamaktadır (30-31).

High ve ark. (32) önümüzdeki 5 yıl içinde yapılacak fare ve köpeklerde yapılacak prelinik çalışmalarla ve bunların adapte edileceği klinik çalışmalarla en etkili ve en az toksik viral vektörün veya uygulama yolunun bulunabileceği umundadır. Ancak günümüzde klasik anlamdaki gen tedavile arzu edilen sonuçların alınamaması sonrası bazı alternatif gen bazlı yaklaşımları da beraberinde getirmiştir. Bunların bir kısmı hayvan modellerinde yeni viral vektörlerin denemesi, nanopartiküllerin kullanılması veya FVIIa'nın farklı türevlerinin denemesi şeklinde olmaktadır. Bu konulardaki en son yaklaşımlar aşağıda ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Hemofilide gen tedavisi dışındaki yeni genetik bazlı tedavi yaklaşımları

Mutant Prokoagulan FVIII veya FVIIa uygulamaları:

Bu yaklaşıma göre nokta bazlı bazı mutasyonların kontrollu olarak FVIII geninde oluşturulmasıyla elde edilen rekombinant FVIII konsantrelerinin tedavide kullanılması hedeflenmektedir. Bu şekilde kullanılan FVIII'in yarı ömrü daha uzun, plazma klirensi uzamıştır. İnhibitörlü hastaların tedavisinde ise FVIIa mutantlarıyla bazı deneyler yapılmaktadır (33).

Gentamisin tedavisi ve Nonsense mutasyonları ilişkisi:

Gentamisin iyi bilinen ve sık kullanılan aminoglikozid tipi bir antibiyotiktir. Normalde aminoglikozidler ribozomal aktiviteyi arttırmaktadır. Bu etki mekanizmasından yola çıkarak gentamisin uygulaması ile nonsense mutasyonu olan hemofili-A hastalarında FVIII aktivitesinin artırılabilceği öne sürülmüştür. Bu konuda yapılan deneysel çalışmalardan sonra Lillicrap grubu (34) bu konuda hemofili hastaları üzerinde klinik çalışma başlatmışlardır. 2005 yılı ASH kongresinde yapılan sunumda gentamisin hem toksik olduğu hem de yeterince FVIII aktivitesini artırmadığı vurgulanmıştır.



Lipozomal PEG FVIII:

FVIII'in pegile edilmiş yani polietilen glikol (PEG) ile non-kovalent bağlandığı lipozomlar kullanıldığında FVIII'in yarı ömrünün çok uzadığı ve hastalarda haftada bir uygulama ile profilaksi yapılabileceği bildirilmektedir. Bu konudaki Faz-2 çalışmaları halen sürmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde FVIII: C aktivitesi ve vWF bağlama kapasitesinin uzun süre devam etmesi ilgi çekicidir (35).

Rekombinant domuz FVIII:

Yapılan eksperimental çalışmalarda plazma kaynaklı domuz FVIII ile karşılaştırıldığında Rekombinant Domuz FVIII'inin immunojenitesinin çok daha az olduğu gösterilmiştir. Daha nadir inhibitör geliştirme riski kuşkusuz avantaj olacaktır. 2005 yılında insan üzerinde Faz-I araştırmalar tamamlanmış ve Faz-II çalışma planlanmaktadır (36).

İnsan-domuz FVIII geni hibridizasyonu:

Bu yaklaşımda insan ve domuz FVIII genleri işlenerek hibrid bir FVIII molekülü oluşturulmakta bu şekilde daha düşük bir immunojenite yani daha düşük bir inhibitör gelişim profili hedeflenmektedir (33).

Transjenik Domuzların sütünden FIX üretimi:

Bu yöntemin gelecekte FIX üretiminde yoğun olarak kullanılacağı tahmin edilmektedir.

