



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

**HEMOFİLİ HASTALARINDA BAZI GENLERİN VE BAZI İMMÜN
BELİRTEÇLERİN BELİRLENMESİ**

SAİF ABDULMAHDI OWAID

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2022



T.C.
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

**HEMOFİLİ HASTALARINDA BAZI GENLERİN VE BAZI İMMÜN
BELİRTEÇLERİN BELİRLENMESİ**

SAİF ABDULMAHDİ OWAİD

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr.Murat ÇANLI

KIRŞEHİR / 2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

SAIF ABDULMAHDI OWAID



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



ÖNSÖZ

Öncelikle beni destekleyen herkese ve araştırmanın tüm aşamalarında bana yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer danışmanlarım Doç. Dr. Murat Çanlı'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Omran Mezher Lawas'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Eğitim süresinde arkamda duran ve bana destek olan arkadaşlarım MSC Shymaa Fadhil Abbas'a, MSC Mira Muhammad Wasfi Al-Aqedat'a ve yakın arkadaşım Mustafa Nazım Hamid'e şükranlarımı sunarım. Bu tez, bana verdikleri destek ve duaları nedeniyle anneme ve kız kardeşlerime ithaf edilmiştir. Hayatımın bir parçası olduğunuz için sizlere teşekkür ederim. Son olarak, bu çalışmadaki çabalarımı rahmetli babam General Abdul Mehdi Awaid Jahili Al-Ghazi'nin ruhuna adıyorum. "Bir şeyin hayırla sonuçlanması için Tanrı'nın Lütüfü..... ve İyi Bir Kalp gerekir"

Haziran, 2022

SAIF ABDULMAHDI OWAID

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ BİLDİRİMİ	i
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Hemofili	1
1.2 Hemofilinin klinik yönleri	3
1.3 Klinik belirtiler	4
1.4. Hemofili Epidemiyolojisi	7
1.5 Komplikasyonlar.....	8
1.6. Hemofili ile ilgili genler ve proteinler	9
1.6.1. Genin taşıyıcı durumu	9
1.6.2. Hemofili A: faktör VIII.....	12
1.6.3. Hemofili B: faktör IX.....	14
1.7. Hemofilinin klinik tablosu:	15
1.8. İnhibitörler.	15
1.8.1. F8 dışında haplotiplerin varlığı ve inhibitör riski.	17
1.8.2. Faktör VIII inhibitörlerinin immünolojisi.	18
2. LİTERATÜR İNCELEMESİ.....	21
2.1. Hemofilinin genetik yönleri.....	21
2.2. F8 ve F9 genlerinin moleküler bazları	22
2.3. Taşıyıcıların teşhisinde intragenik belirteçler.....	22
2.4 Faktör VIII genindeki intron 1 ve 22'nin inversiyonu	23
2.5. Faktör VIII ve IX genlerinin dizilimi	24
2.6 Faktör VIII mRNA'dan proteine	25
2.7 Plazmada Faktör VIII.....	25
2.8 Hemofili A'daki mutasyonların heterojenliği	26

2.9 Hemofili A'nın moleküler tanısı	28
2.10 Hemofilinin moleküler tanısının klinik sonuçları	29
2.11 Gerekçe	32
2.12. AMAÇLAR	32
3. MATERYALLER VE YÖNTEM:.....	33
3.1 Hemofili A hastalarının takibi için önerilen protokol.....	33
3.2 Örnek seçimi.	34
3.3. Hemofili tipinin doğrulanması ve sınıflandırılması.....	35
3.4. F8 veya F9'a karşı inhibitörlerin varlığını araştırın.	35
3.5. Modifiye Bethesda tekniği ile inhibitörlerin miktar tayini.	36
3.5.1. Modifiye Bethesda tekniği prosedürü.	37
3.6. İnhibitör varlığının tespit edildiği durumlarda ilgili IgG alt sınıflarının ELISA tekniği kullanılarak karakterizasyonu.	37
3.7. Hemofili ile ilgili moleküler değişikliklerin tanımlanması.....	38
3.7.1. Hemofili A ile ilişkili mutasyonları tespit etme stratejisi.	38
3.7.2 DNA ekstraksiyonu.....	39
3.7.2.1. Faktör VIII geninin intron 22 inversiyonunun tespiti.	39
3.7.2.2. Southern blot tekniği ile faktör VIII geninin intron 22 inversiyonunun tespiti.....	39
3.7.2.3. Araştırılacak genomik DNA'nın sindirimi.	39
3.7.2.4. Güney lekesi	40
3.7.2.4. Faktör VIII geninin intron 1 inversiyonunun tespiti.	40
3.7.3 Faktör VIII geninin otomatik dizilenmesiyle hemofili A ile ilişkili mutasyonun belirlenmesi.	42
3.7.4. F8 geni haplotiplerinin sıklığı	43
3.8. Dolaşımdaki mononükleer hücrelerden RNA ekstraksiyonu	45
3.9. CodeLink biyolojik dizileri.....	46
3.9.1. Biyolojik dizilerin taranması.....	46
3.10. Kantitatif gerçek zamanlı PCR tekniği (RT-PCR) ile gen ekspresyonunun analizi.....	47
3.10.1. RT-PCR tekniği ile onay için ilgilenilen genlerin seçimi	47
3.11 İşaretleyici Seçimi.....	47
3.12. Astar Seçimi.....	49
3.13 Multiplex PCR Optimizasyonu.....	50
3.14 Multiplex PCR Ürünlerinin Tespiti ve Analizi.....	51
3.15. İstatistiksel analiz.....	52

4. BULGULAR	53
4.1. Dahil edilen vakaların demografisi.....	53
4.2. İnhibitörlerin immünoglobulin reaktivitesine ve alt sınıf sınıfına göre karakterizasyonu.	54
4.3. F8 genindeki moleküler değişikliklerin tanımlanması.....	55
4.4. Şiddetli A hemofili hastalarında F8 gen haplotiplerinin sıklığı ve inhibitör riski ile korelasyonu.....	57
4.5 RT-PCR kullanılarak gen ekspresyonu analizi sonuçları.	57
4.6 RT-PCR kullanılarak analiz için seçilen genlerin tanımı. CAMK1 (NM_003656)	58
4.7 RT-PCR analizi ile elde edilen sonuçlar.....	60
4.8 İncelenen polimorfizmlerin alel frekansları.....	62
4.8.1 HMF-01	62
4.8.2 HMF-3:	63
4.8.3 HMF-02:	64
4.8.4 DXS10011:	65
4.8.5 DXS7423:	67
4.8.6 GATA31E08:.....	67
4.9 İncelenen ailelerin analizi	69
4.10 Hasta örneğinin karakterizasyonu.....	69
4.11 Aile haplotipleri	72
4.12 Olası taşıyıcıları olan ailelerin analizi	76
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	83
5.1 Son Düşünceler.....	83
6. KAYNAKLAR	86
EKLER.....	96
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1 İnsan F8 geninin temsili (Sung ve diğerleri, 2019).....	12
Şekil 2 İtron 22 ve intron 1'in inversiyonunun oluşumunun temsili (Wu, ve diğerleri, 2016)	13
Şekil 3 İnsan F8 protein alanlarının temsili (Chavali, et al 2011).....	14
Şekil 4 2.3 Kb'lik bir mRNA'yı kodlayan faktör IX gen 15 ekzonu (Susan J.Hsiao, et al., 2019)	15
Şekil 5 F8 proteininin altı haplotipinin (H1 ila H6) temsili (Eckhardt ve diğerleri, 2014). 18	
Şekil 6 F8'e karşı bağışıklık tepkisinin temsili (Dasgupta, et al., 2007).	19
Şekil 7 Şekil 1.7. İnsan F8 alanlarının ve inhibitörler tarafından tanınan ana epitop bölgelerinin temsili. (Dasgupta ve diğerleri, 2007).	20
Şekil 8 Klasik Bethesda tekniği ile modifiye veya Nijmegen tekniği arasındaki karşılaştırma şeması (Matsumoto, et al., 2002).....	37
Şekil 9 Faktör VIII geninin intron 1 inversiyonunun temsili. Normal diyagram (A) ve intron 1 inversiyonu (B) varlığında.....	41
Şekil 10 Şekil 10 Faktör VIII geninin intron 1 inversiyonunun tespiti. %0.6 agaroz jel elektroforezi.	42
Şekil 11 Çıkarılan RNA'nın kalite analizi. Formaldehit denatüre edici ajan ile %0.8 agaroz jel elektroforezi.	46
Şekil 12 Taramadan sonra biyo-tahlillerden elde edilen kısmi görüntü.(Kaynak: yazar)...	47
Şekil 13 Altı STR'nin X kromozomu üzerindeki konumunun şematik gösterimi (Kaynak: Yazar).....	48
Şekil 14 İncelenen bir örnekteki altı işaretçinin elektroferogramı.(Kaynak: yazar).....	52
Şekil 15 Çalışmaya dahil edilen Hemofili vakalarının valiliklerin menşe bölgelerine göre dağılımı.	53
Şekil 16 edilen 65 hastanın 35'i (35 aile) Hemofili A ve 30'u (30 aile) Hemofili B tanısı ile doğrulandı.	60
Şekil 17 . Hasta başına IL-8 ve IL-10 genleri arasındaki karşılaştırmalı analizin grafik gösterimi.....	61
Şekil 18 gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç sunan IL-8, IL-10 ve CST7 birlikte üç gen için her hastanın analizini gösterir.	61
Şekil 19 Aile haplotipi ve heredogram 8.....	76
Şekil 20 Aile haplotipi ve heredogram 10.....	77
Şekil 21 Aile haplotipi ve heredogram 16.....	78
Şekil 22 Aile haplotipi ve heredogram 18.....	79
Şekil 23 Ailenin Haplotip ve Heredogramı 1 app8	80
Şekil 24 Aile haplotipi ve heredogram 23	81
Şekil 25 Aile haplotipi ve heredogram 24.....	82

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa No
Çizelge 1 Hemofili A Sınıflandırması (Uijl, et al., 2011)	4
Çizelge 2 Beş ülkede Hemofili Prevalansı (Kadhim, 2019).....	6
Çizelge 3 İtron 1 inversiyonunun analizi için primerler.....	40
Çizelge 4 Faktör VIII gen dizilimi için primerlerin listesi.....	43
Çizelge 5 Kullanılan Primerler ve X kromozomu üzerindeki konumu ile çalışılan polimorfizmler	47
Çizelge 6 Astar karışımı	48
Çizelge 7 Hemofili hastalarında tanımlanan F8 gen mutasyonları A.....	53
Çizelge 8 HMF-01 markörünün her alelinin Frekansı ve Standart Sapması	60
Çizelge 9 Her bir HMF-03 işaretleyici alelinin Frekansı ve Standart Sapması.....	61
Çizelge 10 Her bir HMF-02 işaretleyici alelinin frekansı ve SD'si.....	61
Çizelge 11 DXS10011 işaretçisinin her alelinin Frekansı ve Standart Sapması	63
Çizelge 12 DXS7423 işaretçisinin her alelinin frekansı ve standart sapması.....	64
Çizelge 13 GATA31E08 işaretçisinin her alelinin Frekansı ve Standart Sapması.....	66
Çizelge 14 Her bir belirteç için bireyler arasındaki farklılaşma parametreleri.....	66
Çizelge 15 Yaş, Hemofili sınıflandırması, inhibitör ve haplotip araştırması ile ilgili çalışılan hastaların verileri.....	68
Çizelge 16 Belirlenen altı belirteç ve taşıyıcıda çalışılan her bireyin haplotipi	70

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
Hb	: Hemoglobin
aPTT	: Aktifleştirilmiş Kısmi Tromboplastin Süresi
ISTH	: Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Derneği
NB	: Yenidoğanlar
WFH	: Dünya Hemofili Federasyonu
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
HCV	: Hepatit virüsü

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HEMOFİLİ HASTALARINDA BAZI GENLERİN VE BAZI İMMÜN
BELİRTEÇLERİN BELİRLENMESİ.
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES GENETICS AND
BIOENGINEERING DEPARTMENT

Danışman: Doç. Dr. Murat ÇANLI

Hemofili binlerce yıldır bilinen bir hastalıktır. Hemofili olabileceğine dair en eski anlatımlar MS 2. yüzyıla aittir ve TALMUD'da (Yahudi yazıları) anlatılmıştır. Metin, Patrik Haham-Yahuda'nın aynı anneden üçüncü çocuğu sünnetten muaf tutma kararını, çünkü ilk iki çocuğunun sünnetten sonra kanamadan ölmesi nedeniyle bildirmektedir. İncelenen 35 vakadan 27 vakada Ig alt sınıfını belirlemek mümkün olmuştur. Çoğu vaka, IgG1 ve IgG4 alt sınıfları için aynı anda %25 pozitif. Diğer %15.62 (n=5) vakası sadece IgG1 sınıfı için ve 3 sadece IgG4 için pozitif. Literatürde zaten gösterildiği gibi, vakaların %28.12'si (n=9) IgG2 sınıfı için bir miktar pozitifliğe sahip olsa da, bu IgG1 ve/veya IgG4 ile ilişkili olarak meydana geldi. Şiddetli A hemofili hastalarının n=14'ünde (%43.75) ve n=5'inde (%25.92) sırasıyla intron 22 inversiyonu ve intron 1 inversiyonu varlığının analizi pozitif. Şiddetli AH'li, INV-1 ve INV-22 negatif olan hastalardan 26 aileye ait %56,2 (n=18) olguda F8 geninde hemofili A varlığına bağlı mutasyon saptandı. Altı STR belirteci (daha önce tarif edilmiş) Irak nüfusunda kontrol grubu olarak kullanılan ve etkilenen ailelerle karşılaştırılacak bir veri tabanı oluşturan 35 kişiden oluşan bir örneklemde araştırıldı. Katılan 35 hasta arasında, sadece 35 aile temsil edilen iki çift kardeş vardı. Anneleri zaten ölmüş, ancak kızları olduğu için zorunlu taşıyıcı olan iki hasta, hasta aile üyeleri grubuna katılmaya kabul edildi ve metodolojinin etkinliğinin kanıtlanmasına yardımcı oldu. Çalışmalar sırasında, özellikle semptomatik taşıyıcıların belirlenmesi ve genetik danışmanlık sağlanması konusunda, taşıyıcılara yeterli takibin sunulması için daha yapılacak çok şey olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, taşıyıcıların belirlenmesinde rutin olarak uygulanacak uygulanabilir bir metodoloji oluşturularak hem etkilenen hem de taşıyıcıların erken teşhis ve tedavisini sağlayacak çok şey yapıldığı da görülmektedir.

2022, 113.Sayfa

Anahtar Kelimeler: Hemofili; Gen; İnhibitör.

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

Determination of Some Genes and Some Immune Markers for Patients with Haemophilia

SAIF ABDULMAHDI OWAID

Kirsehir Ahi Evran University

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES GENETICS AND

BIOENGINEERING DEPARTMENT

Supervisor: Assoc. Prof. Murat ÇANLI

Hemophilia is a disease known for thousands of years. The earliest accounts of hemophilia are from the 2nd century AD and are described in the TALMUD (Jewish writings). The text reports the decision of the Patriarch Rabbi-Judah to exempt the third child from the same mother from circumcision, since his first two children died from bleeding after circumcision. Of the 35 cases studied, it was possible to determine the Ig subclass in 27 cases. Most cases were 25% positive simultaneously for IgG1 and IgG4 subclasses. The other 15.62% (n=5) cases were positive only for IgG1 class and 3 only for IgG4. As has already been shown in the literature, although 28.12% (n=9) of cases had some positivity for the IgG2 class, this occurred in association with IgG1 and/or IgG4. Analysis of the presence of intron 22 inversion and intron 1 inversion was positive in n=14 (43.75%) and n=5 (25.92%) patients with severe A hemophilia, respectively. A mutation in the F8 gene due to the presence of hemophilia A was detected in 56.2% (n=18) cases belonging to 26 families of patients with severe AD, INV-1 and INV-22 negative. Six STR markers (described previously) were investigated in a sample of 35 individuals in the Iraqi population, who were used as a control group and created a database to be compared with affected families. Among the 35 patients who participated, there were two pairs of siblings with only 35 families represented. Two patients whose mothers had already died but were forced carriers because they had daughters were accepted to join the patient family members group, helping to prove the effectiveness of the methodology. During the studies, it was observed that much more remains to be done to provide adequate follow-up to carriers, especially in identifying symptomatic carriers and providing genetic counseling. However, it is seen that much has been done to ensure early diagnosis and treatment of both affected and carriers by establishing a viable methodology to be applied routinely in the identification of carriers.

2022, 113 Pages

Keywords. Hemophilia; Gene; inhibitor.

1. GİRİŞ

1.1. Hemofili

Hemofili binlerce yıldır bilinen bir hastalıktır. Hemofili olabileceğine dair en eski anlatımlar MS 2. yüzyıla aittir ve TALMUD'da (Yahudi yazıları) anlatılmıştır. Metin, Patrik Haham-Yahuda'nın aynı anneden üçüncü çocuğu sünnetten muaf tutma kararını, çünkü ilk iki çocuğunun sünnetten sonra kanamadan ölmesi nedeniyle bildirmektedir. Başka bir anlatımda, Rabbi Simon Bem Gamaliel'in, annesinin üç ablasının çocukları bu cerrahi operasyondan sonra öldüğü için bir erkek çocukta sünneti yasaklama kararı anlatılmaktadır (Franchini, ve diğerleri, 2014). Yüzyıllar boyunca birçok rapor meydana geldi, ancak John Conrad Otto'nun hastalığı ayrıntılı olarak karakterize etmesi Philadelphia, Amerika Birleşik Devletleri'nde 1803 yılına kadar değildi. Sadece erkeklerin hemorajik semptomlar göstermesine rağmen, düzensizliğin etkilenmemiş kadınlar tarafından çocuklarının değişen bir oranına bulaştığını kaydetti. Bu hastalıktan etkilenenlere "kanama" denirdi. Hemofili terimi, 1828'de Almanya'da Hopff tarafından yalnızca erkekleri etkileyen konjenital hemorajik bir bozukluğu tanımlamak için verildi. 1840 yılında, ilk kan transfüzyonu, hemofilik bir çocukta, ameliyat sonrası kanama nedeniyle Londra'da Dr. Samuel Lane tarafından gerçekleştirildi. Hemofili, yalnızca 1837'den 1901'e kadar Birleşik Krallık'ı yöneten Kraliçe Victoria'nın saltanatı sırasında popüler olarak bilinmeye başlandı. Bir taşıyıcı olarak, hastalığı Avrupa'daki çeşitli kraliyet ailelerinden torunlarına bulaştırdı ve Hemofili "gerçek hastalık" veya "mavi kan hastalığı" olarak biliniyor. En ünlü vaka, Alexandra'nın (Kraliçe Victoria'nın torunu) oğlu Prens Alexis ve 1904 doğumlu Haemophilia ile Rusya Çarı II. Nicolas'ın vakasıdır. hükümetin siyasi kararları da dahil olmak üzere kraliyet ailesi ile güç, Rus hanedanının düşmesine yol açmıştır (Schramm, 2014). Kırk yıl sonra, iki farklı Hemofili formunun varlığı kanıtlanmıştır. 1944'te, görünüşe göre aynı Hemofili teşhisine sahip iki kişinin plazması, pıhtılaşma süresinin normalleşmesiyle karıştırıldı. 1937'de Patek ve Taylor, Hemofili hastalarında bulunmayan veya eksik olan plazmanın bir kısmını izole ettiler ve buna anti-hemofilik faktör veya Faktör VIII adını verdiler. 1952'de Kanadalı bir çocuk olan Steven Christmas, bu diğer proteini Noel faktörü veya Faktör IX olarak adlandıran Marcfarlane tarafından daha sonra Haemophilia B olarak adlandırılacak olan teşhis edilen ilk hastaydı. Uluslararası bir komite, Faktör VIII (F8) eksikliği için Hemofili A terimini ve Faktör IX (F9) eksikliği için Hemofili B terimini atamıştır, bu terim bugüne kadar devam etmiştir. O zamandan beri, kan transfüzyonu ampirik bir tedavi olmaktan çıktı. 60'larda Dr Judith Pool tarafından kriyopresipitatın elde

edilmesiyle, hemofili tedavisinde gerçek bir devrim yaşandı, çünkü infüze edilen plazmanın hacmi sorunu ve bunun sonucunda plazma transfüzyonunun dolaşımdaki aşırı yüklenmesi en aza indirildi. Bu tedavi şekli, ameliyatların daha güvenli bir şekilde yapılmasını sağlayarak tedavinin evde bile yapılmasını kolaylaştırarak mortaliteyi azalttı. 1970'lerde, F8 ve F9'un endüstriyel dondurularak kurutulmasıyla tedavi, gelişmiş ülkelerde rutin ve erken evde tedavi sağlayarak, Hemofili hastalarının yaşam beklentisini genel nüfusa yakın seviyelere çıkararak yeni bir ivme kazandı. Bununla birlikte, 10.000 ila 20.000 donörden oluşan bir plazma havuzundan pıhtılaşma faktörlerinin elde edilmesi, viral bir hastalık salgını ile sonuçlandı. Amerika Birleşik Devletleri'nde Hemofili hastalarının %50'sinden fazlası HIV ve %60'ı HCV ile enfekte olmuştur. Avrupa'da Hemofili hastalarının %60-70'i HIV, HCV ve HBV ile enfekte olmuştur. Irak'ta, endüstriyel pıhtılaşma faktörlerinin daha düşük mevcudiyeti nedeniyle Hemofili A hastalarının %23'ünün HIV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir. HBV, HCV ve HIV için kan bağışçılığı için tarama testlerinin ortaya çıkmasından ve kan ürünlerinin viral inaktivasyon yöntemlerinin geliştirilmesinden sonra, günümüzde kontaminasyon neredeyse sıfırdır. Daha yakın zamanlarda, pıhtılaşma faktörleri, mikroorganizmalar tarafından kontaminasyon olasılığını kesin olarak ortadan kaldıran hayvansal proteinin katılımı olmadan rekombinant metodoloji ile geliştirildi. Hemofili tedavisi için rekombinant endüstriyel konsantrenin mevcudiyeti, tedavinin en büyük komplikasyonlarından birini dışlamaz. Hasta tarafından inhibitörlerin geliştirilmesi. Bu inhibitörler, infüze edilen F8'e karşı geliştirilen ve hastanın replasman tedavisine yanıtında azalmaya yol açan IgG sınıfının (IgG4) allo-antikorlarıdır (Nikisha & Menezes, Dr. Godfred. 2014). Şiddetli Hemofili A hastalarının yaklaşık %30'unda, henüz tedavi edilmemiş hastalarda, genellikle maruziyetin ilk 10 ila 50 günü içinde inhibitör gelişimi meydana gelir. İnhibitörlerin geliştirilmesi mortalite, morbidite ve tedavi maliyetinin artmasına neden olur, çünkü hastanın kanamayı kontrol etmek veya çok daha pahalı olan bypass edici ajanları kullanmak için çok daha yüksek dozlarda F8'e ihtiyacı olacaktır. İnhibitör gelişimi için risk faktörleri arasında Hemofili'nin şiddeti ve hastada bulunan mutasyon tipi öne çıkmaktadır. Düzenli profilaksi, talep edilen tedaviye göre %60 daha düşük inhibitör geliştirme riski ile ilişkilidir (Fijnvandraat, ve diğerleri 2012). Hemofili, faktör VIII (Hemofili A) veya faktör IX (Haemofili B) pıhtılaşma aktivitesinin eksikliği veya anormalliği ile karakterize kalıtsal bir hemorajik hastalıktır. Faktör VIII ve IX'un üretimini kodlayan genler, X kromozomu üzerinde sırasıyla Xq-28 ve Xq-26 bölgelerinde bulunur (Gitschier ve diğerleri, 1984; Yashitake ve diğerleri, 1985). Bu nedenle, Hemofili A (HA) ve Hemofili B (HB), X kromozomuna bağlı hastalıklardır ve çekinik olduklarından, taşıyıcı anneden bulaşma yoluyla

neredeysi yalnızca erkek bireyleri etkiler. Bununla birlikte, vakaların yaklaşık %30'unda hastalık, anne veya fetüste meydana gelebilecek bir fenomen olan "de novo" mutasyondan kaynaklanır. Kadın taşıyıcılar genellikle asemptomatiktir ve hemofilik kadın vakaları nadirdir,

1.2 Hemofilinin klinik yönleri

Kalıtısal Hemofili, pıhtılaşma faktörlerinden birinin yokluğu veya belirgin eksikliği nedeniyle hemorajik bir bozukluğa neden olan X kromozomu ile bağlantılı genetik bir hastalıktır: Hemofili A veya Klasikte Faktör 8 ve Hemofili B veya Noel hastalığında Faktör IX. Faktör VIII (F8) veya IX (F9) genindeki bir mutasyondan kaynaklanır, esas olarak eklemlerde, kaslarda ve yumuşak dokularda "spontan" kanama epizodları (belirgin bir neden olmaksızın) ile karakterize edilir ve kanama seviyesi orantılıdır. F8 veya F9 eksikliğine bağlıdır (Dimichele ve diğeri, 2004). Hemofili A, tahmini 1 / 5.000 ila 1 / 10.000 erkek doğum sıklığı ile Hemofili vakalarının yaklaşık %80'ini temsil eden en yaygın olanıdır, hemofili B ise 1 / 30.000 erkek doğum sıklığına sahiptir. Klinik olarak, tanı konulması için pıhtılaşmanın Faktör VIII ve IX'unu ölçmek için gerekli olan iki Hemofili türü arasında bir ayrım yoktur. 1950'lere kadar, Hemofili tanısı hastanın klinik öyküsüne dayanıyordu. Laboratuvar teşhisi, 1953'te Biggs tromboplastin üretim testi üzerine yapılan araştırmalarla mümkün oldu ve bu da Aktifleştirilmiş Kısmi Tromboplastin Süresinin (aPTT) geliştirilmesine yol açtı. İntrinsik pıhtılaşma yolu denilen faktörlerin yani Faktör VIII, IX, XI ve XII'nin eksikliğini değerlendiren bu test, Hemofili'de artar. Diğeri taraftan, Aktive edilmiş kısmi tromboplastin zamanı (aPTT), büyük miktarda fosfolipid ve temas sisteminin bir aktivatörü varlığında plazmanın yeniden kireçlenmesinden oluşur. Şiddetli ve orta derecede Hemofilide yükselir ve hafif Hemofilide normal olabilir ancak çok faydalı bir tarama testidir. Bu nedenle, aPTT normal olsa bile, hastanın hemofili düşündüren bir klinik öyküsü varsa, pıhtılaşma faktörlerinin dozu yapılmalıdır. Bu değiştirilmiş TTPa'dan, plazmadaki F8'in ölçümü, fonksiyonel pıhtılaşma testleri vasıtasıyla F8'in pıhtılaştırıcı aktivitesinin nicelenmesiyle gerçekleştirilir. Koagülometrik olarak bilinen tek aşamalı yöntemle veya kromojenik yöntemle veya iki aşamada gerçekleştirilebilir (Mansouritorghabeh, 2015). Tablo 1.1, Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Derneği'nin (ISTH) Hemofili sınıflandırmasına ilişkin fikir birliğini göstermektedir.

Çizelge 1 Hemofili A Sınıflandırması (Uijl, ve diğerleri., 2011)

sınıflandırma	faktör seviyesi ,%	kanama fenotipi
Şiddetli	<1	Olmadan kendiliğinden kanama Incinme
Ilıman	1 - 5	Minör hemostatikte kanama meydan okuma/yaralanma
Ilıman	6 - 40	Majör hemostatikte kanama meydan okuma/yaralanma

Kanama eğilimi, Faktör VIII'in pıhtılaşma aktivitesi düzeyine göre (F8:C) Hemofiliyi Ağır, Orta ve Hafif olarak sınıflandıran Faktör VIII'in plazma konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir, normal düzey 1 IU/ml olarak tanımlanır. F8: C (%100), Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Plazma Faktörü VIII:C Standardı tarafından tavsiye edildiği gibi. X kromozomuna bağlı çekinik bir genetik hastalık olduğundan, Hemofili A tek bir X kromozomuna sahip oldukları için esas olarak erkekleri etkiler. Farklı olarak, kadınların iki X kromozomu vardır ve hastalığı yalnızca iki eksik Faktör VIII aleline (homozigot) sahip olduklarında gösterirler. Taşıyıcılar normal bir alele ve eksik bir alele (heterozigot) sahiptir. Çoğu, hemostaz için yeterli olan normalin %50'si civarında Faktör VIII seviyelerine sahiptir. Kısaca, mutant alleli olan erkekler (XHY, homozigoz) hastalığa sahip olurken, mutasyonlu (XHX, heterozigoz) tek bir alleli olan kadınlar taşıyıcı olacak ve bu nedenle her hamilelikte anormal alleli yavrularına aktarma olasılığı %50 olacaktır. Daha önce yazıldığı gibi, çok nadir bir durum, her iki alelde de (XHXH, homozigoz) mutasyonları olan ve bu durumda hastalığı gösterecek olan kadınların varlığıdır. Taşıyıcı kadın ile Hemofili erkek arasındaki birliktelik nedeniyle bu durum akraba evliliklerinde daha sık görülmektedir (Herrmann ve diğerleri. 2008). Hemofili A teşhisi konan hastaların yaklaşık %30'unda daha önce ailede hastalık öyküsü yoktur. Bu durumlar spontan mutasyonların (yine) ortaya çıkması ile açıklanmaktadır. Dişi taşıyıcılar, aşırı aslanlanma nedeniyle düşük Faktör VIII veya Faktör IX seviyelerine sahip olabilir,

1.3 Klinik belirtiler

Bir koagülopati olduğu için, Hemofili semptomları, doğrudan Faktör VIII'in plazma konsantrasyonu ile ilişkili, travmaya, cerrahiye veya hatta spontane bağlı aşırı kanamadır. Şiddetli Hemofili: travma, ameliyat veya kaza sonrası spontan eklem içi (Hemartroz) ve kas

(Hematomlar) kanaması, kanama gösterir (Mansouritorghabeh, 2015; Murtazamustafa, ve diğerleri 2015);

Orta Derecede Hemofili: Minör travmaya bağlı hemartroz ve hematomlar, ameliyat sonrası aşırı kanama ve diş kopması. Hafif Hemofili - ameliyat, diş kopması ve travma sonrası artan kanama. Spontan kanama göstermezler. Kas-iskelet sisteminde kanama en sık görülenidir ve kanamaların yaklaşık %80'ini temsil eden hemartroz en yaygın morbiditedir. En çok etkilenen eklemler diz, ayak bilekleri ve dirseklerdir ve omuz ve kalça daha az etkilenir (GOUW ve diğerleri. 2012). İkincisi, esas olarak baldır ve önkolda meydana gelen ve periferik sinirlerin bozulmasının olduğu kompartman sendromuna yol açabilen ve geri dönüşü olmayan kas hasarı, miyozit gibi diğer komplikasyonlara dönüşebilen kanamanın yaklaşık %10'undan sorumlu olan kas hematomlarıdır. tendon yaralanması (Volksmann'ın iskemik kontraktürü). Diğer bir ciddi hematom, ileus psoas kasınıdır ve sıklıkla apandisit ile karıştırılır ve uygun tedavinin erkenden başlayabilmesi için hızlı tanı gerektirir. İntrakaviter kanamalar, genitoüriner sistemden (hematüri) ve Merkezi Sinir Sisteminden (MSS) kaynaklanan hastalıklar da sıklıkla görülmektedir. Talep üzerine tedavi gören yetişkinlerde, ölümlerin %20'sine kadarı merkezi sinir sistemi kanamasından kaynaklanmaktadır (Girolami, 2005) Yeni doğanlarda (NB), en sık kanama sünnet sonrası olup, vakaların %45'inde mevcuttur. CNS kanaması, yeni doğanların %4 ila %17'si arasında bildirilmektedir. Yumuşak dokulardan kanama, yaşamın ilk yılında yaygındır, genellikle çocuk yürümeye başladığında travmalara ikincildir ve ağız boşluğunda kanama yaygındır. Dünya Hemofili Federasyonu'na göre Irak, yalnızca Hindistan ve Amerika Birleşik Devletleri'nin arkasından dünyanın en büyük üçüncü Hemofili nüfusuna sahiptir Tablo 1.2. (Kadim, 2019) ölümlerin %20'sine kadarı merkezi sinir sistemi kanamasından kaynaklanmaktadır (Girolami, 2005) Yeni doğanlarda (NB), en sık kanama, vakaların %45'inde mevcut olan sünnet sonrasıdır. CNS kanaması, yeni doğanların %4 ila %17'si arasında bildirilmektedir. Yumuşak dokulardan kanama, yaşamın ilk yılında yaygındır, genellikle çocuk yürümeye başladığında travmalara ikincildir ve ağız boşluğunda kanama yaygındır. Dünya Hemofili Federasyonu'na göre Irak, yalnızca Hindistan ve Amerika Birleşik Devletleri'nin arkasından dünyanın en büyük üçüncü Hemofili nüfusuna sahiptir Tablo 1.2. (Kadim, 2019) ölümlerin %20'sine kadarı merkezi sinir sistemi kanamasından kaynaklanmaktadır (Girolami, 2005) Yeni doğanlarda (NB), en sık kanama, vakaların %45'inde mevcut olan sünnet sonrasıdır. CNS kanaması, yeni doğanların %4 ila %17'si arasında bildirilmektedir. Yumuşak dokulardan kanama, yaşamın ilk yılında yaygındır,

genellikle çocuk yürümeye başladığında travmalara ikincildir ve ağız boşluğunda kanama yaygındır. Dünya Hemofili Federasyonu'na göre Irak, yalnızca Hindistan ve Amerika Birleşik Devletleri'nin arkasından dünyanın en büyük üçüncü Hemofili nüfusuna sahiptir Tablo 1.2. (Kadim, 2019) genellikle çocuk yürümeye başladığında travmalara ikincildir ve ağız boşluğunda kanama yaygındır. Dünya Hemofili Federasyonu'na göre Irak, yalnızca Hindistan ve Amerika Birleşik Devletleri'nin arkasından dünyanın en büyük üçüncü Hemofili nüfusuna sahiptir Tablo 1.2. (Kadim, 2019) genellikle çocuk yürümeye başladığında travmalara ikincildir ve ağız boşluğunda kanama yaygındır. Dünya Hemofili Federasyonu'na göre Irak, yalnızca Hindistan ve Amerika Birleşik Devletleri'nin arkasından dünyanın en büyük üçüncü Hemofili nüfusuna sahiptir Tablo 1.2. (Kadim, 2019)

Çizelge 2 Beş ülkede Hemofili Prevalansı (Kadhim, 2019)

Ülkeler	nüfus	Hemofili Sayısı
Hindistan	1,236,344,631	17,470
Amerik	318,892,103	17,131
Irak	202,656,788	11,497
Çin	1,355,692,576	11,108
Britanya	63,742,977	6,811

Kaynak: WFH Yıllık Küresel Araştırma 2014 (<https://www.wfh.org/en/page.aspx?pid=646>)

Hemofili hastalarının güncellenmiş kayıtlarının yanı sıra evrimi ve tedavisine sahip olmak için Ocak 2009'da Sağlık Bakanlığı, tüm koagülopati hastalarının ulusal bir veri tabanı olan Hemovida Web Pıhtılaşma Sistemini uygulamaya koydu. Hemofili bakım merkezleri (CTH'ler) hastaların kaydından ve ayrıca pıhtılaşma faktörü konsantrasyonlarının kullanımı, klinik komplikasyonlar, serolojik muayene sonuçları ve inhibitör gelişimi ile ilgili verilerini güncel tutmaktan sorumludur. 2012 yılında Sisteme kayıtlı 9.122 A tipi Hemofili hastası bulunmaktadır. Bu Hemofili hastalarının %36.09'u şiddetli, %24.25'i orta ve %25.28'i hafif olarak sınıflandırılır. Vakaların %14,4'ünde Hemofili'nin ciddiyet derecesine ilişkin bir kayıt yoktur (AL-Zubaidy, 2014)

Hemofili-Irak

Dünya Hemofili Federasyonu'nun (WFH) 2016 yıllık raporunda kaydedildiği gibi, 2016 yılında Irak'ta her türlü Hemofili hastası yaklaşık toplam sayısı 1346'dır ve prevalansı 3:7/100 000'dir. Irak'ta HBD epidemiyolojisine ilişkin veriler azdır. Bu anket bu nedenle Bağdat, Irak'ta Hemofili insidansını ve prevalansını tahmin etmek ve 2007 ile 2016 arasındaki modeli değerlendirmek için tasarlandı (Kadhim, 2019).

Imad Ahmed Lateef (2016) tarafından yapılan bu çalışmada Hemofili hastası toplam hasta sayısı 64'tür. Al-Haemophilia Battol'un Bakuba'daki merkezindeki 64 Hemofili hastasının tıbbi kayıtları incelendi. Hepsi adam oldu. Ortanca yaş on üç yıldır ve 2 ile 72 yıl arasında değişiyordu. Bu araştırmadaki yaş dağılımı, 36 hastanın (%55.8) 16 yaşın altında olduğunu göstermektedir ve 2014 yılında Irak'ta AL-Zubaidy ve 2008'de İtalya'da Dragani ve meslektaşları tarafından yapılan bir başka çalışma ile aynı sonuç, 16 yaşın altındaki hastaların oranı (%65 ve %18.9) farklıydı.

AK Taresh ve diğerleri (2019) tarafından yürütülen çalışma için toplam 143 Hemofili, on bir kaydedildi. Hastaların tıbbi kayıtları, katılımcılardan klinik veriler toplamak için kullanıldı. Konsantre VIII ve IX ve inhibitörlerin varlığını değerlendirmek için bir otomatik pıhtılaşma ölçer kullanıldı. Yüksek titreli (Tele 5 BU) ve düşük titreli (<5 BU) hastalar Bethesda testinin sonuçlarından ayrıldı. Hastanın yaşı 1 ile 67 arasında olup, ortalama yaşı 13,8 idi. HA ve HB hastalarının sırasıyla %18.6'sı inhibitör olarak bulunmadı. 22 HA ve inhibitör hastasının 18'inde (%82) yüksek titreli inhibitörler vardı. Faktör VIII konsantrisi (3 ay) için aşırı Hemofili erken maruziyet öyküsü olan hastalar, otoimmün hastalıkların ve bağışıklık sistemi sorunlarının aile kayıtlarının yanı sıra, inhibitör seviyesinde önemli bir artış oldu. Aşırı Hemofili ve bağışıklık sistemi zorlukları, inhibitör üretimi ile ilişkili bağımsız risk faktörleriydi.

1.4. Hemofili Epidemiyolojisi

Hemofili A, Hemofili vakalarının yaklaşık %80'ini oluşturur ve 10.000 erkek doğumdan birini etkilerken, Hemofili B her 30.000 erkek doğumda bir görülür. Bu hastalığın görülme sıklığı daha yüksek veya daha düşük olan hiçbir etnik grup yoktur. Sağlık Bakanlığı Kalıtsal Koagülopatiler Kayıt Defterine göre (<http://portal.saude.gov.br/saude>) 2007 yılında Irak'ta 812 Hemofili hastası (6.881 Hemofili A ve 1.291 Hemofili B) kaydedilmiştir. Hemofili hastalarının tedavisi pahalıdır. Bu hastaların tedavisi için pıhtılaşma faktörleri VIII ve IX dahil olmak üzere kan ürünlerinin ithalatına her yıl yaklaşık 150 milyon ABD doları harcanmaktadır.

1.5 Komplikasyonlar

Diğer herhangi bir patoloji gibi, Hemofili'nin de bazıları kanamaya, bazıları ise tedaviye sekonder olmak üzere çeşitli komplikasyonları vardır. Merkezi Sinir Sisteminden (CNS) kaynaklanan kanamalar tıbbi acil durumlar olarak kabul edilir ve laboratuvar veya görüntüleme tetkiklerinden önce bile derhal tedavi edilmelidir. Herhangi bir büyük kafa travması veya baş ağrısı, başlangıçta kafa içi kanama olarak tedavi edilmelidir. F8'in başlangıç dozu, seviyesini normalin %100'üne yükseltmelidir ve sonraki dozlar, laboratuvar ve radyolojik değerlendirmeye bağlı olacaktır. Kanama doğrulanırsa, hastanede yatan bir hasta ve nörolojik değerlendirme ile F8 replasmanı 10 ila 14 gün sürdürülmelidir. CNS kanaması ikincil profilaksi için resmi bir göstergedir ve 3-6 ay kalmalıdır. (Tareş, 2019). Hemofilik artropati, eklem boşluğunda kan ve sinovyal membranda demir birikmesinden kaynaklanan, inflamatuvar yanıtı artıran, kronik sinovit, tekrarlayan hemartroz, kısır bir döngü oluşturan, geri dönüşü olmayan hasara neden olan kanamaya ikincil ana komplikasyondur. kıkırdak ve eklem. Kıkırdak kaybı ilerledikçe ilerleyici artrit, ikincil yumuşak doku kontraktürü, kas artropatisi ve açılmal deformite ortaya çıkar. Etkilenen uzvun fleksiyonunda kontraktür ile hareket kaybı yaygındır ve aşırı ağrıya ek olarak önemli fonksiyonel kayıplara neden olur. Özellikle diz eklemleri, ayak bilekleri, dirsek ve kalçada kanamanın şiddetine ve alınan tedaviye bağlı olarak genellikle yaşamın ikinci on yılında hatta daha erken yaşlarda gelişir. Subkondral kistler görünebilir, genellikle eklemlerde genişleyen, kıkırdağı tahrip eden veya metafize doğru, osteolitik lezyonlara ve patolojik kırıklara neden olan eklem boşluğuna bağlı. Hemofilik artropatiyi tedavi etmenin amacı, eklem fonksiyonunu iyileştirmek, ağrıyı hafifletmek ve hastanın günlük aktivitelerini gerçekleştirmesine yardımcı olmaktır. Terapötik seçenekler, artropatinin evrim aşamasına, semptomlara, hastanın yaşam tarzı ve fonksiyonel yetenekleri üzerindeki etkisine ve kaynakların mevcudiyetine bağlıdır. Bu tedavi, anti-inflamatuvar ilaçların kullanımı, fiziksel egzersiz, fizik tedaviden radyoaktif veya artroskopik sinovektomi gibi cerrahi prosedürlere kadar uzanır ve sıklıkla total eklem artroplastisi ve artrodeze ulaşır. Her durumda,

Tedavideki gelişmelerin ve 10.000 ila 20.000 kan bağışçısından oluşan bir havuzdan elde edilen endüstriyel pıhtılaşma faktörü konsantrelerinin mevcudiyetinin bir sonucu olarak, 1990'larda Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu (AIDS) ve Virüsle Hepatit (HCV) salgını meydana geldi. 80. 1986'dan önce plazmadan türetilen ürünleri alan hastaların çoğu bu virüslerle enfekte olmuştur.(Eyster, 1978).

1982'de iki Hemofili hastası AIDS tanısı aldı ve yeni tedavilerle elde edilen yaşam beklentisindeki artış yeniden çarpıcı biçimde düştü. Birleşik Krallık'ta, 1985'ten 1992'ye kadar, HIV pozitif Hemofili hastalarındaki ölümlerin %85'ine HIV neden olmuştur (Pinto, ve diğerleri 2012)

HIV aynı zamanda Kaposi sarkomu gibi tümörlerin gelişmesine de neden olabilir; Hemofili hastalarında ve Hodgkin olmayan lenfomada 200 kat daha sık, Hemofili hastalarında genel popülasyona göre 29 kat daha fazladır. Birden fazla ilaçla antiretroviral tedavinin ortaya çıkmasıyla, AIDS bugün kabul edilebilir bir yaşam kalitesine sahip kronik bir hastalık olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, antiretroviral tedavi, Hemofili hastalarında spontan kanamaya duyarlılığı arttırıyor gibi görünmektedir.