Transjenik hale getirilen laktasyon dönemi domuzlara FIX geni nakledilmekte ve sütlerinde yoğun olarak FIX üretmeleri sağlanmaktadır. Üretim miktarının saatte 1-15 litre'yi bulabileceği düşünüldüğünde 50 kiloluk bir ineğin 100 U F IX / ml verimde 100-300 litre/yıl süt üretebileceği hesaplanmaktadır. Yapılan değerlendirmelere göre gelecekte sadece 100 domuzun sütünden elde edilebilecek FIX tüm ABD'nin profilaksi ihtiyacını karşılayabilecek düzeydedir. Gelecekte enteral veya inhalasyonla FIX uygulama şansı olabileceği düşünülmektedir (37).

Polisilyaliz edilmiş Lipozomal FVIII:

Doğal polisilyaliz asit polimerleri kovalent olarak aktif proteine bağlandıklarında söz konusu proteinlerin plazma klirensinin azalmasına neden olmaktadır. Bu şekilde immunojenitede de azalma olduğu belirtilmektedir. Lipozomal FVIII ile yapılan araştırmalar henüz başlangıç aşamasındadır (38).

Farelerde Kolonik FVIII gen infüzyonları:

Çinde yapılan bu çalışmada (ASH-2005) AAV viral vektörü kullanılarak barsak endotel hücreleri transenfekte edilmektedir. Daha sonra hemofilik farelere kolonik infüzyon (lavman) şeklinde yapılan gen uygulaması modeli ile yüz güldürücü sonuçların alındığı duyurulmuştur. İnsanlarda ne zaman deneneceği belirsizdir (17).

Fare Kemik İliğine FVIII gen infüzyonları:

ABD'den Montgomery ve ark. Farenin kemik iliğine lenti-viral vektörler kullanılarak 'B-domain deleted' FVIII geni uygulanmışlardır. Daha sonra uygulama yapılan farelerin trombositlerinden önemli ölçüde FVIII ekspresyonu sağlandığı rapor edilmektedir (17).

HEMOFİLİDE PREİMLANTASYON GENETİK TANI (PGD) OLANAKLARI

Hemofilide prenatal tanı klasik olarak 12-14. haftalarda yapılan CVS işlemi ile gerçekleştirilmektedir. Ancak bu şekilde %100 güvenli prenatal tanı sağlamak için hastanın mutasyonunun önceden bilinmesi gerekir. PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis) işleminde ise prenatal tanının daha fetus anne karnına düşmeden annedeki yumurtaların (daha babanın spermiyle birleşmeden) ayıklanması suretiyle yapılması özelliği vardır. Hastalığı taşıyan yumurtaların ayıklanmasıyla söz konusu genetik hastalığın fetusta hiç olmaması hedeflenmektedir. Buradaki teknik artık klasiğe girmiş olan tüp bebek (test-tube baby) teknolojisinde kullanılan "in-vitro fertilizasyon" işlemidir. Kısaca özetlemek gerekirse; öncelikle annenin ovulasyonu stimüle edilmektedir. Daha sonra toplanan yumurtalar laparotomi ile aspire edilerek laboratuvar ortamına alınmaktadır. Bu hücrelerde henüz 46 kromozom mevcuttur. Kültür ortamına daha sonra babanın spermleri eklenmektedir. Bu aşamada ovosit polar body'lerinden kromozom incelemesi yapılmaktadır. Daha sonra fertilizasyon için seçilen yumurta ile spermin buluşmasıyla "zigot" oluşturulmaktadır. 48 saatlik büyüme sonrası genetik analiz için bir numune hücre alınarak genetik analiz yapılmaktadır. Böylece sağlıklı birey elde edilebilmek için 2 ayrı analiz yapıldığı (double-check) görülmektedir. Bu test sonrası sağlıklı olduğu kesinleşen zigot artık kültür ortamından anne rahimine transfer edilebilir. Bu aşamada canlı doğum şansını arttırmak isteyen araştırmacılar birden fazla embriyoyu uterusu yerleştirmektedir (17,39).