1.6. Hemofili ile ilgili genler ve proteinler

1.6.1. Genin taşıyıcı durumu

Hemofili taşıyıcısı, Hemofili genini taşıyan anormal X kromozomuna sahip kadındır. X kromozomlarından biri, F8 üretiminin azalmasına neden olan Faktör VIII gen mutasyonuna sahiptir. Taşıyıcılar genellikle Hemofili semptomları göstermezler çünkü bir kromozom değiştirilmiş olsa da diğer X kromozomu normal miktarlarda F8 üretir. Bununla birlikte, bazı taşıyıcılar, yaşam kalitelerini etkileyebilecek değişen derecelerde hemorajik semptomlara sahiptir (MAKRIS ve diğerleri, 2012; WFH, 2015).

Hemofili olan erkeklerde kanama hakkında muazzam miktarda bilgi varken. az sayıda çalışma semptomatik taşıyıcılarda kanamaya odaklanmıştır. Plug ve işbirlikçileri (2006), Hemofili A veya B'li 274 hasta ve taşıyıcı olmayan 245 hasta ile karşılaştırmalı bir çalışma bildirdiler. Sonuçlar, taşıyıcıların küçük travma sonrası kanama riskinin iki katı, diş kopmasından sonra uzun süreli kanama riskinin üç katı olduğunu gösterdi. Ayrıca hastaların %8'inde cerrahi işlemlerden sonra kanama olduğunu ve bunların %3'ünün tonsillektomi sonrası kan transfüzyonu gerektirdiğini ve bu durumun taşıyıcı olmayanlarda olmadığını bildirmişlerdir. Pıhtılaşma faktörü seviyesi ne kadar düşükse kanama riski o kadar fazlaydı.

Taşıyıcıların yaklaşık %20'si, aslanlanma nedeniyle %40'ın altında bir F8 seviyesine sahiptir. Bu taşıyıcıların hafif Hemofiliye benzer hemorajik semptomları vardır. ancak nadiren şiddetli Hemofili'ye benzer semptomlar gösterebilirler ve semptomatik Hemofili taşıyıcıları olarak adlandırılırlar (Endove diğerleri, 2017).

Bu tanı, cerrahi prosedürler ve doğum durumunda önemlidir, çünkü bu durumlarda kontrolü zor olan ve hastanın sağlığını ve hayatını riske atan kanamalar olabilir.

Bir taşıyıcıda beklenen pıhtılaşma faktörü seviyesi, sağlıklı popülasyonda bulunan konsantrasyonun %50'sine eşittir (AL-Zubaidy 2016).

X kromozomunun aslanizasyonu veya inaktivasyonu, embriyonik fazın gelişiminin başlangıcında meydana gelir. Embriyo hala birkaç hücreden oluştuğunda, her hücredeki X kromozomlarından biri tamamen rastgele bir süreçte inaktive edilir (İmad Ahmed Lateef, 2016)

Tipik olarak, X kromozomlarının yaklaşık %50'si devre dışı bırakılır, ancak bazı durumlarda, Hemofili mutasyonunu taşıyan daha fazla kromozom devre dışı bırakılır ve diğer durumlarda, çoğu "sağlıklı" kromozom devre dışı bırakılarak daha fazla kanama eğilimine neden olur (WFH, 2015). Bunun ana sonucu, kadınlarda etkilenmiş ve etkilenmemiş X kromozomlarının gerçek bir mozaiğinin ifade edildiğinin gözlenmesidir (Kadim, 2019).

Klinik olarak, babası Hemofili c olan bir kadının zorunlu taşıyıcı olduğunu söyleyebiliriz; anne tarafından Hemofili hastası akrabaları varsa ve etkilenmiş bir çocuğu varsa; birden fazla etkilenmiş çocuğu varsa veya etkilenmiş bir çocuğu varsa ve kız kardeşinin de etkilenmiş bir çocuğu varsa. Anne tarafından hemofili olan akrabaları varsa olası bir taşıyıcıdan şüphelenilir. ancak etkilenmiş çocuğu yoktur veya etkilenmiş bir çocuğu olduğunda, Hemofili hastası akrabası yoktur.(AL- Zubaidy AM, 2014).

Taşıyıcı durumunu teşhis etmek son derece önemlidir. Özellikle doğurganlık çağındaki kadınlarda aile planlamasına katılmalarına ve karar vermelerine olanak tanır.

Ayrıca, Hemofili'nin moleküler teşhisi, hastalığın genetik durumunun (kalıtsal veya sporadik) kesin olarak belirlenmesine olanak tanıyan bir genetik danışma/aile oryantasyon programının yapılandırılmasına neden olur. Bu belirlemeden elde edilen veriler, hastalığın özellikleri, tekrarlama riski, genetik geçiş yöntemleri, doğum sonrası ve doğum sonrası teşhis cephaneliği ile psikolojik ve duygusal destek hakkında potansiyel bilgiler sağlar. Taşıyıcıların teşhisi, ciddi hastalıklardan etkilenen bireylerin kürtajın yasal olduğu ülkelerde doğum öncesi tanıda pratik öneme sahiptir. Irak'ta bu duruma izin verilmemekte ve bu endikasyon için kullanımını sınırlandırmaktadır.

Son olarak, genetik danışmanlık için taşıyıcıların teşhisi esastır. Özellikle daha önce ailede hastalık öyküsü olmayan sporadik vakalarda, yalnızca ilişkili mutasyonun bilgisi, taşıyıcı

durumu tanıyabilir ve gelecekteki yavrularda hastalığın tekrarlama riskini tahmin edebilir (Cormier ve diğerleri, 2020).

Gelişmiş ülkelerde test, Irak'ta henüz rutin olmasa da tanı anında tüm Hemofili hastalarına sunulmaktadır. Bu tespit için birkaç yöntem kullanılabilir:

1- Pıhtılaştırıcı F8 Dozajı - Kandaki F8 miktarını ölçen bir yöntemdir. Çoğunda F8 seviyeleri normal parametreler içinde %40'ın üzerinde olduğundan, tüm taşıyıcıları tespit etmediğinden bu yöntem yetersizdir. Hormonal etki, kontraseptif kullanımı, stres, enfeksiyonlar ve fiziksel egzersizler gibi diğer faktörler F8 dozajını etkileyebilir.

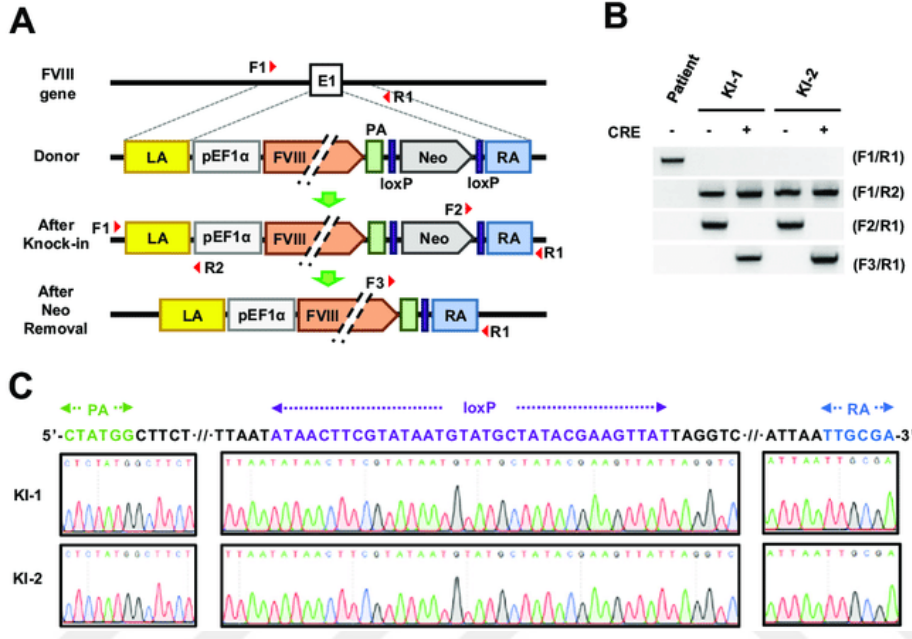
2- Genetik Testler - Bu testler, taşıyıcıların %90 ila 99'unda F8 genindeki kesin mutasyonu belirleyebilir ve ayrıca doğum öncesi tanıda, baba Hemofili c olduğunda fetüsün genetik mutasyonu taşıyıp taşımadığını belirlemek için kullanılabilir. veya anne zorunlu bir taşıyıcıdır. Bir aile üyesine Hemofili teşhisi konmuş olan kadınlar, genetik danışmaya izin vermek için genin taşıyıcısı için de test edilmelidir, ancak Hemofili tedavi merkezlerinde genetik testler nadiren mevcuttur.

2.1-Mutasyon analizi - bu durumda laboratuvar, öncelikle hastalıktan etkilenen insanda F8 genindeki değişikliği arar; Mutasyon tespit edildikten sonra, olası taşıyıcılar üzerinde test yapılabilir. Başlangıçta, intron 22'deki inversiyon aranır, çünkü bu mutasyon şiddetli Hemofili A vakalarının yaklaşık %40'ından sorumludur. Bu mutasyon mevcut değilse, gendeki diğer değişiklikler incelenecektir. Bu tip bir çalışmanın, F8 geninin büyük olması (186 Kb), karmaşık bir genomik organizasyona sahip olması (boyutu 50 bp ila 3.2 Kb arasında değişen 26 ekzon) ve tarif edilen mutasyonların büyük bir heterojenliği gibi bazı komplikasyonları vardır.

2.2-Dolaylı Mutasyon Tespiti-, mikro uydu bağlantı dengesizliğini tanıyarak, gene yakın bulunan polimorfik işaretleyiciler kullanılarak bağlantı analizi ile yapılabilir. Yöntem, F8 ile bağlantılı DNA polimorfizmlerinin analizine dayanmaktadır. Bu genetik polimorfizmler, genel popülasyonda meydana gelen ve aileler içindeki mutant genleri izlemek için uygun bir işaret olarak kullanılabilen genom dizisinin doğal bir varyasyonunu temsil eder. Kullanılan belirteçler, gene yakın veya intronlar içinde bulunanlardır (örn: intragenik BclI, intragenik mikro uydu IVS13 (CA) n ve ekstragenik mikro uydu P39 (CA) n (JAYANDHARAN ve diğerleri, 2005; KLEIN ve diğerleri, 2001; TAGARIELLO ve diğerleri, 2000) Ardından, mutasyona eşlik eden haplotipin hangisi olduğunu ayırt etmek için heredogram analiz edilir.

1.6.2. Hemofili A: faktör VIII

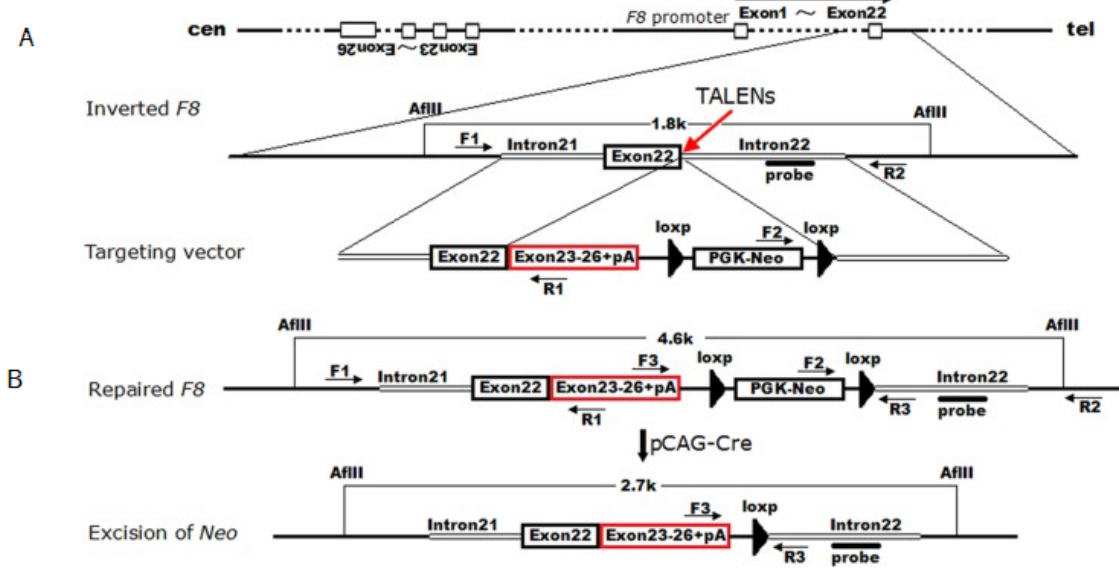
Faktör VIII geni (F8), X kromozomunun (bant Xq28) uzun kolunda bulunur ve 25 intronla ayrılmış 26 ekzondan oluşan 186 Kb'lik bir bölge içerir. Eksonlar, sırasıyla 3.106 ve 1.958 bp içeren eksonlar 14 ve 26 hariç, 69 ila 262 bp arasında değişir. Haberci RNA (mRNA) 9 Kb'ye sahiptir (Şekil 1.1).



Şekil 1 İnsan F8 geninin temsili (Sung ve diğerleri, 2019)

F8, X kromozomunun yaklaşık %0.1'ini oluşturur ve %80'i intron bölgelerinden oluşur. En büyük intron 32 Kb ile 22'dir (INT22). Bu bölge, ekson 22'den 10 Kb'de yer alan ve iki yönlü teşvik edici bölgeler olarak işlev görebilen ve iki genin varlığını karakterize eden bir CpG nükleotit adası içerir: F8A ve F8B. Faktör VIII genine zıt yönde kopyalanan F8A geni 1.8 Kb'ye sahipken, 2.5 Kb'ye sahip F8B, faktör VIII ile aynı yönde kopyalanmıştır. F8A geninin iki homolog kopyası, telomerden yaklaşık 500 Kb uzaktaki bir bölgede tarif edilmiştir. F8A ve F8B'nin işlevi hala bilinmiyor. Şiddetli olarak sınıflandırılan Hemofili A vakalarının yaklaşık %40'ı, yani <%1 F8 aktivitesi ile, faktör VIII (INV-22) geninin intron 22'sinin ters çevrilmesine yol açan moleküler bir yeniden düzenlemeden kaynaklanır. Bu mutasyon, intron 22'nin (Int22h1) 9.5 Kb bölgesi ile iki homolog ekstrasjenik bölgeden biri olan Int22h2 ve Int22h3 arasındaki bir rekombinasyondan kaynaklanmaktadır ve bu, sırasıyla tip I veya tip II'nin intron 22 inversiyonu ile sonuçlanacaktır (AL-Zubaidy, 2014)(Şekil 1.2A). Yakın zamanda, Bagnall ve diğerleri, (2002), ağır Hemofili A hastalarının yaklaşık %5'inde bulunan faktör VIII geninin (INV-1) intron 1 dizilerinin ikinci bir inversiyonunu tanımlamıştır. F8

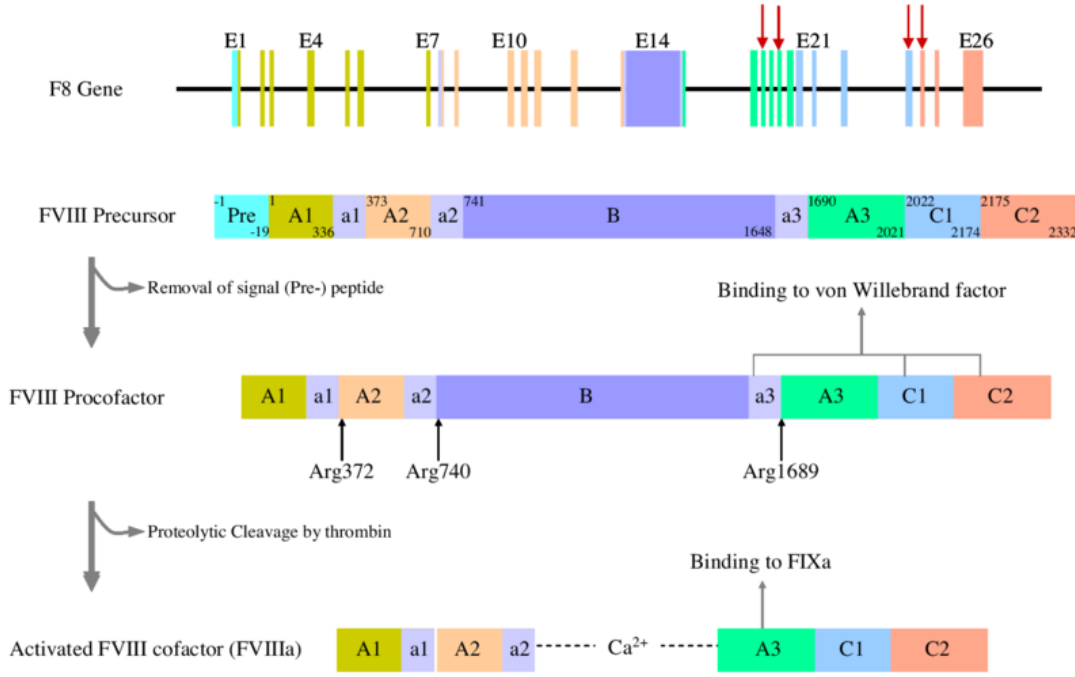
geninin diğer kusurları arasında Hemofiliye neden olan çoğu, tek bir nükleotidin yer değiştirmesinden kaynaklanır ve vakaların yalnızca %5'inde eklemeye veya silme vardır (Şekil 1.2B).



Şekil 2 İtron 22 ve intron 1'in inversiyonunun oluşumunun temsili (Wu, ve diğerleri, 2016)

Faktör VIII gen mutasyon oranının çok yüksek olduğu (büyük boyutu, mutasyonların daha yaygın olduğu bölgelerin (sıcak noktalar) bulunması nedeniyle nesil başına $2,4 \times 10^{-5}$) olduğu kabul edilmektedir. geni susturan yeniden düzenlemelerin ortaya çıkması Bu gerçekler, geçmişte çocuklarda genellikle ölümcül olduğundan, hastalığın birkaç nesil boyunca devam etmesini açıklamaya yardımcı olur.

Faktör VIII proteini (F8) altı A1-A2-B-A3-C1-C2 alanından oluşur. Her A alt biriminde 350 amino asit bulunur. Farklı türlerde oldukça korunmuş bir bölgedir ve bu proteinin bakır metaline bağlanma yeteneğinde rol oynayabilir. 150 amino asitli C1 ve C2 alanları, fosfolipidlere bağlanma yeteneğinde rol oynar. B Alanı, proteinin %40'ını temsil eder ve F8'in 14. eksonu tarafından kodlanır. Bununla birlikte, B alanı görünüşte pıhtılaşma sürecine çok az katılıma sahiptir, F8 trombin tarafından aktive edildiğinde kaybedilir. A ve C alanları, pıhtılaşma faktörü V'de bulunan alanlara homologdur (Şekil 1.3).

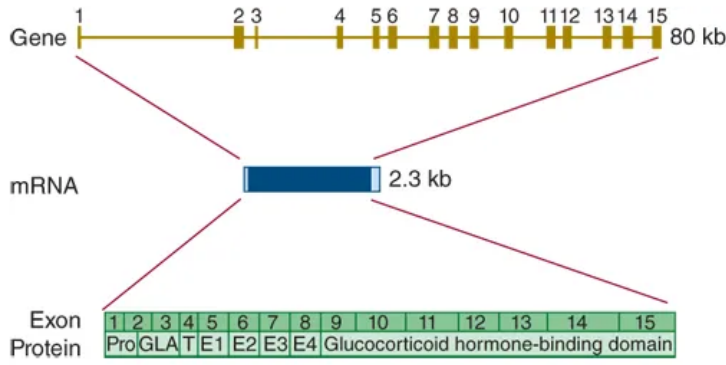


Şekil 3 İnsan F8 protein alanlarının temsili (Chavali, et al 2011)

1.6.3. Hemofili B: faktör IX

34Kb'lik faktör IX (F9) geni de X kromozomunun uzun kolunun (bant Xq-27) ucunda, ancak F8 sentezi ile ilgili bölgeden uzak bir bölgede bulunur. F9'un 2.8 Kb'lik bir mRNA'yı kodlayan sekiz ekzonu vardır. Gen ilk olarak 1982'de klonlandı ve 1985'te dizilendi.

Faktör IX (F9), 415 amino asitli bir glikoproteindir ve diğer K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörleri gibi dört alana sahiptir. Birinci alan (Gla), kalsiyum iyonlarına bağlı olarak faktör IX'dan fosfolipidlere ve endotel hücrelerine bağlanma için gerekli Y-karboksiglutamik asit kalıntılarını içerir. Epidermal büyüme faktörüne benzer iki alanın işlevleri, EGF-1 ve EGF-2 alanları, tamamen açık değildir, F9'un faktör VIII ve X'e eklenmesi ve aktive edilmiş F9'un faktöre dahil edilmesi ile ilgili görünmektedir. "gerginlik kompleksi". Son alanda, katalitik alanda, F9'un aktif serin-proteaz bölgesi bulunur (Şekil 1.4). Hemofili A'nın aksine, F9 genindeki spontan mutasyon oranı nispeten düşüktür (AL- Zubaidy ve diğerleri, 2014).



Şekil 4 2.3 Kb'lik bir mRNA'yı kodlayan faktör IX gen 15 ekzonu (Susan J.Hsiao, et al., 2019)

1.7. Hemofilinin klinik tablosu:

Klinik sunum, eklem içi kanama (hemartroz), kas kanamaları veya diğer doku veya boşluklarda karakterize edilen Hemofili A veya B için benzerdir. Hemorajik epizodlar spontan veya travmadan sonra ortaya çıkabilir ve F8 veya F9'un rezidüel pıhtılaştırıcı aktivitesine göre değişiklik gösterebilir. Dolaşım seviyeleri normalin %1'in altında olan hastalarda (şiddetli Hemofili) genellikle spontan kanama görülür, %1 ila %5 (orta Hemofili) olan hastalarda spontan kanama görülebilir, ancak şiddetli Hemofili hastalarına göre daha az sıklıkla. %5 ila %40 seviyelerinde (hafif Hemofili) hastalar genellikle sadece travmadan sonra kanama yaşarlar. Hemofili tedavisi temel olarak hemorajik atakları önlemek veya yanıt olarak pıhtılaşma faktörü konsantrasyonunun uygulanmasına dayanır. Akut hemorajik komplikasyonlara ek olarak, Hemofili hastaları özellikle üç tip kronik komplikasyondan muzdariptir: a) tekrarlayan eklem içi kanamaya bağlı artropatiler; b) özellikle HIV virüsü ve hepatit C ile kontaminasyon olmak üzere iki ciddi sorunu olan kan ürünleriyle bulaşan bulaşıcı hastalıklar; c) F8 veya F9'un (inhibitörler) pıhtılaşma fonksiyonunu inhibe edebilen antikörlerin (Ljung, Rolf ve diğerleri.2008).

1.8. İnhibitörler.

Hemofili ile ilişkili kronik komplikasyonlar arasında inhibitörlerin gelişimi, şiddeti ve sıklığı nedeniyle akademiye öne çıkan bir sorun olmuştur. İnhibitörler, Hemofili hastaları tarafından geliştirilen, F8 veya F9'un pıhtılaştırıcı aktivitesini nötralize eden alloantikörlerdir, hemofili tedavisinden, yani bu pıhtılaşma faktörlerinin konsantrasyonunun uygulanmasından kaynaklanan bir komplikasyon olarak. Klinik olarak, bu antikörlerin varlığı, faktör konsantrasyonunun

değiştirilmesinden terapötik hemostazın indüklenmesini zorlaştırır. Bu ciddi bir komplikasyon olarak kabul edilir, çünkü bu durumdaki tedavi alternatifleri hemostazın etkin bir şekilde garanti edilememesinin yanı sıra son derece pahalıdır. Bazı durumlarda faktör konsantrasyonunun yüksek dozlarının kullanılması yeterli olabilir. (Hedner ve diğerleri, 1983)

İmmünolerans indüksiyonunun (TII) tedavisi, inhibitörün varlığını ortadan kaldıracak şekilde şun anda mevcut olan tek terapötik formdur. Bu tedavi, immünosupresif ilaçlarla ilişkili olsun veya olmasın, yüksek dozlarda (200 IU / kg / gün) veya düşük dozlarda (50 IU / kg / haftada 3 kez) F8'in sık uygulanmasına dayanır. Bu tedavi birkaç ay hatta yıllarca sürebilir. TII'deki sınırlamalar, özellikle çocuklar için bir sorun olabilen, yüksek maliyet ve sık intravenöz infüzyon ihtiyacı ile ilgilidir. Ayrıca, her durumda başarı garantisi yoktur. Hemofili B durumunda, F9'a karşı bir inhibitörün varlığı, anafilaksi dahil ciddi alerjik reaksiyonlara neden olabilir. Bu tür reaksiyonlar, inhibitörün gelişmesinden sonra eksojen faktör IX'un ilk infüzyonunda meydana gelebilir, inhibitör teşhis edilmeden önce bile. Ek olarak, Hemofili B için TII protokolleri, F9 ile antikor arasında oluşan immün kompleksin çökmesi nedeniyle ek nefrotik sendrom geliştirme riski sunabilir. Avrupa ve Kuzey Amerika popülasyonlarında yürütülen çalışmalara göre, inhibitörlerin kümülatif riski Hemofili A hastalarında %20 ile %30 ve Hemofili B hastalarında %1 ile %5 arasında değişmektedir. Bir meta-analiz çalışmasında, inhibitör prevalansının tüm Hemofili A hastalarında %5 ile %7 olduğunu ve şiddetli Hemofili hastalarında bunun %12 ile %13 olduğunu göstermiştir. İnhibitörlerin gelişimine zemin hazırlayan faktörlerden biri de F8 veya F9 genlerindeki mutasyon tipidir. Aslında, İntron 22 ve intron 1 inversiyonları, büyük delesyonlar, anlamsız mutasyonlar, A nükleotid tekrarlı bölgelerin dışındaki küçük eklemeler veya delesyonlar ve A2, C1 ve C2'de yanlış anlamlı mutasyonlar gibi inhibitör gelişimi açısından yüksek risk altında olduğu düşünülen mutasyonları olan hastalar etki alanları, alternatif ek mutasyonları gibi inhibitörlerin gelişimi için düşük risk olarak kabul edilen mutasyonlara sahip hastalara kıyasla 7 ile 10 kat daha fazla inhibitör geliştirme riskine sahiptir; A tekrarlama bölgelerinde küçük eklemeler veya silmeler; ve diğer F8 alanlarındaki yanlış anlamlı mutasyonlar. Son zamanlarda, sadece ilgili mutasyon tipinin inhibitör gelişme riski ile ilişkili olduğu değil, aynı zamanda spesifik mutasyon ve sınıf II doku uyumluluk antijeninin ilişkisi ile de ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Büyük delesyonlar, anlamsız mutasyonlar, A nükleotid tekrarı olan bölgelerin dışındaki küçük eklemeler veya delesyonlar ve A2, C1 ve C2 alanlarındaki yanlış anlamlı mutasyonlar, düşük riskli kabul edilen mutasyonlara sahip hastalara kıyasla 7 ile 10 kat daha fazla inhibitör geliştirme riskine sahiptir. alternatif eklemeler mutasyonları gibi

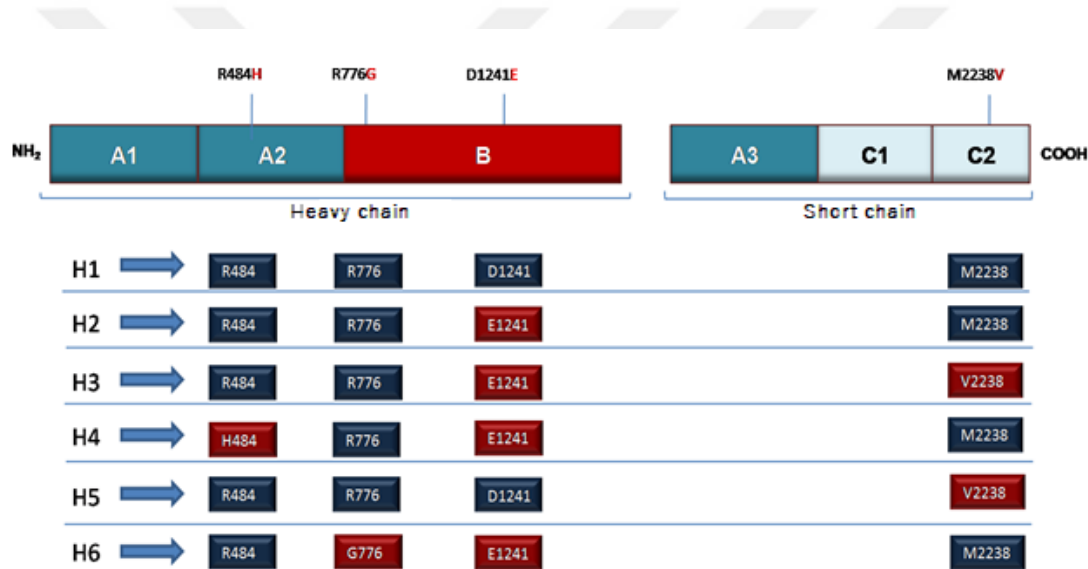
inhibitörlerin geliştirilmesi; A tekrarlama bölgelerinde küçük eklemeler veya silmeler; ve diğer F8 alanlarındaki yanlış anlamlı mutasyonlar. Son zamanlarda, sadece ilgili mutasyon tipinin inhibitör gelişme riski ile ilişkili olduğu değil, aynı zamanda spesifik mutasyon ve sınıf II histo-uyumluluk antijeninin ilişkisi ile de ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Büyük delesyonlar, anlamsız mutasyonlar, A nükleotid tekrarı olan bölgelerin dışındaki küçük eklemeler veya delesyonlar ve A2, C1 ve C2 alanlarındaki yanlış anlamlı mutasyonlar, düşük riskli kabul edilen mutasyonlara sahip hastalara kıyasla 7 ila 10 kat daha fazla inhibitör geliştirme riskine sahiptir. alternatif eklemeler mutasyonları gibi inhibitörlerin geliştirilmesi; A tekrarlama bölgelerinde küçük eklemeler veya silmeler; ve diğer F8 alanlarındaki yanlış anlamlı mutasyonlar. Son zamanlarda, sadece ilgili mutasyon tipinin inhibitör gelişme riski ile ilişkili olduğu değil, aynı zamanda spesifik mutasyon ve sınıf II histo-uyumluluk antijeninin ilişkisi ile de ilişkili olduğu öne sürülmüştür. alternatif ek mutasyonları gibi inhibitörlerin gelişimi için düşük risk olarak kabul edilen mutasyonlara sahip hastalara kıyasla 7 ila 10 kat daha fazla inhibitör geliştirme riskine sahiptir; A tekrarlama bölgelerinde küçük eklemeler veya silmeler; ve diğer F8 alanlarındaki yanlış anlamlı mutasyonlar. Son zamanlarda, sadece ilgili mutasyon tipinin inhibitör gelişme riski ile ilişkili olduğu değil, aynı zamanda spesifik mutasyon ve sınıf II histo-uyumluluk antijeninin ilişkisi ile de ilişkili olduğu öne sürülmüştür. alternatif ek mutasyonları gibi inhibitörlerin gelişimi için düşük risk olarak kabul edilen mutasyonlara sahip hastalara kıyasla 7 ila 10 kat daha fazla inhibitör geliştirme riskine sahiptir; A tekrarlama bölgelerinde küçük eklemeler veya silmeler; ve diğer F8 alanlarındaki yanlış anlamlı mutasyonlar. Son zamanlarda, sadece ilgili mutasyon tipinin inhibitör gelişme riski ile ilişkili olduğu değil, aynı zamanda spesifik mutasyon ve sınıf II histo-uyumluluk antijeninin ilişkisi ile de ilişkili olduğu öne sürülmüştür. (Kazimi, 2011).

Ek olarak, aile öyküsünde bir inhibitörün varlığı, tedaviye başlama yaşı, bağışıklık sistemindeki spesifik değişiklikler, faktör değiştirmede kullanılan ürünün türü gibi inhibitörlerin gelişimi için diğer risk faktörleri tanınır. İnhibitörlerin (ilişkili enfeksiyonlar) gelişimi sırasındaki ilişkili değişiklikler de bir inhibitörün görünümünü etkileyebilir.

1.8.1. F8 dışında haplotiplerin varlığı ve inhibitör riski.

Pinto ve diğerleri (2012) Şekil 1.5'te açıklandığı gibi F8 proteininin doğal formu için altı haplotipi (H1 ila H6) kodlayan dört tek bazlı polimorfizm (SNP) (R484H, R776G, M208V ve D1241E) tanımladı. 2009'da bu yazarlar, bu haplotiplerden beşinin (H1, H2, H3, H4 ve H5) Kuzey Amerikalı siyah Hemofili hastalarında ifade edildiğini, Kafkasyalılarda ise sadece iki

haplotipin (H1 ve H2) ifade edildiğini gösterdi. En yaygın haplotip H1 tüm etnik gruplarda bulunur ve rekombinant ticari F8 proteini (rF8) Kogenate®'i (Bayer HealthCare Pharmaceuticals) ifade ederken, diğer tüm etnik gruplarda da bulunan H2 ve başka bir rF8 proteini olan Rekombinate'i ifade eder. ® (Baxter Healthcare Corporation). H2 haplotipi, Kuzey Amerika siyahi Hemofili hastaları (%38) arasında en yaygın biçimdir. Ancak H3, H4 ve H5 haplotipleri, proteinleri iki rekombinant ürün arasında bulunmayan, yalnızca siyah Amerikalılar arasında bulunur. Yazarlar tarafından yapılan değerlendirmede, rF8 konsantrlerinde proteinleri bulunmayan H3 ve H4 haplotipinin varlığının, inhibitör insidansının daha yüksek olması ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Bu nedenle, bu, F8 geninin farklı haplotiplerinin farmakogenetik olarak siyahlarda yüksek inhibitör gelişme riskine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Eckhardt ve diğerleri, 2014).



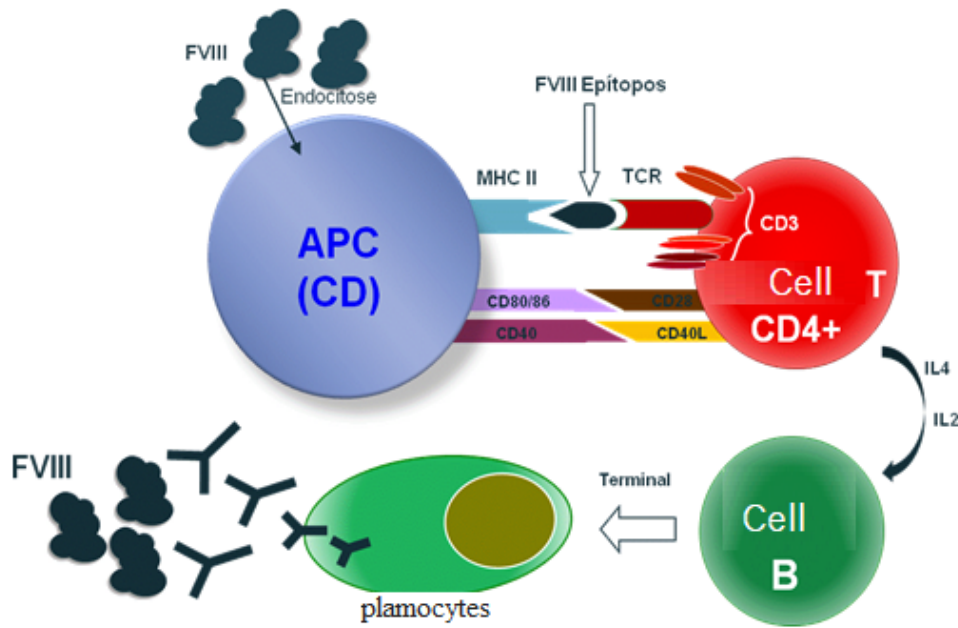
Şekil 5 F8 proteininin altı haplotipinin (H1 ila H6) temsili (Eckhardt ve diğerleri, 2014).

F8 geninde R484H, R776G, M208V ve D1241E polimorfizmlerinin ortaya çıkması, altı F8 haplotipinin varlığı ile ilgilidir. Dört eş anlamlı olmayan tek bazlı polimorfizmi (SNP) (R484H, R776G, D1241E ve M208V) temsil eden farklı alanlara sahip F8 proteininin doğrusal yapısı. F8'de dört SNP tarafından kodlanan altı farklı haplotip (H1 ila H6) (amino asit değişiklikleri kırmızı dikdörtgenlerle temsil edilir).

1.8.2. Faktör VIII inhibitörlerinin immünolojisi.

Bu inhibitörlerin gelişimini içeren mekanizma oldukça karmaşıktır ve henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. F8'in kan dolaşımına verildiğinde, F8'i moleküller tarafından taşınan 8-12 amino asitlik küçük peptitlere ayıran dendritik hücreler gibi antijen sunan

hücreler (APC) tarafından alındığına inanılmaktadır. APC'lerin yüzeyine karmaşık daha yüksek derecede histo-uyumluluk (MHC) sınıf II. Bu süreç, inflamatuvar sistem, APC'ler veya dendritik hücreler olgunlaştığında bir "tehlike" bağlamında meydana gelirse ve yüzey yardımcı uyarıcı molekülleri uyararak bu yanıtı güçlendirebilir. Olgun dendritik hücreler ikincil lenfoid organlara göç eder ve antijeni yardımcı T hücrelerine veya T yardımcı lenfositlere, CD4 + sunar. Anti-F8 bağışıklık tepkisi, MHC-sınıf II kompleksi - F8 peptidini tanıyan CD4+ T lenfositlerine bağlıdır. Aktive T lenfositleri, F8'e karşı spesifik antikorları sentezlemeye başlayan B lenfositlerini aktive eder (Şekil 1.6). Bu antikorlar, F8'in pıhtılaşma aktivitesini nötralize edebiliyorsa, bunlara inhibitör denir.(Dasgupta, ve diğerleri, 2007).



Şekil 6 F8'e karşı bağışıklık tepkisinin temsili (Dasgupta, ve diğerleri., 2007).

F8 inhibitörleri, poliklonal G (IgG) immünoglobulinlerdir ve esas olarak IgG4 alt sınıfındadır. Bununla birlikte, alt sınıf IgG1 ve IgG2 de genellikle anti-F8 antikorlarının popülasyonlarında bulunur. Bu inhibitör antikorlar, F8'deki, özellikle A2, C2 ve A3 alanlarındaki epitoplara tanır (Şekil 1.3). Proteinin bu bölgeleri, F8 bağlayıcı faktör X (FX), F9a, Von Willebrand faktöründe (FVW) bölgeler oldukları için kritiktir.



Şekil 7 İnsan F8 alanlarının ve inhibitörler tarafından tanınan ana epitop bölgelerinin temsili. A2, C2 ve A3 alanları, inhibitör antikolar (burada Y olarak temsil edilir) tarafından en çok tanınan epitoplara sahiptir) fosfolipidler (FL) (Dasgupta ve diğerleri, 2007).

Endojen F8, yani Hemofili A'ya sahip olmayan bireyler olduğunda, F8 immünolojik olarak tolere edilir, bu nedenle bir immün yanıtı uyarmaz. Bu, gelişim sırasında timik epitel hücrelerinin antijenlere sahip olduğu ve negatif bir seçimin yüksek afiniteli T hücrelerini dışlayarak bu hücrelerin periferik bağışıklık sisteminde varlığını önlediği zaman ortaya çıkan bir tür merkezi bağışıklık toleransına atfedilir. Öte yandan, Hemofili A hastalarının periferik sisteminde F8'e özgü yüksek afiniteli T hücreleri olacaktır ve bu hastalara F8 infüzyonu verildiğinde bağışıklık sistemi onu yabancı bir antijen olarak tanıyacak ve bu olumsuz olayı tetikleyecektir. Ancak bu, çoğu Hemofili A'nın neden inhibitör geliştirmedeğini açıklamaz. Böylece, "koruyan" mekanizmayı anlamak (Cormier ve diğerleri, 2020)

Yakın zamanda tüm CD4+ T hücrelerinin periferik bağışıklık sisteminde dışlanmadığı gözlemlenmiştir. Bu kendi kendine tepki veren T hücrelerinin, bir bağışıklık reaksiyonunu önlemek için bastırılması gerekir. Düzenleyici T hücreleri (Treg), periferik sistemde bulunan ve kendi kendine reaktif T hücrelerinin baskılanmasından sorumlu olan CD4+, CD25+ ve Foxp3+ olan bir T hücresi popülasyonu oluşturur. Antijenin sunumu bir "tehlike" işaretinin yokluğunda meydana geldiğinde, dendritik hücreler olgunlaşmamış halde kalır ve bu nedenle antijeni T hücrelerine sunduklarında genişleyen lenfosit popülasyonu T reg hücreleri olacaktır. (Lai ve diğerleri, 2017)

Bu çalışma, Irak federasyonunun beş bölgesinden (Kuzey, Kuzeydoğu, Merkez -Batı, Güney ve Güneydoğu) (Kadhim ve diğerleri, 2019). Bu risk faktörlerinin anlaşılması, gelecekte inhibitör gelişiminin kontrolü ve her şeyden önce önlenmesi için farklı bir tedavi belirlemeye yardımcı olacaktır.