Hemofilide tüm dünyada bugüne kadar 50 kadar ailenin PGD işleminden faydalandığı sanılmaktadır. Günümüzde kistik fibroz ve talasemi hastalığında çok daha sık oranda PGD yapılmaktadır. ABD'deki özel sigorta şirketleri hemofili ailelerindeki PGD işleminin masrafını karşılamaya başlamıştır. Günümüzde İtalya ve Almanya gibi ülkelerde embryo üzerinde diagnostik test yapmak legal olmadığından bu ülkelerdeki hastalar diğer ülkelere yönelmektedir. Türkiye'de söz konusu işlem kanun dışı değildir. İstanbuldaki bazı özel hastanelerde günümüzde uygulanabilmektedir. Ancak devlet güvencesinde bir işlem olmadığından söz konusu aileler kendi olanaklarıyla sorunlarına çare aramaktadır. Bildiğimiz kadarıyla yurdumuzda herhangi bir hemofili ailesine henüz PGD işlemi uygulanmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Di Michele D, Neufeld EJ. Hemophilia. A new approach to an old disease. *Hematol Oncol Clin Nort Am* 1998; 12:1315-1344.
2. Kessler CM. New perspectives in hemophilia treatment. *Hematology 2005 (ASH- Education Program Book)*, 2005; 429-435.
3. Kavakli K. Hemofili hastaları, yakınları ve Hekimler için: Hemofili Rehberi. Ege Hemofili Derneği Yayınları Meta Basımevi, İzmir, 2001.
4. Kavakli K. Hemofili Hasta Okulu, Ege Hemofili Derneği Yayınları, Meta Basımevi, İzmir, 2003.
5. Kavakli K, Nişli G, Aydinok Y, et al. Prophylactic therapy for hemophilia in a developing country, Turkey. *Pediatr Hematol Oncol* 1997; 14:151-159.
6. Kavakli K, Gringeri A, Bader R, et al. Inhibitor development and substitution therapy in a developing country: Turkey. *Haemophilia* 1998;4:104-108.
7. Kavakli K, Polat A, Huseyinof A, et al. Plasma PAF levels and Desmopressin response in children with hemophilia A and von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 1999; 81: 665-666.
8. Kavakli K and Aledort L. Circumcision and Haemophilia: a perspective. *Haemophilia* 1998; 4:1-3.
9. Kavakli K. Fibrin Glue and clinical impact on hemophilia care. *Haemophilia* 1999; 5: 392-396.
10. Kavakli K, Kurugol Z, Goksen D, Nişli G. Should hemophiliac patients be circumcised ? *Pediatr Hematol Oncol* 2000; 17:149-153.
11. Kavakli K, Aydoğdu S, Omay SB, et al. Long-term evaluation of radioisotope synovectomy with Yttrium 90 for chronic synovitis in Turkish haemophiliacs: Izmir experience. *Haemophilia* 2006; 12:28-35.
12. Kavakli K, Nişli G, Polat A, Aydinok Y. Hepatitis C virus and the treatment of hemophilia in Turkey. *Transfusion* 1998; 38:798-799.
13. Kavakli K, Balkan C, Karapinar DY, Bilenoğlu B. Inhibitor incidence and prevalence rates in Turkish patients with hemophilia A. 10 years of experience in Ege Hemophilia Center, Izmir, Turkey. *Turk J Hematol* 2005; 22 (Suppl):a 161.
14. Lusher JM, Arkin S, Abilgaard CF, Schwartz RS, and the Kogenate PUP study group. Recombinant factor VIII for the treatment of PUP patients with hemophilia A. *N Engl J Med* 1993;328:453-459.
15. Bray GL, Gomperts ED, Courter S, et al. Multi-center study of recombinant factor VIII (Recombinate): Safety, efficacy and inhibitor risk in PUP patients with hemophilia A. *Blood* 1994;83: 2428-2435.
16. Lusher JM, Lee CA, Kessler CA, Bedrossian CL and the Refacto phase 3 study group. The safety and efficacy of B-domain deleted recombinant factor VIII concentrate in PUP patients with hemophilia. *Haemophilia* 2003; 9:38-49.