2. LİTERATÜR İNCELEMESİ

2.1. Hemofilinin genetik yönleri

X kromozomuna bağlı çekinik genetik bir hastalık olduğu için, Hemofili A neredeyse sadece erkekleri etkiler. Erkeklerde tek faktör VIII (XY) aleli bulunurken, kadınlarda iki (XX) aleli vardır. Mutasyona uğramış bir aleli (XHY, hemizigosis) olan erkekler hastalığa sahip olurken, tek bir mutasyona uğramış aleli (XHX, heterozigoz) olan kadınlar taşıyıcı olacak ve bu nedenle her hamilelikte anormal aleli yavrularına aktarma olasılığı %50 olacaktır. Her iki allelde (XHXH, homozigoz) mutasyonları olan kadınlar, bu çok nadir bir durum olmasına rağmen, hastalığı ortaya çıkaracaktır. Hemofili A teşhisi konan hastaların yaklaşık %30'unda daha önce ailede hastalık öyküsü yoktur (Muhammedve diğerleri., 2016). Bu vakalar, iki durumda meydana gelebilecek spontan mutasyonların ortaya çıkmasıyla açıklanır: (I) ebeveynlerden birinin gametogenezi sırasında. Bu durumda, mutasyon germ hattının hücrelerinden birinde meydana gelir ve aynı genin tüm klonal torunlarında ve gametlerin bir kısmında, germ hattı mozaizmini karakterize eden devam eder; (II) mutasyon, etkilenen hastanın embriyogenezinin erken evrelerinde de meydana gelebilir. Bu durumda embriyonun erken evrelerinde bulunan hücrelerden biri mutasyona uğrar ve bu birbirini izleyen mitozlarla diğer hücrelere geçerek bireyin hem normal hem de değişmiş hücrelere sahip olmasına neden olur. Bu gerçek somatik mozaikçiliği karakterize eder. (Muhammed, 2017)

Hemofili A ve B, faktör VII I (Haemofili A, HA) ve faktör IX (Haemofili B, HB) genlerindeki mutasyonlar nedeniyle oluşan, X kromozomuna bağlı başlıca kalıtsal kanama bozukluklarıdır ve bu bozukluklarda azalmaya veya fonksiyonel yetersizliğe neden olur. Bu proteinler plazmada Sıklıkları sırasıyla 5.000'de 1 ve 30.000 canlı yenidoğan erkekte 1'dir. Bu genler X kromozomu (Xq28 HA, Xq27 HB) üzerinde yer alır, bu nedenle onların kalıtım modeli çekiniktir ve X kromozomuna bağlıdır ve neredeyse yalnızca taşıyıcı olan erkek ve kadınları etkiler ve bunu çocuklarından alma riski %50'dir. Bu nedenle, taşıyıcıları belirlemek, etkilenen bireylerde mutasyonların tespiti ve sporadik vakalarda mutasyonun ebeveyn kökeninin belirlenmesi için moleküler tanı yoluyla genetik danışmanlık sağlamak önemlidir. Her iki patoloji de, özellikle eklemlerde ve kaslarda, her türden uzun süreli kanamalara neden olan pıhtılaşma değişikliğinin neden olduğu klinik belirtiler sunar. Klinik şiddetin sınıflandırması, plazmada dolaşan faktör VIII (F8:C) ve IX (F9:C)'nin pıhtılaştırıcı

aktivitesinin değerlerine dayanır ve şiddetli Hemofili için <%1 aktivite, %1-5 arasında orta Hemofili ve hafif Hemofili için > %5 - <%40(Peyvandi, et al., 2006).

2.2. F8 ve F9 genlerinin moleküler bazları

80'lerin başında faktör VIII ve IX genlerinin tanımlanması ve klonlanması, karakterizasyonları için paha biçilmez bir katkı olarak hizmet etti. F8 geni, var olan en büyük memeli genlerinden biridir, protein ürünü 2.351 amino asit olan 9 kb'lik bir mRNA olarak kopyalanan 26 ekzonda dağıtılan 186 kb'den oluşur. F9 geni daha küçüktür, 34 kb'den oluşur ve 461 amino asitlik bir proteinden kaynaklanan 2.0 kb mRNA olarak kopyalanan 8 ekzondan oluşur. F9, içinde mutasyonların doğrudan tanımlanmasına izin veren sıralamaya sahibiz. Hemofili A'da en çok kullanılan dolaylı teknikler arasında, RFLP'ler (değişken uzunluktaki kısıtlama parçaları nedeniyle polimorfizmler) ve mikro uydular gibi farklı intragenik belirteçler kullanılarak yapılan bağlantı analizi yer alır. doğal poliakrilamid jellerde analiz edilir. Halihazırda PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tekniğine dayanan Protokoller, şiddetli Hemofili A hastalarında faktör VIII geninin 1 ve 22 intronlarının inversiyonları gibi daha sık mutasyonların saptanması için uyarlanmıştır.(Goodeve ve diğerleri., 2003)

2.3. Taşıyıcıların teşhisinde intragenik belirteçler

Polimorfizmler, genel popülasyonda bulunan genom dizisindeki doğal varyasyonlardır ve etkilenen ailelerde mutasyona uğramış genleri izlemek için belirteçler olarak kullanılabilir. Bilgilendirme derecesi, söz konusu polimorfizm için popülasyondaki heterozigotluk yüzdesi olarak tanımlanır; bu, bir bialelik sistemde (kısıtlama parçası uzunluk polimorfizmleri durumunda, RFLP'ler durumunda) maksimum değeri %50'dir, varlığı ile tanımlanan iki alele sahiptir. veya kısıtlama sitesinin olmaması. Bu değere yakın bir heterozigotluk değeri bulunduğu, bir aile içinde her iki alelin de bulunma olasılığı artar. F8 geni söz konusu olduğunda, intronlar 13 ve 22'de değişken tekrarlı mikro uyduların mevcudiyeti ile üretilen, dört ila sekiz alel arasında sahip oldukları için en bilgilendirici olan iki çoklu alelik işaretleyici rapor edilmiştir. (Abdulqader ve diğerleri., 2019)F8 geni için en yaygın olarak kullanılan intragenik RFLP'ler, intron 7'de AlwNI ve intron 18'de Bc / I'dir, ikincisi çeşitli popülasyonlarda %50'ye yakın bir bilgilendiriciliğe sahiptir. Çoklu alelik sistemler olarak özellikleri ve PCR ile doğrudan tanımlamaları nedeniyle, mikro uydular, yüksek derecede bilgilendirici olmaları nedeniyle şüphesiz ilk tercih edilen seçimdir. Ailelerin çoğu (%75) en

az bir veya iki polimorfizm için bilgilendiricidir ve tanıda <%1 hata oranı vardır, çünkü bunlar intragenik belirteçler olduklarından, mutasyon bölgesi ile rekombinasyon olasılığı minimumdur, bununla birlikte bir bağlantı dengesizliği vardır. varsayıldı. DXS52 lokusunda bulunan St14 gibi diğer çok bilgilendirici ekstragenik mikro uydular da kullanılmıştır. (Graham ve diğerleri, 1985) Bununla birlikte, söz konusu işaretçinin mutasyon bölgesi ile konumuna bağlı olarak mayoz sayısına bağlı olan rekombinasyon olasılığı nedeniyle hata riski daha yüksektir (% 2-6). F9 geni ile ilgili olarak, en bilgilendirici olan farklı intragenik polimorfizmler kullanılır: NruI, Sa / I ve BamHI promotör bölgesinde; intronik bölgelerde, intron I'de 50 bp, intron IV'te TaqI ve 3'terminal bölgesinde HhaI'lik bir tetraelik ekleme/silme polimorfizmi. Sıklıkları esas olarak Asya ve Avrupa popülasyonlarında bilinir, belirteçlere bağlı olarak %30-80 arasında bilgilendiricilik ile ve hepsi intragenik oldukları için hata riskleri %1'den azdır.

2.4 Faktör VIII genindeki intron 1 ve 22'nin inversiyonu

1994'ten beri, şiddetli Hemofili A'lı hastalarda F8 geninin intron 22'sindeki bir inversiyona bağlı bir mutasyon mekanizması tanımlanmıştır.(Abdulqader, ve diğerleri., 2020)mutasyonlar için tek yer veya sıcak nokta olarak kabul edilir. F8 mRNA'sındaki kodlama bölgesi boyunca mutasyonları belirlemek için çalışmalar yapıldı ve F8A arasındaki homolog rekombinasyonun neden olduğu şiddetli Hemofili A hastalarının %50'sinde ekson 22 ve 23 arasında bir kırılma bulundu. F8 geninin intron 22'si ve telomerik bölgede bulunan aynı F8A geninin iki kopyasından biri, F8 geninden yaklaşık 500 kb, bu da protein ürününün tamamen yokluğuna neden olan bir dizi kesintisine yol açar. Yakın zamanda, intron 1'deki F8 geninin bozulmasına neden olan ve Kafkas popülasyonlarında ciddi Hemofili A vakalarının %5'ine neden olan benzer bir yeniden düzenleme tespit edildi. Yeniden düzenlemeye ayrıca F8 genindeki bir intron 1 bölgesi ile telomerdeki başka bir tekrarlanan bölge arasındaki homolog rekombinasyon neden olur, ayrıca orijinal gende bu segmentin ters oryantasyonuna ve ürün proteininin üretilmesi için translasyonun imkansızlığına neden olur. İtron 22'deki yüksek inversiyon sıklığı ve daha az ölçüde intron 1'deki inversiyonların yanı sıra PCR ile tespit teknik fizibiliteleri, onları ciddi Hemofili A ve doğrudan Özellikle %30'luk sporadik vakalarda büyük bir değer taşıyan taşıyıcıların teşhisinde uygulama, taşıyıcıların tanımlanması için dolaylı bir teşhis kullanımının mümkün olmadığı yüksek bir yüzde aynı zamanda orijinal gende bu segmentin ters oryantasyonuna ve ürün proteininin üretimi için translasyonun imkansızlığına neden olur. İtron 22'deki yüksek inversiyon sıklığı ve daha az

ölçüde intron 1'deki inversiyonların yanı sıra PCR ile tespit teknik fizibiliteleri, onları ciddi Hemofili A ve doğrudan Özellikle %30'luk sporadik vakalarda büyük bir değere sahip olan taşıyıcıların teşhisinde uygulama, taşıyıcıların tanımlanması için dolaylı bir teşhis kullanımının mümkün olmadığı yüksek bir yüzde aynı zamanda orijinal gende bu segmentin ters oryantasyonuna ve ürün proteininin üretimi için translasyonun imkansızlığına neden olur. İntron 22'deki yüksek inversiyon sıklığı ve daha az ölçüde intron 1'deki inversiyonların yanı sıra PCR ile tespit teknik fizibiliteleri, onları ciddi Hemofili A ve doğrudan özellikle %30'luk sporadik vakalarda büyük bir değere sahip olan taşıyıcıların teşhisinde uygulama, taşıyıcıların tanımlanması için dolaylı bir teşhis kullanımının mümkün olmadığı yüksek bir yüzde (Jayandharan, ve diğerleri., 2012).

2.5. Faktör VIII ve IX genlerinin dizilimi

Sekanslama, faktör VIII ve IX'un genlerindeki mutasyonların karakterizasyonu için tercih edilen stratejidir ve bu, onların konumlarını ve ilgili genetik yeniden düzenleme türünü doğrudan görselleştirmemizi sağlar. Taşıyıcıların tespiti için en doğru tanı yöntemi olup, %99'un üzerinde bir güvenilirliğe sahiptir ve hastalığın moleküler etiyolojisini anlamak için temel araçtır. F9 geni büyük mutasyonel heterojenlik gösterir, en yaygını nokta tipi mutasyonlardır ve geçişleri takiben transversiyonlar ilk sırada yer alır. F9 geni söz konusu olduğunda, dizileme, Hemofili B'ye neden olan toplam mutasyonların %96'sından fazlasının bulunduğu kodlama ve promotör bölgelerinin (2.2 kb) boyutu nedeniyle erişilebilir moleküler bir tanı yöntemidir. bu nedenle özellikle sporadik vakalarda taşıyıcı tanısında uygun bir strateji olarak önerilmiştir.5 10 Meksikalı hastadan oluşan bir grupta Hemofili B'ye neden olan mutasyonlar saptanmış ve bu sayede hastaların %100'ünde taşıyıcı tanısına ulaşılmıştır. aileler. Ayrıca, bu mutasyonların karakterizasyonu, Meksika popülasyonunda, tipik bir Latin Amerika popülasyonu gibi görünen ve daha önce tanımlanmamış bir mutasyon modelinin tanımlanmasına izin verdi.5 F8 durumunda, mutasyon modeli farklıdır, çünkü her ne kadar mutasyonlar da baskındır Özellikle, intron 22, mutasyonlar için bir "sıcak nokta" bölgesi olarak tanımlanmıştır ve nokta mutasyonlarının çoğu, kodlama bölgelerinin geri kalanına kıyasla daha büyük olan ekson 14'te bulunur.(Ludlam ve diğerleri, 2005)

2.6 Faktör VIII mRNA'dan proteine

F8 transkripti, kısa bir 5' çevrilmemiş bölge (150 bp), açık bir okuma penceresi (7.056 baz) ve çevrilmemiş uzun bir 3' uç (1.806 bp) ile yaklaşık 9010 b boyutundadır. Açık okuma penceresi, 19'u bir sinyal peptidinin dizisine karşılık gelen 2.351 amino asit içeren tek zincirli bir öncü proteini kodlar. Proteinin endoplazmik retikulumdan geçişi sırasında, sinyal peptidi, 2,24 amino asitlik bir birincil yapıya sahip bir protein ile sonuçlanacak şekilde bölünür. Bu proteinin birincil yapısının analizi, alanların varlığını gösterdi: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2. Faktör VIII hücre içi sentez yolu bilgisi, faktör VIII cDNA ile transfekste edilmiş insan olmayan memeli hücre hatlarının kültürüyle yapılan çalışmalar sayesinde mümkün olmuştur. Yeni sentezlenen faktörün olgunlaşması ve salgılanması, çok çeşitli protein-protein etkileşimlerini ve çeşitli translasyon sonrası modifikasyonları içerir. Endoplazmik retikulumda faktör VIII, daha sonra Golgi kompleksine yönlendirilmek üzere birkaç glikosilasyon olayına maruz kalır. Bunda molekül, B-A3 alanlarının birleşim yerinde ve "B" alanı içindeki ek sitelerde proteolitik bölünmelere ek olarak, spesifik kalıntıların bir sülfatlama ve glikosilasyon sürecinden geçecektir.(Kadir ve diğerleri.,2020).

2.7 Plazmada Faktör VIII

Faktör VIII'in salgılanmasından hemen sonra, heterodimer, plazmada dolaşımı sırasında faktör VIII için bir taşıyıcı görevi gören von Willebrand faktörü ile etkileşime girer. Von Willebrand faktörüne bağlı Faktör VIII, 12-15 saat arasında değişen bir yarı ömre sahip olacaktır. Faktör VIII, trombin ve faktör X tarafından aktive edilir. Her iki proteaz da faktör VIII molekülünü ağır zincirin Arg 372 ve Arg 740 pozisyonlarında ve hafif zincirin Arg 1689 pozisyonlarında parçalar. Bu bölünmeler, A1 ve A3 alanları arasındaki elektrostatik etkileşimler yoluyla ilişkili kalan iki A1-A2 ve A3-C1-C2 parçası ile sonuçlanır. Faktör VIII'in aktivasyonu, von Willebrand faktörüne olan afiniteyi önemli ölçüde azaltır. Aktive edilmiş faktör VIII, aktive edilmiş faktör IX, negatif yüklü membran fosfolipidleri ve kalsiyum iyonları ile birlikte tenaz kompleksini oluşturur, bu da enzimatik olarak faktör X üzerinde etki ederek onu aktif hale getirir. Aktifleştirilmiş faktör X, aktifleştirilmiş faktör V ve kalsiyum iyonları (protrombinaz kompleksi) ile birlikte protrombinin trombine dönüşümüne katılır. Trombin, nihayetinde fibrinojeni fibrine dönüştürecek olan pıhtılaşma zincirindeki anahtar enzimdir. Aktive faktör VIII, pıhtılaşma kademesinde rolünü oynadıktan sonra, bu hızla etkisiz hale gelir. Fizyolojik koşullar altında bu inaktivasyonun kesin mekanizması hala bilinmemektedir. Bununla birlikte, aktive protein C, protein S'nin ve faktör

derlenen büyük miktarda bilgi üretti. Hemofili A hakkında en temsili bilgi bankalarından biri HAMSTeRS'dir.(Wacey, ve diğerleri. 1996)(Hemophilia A Mutasyon Arama Testi ve Kaynak Sitesi). Bu veritabanı, yayınlanmış mutasyonların tam bir listesini, fenotipik verileri, moleküler modelleri, mutasyonları tarama yöntemlerini, polimorfizmlerin bir listesini ve Hemofili A'nın moleküler patolojisinin bir incelemesini sağlar. HAMSTeRS şu anda Hemofili A ile ilişkili ikameleri içeren 1.000'den fazla mutasyonu listeler, gen boyunca dağıtılan silmeler ve eklemeler(Bicocchi ve diğerleri, 2003). Hemofili A ile ilgili moleküler veriler, hastalıkla ilişkili mutasyonların büyük bir heterojenliğini göstermektedir. Bununla birlikte, iki spesifik mutasyon, intron 22'nin inversiyonu ve intron 1'in inversiyonu, şiddetli Hemofili A vakalarının sırasıyla yaklaşık %50 ve %5'inde bulunur. İntron 22'nin inversiyonu, int22h1 dizisi ile F8'in telomerik kısmından önce 400-500 kb'de bulunan ekstragenik kopyalardan biri (int22h2 veya int22h3) arasındaki homolog rekombinasyondan kaynaklanır. Rekombinasyon olayında yer alan ekstragenik kopyaya bağlı olarak, iki ana inversiyon türü tanınır. Tip 1 inversiyon distal kopyayı (int22h3) ve tip 2 inversiyon proksimal kopyayı (int22h2) içerir. Bu inversiyonlar neredeyse sadece erkek mayoz bölünmede meydana gelir. İntron 1'in tersine çevrilmesi, 1'lik bir bölge arasında homolog rekombinasyonu içerir, 041 bp intron 1'de (int1h1) ve ekstragenik bir kopyada (int1h2) C61A ve VBP1 genleri arasında F8'in telomerik bölümünün yaklaşık 140 kb önünde bulunur. int1h1 ve int1h2 dizileri arasındaki benzerlik, aralarında tek bir nükleotit farkı olmak üzere çok yüksektir. Hemofili A'nın moleküler temelleri hakkında büyük miktarda bilgi bulunmasına rağmen, genin analizi için en gelişmiş yaklaşımlar kullanılsa bile moleküler tanısı kurulmamış hastaların yaklaşık %2'lik bir yüzdesi vardır. Bu, kodlamayan bölgelerde bulunan mutasyonlardan veya bu hastaların F8 ile ilişkili mutasyona sahip olmamasından kaynaklanabilir. Diğer genler, örneğin lektin durumunda, mannoz bağlama 1, faktör VIII'in endoplazmik retikulumdan Golgi aygıtına hücre içi taşınmasından sorumlu olan ERGIC53 ve MCFD2 (çoklu pıhtılaşma faktörü eksikliği 2 protein genleri) olarak da bilinir. Bu proteinlerdeki kusurlar, pıhtılaşma faktörleri V ve VIII'in birleşik eksikliğine neden olur.(Mensur 2021).

Birkaç protein dolaşımında faktör VIII ile etkileşime girer. En önemlilerinden biri von Willebrand faktörüdür. Von Willebrand faktörü, hemostazda iki ana rol oynayan multimerik bir glikoproteindir: (I) vasküler yaralanma bölgesinde trombosit yüzeyi ve endotel duvarındaki glikoproteinler arasındaki etkileşim için bir aracı olarak hareket ettiğinde birincil hemostazda yer alır ve (II) faktör VIII taşıyıcı protein olarak hareket ettiğinde sekonder hemostazda yer alır ve yarı ömrünü uzatır. (Eckhardt ve diğerleri, 2014)Sekonder

hemostazdaki rolü göz önüne alındığında, von Willebrand faktör eksikliğinin faktör VIII seviyelerinde ve Hemofili A hastalarında görülenlere benzer klinik koşullarda karşılık gelen bir düşüşle sonuçlandığını anlamak kolaydır. Von Willebrand hastalığının çeşitli klinik alt tiplerinden (Tip 1, 2A, 2B, 2M, 2N), 2N varyantı, von Willebrand faktörü ile faktör VIII arasındaki etkileşimin, o faktörün D' veya D3 alanlarındaki mutasyonlar nedeniyle azalmasından kaynaklanan tek varyanttır.(Dasgupta ve diğerleri., 2007). Bu durum için homozigot veya heterozigot bileşikler, plazmadaki faktör VIII seviyelerinde bir azalma gösterir ve genellikle hemorajik olaylar sunarlar ve sıklıkla yanlışlıkla Hemofili A olarak teşhis edilirler. Bu varyantın analizi, özellikle hastalarda önemlidir. Hemofili A için moleküler analizi F8 mutasyonları için negatif olan (Cormier ve diğerleri, 2020). Diğer genlerdeki mutasyonlarla ilgili olarak belirtilmesi gereken bir diğer konu, Hemofili fenotipini etkileyebilecek faktörlerle ilgilidir. Son araştırmalar, aynı mutasyona sahip ve benzer rezidüel faktör VIII seviyelerine sahip hastalarda bile, hemorajik belirtilerin modelinde farklılıklar olabileceğini göstermiştir. Fenotipik değişkenliğin açıklamaları arasında faktör V Leiden gibi protrombotik mutasyonların varlığı, protrombin genindeki (G20210A), metilentetrahidrofolat redüktaz genindeki mutasyonlar, protein C ve protein S eksikliği ve hatta polimorfizmlerin birlikte kalıtımı pıhtılaşma sistemi. Fenotipik değişkenliği, hastalara infüze edilen faktör VIII'in farmakokinetiğindeki farklılıklarla ilişkilendiren yeni çalışmalar da vardır (Bayat, 2019; Collins ve diğerleri, 2011)

2.9 Hemofili A'nın moleküler tanısı

Aile öyküsü ve hemorajik atakların oluşumu, Hemofili tanısı için ana verilerdir. Bununla birlikte, Hemofili hastalarının yaklaşık %20-30'unun ailesinde hastalık öyküsü yoktur. Hemofilinin laboratuvar teşhisine eklenen moleküler tekniklerin mevcudiyeti, hastalığı moleküler düzeyde karakterize etme olasılığı. Moleküler analiz, DNA veya RNA'yı kullanabilir, ancak birincisi daha fazla stabilitesi ve kullanım kolaylığı nedeniyle daha yaygın olarak kullanılır. DNA analizi için kullanılan yaklaşımlar doğrudan veya dolaylı olabilir. Dolaylı yaklaşımlar, bağlantı analizine dayanır ve spesifik polimorfik belirteçler kullanır. Doğrudan yaklaşımlar, mutasyonun doğru tanımlanmasına izin veren birkaç moleküler tekniğe dayanmaktadır. Ancak, F8'in büyük boyutu, genomik karmaşıklığı ve mutasyonların büyük çeşitliliği zordur. Büyük DNA dizilerini içeren mutasyonlar, yani büyük delesyonlar, eklemeler veya yeniden düzenlemeler Southern blot ile tanımlanabilir. Muhammed, ve diğerleri., 2016). İntron 22 inversiyonunun tespiti için uzun PCR teknikleri(Wacey, ve

diğerleri. 1996)ve daha yakın zamanda, tarafından önerilen bir multipleks PCR tekniğiPeyvandi ve diğerleri, (2006)DNA dizisindeki küçük değişiklikleri içeren mutasyonlar (genel olarak nokta mutasyonları) özel teknik prosedürler gerektirir. Bunun için PCR amplifikasyonu, ardından bir elektroforetik hareketlilik tahlili kullanılır. Genel olarak, bu tahlillerle elde edilen mutasyon saptama oranları oldukça yüksektir ve protokoller uyarlanarak geliştirilmiştir.(Kadir, ve diğerleri.,2020).

2.10 Hemofilinin moleküler tanısının klinik sonuçları

Genel olarak, Hemofili A'nın moleküler karakterizasyonu, hastalığın teşhisi veya tedavisi için gerekli değildir. Hemofili teşhisi klinik olarak şüphelenilir ve F8:C testi yapılarak doğrulur. (Muhammed, ve diğerleri., 2016)Eksik faktör profilaktik olarak veya isteğe bağlı olarak aşılansak tedavi gerçekleştirilir. Bununla birlikte, hemofilinin moleküler teşhisi, durumun mümkün olduğu ancak zorunlu olmadığı durumlarda (taşıyıcı bir kadının kızları) veya hatta daha önce aile öyküsü olmamasına rağmen, taşıyıcıların tanımlanması için oldukça önemlidir. Hastalığı olan bir bireyin hemofili doğumu. Bu durumlarda, özellikle doğurganlık çağındaki kadınlarda taşıyıcılık durumunun belirlenmesi esastır, çünkü kadının aile planlamasına katılmasına ve karar vermesine olanak tanır. Son olarak, Hemofili'nin moleküler teşhisi, hastalığın genetik durumunun doğru bir şekilde belirlenmesine (kalıtsal veya sporadik) izin veren bir genetik danışmanlık / aile oryantasyon programı yapılandırabilir Pinto, ve diğerleri (2012). Bu belirlemeden elde edilen veriler, hastalığın özellikleri, tekrarlama riskleri, genetik aktarım yöntemleri, doğum öncesi ve sonrası teşhis cephaneliği ile psikolojik ve duygusal destek hakkında potansiyel bilgiler sağlar. Hemofilinin moleküler teşhisi, hastalığın genetik durumunun (kalıtsal veya sporadik) kesin olarak belirlenmesine olanak tanıyan bir genetik danışmanlık / aile oryantasyon programının yapılandırılmasına neden olur. Bu tespitten elde edilen veriler, hastalığın özellikleri, tekrarlama riskleri ve genetik geçiş yöntemleri, doğum öncesi ve sonrası teşhis cephaneliği ile psikolojik ve duygusal destek hakkında potansiyel bilgiler sağlar. Hemofilinin moleküler teşhisi, hastalığın genetik durumunun (kalıtsal veya sporadik) kesin olarak belirlenmesine olanak tanıyan bir genetik danışmanlık / aile oryantasyon programının yapılandırılmasına neden olur. Bu belirlemeden elde edilen veriler, hastalığın özellikleri, tekrarlama riskleri ve genetik aktarım yöntemleri, doğum öncesi ve sonrası teşhis cephaneliği ile psikolojik ve duygusal destek hakkında potansiyel bilgiler sağlar.

Hemofilinin moleküler teşhisi, ciddi hastalıklardan etkilenen bireylerin kürtajın yasal olduğu ülkelerde doğum öncesi tanıda pratik öneme sahiptir. Irak'ta bu duruma izin verilmemekte ve bu endikasyon için kullanımını sınırlandırmaktadır. Hemofili A'nın en korkulan komplikasyonlarından biri faktör VIII inhibitörlerinin (alloantikorlar) gelişmesidir.(Jayandharan, ve diğerleri., 2012)hastaların %10-30'unda görülür. İnhibitör hastalar faktör VIII infüzyonuna dirençli hale gelirler, daha sık ve/veya daha şiddetli kanamalar yaşarlar ve daha pahalı ürünlerle tedaviye ihtiyaç duyarlar. Vakaların yaklaşık %95'inde, konsantre infüzyonun ilk 50 günü içinde inhibitör gelişimi meydana gelir. Hemofili'de inhibitörleri yok edebilen tek tedavi, hastayı "tolere etmek" için faktör VIII konsantresinin sık sık infüzyonundan oluşan immüntoleranstır. İnhibitörlerin gelişimini ve mutasyon tiplerini ilişkilendiren çalışmalar, amino asit değişimi ve küçük delesyonlar ile mutasyonların düşük bir inhibitör prevalansı (yaklaşık %5) sergilediğini göstermiştir (AL-Zubaidy, 2014). Buna karşılık, büyük delesyonlar, anlamsız mutasyonlar ve yaygın intron inversiyonu 22, daha yüksek bir inhibitör prevalansı (7-10 kat) (yaklaşık %35) ile ilişkilendirildi.(Jayandharan, ve diğerleri., 2012)Benzer sonuçlar Durisová ve ark.(1998)genotip ve fenotip ve inhibitörlerin gelişimi arasındaki ilişkiyi kurarken. Duyu değişimi mutasyonları olan hastaların, işlevsel olmasa da, eksojen faktör VIII için immünotoleransı indüklemek için yeterli olabilecek endojen faktör VIII'i sentezleyebilmeleri mümkündür. Buna karşılık, ciddi moleküler kusurları olan hastalarda minimal miktarlarda endojen faktör VIII sentezlenir ve bu nedenle eksojen faktör VIII, bir bağışıklık tepkisini tetikleyecek bir yabancı proteini temsil eder⁴⁰. Ayrıca, faktör VIII hafif zincirindeki mutasyonların daha büyük bir risk oluşturduğu görülmektedir. 42 ağır zincirdeki mutasyonlardan daha fazla inhibitör. Hafif/orta dereceli Hemofili A hastalarındaki inhibitörlerin çoğu, A1-A2 alanlarında (482-501 artıkları arasında) ve faktör VIII C1-C2 birleşim yerlerinde duyu değişikliği olan mutasyonlarla birlikte ortaya çıkar. Bu mutasyonlar, muhtemelen proteindeki konformasyonel bir değişikliğin neden olduğu, %50'ye kadar artan inhibitör riski ile ilişkilidir.(Jayandharan ve diğerleri, 2005; Wacey ve diğerleri, 1996). Özellikle bazı mutasyonlar, hafif/orta dereceli Hemofili A: Arg593Cys, Arg210His ve Trp2229Cys'de bir inhibitörün gelişimi ile daha yaygın olarak ilişkilidir. (Bicocchi ve diğerleri, 2003)Hafif/orta dereceli Hemofili A ve inhibitör gelişimi için risk mutasyonları olan hastalarda, faktör VIII konsantresi infüzyonlarını en aza indirmek ve böylece inhibitör geliştirme riskini azaltmak için kanama olaylarının mümkün olduğunda desmopressin ile tedavi edilmesi önerilir. Ayrıca risk mutasyonları karşısında özellikle 50. infüzyona kadar hastanın inhibitör varlığı açısından daha sık test edilmesi önerilir. Yakın tarihli bir çalışma,

hemofili A ve inhibitörü olan, immüntolerans ile tedavi edilen ve büyük F8 delesyonları olan hastaların, diğer mutasyon türlerine kıyasla daha kötü bir yanıtı sahip olduğunu ortaya koydu.(Mensur 2021). Doğal mutasyonların incelenmesi, farklı proteinlerin yapısal-fonksiyonel ilişkilerinin daha net anlaşılmasına yol açabilir. Bu öğrenme, faktör VIII ile ilgili olarak farklı değildir, çünkü birkaç mutasyonun karakterizasyonu, F8-faktör VIII ilişkilerinin daha iyi anlaşılmasına yol açmıştır.(Collins ve diğerleri, 2011; Durisová ve diğerleri, 1998).

Son olarak, hemofili A'nın moleküler teşhisi, genetik danışmanlık için gereklidir. Özellikle daha önce ailede hastalık öyküsü olmayan sporadik vakalarda, yalnızca onunla ilişkili mutasyon bilgisi, taşıyıcı durumu tanıyabilir ve gelecekteki yavrularda hastalığın tekrarlama riskini doğru bir şekilde tahmin edebilir. Ayrıca, genotip bilgisi, inhibitör geliştirme riskinin, muhtemelen immüntoleransın başarısının ve gelecekte gen tedavisinin tahmin edilmesinde avantajlar sağlayabilir. Hastalıktan etkilenen tüm hastalarda Hemofili A'nın moleküler tanısının yapılması önerilir. Gelişmiş ülkelerde test, Irak'ta henüz rutin olmasa da tanı anında tüm Hemofili hastalarına sunulmaktadır.(Kadhim, ve diğerleri., 2019).

Bilim ve teknolojiadaki ilerlemeler, bugüne kadar Hemofili hakkında daha geniş perspektifleri ortaya koymamıza izin veriyor. Bir yandan, hastanın daha iyi bir yönetimi vardır, çünkü genetik kusurun doğasına ilişkin bilgi, ciddi Hemofilide intron 22'ye yapılan yatırımlarla ilişkili inhibitörlerin gelişimi gibi klinik komplikasyon risklerini önemli ölçüde azaltmaya izin verir. A. Öte yandan, prenatal veya preimplantasyon tanı gibi erken tanı stratejileri oluşturmamızı sağlayan taşıyıcıların saptanması için tanı stratejilerine sahip olarak bize önleyici olanak sunmaktadır. Halihazırda, Hemofiliye uygulanan genomik tıbbın katkısı, birincil genetik kusurun, hastaların klinik davranışlarını değiştiriyor gibi görünen diğer genlerle etkileşimini tanımlamayı mümkün kılacaktır.

Kuşkusuz, tüm bu stratejilerin uygulanması, kapsamlı bir Hemofili yönetimi çabalarıyla birlikte gerçekleştirilmelidir. Hemofili eğitimini teşvik etmek için sivil derneklerin organizasyonu ve Hemofili olan popülasyonda en kaliteli teşhis, yönetim ve tedavi stratejilerinin tanımlanmasını mümkün kılacak bir ulusal nüfus sayımının entegrasyonu için hastaların ve ailelerin tam olarak tanımlanması Arap Ülkelerinde özellikle Irak'ta(Abu-Amero ve diğerleri, 2008; Korzeniewski 2006),

2.11 Gerekçe

Hemofili hastalarında F8 veya F9'a karşı inhibitörlerin geliştirilmesi, bu hastaların tedavisini önemli ölçüde tehlikeye atarak bu vakaların morbidite ve mortalitesini artırır. Genetik ve genetik olmayan çeşitli yönleri içeren karmaşık bir mekanizma, bu inhibitörlerin ortaya çıkması ile ilişkilidir. Daha önce açıklanan risk faktörleri arasında, bağışıklık sisteminin belirli yönlerine ek olarak, mevcut F8 veya F9 genindeki mutasyon tipi yer alır. Bu inhibitörlerin çoğu çocukluk döneminde gelişir ve önceki çalışmalarda Irak Hemofili hastaları gibi belirli etnik gruplarda daha büyük bir yatkınlık gözlemlenmiştir. Araplar, Kürtler, Türkmenler ve yerli halkların karışımından oluşan Irak nüfusunun belirli etnik özelliklerini göz önünde bulundurarak, Bu hastalar arasında, inhibitör gelişimine bir şekilde katkıda bulunabilecek genetik ve immünolojik yönlerden de farklılıklar bulmanın mümkün olduğuna inanıyoruz. İnhibitörlerin gelişim mekanizmasında yer alan faktörlerin belirlenmesi çok önemlidir ve bu antikorların ortaya çıkmasını önleme stratejilerinin yanı sıra inhibitörleri olan Hemofili hastalarında immüno-toleransı indüklemeye daha etkili yeni tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir. .

2.12. AMAÇLAR

Bu çalışmada, hemofili A hastalarının ve taşıyıcılarının F8 genindeki değişikliklerin, teşhis konulan hastalar ve kan akrabalarının analizine dayalı olarak moleküler tanımlanması için gerekli metodolojiyi geliştirmeyi amaçlıyoruz.

- Irak'ın farklı bölgelerinden temsili bir popülasyonda inhibitörlerin prevalansının belirlenmesi ve genetik ve genetik olmayan risk faktörlerinin değerlendirilmesi.
- F8 geni için moleküler bir araştırma protokolü oluşturmak.
- Taşıyıcıların dolaylı araştırılması için mikro uydu kullanmanın fizibilitesini analiz etmek.
- Bireyler arasındaki farklılaşmayı tahmin etmek için bir kontrol popülasyonunda oluşturulan protokolü uygulamak.
- Kayıtlı Hemofili hastalarının akrabaları arasında olası Hemofili A geni taşıyıcılarını belirlemek
- Hemofili A ve pozitif Faktör 8 inhibitör testi olan hastalarda haplotip paterni olup olmadığını kontrol etmek. Hastaları izlemek ve tedavi etmek için bir protokol önerin.

- İnhibitörlü ve inhibitörsüz hastalarda dolaşımdaki mononükleer hücrelerin gen ekspresyonu çalışmasına dayalı olarak inhibitörlerin gelişimi ile ilgili yeni genetik yönleri belirlemek.

3. MATERYALLER VE YÖNTEM:

3.1 Hemofili A hastalarının takibi için önerilen protokol.

Zorunlu taşıyıcılar:

- Hemofili hastası bir adamın tüm kızları;
- Hemofilili bir çocuğun annesi Ve hemofili olan en az bir aile üyesi (erkek kardeş, anne tarafından büyükbaba, amca, yeğen veya kuzen);
- Hemofili hastası bir çocuğun annesi ve hemofili genini taşıyan bir aile üyesi (anne, kız kardeş, anneanne, teyze, yeğen, kuzen);
- Hemofili hastası iki veya daha fazla çocuğun annesi veya hemofili A olan bir çocuk ve aynı zamanda hemofili hastası olan kızı.

Olası Taşıyıcılar:

- Tüm taşıyıcı kızları
- Hemofili olan veya hemofili olan diğer aile üyeleri olmayan hemofili olan bir çocuğun annesi
- Kız kardeşler, anneler, anneanne, teyzeler, yeğenler, taşıyıcı kuzenler.

Hariç Tutulan Taşıyıcılar: Ailede baba tarafından hemofili hastası olan ve kendi babasını etkilemeyen kadınlar.

- i. Hastanın ablası varsa taşıyıcılık durumu için de aynı sınıflandırmayı yapın.

ii. Ailedeki diğer kadınlara, anne tarafından, taşıyıcı statüsünün sınıflandırılmasını yapma fırsatı verin.

iii. Tüm Zorunlu Taşıyıcılarda ve Olası Taşıyıcılarda F8'in nicelleştirilmesini gerçekleştirin.

iv. F8 dozu %30'dan azsa, hastayı F8 kantifikasyonuna göre Sağlık Bakanlığı'nın web koagülopatiler sistemine kaydedin:

● < %1 = Şiddetli Hemofili

● %1 ila %5 = Orta Hemofili

● >%5 = Hafif Hemofili

v. F8 kantifikasyonuna göre kanama olasılığı hakkında rehberlik sağlayın.

vi. Doğurganlık çağındaki zorunlu taşıyıcıları genetik danışma servisine yönlendirin.

vii. Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Derneği (ISTH) kanama skorunu doldurun

3.2 Örnek seçimi.

Irak'ta Bağdat Eğitim Hastanesi hematoloji polikliniğinde Hemofili A tanısı konan 35 hasta ailesi takibe alındı. Yaşları (18-35) olan 20 erkek hemofili A hastası takibe alındı. Daha sonra 23-Mart-2021-23-Eylül-2021 döneminde (15-28) yaşlarında 15 kadın hemofili A hastası takip edildi.

Seçilen dahil etme kriterleri:

a) Faktör VIII dozu %40'tan az olan (koagülopatiler yöntemiyle gerçekleştirilen doz) Hemofili -A'lı hastalar;

b) Anne ve anne tarafından kadın akrabalar: Dokuz anne toplamaya gelmemiş ve hastalar çalışmadan çıkarılmıştır. Aile çalışması, hemofili A hastası olan 35 aileden 62 bireyden oluşuyordu. Bunlardan on dokuz aile hasta ve anneden oluşuyordu ve iki ailede iki hasta vardı; etkilenen kişi, annesi ve anne tarafından kan akrabalarından oluşan beş aile; iki aile sadece hasta ve kızlardan oluşuyordu.

Numune toplama ve işleme arasındaki süre 1 saati geçmedi. Tam kan, 15 dakika boyunca 3500 rpm'de, tercihen 4°C'de santrifüjlendi ve plazma ayrıldı ve polipropilen tüplerde (eppendorf tipi) 500 µl'lik kısımlar halinde (en az 3 ve maksimum 5 kısım) saklandı.

Sıvılaştırmadan sonra plazma içeren tüpler hemen -80°C 'de donduruldu. Alternatif olarak, bazı durumlarda tüpün kuru buz ve alkol karışımına daldırılıp daha sonra -80°C 'de saklanarak hızlı dondurma işlemi uygulanmıştır. F8:C ve F9:C dozajının endojen faktöre atıfta bulunmasını sağlamak için, bu F8:C ve F9:C analizi için numunelerin toplanması arasında sırasıyla minimum 15 ve 30 günlük bir süreye saygı duyuldu ve faktör konsantrasyonunun son infüzyonu.

Kontrol Örneği: Irak nüfusunu kontrol etmek için bu çalışmada, tümü Irak Bağdat Üniversitesi İnsan ve Tıbbi Genetik Laboratuvarı'nın (LGHM) örnek veritabanının bir parçası olan 35 erkekler ve kadınlar bireyden DNA örnekleri kullanıldı. Numuneler 1 Nisan 2021'den 31 Ekim 2021'e kadar toplanmıştır.

3.3. Hemofili tipinin doğrulanması ve sınıflandırılması

En fazla, bu çalışma yürütülürken hemostaz ve trombozda kullanılan testlerin laboratuvar yöntemlerine ilişkin kılavuzlar dikkate alınmıştır (Baker ve diğerleri., 2020). F8/F9'un belirlenmesine yönelik testler, her bir faktörden yoksun ticari plazma (sırasıyla Faktör 8 eksik plazma veya Faktör 9 eksik plazma, Sigma-Trinity Biotech®, İrlanda) (Peyvandi ve diğerleri., 2016), kullanılarak fonksiyonel dozajın tek bir aşamada belirlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bir referans standardı (Sigma-Trinity Biotech®, İrlanda) kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi belirlendi. Testler bir MTX koagülometresi (Coag-A-Mate MTX, Biomerieux-USA) kullanılarak yapıldı. Araştırılacak plazma, sadece analiz edilecek faktörde eksik olan plazma ile karıştırıldıktan sonra, pıhtılaşmaya özgü yol faktörlerinin varlığına dayalı olarak fibrin oluşum süresi ile ilgili bir test olan aktive tromboplastin aktivite süresi (APTT) belirlendi. , hangi faktörlerin VIII ve IX parçası olduğu. Her durumda fibrin oluşumu için gereken süre, standart bir kalibrasyon eğrisi ile ilişkilendirilir ve bu şekilde, spesifik faktörün pıhtılaştırıcı aktivitesinin belirlenmesini mümkün kılar. Böylece hemofili şiddeti F9 veya F9'un kalıntı pıhtılaştırıcı aktivitesine göre belirlendi. Dolaşım seviyeleri normalin %1'inden az olan hastalar şiddetli hemofili, %1 ila %5 arasında olan hastalar orta hemofili ve %5 ila %40 arasında olan hastalar hafif hemofili olarak sınıflandırıldı.

3.4. F8 veya F9'a karşı inhibitörlerin varlığını araştırın.

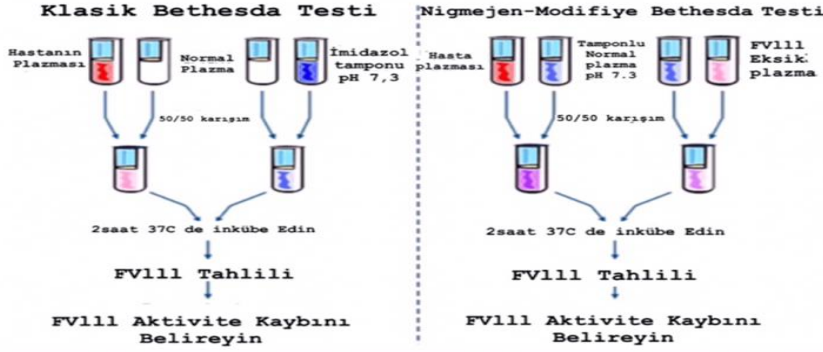
F8 veya F9'un pıhtılaştırıcı aktivitesinin inhibitörlerinin veya nötralize edici antikorların varlığı, 2 saat süreyle 37°C 'de inkübe edilen normal plazma havuzu ile analiz edilecek plazma karışımının test edilmesiyle araştırıldı. Normal plazma havuzunun aynı hacmine sahip

bir numune paralel olarak inkübe edildi ve test için referans olarak kullanıldı. (Castellone and Adcock 2017). APTT, kontrol numunesi ve araştırılacak numuneler üzerinde gerçekleştirilir. İnhibitörlerin varlığında, kontrol numunesine göre APTT'de bir artış gözlenir. Test, inhibitörlerin varlığı açısından pozitif kabul edildiğinde, modifiye Bethesda tekniği kullanılarak inhibitörün teyidi ve miktar tayini (titrasyon) yapıldı (Fan ve diğerleri, 2009).