17. Kasper CA. Newsletter. 2006 (1).
18. Kavakli K. Gene therapy for hemophilia: From today to future. *Turk J Haematol* 2000; 17 (Suppl):251-255.
19. Nathwani AC, Mc Intosh J, Davidoff AM. An update o gene transfer for hemophilia. *Curr Hematol Rep* 2005;4:287-293.
20. Nathwani AC, Davidoff AM, Linch AC. A review of gene therapy for hematological disorders. *Br J Haematol* 2005; 128:3-17.
21. Hough C, Lillicrap D. Gene therapy for hemophilia: an imperative to succee. *J Thromb Haemost* 2005; 3:1195-2005.
22. High KA. Gene transfer a an approach to treating hemophilia. *Semin Thromb Hemost* 2003; 29: 107-119.
23. Chuah MKL, Collen D, VandendriesecheT. Preclinical and Clinical gene therapy for hemophilia. *Haemophilia* 2004; 10 (Suppl 4):119-124
24. White GC II. Gene therapy in hemophilia: clinical trials update. *Thromb Haemost* 2001; 86:172-177.
25. Roth DA, Tawa NE Jr, O'Brien JM, et al. Nonviral transfer of gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2001; 344:1735-1742.
26. Zhang WW, Josephs SF, Zhou J, et al. Development and application of a minimal-adenoviral vector system for gene therapy of hemophilia A. *Thromb Haemost* 1999; 82:562-571.
27. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in hemophilia B patients treated with an AAV-vector. *Nat Genet* 2000; 24:257-261.
28. Manno CS, Chew AJ, Hutchinson S, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 2003; 101: 2963-2972.
29. High KA, Manno CS, Sabatino DE, et al. Immune response to AAV and to factor IX in a phase I study of AAV-mediated, liver directed gene transfer for hemophilia B. *Mol Ther* 2004; 9:5383-84.
30. Farrugia A, Manno CS, Evatt BL. Emerging and receding risks of therapeutic regimens for hemophilia. *Haemophilia* 2004; 10 (Suppl 4):47-54.
31. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmith M, et al. LMO2-associated clonal T cell porliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302:415-419.
32. High K. Gene transfer for hemophilia: can therapeutic efficacy in large animals be safely translated to patients ? *J Thromb Haemost* 2005; 3:1682-1691.
33. Pipe SW. The promise and chalange of bioengineered recombinant clotting factors. *J Thromb Haemost* 2005;3:1692-1701.
34. James PD, Rauf S, Lillicrap D. Aminoglycosid suppression of non-sense mutations in severe hemophilia. *Blood* 2005; 106:3043-48.
35. Baru M, Carmel-Goren L, Barenholz Y, Dayan I, Ostropolets S et al. Factor VIII efficient and specific non-covalant binding to PE-Gylated liposomes enables prolongation of its circulation time and haemostatic efficacy. *Thromb Haemost* 2005; 93:1061-68.
36. Parker ET , Craddock HN, Barrow RT, Lollar P. Comparative immunogenicity of recombinant B domain-deleted porcine FVIII and Hyate-C in hemophilia A micepresented to human FVIII. et al. *J Thromb Haemost* 2004; 2:605-611.
37. Von Cott KE, Monahan PE, Nichols TC, Valender WH. Haemophilic factors produced by transgenic livestock: abundance that can able alternative therapies worldwide. *Haemophilia* 2004; 10 (Suppl 4):70-76.
38. Jains E. Liposomal FVIII concentrates. *Drug Del Sys Sci* 2004;4: 59-65
39. Lavery S. Preimplantation genetic diagnosis: new reproductive options for carriers of hemophilia. *Haemophilia* 2004; 1 (Supll 4):126-132.