3.5. Modifiye Bethesda tekniği ile inhibitörlerin miktar tayini.

Bethesda tekniği kullanılarak F8 veya F9'un pıhtılaştırıcı aktivitesine yönelik spesifik inhibitörlerin miktar tayini, (Duncan ve diğerleri., 2013) bir normal plazma havuzu ile analiz edilecek plazmanın seri dilüsyonlarının bir karışımı ile gerçekleştirilmiştir. 37°C'de 2 saatlik inkübasyondan sonra, F8 veya F9'un kalıntı aktivitesi belirlendi. Tanım olarak, bir Bethesda birimi (UB), mevcut F8 veya F9'un aktivitesinin %50'sini inhibe eder. Bu nedenle, en az bir durumda 0,6'nın üzerinde titreye sahip hastalar pozitif inhibitör olarak kabul edildi ve 0,6 UB ile 5 UB arasında inhibitörü olan hastalar düşük titreli inhibitörlü hastalar olarak sınıflandırıldı ve titre 5 UB'den büyük veya ona eşit olduğunda şu şekilde sınıflandırıldı: yüksek titre inhibitörleri olan hastalar. Klasik Bethesda yöntemi ile modifiye edilmiş Bethesda veya Nijmegen tekniği (Matsumoto ve diğerleri, 2002) arasındaki fark, ilkinde, veronal tampon, numuneleri ve normal havuzu seyreltmek için kullanılır ve modifiye edilmiş testte, imidazol, pH 7.4, plazma seyreltmesi için standardize edilmiştir. Kontrol olarak, analiz edilen faktörde veya %4 sığır albümini (BSA) ile plazma eksikliği olan normal plazma havuzununun 1:1 seyreltmesi gerçekleştirilir. Orijinal testi değiştirmenin avantajı, düşük titreleri saptamak için daha yüksek hassasiyet anlamına gelir (Şekil 3.1).

Bethesda Testi



Şekil 8 Klasik Bethesda tekniği ile modifiye veya Nijmegen tekniği arasındaki karşılaştırma şeması (Matsumoto, ve diğerleri., 2002).

3.5.1. Modifiye Bethesda tekniği prosedürü.

Analiz edilecek plazma numuneleri, imidazol tamponu pH 7.4 kullanılarak 1:2; 1:5; 1:10; 1:20 ve 1:40. Aynı zamanda, normal bir plazma havuzu numunesi, burada POOL T olarak adlandırılan imidazol tamponunda 1:1 oranında seyreltildi (Kim, ve diğerleri 2010). Her karışımı içeren numuneler 2 saat 37°C'de inkübe edildi ve ardından her dilüsyonun F8 veya F9'un pıhtılaştırıcı aktivitesi belirlendi. Daha sonra, aşağıdaki formül kullanılarak her karışımın kalıntı faktörünün hesaplanması yapıldı:

$$\text{Artık faktör aktivitesi (\%)} = \frac{\text{atividade do fator de cada mistura} \times 100}{\text{KONTROL faktör aktivitesi}}$$

Artık aktivite bulunduğunda, %25 ile %75 arasındaki dilüsyonları dikkate aldık. Bir Di-log grafiği kullanılarak, 1 UB/ml plazmaya karşılık gelen %50 kalıntı aktiviteye eşdeğer noktayı bulmak için bir eğri çizildi.

3.6. İnhibitör varlığının tespit edildiği durumlarda ilgili IgG alt sınıflarının ELISA tekniği kullanılarak karakterizasyonu.

F8 veya F9'a karşı spesifik antikorların karakterizasyonu, Hofbauer ve ark. (2014), ELISA (enzim bağlantılı immünosorbent tahlili) tekniğine dayalıdır. Analiz edilen her bir antikor alt sınıfı için ayrı ayrı üç farklı ticari plazmadan türetilmiş insan faktörü VIII konsantresi kullanılarak üç farklı deney gerçekleştirilmiştir: a) F8 Octavi SD Optimun konsantresi

(Octapharma-Fransa); b) F8 8Y konsantresi (Bio Products Laboratory-UK) ve c) F8 Hemofili konsantresi (Baxter Healthcare Corporation-ABD).

Kullanılan ELISA tekniği, bir mikropolanın (96 kuyu) 0.05 M sodyum karbonat tamponu, pH 9.6 içinde 51 U/mL nihai konsantrasyonda 100 uL saflaştırılmış faktör VIII konsantresi ile 4°C'de 24 saat inkübe edilmesinden oluşur. İnkübasyon süresinden sonra plaka, 0.01 M fosfat tamponlu salin (PBS: 0.137 M NaCl, 2.68 mM KCl, 6.8 mM Na₂HPO₄ ve 70.74 mM KH₂PO₄), pH 7.4 ve %0.5 içinde %3 sığır albümini içeren bir çözelti ile bloke edildi. Tween 20 (Sigma-ABD). Plaka, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve ardından PBS ve %0.5 Tween 20 (kuyu başına 250 uL) ile 3 yıkama yapıldı. İnhibitör varlığı için pozitif 50 uL hasta plazması, PBS içinde 1:10 ile 1:1000 arasında seri seyreltmede eklenmiştir. 1 saatlik inkübasyondan sonra plaka 4 kez PBS ile yıkandı. O zamanlar, AP (alkalin-fosfataz) ile konjuge edilmiş 100 uL ikincil anti-insan monoklonal antikoru ilave edildi ve deneyler, %3 sığır albümini içeren 50 mM/L Tris-salin tamponu içinde seyreltilmiş her bir antikor alt sınıfı için ayrı ayrı yapıldı. , oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Daha sonra, %0.5 Tween 20 içeren PBS tamponu ile dört yıkama yapıldı. Daha sonra, 0,09 M dietanolamin tamponu içinde seyreltilmiş alkalın fosfataz için kullanılan substrat (p-nitrofenil fosfat; Zymed®, ABD) ilave edildi, pH 9,8, 0.05 mM MgCl₂ içeren , ardından oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra reaksiyonu engellemek için 3M H₂SO₄ solüsyonu eklendi. Plaka daha sonra analiz edildi ve bir mikropolaka okuyucuda 405 nm dalga boyunda okundu. Sonuçlar, seyreltmelere göre verilen reaktivite yoğunluğu ile her analizde elde edilen en yüksek yoğunluğa göre değerlendirildi: + 1:10; ++ 1:40; +++ 1:80 ve ++++ 1:320, ++++ ile negatif numune arasında değişir (negatif kontrole eşit veya daha az: boş).

3.7. Hemofili ile ilgili moleküler değişikliklerin tanımlanması.

Hemofili ile ilişkili moleküler değişimin tanımlanması, tipine (hemofili A veya B) ve sınıflandırmasına (hafif, orta veya şiddetli) göre farklı stratejilere bölünmüştür.

3.7.1. Hemofili A ile ilişkili mutasyonları tespit etme stratejisi.

Hemofili A teşhisi konan vakalarla ilişkili moleküler değişiklikleri belirlemek için aşağıdaki strateji izlendi. Şiddetli (F8:C < %1) olarak sınıflandırılan hemofili A vakalarının yaklaşık %40'ı, faktör VIII geninin intron 22'sinin inversiyonuna yol açan moleküler bir yeniden düzenlemeden kaynaklanmaktadır. Matsumoto, et al. (2002), şiddetli hemofili A hastalarının

yaklaşık %5'ini etkileyen faktör VIII geninin ikinci bir intron 1 dizi inversiyonunu tanımladı. Bu nedenle, şiddetli hemofili A hastalarında, bu iki yeniden düzenleme başlangıçta araştırıldı, yani INV-22 ve faktör VIII geninin INV-1'i.

3.7.2 DNA ekstraksiyonu

Mevcut araştırmanın tüm numunelerinde (kasuistry'den 63 numune ve Bağdat'tan 32 kontrol numunesi), Aziz ve diğerlerine göre DNA, fenol-kloroform ile geleneksel yöntemle ekstrakte edildi. (2017) DNA Sambrook et al., 1989. ekstraksiyonundan sonra numuneler NanoDrop ND-1000 ekipmanında (NanoDrop Technologies - ABD) ölçüldü.

3.7.2.1. Faktör VIII geninin intron 22 inversiyonunun tespiti.

INV-22'nin araştırılması için laboratuvarımızda üç farklı teknik standardize edilmiştir: Southern blot; alt döngü-PCR analizi (S-PCR) ve ters PCR tekniği (I-PCR). İlk seçenek olarak kullanılan I-PCR (Abdulqader ve diğerleri., 2020; Rossetti ve diğerleri., 2008). tekniğinin kesin olmadığı bazı durumlarda, bu mutasyonun varlığını veya yokluğunu doğrulamak için diğer tekniklerden biri uygulandı.

3.7.2.2. Southern blot tekniği ile faktör VIII geninin intron 22 inversiyonunun tespiti.

INV-22'nin saptanması için açıklanan ilk teknik, genomik DNA'nın kısıtlama enzimi Bcl I tarafından sindirilmesine ve ardından Int22h1'e (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu - ATCC, Rockville) karşılık gelen p482.6 probu kullanılarak Southern blot analizine(Southern 1975) dayanmaktadır. , MD ABD). Bu tekniğin daha zahmetli olduğu ve sonucun daha uzun sürdüğü için, sadece intron 22'nin inversiyonunun S-PCR veya I-PCR yöntemleri ile analiz edilmesinin mümkün olmadığı durumlarda kullandık.

3.7.2.3. Araştırılacak genomik DNA'nın sindirimi.

Aranacak genomik DNA (10 ug), 10 mM Tris-HCl tamponu, pH 7.5, %50 gliserol, 50 mM KCl, 1 mM DTT, EDTA 0.1 mM içinde 50 IU kısıtlama enzimi Bcl I ile sindirildi., 55 °C'de 16 saat süreyle. (Sambrook ve diğerleri., 1989). İnkübasyondan sonra genomik DNA, 7 M amonyum asetat ve mutlak etanol ile tekrar çökeltilerek konsantre edildi.

3.7.2.4. Güney lekesi

DNA sindirimi ürünleri, %0,6 agaroz jel üzerinde, 7x15 cm boyutunda ve 5 mm kalınlığında, TAE tamponunda ve 48 saat boyunca 40 V sabit voltajda elektroforez ile ayrıldı. Jel ile ayrılmış DNA, pozitif yüklü naylon membran yan yana yerleştirilmiş bir tabakaya (Hybondtm -N+, Amersham Life Science, İsveç) aktarıldı. Transfer, alkalın bir yöntem kullanılarak yapıldı. Jel 10 dakika 250 mL 0.25 N HCl içinde inkübe edildi ve bu sürenin ardından jel distile su ile yıkandı ve 30 dakika denatüre edici bir çözelti (0.4 N NaOH ve 1 M NaCl) içine yerleştirildi. Bir rezervuarın içine bir platform monte edildi ve bunun üzerine transfer solüsyonuyla (1.5 M NaCl, 0.25 N NaOH) doyurulmuş bir Whatman 3MM kağıt köprüsü (uygun boyutta kesilmiş 3 yaprak) yerleştirildi. Jel boyutunda bir zar (Hybond N) kesildi ve zar jelin üzerine yerleştirildi. Transfer solüsyonunda nemlendirilmiş üç adet 3MM yaprak artı yaklaşık 5 cm yüksekliğinde bir çimlenme kağıdı yığını zarın üzerine yerleştirildi. Rezervuar transfer solüsyonu ile dolduruldu. Çimlenen kağıt yığınının üzerine 20 x 25 cm jeller için yaklaşık 0,5 – 0,7 kg ağırlık yerleştirildi. Transfer 16 ila 24 saat arasında gerçekleşti. Membran, 0.2 M Tris kullanım solüsyonu, pH 7.5, 20 x SSC (3 M NaCl, 3 mM sodyum sitrat) içinde yıkanarak nötralize edildi. DNA, 7 M amonyum asetat ve mutlak etanol ile 2 saat yeniden çökeltme için 80°C'de ısıtılarak zara F9 edildi. 20 x 25 cm jeller için yaklaşık 0,5 – 0,7 kg ağırlık yerleştirildi. Transfer 16 ila 24 saat arasında gerçekleşti. Membran, 0.2 M Tris kullanım solüsyonu, pH 7.5, 20 x SSC (3 M NaCl, 3 mM sodyum sitrat) içinde yıkanarak nötralize edildi. DNA, 7 M amonyum asetat ve mutlak etanol ile 2 saat yeniden çökeltme için 80°C'de ısıtılarak zara F9 edildi. 20 x 25 cm jeller için yaklaşık 0,5 – 0,7 kg ağırlık yerleştirildi. Transfer 16 ila 24 saat arasında gerçekleşti. Membran, 0.2 M Tris kullanım solüsyonu, pH 7.5, 20 x SSC (3 M NaCl, 3 mM sodyum sitrat) içinde yıkanarak nötralize edildi. DNA, 7 M amonyum asetat ve mutlak etanol ile 2 saat yeniden çökeltme için 80°C'de ısıtılarak zara F9 edildi.

3.7.2.4. Faktör VIII geninin intron 1 inversiyonunun tespiti.

İntron 1 inversiyonu için analiz, iki PCR reaksiyonu kullanılarak yapıldı (Matsumoto, ve diğerleri, 2002). Bu teknik, hızlı ve basitleştirilmiş olma avantajına sahiptir. kullanılan primerleri listeler.

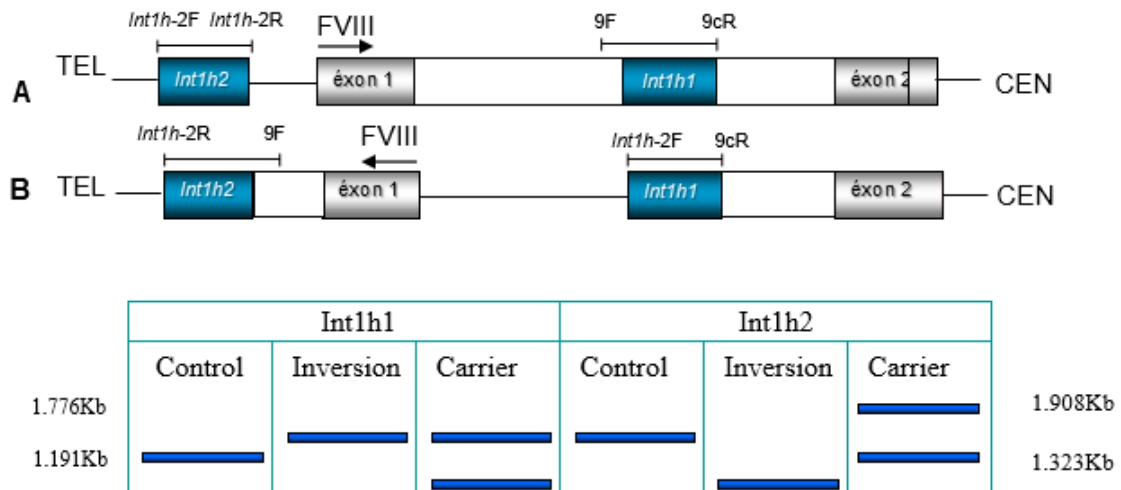
Çizelge 3 İntron 1 inversiyonunun analizi için primerler.

Primerler	5-Sequence -3'
9cR	CGA GGT TGA GAT CTC TAT CG
9F	GTT GTT GGG AAT GGT TGC TG
Int1h-2F	GCC AGG CCC CTT GTT GCT ACA
Int1h-2R	TCG GCG ATA TCA GCT GCT GAGG

100 ng genomik DNA'dan PCR reaksiyonları, 25µL reaksiyon içeren: 2.5µL Taq polimeraz enzim tamponu (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) 1.5 mM MgCl₂; %5 DMSO; her dNTP'den 0.5 mM; 2.5 U Taq polimeraz enzimi ve her bir primerden 0.2 mM:

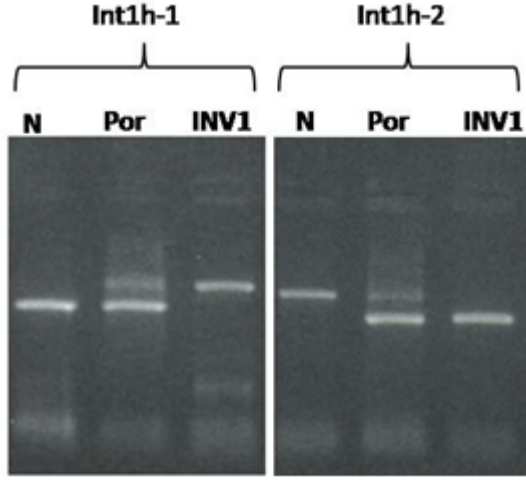
- Int1h-1: 9F + 9cR + int1h-2F primerleri
- Int1h-2: int1h-2F + int1h-2R + 9F primerleri

94°C'de 2 dakikalık denatürasyondan sonra, reaksiyon 30 döngü ile sağlandı: 94°C 30", 65°C 30" için, 72°C 120" için. Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te gösterildiği gibi, intron 1 inversiyonunun varlığı, Int1h-1 primerlerinin varlığında 1.323 Kb'lik ve Int1h-2 primerlerinin varlığında 1.776 Kb'lik bir bant oluşturur.



Şekil 9 Faktör VIII geninin intron 1 inversiyonunun temsili. Normal diyagram (A) ve intron 1 inversiyonu (B) varlığında. Int1h-1'in (9F+ 9cR + int1h-2F) amplifikasyonu, normal

kontrolde 1.191 kb'lik bir bant ve inversiyon varlığında 1.776 kb'lik bir bant oluştu.(Kaynak yazarı)



Şekil 10 Faktör VIII geninin intron 1 inversiyonunun tespiti. %0.6 agaroz jel elektroforezi, burada intron 1 inversiyonunun varlığı 1.776 Kb(Int1h-1) ve 1.323Kb(Int1h-2) bantlarının varlığı ile teyit edilebilir; intron 1 inversiyonu (INV1) olan hastalardan ve faktör VIII geninin (Por) intron 1 inversiyonu olan hastalardan alınan numunelerde gözlemlendiği gibi 1.191 Kb(Int1h-1) ve 1.908(Int1h-2) bantlarının yokluğu. N, normal kontrol.

[https://www.umbjournal.org/article/S0301-5629\(07\)00464-4/fulltext](https://www.umbjournal.org/article/S0301-5629(07)00464-4/fulltext)

3.7.3 Faktör VIII geninin otomatik dizilenmesiyle hemofili A ile ilişkili mutasyonun belirlenmesi.

İntron 22 ve intron 1 inversiyonları için negatif sonuçları olan şiddetli hemofili hastaları ve tüm orta ve hafif hemofili A vakaları için faktör VIII geninin spesifik bölgeleri otomatik dizileme ile değerlendirildi. Bu durumda, PCR ürünleri lökositlerden izole edilen 100 ng genomik DNA'dan aşağıdaki karışımla gerçekleştirilir: 25µL Taq polimeraz enzim tamponu; 1.5 mM MgCl₂; her dGTP'den 0.5 mM; 2.5 U Taq polimeraz enzimi ve Tablo 3.2'de açıklandığı gibi her primerden 0.2 mM. DNA'nın spesifik bölgelerinin PCR tekniği ile amplifikasyonundan sonra, 50 µL amplifiye edilmiş ürün, bir GFX PCR kiti DNA ve Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, İngiltere, Birleşik Krallık) kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan ürün, amplifiye edilen ürünün konsantrasyonunu değerlendirmek

için kantitasyon işaretçisi (Low DNA Mass Ladder, California, ABD) ile bir agaroz jeli üzerinde ölçülmüştür. Ardından, sıralama reaksiyonu, otomatik bir sıralayıcıda (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Perkin) müteakip elektroforez için üreticinin talimatlarına göre Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystem, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Elmer Uygulamalı Biyosistem, CA, (Sanger 1977; Smith et al., 1986).

3.7.4. F8 geni haplotiplerinin sıklığı

Viel ve diğerleri tarafından tarif edildiği gibi F8'in H1, H2, H3, H4, H5 ve H6 haplotiplerini belirleyen F8 geni SNP'leri R484H, R776G, M208V ve D1241E için genotiplendirme. (VIEL ve diğerleri, 2007), F8 genomik DNA'nın doğrudan dizilenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerler Tablo 3.2'de açıklananlarla aynıydı, yani: ekson 10 (R484H), ekson 14 (R776G ve D1241E) ve (M208V).

Çizelge 4 Faktör VIII gen dizilimi için primerlerin listesi

Exon	1-5-Sequence -3'	Fragment (pb)	² T. °C	Exon	1-5-Sequence -3'	Fragment (pb)	² T. °C
1	GCTCCTGTTCACTTTGA CTT	608	56	14A	GAGAACCTCTAACAGAA CGT	1252	56
	AGCATCCACAACCATCC TAAC				CTGTTGGACCATTTC TGT		
2	TGAAGTGTCACCAAAA TGA	207	56	14B	ATGCTACAGCTTTGAGG CTA	1085	56

	TACCCAATTTTCATAAAT AGC				AGATGAGAAGAGTTGTC TTG		
3	GTACTATCCCCAAGTAA CCT TATTCATAGAATGACAG GAC	208		5614C	ATTGCAAAGGTATCATC ATT AGCAGAGCAAAGGAAT AACC	1029	56
4	ACAGTGGATATAGAAAG GAC TGCTTATTTTCATCTCAA TCC	295		5615-18	CACCTAGGAAAAATGAG GATG AGTGGGAATACATTATA GTC	314	56
5	CTCCTAGIGACAATTTTC CTA AGCAGAGGATTTCTTTC AGG	187		5619	AGCATCCATCTTCTGTA CCA TTGCACGTAGGATAAAT ATC	456	56
6	CATGAGACACCATGCTT AGC CTGGTGCTGAATTTGGA AGA	220		5620-22	AATCCACTCTGGTTCAT AGG ACTGATTGTGTTCCCAG TGC	778	56
7	TCAGATTCTCTACTTCA TAG GAAACTGTGCAAGGTCC ATC	225		5623	GCTGAGTAGGTAGGGA ACCT GCAAGCACTTTGCATTT GAG	197	56
8	CTCTGGTATAGGACAGC CTA AGAGAGGTACAATAGTC AAA	356		5624-27	TTGTGCACTCTAGTTAC TGT ATAATCAGCCCAGGTTC TTG	155	56
9	AGAGTTGGATTTGAGCC TAC CAGACTTTTTCTTCTTA CCT	284		5628	GACTAACCCAGCTGAAT TTA GAGTGAATGTGATACAT TTC	181	56
10	AGCCTCAAATTAATA ATG ACTTTAGACTGGAGCTT	347		58+DM SO 29	TCAGGAGGTAGCACATA CAT GTCCAATATCTGAAATC	288	56

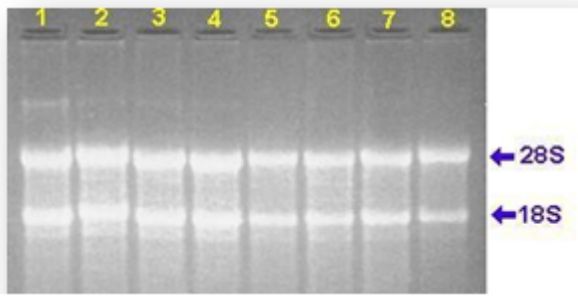
	GAG				TGC		
11	CATGATTATCAATATGT GGC	334	56	30	CTCTGTATTCACTTTCC ATG	214	56
	GGATCCGACATACACTG AGA				GATATTGGATGACTTGG CAC		
12	CTAGCTCCTACCTGACA ACA	283	56	31	GCTCAGTATAACTGAGG CTG	249	56
	GACATCACTTIGATTAC ATC				CTCTGAGTCAGTTAAAC AGT		
13	ACTGGAAACAAC TAGAA GTG	368	56	32	GAATTTCTGGGAGTAAA TGG	322	57+DM SO
	TTAGCACAAAGGTAGAA GGC				GCTTACCTTTACTTTGC CAT		

1. Arruda et al. (1995); 2. Hibridizasyon sıcaklığı.

3.8. Dolaşımdaki mononükleer hücrelerden RNA ekstraksiyonu

RNAlater RNA Stabilizasyon Reaktif® (QIAGEN) reaktifinde süspanse edilen mononükleer hücreler tarafından oluşturulan solüsyon, 5 dakika 2.000 rpm'de santrifüjlendi ve reaktif çıkarıldı. Oluşan hücre peleti daha sonra RNeasy® Kiti (QIAGEN, ABD) (Tavares ve diğerleri., 2011).tarafından RNA ekstraksiyonu için kullanıldı. Bu kit, hücre bozulmasını destekleyen guanidin izotiyosiyanat içeren bir tampon solüsyonunun kullanımına ve ardından RNA'nın bir silika jel membranına seçici bir şekilde bağlanması için koşulları destekleyen etanolün eklenmesine dayanmaktadır. RNA membrana bağlandığında, yüksek oranda saflaştırılmış RNA'yı geri kazanmak için RNase içermeyen su ile elüsyon yeterlidir. RNA konsantrasyonu, NanoDrop® ND-1000 UV-Vis cihazında (NanoDrop Technologies, ABD) standart bir değer olan 1 ABS 260nm = 40 ile belirlendi.µg/ml RNA ve 1.8-2.1 aralığında olması gereken ABS 260/280nm oranına göre saflık derecesi. RNA kalitesi, (Aranda ve diğerleri., 2012) denatüre edici ajan formaldehit içeren agaroz jelde elektroforez ile doğrulandı, böylece ikincil yapıların etkisi ortadan kaldırıldı. RNA numunesi, %6.5 formaldehit, %50 deiyonize formamid, %5 Ficoll-Paque Plus içeren bir tampon solüsyonunda seyreltildi ve sonra jele yüklendi. Elektroforez, olası RNA bozunmasını önlemek için önceden %3 H2O2 ile muamele edilmiş bir kap içinde 0.1M 3-(n-morfolino) propan sülfonik

asit (MOPS), 0.05M EDTA, pH 8.0 ve 0.3M CH₃COONa içeren çalışan bir tampon ile gerçekleştirildi. Bir ultraviyole translüminatör üzerinde görüntülenen jel, RNA'nın kalitesini göstermek için çok farklı 18S ve 28S bantlarına sahip olmalıdır (Şekil 3.5).



Şekil 11 Çıkarılan RNA'nın kalite analizi. Formaldehit denatüre edici ajan ile %0.8 agaroz jel elektroforezi. 18S ve 28S bantlarını gösteren 1-8 arası hastalardan örnekler <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214514117300156>

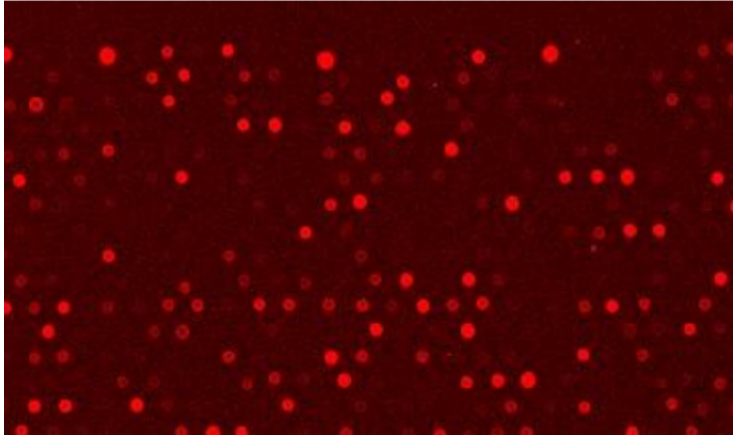
3.9. CodeLink biyolojik dizileri

Birkaç genin aynı anda taranması için GenBank, Unigene ve RefSeq'de depolanan insan genlerinden türetilen 55.000 oligonükleotitten oluşan CodeLink Human Whole Genome Bioarrays platformu (Amersham Biosciences Piscataway, ABD) (Wu et al., 2005) kullanıldı. Her slaytta ayrıca pozitif kontroller olarak 380 negatif ve 360 bakteri dizisi bulunur. Seçilen her hasta için, bir prob olarak tam kandan mononükleer hücrelerden ekstrakte edilen RNA kullanılarak bir biyodizi hibridize edildi. Hibridizasyondan sonra biyodiziler, GenePix Pro programı (Molecular Devices, ABD) ve CodeLink tarafından tarandı ve analiz edildi.

3.9.1. Biyolojik dizilerin taranması.

Biyodiziler, üretici tarafından belirlenen parametreler (dalga boyu: 635 nm; PMT voltajı: 600 V; lazer gücü: %100; piksel boyutu: 5) (Saal ve diğerleri., 2002) izlenerek bir GenePix 4.000B tarayıcıda (Molecular Devices, ABD) tarandı.µm ve konum konumu 0µm). Her noktanın yoğunluğu tarafından üretilen veriler GenePix Pro programı (Molecular Devices, ABD) tarafından toplandı (Şekil 3.6). Toplamadan sonra program, düzensiz noktaları otomatik olarak geçersiz kıldı. CodeLink programı, medyanla ilgili olarak sonuçları normalleştirdi ve pozitif ve negatif kontrolleri analiz ederek, beklenen sonuçları verip vermediklerini doğruladı. Üretici, tam genom biyodizileri için L noktası (arka plana yakın)

sayısının toplam değerin %30 ila %60'ı arasında olmasını ve C (kontamine), I (düzensiz) ve S (doymuş) noktalarının sayısının olmasını tavsiye eder. %1'den az olmalıdır.



Şekil 12 Taramadan sonra biyo-tahlillerden elde edilen kısmi görüntü.(Zimmerman,2013)

3.10. Kantitatif gerçek zamanlı PCR tekniği (RT-PCR) ile gen ekspresyonunun analizi

Gen ekspresyonunun değerlendirilmesi için kantitatif real-time PCR (RT-PCR) yöntemi kullanılmaktadır. İfadenin göreceli olduğu söylenir çünkü aynı zamanda beta-aktin ve GAPDH (gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz) gibi endojen kontrollerin ifadesini de hesaba katar. Teknik, PCR reaksiyonu (Goodeve, 2008) sırasında yayılan flüoresansın, yeni sentezlenmiş şeride spesifik bir prob veya bir boya bağlayarak optik olarak izlenmesinden oluşur.

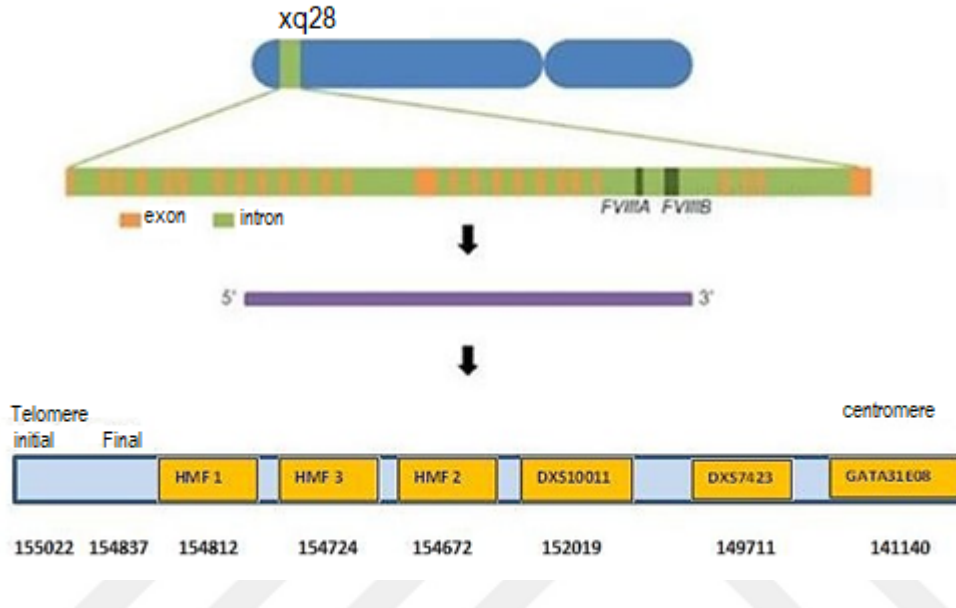
3.10.1. RT-PCR tekniği ile onay için ilgilenilen genlerin seçimi

Biyolojik diziler ile elde edilen tarama sonuçlarına ve daha önce inhibitör gelişimi için daha yüksek bir riskle ilişkili olarak tanımlanan genlere dayanarak (Hwang ve diğerleri, 2008), ekspresyon yoğunluğu ile ilgili değerlendirme için genler seçildi. Bunun için RT-PCR tekniği kullanıldı.

3.11 İşaretleyici Seçimi

Mevcut çalışmada, seçilen belirteçler STR'ler (Kısa Tandem Tekrarları - seri halinde tekrarlanan küçük DNA dizileri) olarak adlandırılanlardır. STR belirteçleri, farklı bireyler arasında daha fazla ayırım gücü sağlayan yüksek sayıda alel içerir. Özellikle işin amacı bir popülasyondaki farklı bireylere karşı ayrımcılık yapmak olduğunda kullanılırlar ve genellikle Babalık Soruşturma testlerinde ve adli amaçlarla kişisel kimlik testlerinde kullanılırlar.

İlk olarak, F8 geni (GAA1N21, GT1N24) içinde ve o genin 3' bölgesinde (CTT3, TAAA2 ve TTTA3) bulunan beş farklı STR seçildi. Ancak, GAA1N21, GT1N24 STR'leri bu çalışma için doğrulanmamıştır. Bu iki belirteç, araştırılan genden biraz daha uzak bölgelerde bulunan ve haplotipin ayırt etme gücünü artırmayı amaçlayan X kromozomu çalışmalarında yaygın olarak kullanılan diğer üç STR ile değiştirildi: DXS 10011, DXS 7423, GATA31E08.. Bu işaretleyicilerin fiziksel konumlarının bir şeması şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 13 Altı STR'nin X kromozomu üzerindeki konumunun şematik gösterimi (Zimmerman,2013)

Daha pratik olarak, işaretçiler şu şekilde yeniden adlandırıldı: CTT3 işaretleri HMF-01, TAAA3 HMF-03 ve TTTA3 HMF-02 olarak. İki bitişik işaretleyici (DXS 7423 ve GATA31E08) arasındaki en uzun mesafe 8,57 Kb (Kilobazlar) ve en kısa mesafe (CTT3 ve TAAA3) (Shrestha et al., 2016) 52 Kb'dir. İki uç işaretçi arasındaki mesafe 13.673 Kb'dir (TTTA3 ve GATA 31E08). Seçilen işaretleyicilerin tümü yüksek değişkenliğe sahiptir. Bu belirteçlerin ortalama heterozigotluğu %70 (0.7) civarındadır. Bu, popülasyonda aynı haplotipe sahip iki erkek (ilgisiz) bulma şansının %1'den az olduğu ve aynı genotipe sahip iki kadın bulma şansının 0.0001'den az olduğu anlamına gelir. Toplanan verilerden, bu belirteçlerin değişkenliğinin, mutasyon için heterozigot kadınları güvenli bir şekilde tanımlamayı mümkün kılacağı sonucunu çıkarmak mümkündür.

3.12. Astar Seçimi

İşaretleyicileri seçtikten sonra, burada kullanılan primerler, altı işaretçinin tek bir sıcaklıkta ortak amplifikasyonunu garanti etmek için Primer (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) programı kullanılarak tasarlandı. 60°C tavlama. Bu program, belirli tavlama sıcaklıklarını, başlatıcıların uzunluğunu, GC içeriğini (Guanine ve Sitozin) ve amplifikasyon ürünlerinin boyutunu seçmenizi sağlar. Primerleri seçtikten sonra, seçilen primerler arasında ikincil yapılar veya dimerler oluşturma olasılıklarını test etmek için Autodimer yazılımı 59] kullanıldı. İnsan genomunun diğer bölgelerinde olası nonspesifik çınlama oluşumunu doğrulamak için primer seti BLAT programında test edildi (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). (Stephen et al., 1997). Multipleks PCR'yi optimize etmek için, flüoresan moleküller (6FAM, HEX ve NED), sırasıyla mavi, yeşil ve sarı olarak seçilen her işaretçinin primerlerinden birine 5' pozisyonuna yerleştirildi. Bu dikkatli seçimden sonra Tablo 3.3'te açıklanan primer dizileri seçildi. Aşağıdaki tablo incelenecek olan belirteçlerin verilerini göstermektedir. Veriler, primerlerin dizilerini, X kromozomu üzerindeki belirteçlerin konumunu ve her bir belirteç için amplifiye edilmiş dizinin boyutunu içerir.

Çizelge 5 Kullanılan Primerler ve X kromozomu üzerindeki konumu ile çalışılan polimorfizmler

Polymorphism	Primer	Position
CTT3 (Haemophilia 1)	5'GCTCCTTTGATTGGATAATTTCA3'	267pb
	5'ATTCCTCAACATCAGAATAGACC3'	180pb
TAAA3 (Haemophilia 3)	5'CAGTATGTGGAGGTTGCAGTTAG3'	185pb
	5'GTTTCCCCAAGGCAAGTGATG3'	368pb
TTTA3 (Haemophilia 2)	5'GTCATGTGAGTAGAGGGATGACT3'	211pb
	5'GGCAAATCTCCCTCCCATTTCTA3'	229pb
DXS10011	5'AGAGGTATGCTGGAGAATTGCC3'	Position
	5'TCCCAGCTACTTGGGAGACTAA3'	267pb
DXS 7423	5'GTCTTCCTGTCATCTCCCAAC3'	180pb
	5'TAGCTTAGCGCCTGGCACATA3'	185pb
GATA31E08	5'GCAAGGGGAGAAGGCTAGAA3'	368pb

	5'TCAGCTGACAGAGCACAGAGA3'	211pb
--	----------------------------------	--------------

3.13 Multiplex PCR Optimizasyonu

Burada incelenen her bir işaretçi, seçilen primerin özgülüğünü test etmek için başlangıçta tek başına amplifiye edildi. Bu PCR'de aşağıdaki ürünler kullanılmıştır: 5 µL QIAGEN® Multiplex PCR Kiti; 1 µL Q-çözültisi; 1 µL astar karışımı (İleri + Geri - her astar için 2 µM); 1 µL DNA (5 ila 10 nanogram) ve 2 µL su. Amplifikasyon reaksiyonları, Veriti-96 termal döngüleyici Well Thermal Cycler'da (Life Technologies, CA ve ABD) aşağıdaki döngü koşulları altında gerçekleştirildi:

İlk denatürasyon - 95 °C 15 dakika Denatürasyon - 94 °C 30 saniye Zil sesi - 60 °C 90 saniye Uzatma - 72 °C 60 saniye Son uzatma - 72 °C 30 dakika. Amplifiye edilen ürün, %2 agaroz jel üzerinde elektroforez ile görselleştirildi. Her primer çiftinin mükemmel bir şekilde amplifiye olduğunu doğruladıktan sonra, seçilen altı markörü birlikte amplifiye etmek için testler yapıldı. Bu adımda, en iyi sistem performansı için her bir primer çiftinin ideal konsantrasyonu belirlendi (bu konsantrasyonlar tablo 6'da gösterilmektedir), bu da 10 µM kullanım solüsyonunu oluşturmak için gereken primer miktarını ortaya koyuyor. Her PCR reaksiyonu için, aşağıda açıklandığı gibi 1µL kullanım solüsyonu kullanıldı.

Çizelge 6 Astar karışımı

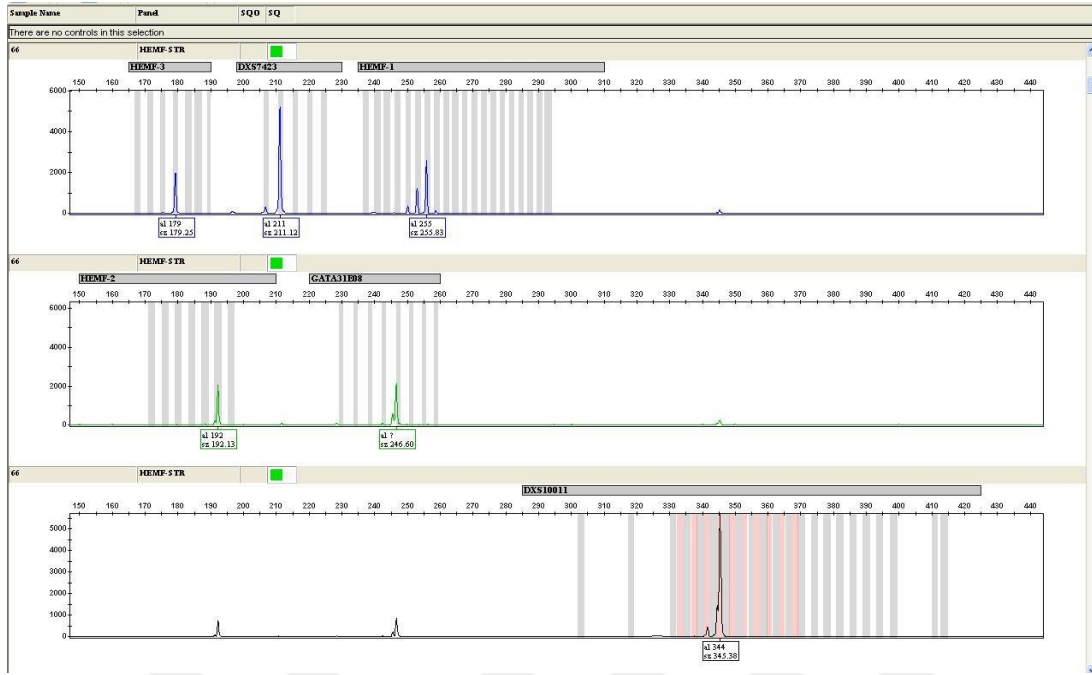
Primer	Forward µL	Reverse MI
HEMF 1	19.2	19.2
HEMF 2	14.4	14.4
HEMF 3	14.4	14.4
DXS 10011	48	48
DXS 7423	7.2	7.2
GATA 31E08	9.6	9.6
TOTAL 225.6 µL		

Multiplex PCR için, her reaktifin hacmi, bireysel PCR için açıklananla aynıydı. Bununla birlikte, döngü koşulları aşağıda gösterildiği gibi değiştirilmiştir: İlk denatürasyon - 15 dakika

için 95 °C Denatürasyon - 30 saniye için 94 °C Çalma - 90 saniye için 60 °C Uzatma - 60 saniye için 72 °C Denatürasyon - 94 ° 30 saniye için C Zil - 90 saniye için 58 ° C, Uzatma - 60 saniye için 72 ° C Son uzatma - 60 dakika için 72 ° C.

3.14 Multiplex PCR Ürünlerinin Tespiti ve Analizi

Multipleks PCR'nin ürünleri ayrılmış ve ABI 3130 Genetic Analyzer'da (Applied Biosystems) kılcal elektroforez vasıtasıyla analiz edilmiştir. Amplifiye edilmiş ürünlerin tanımlanması için, primerleri işaretlemek için kullanılan 6FAM (mavi), HEX (yeşil), NED (sarı) ve LIZ (turuncu) floroforlarının tanımlanmasına özel olan sanal filtre matrisi G5 kullanıldı. Kapiler elektroforez için numuneler 8.7 µL Hi-Di formamid (Applied Biosystems), moleküler ağırlık standardı olarak 0.3 µL GS-500 LIX ve 1.0 µL PCR ürünü ile hazırlandı. Kapiler elektroforezden sonra numuneler GeneMapper® 3.7 yazılımı (Applied Biosystems) kullanılarak analiz edildi. Bu program, LIZ 500 moleküler ağırlık standardı tarafından belirlenen algoritmaya dayalı olarak alellerin boyutunu hesaplar. Sonraki,



Şekil 14 İncelenen bir örnekteki altı işaretçinin elektroferogramı

<http://www.ensembl.org/> Ensembl Genome Browser

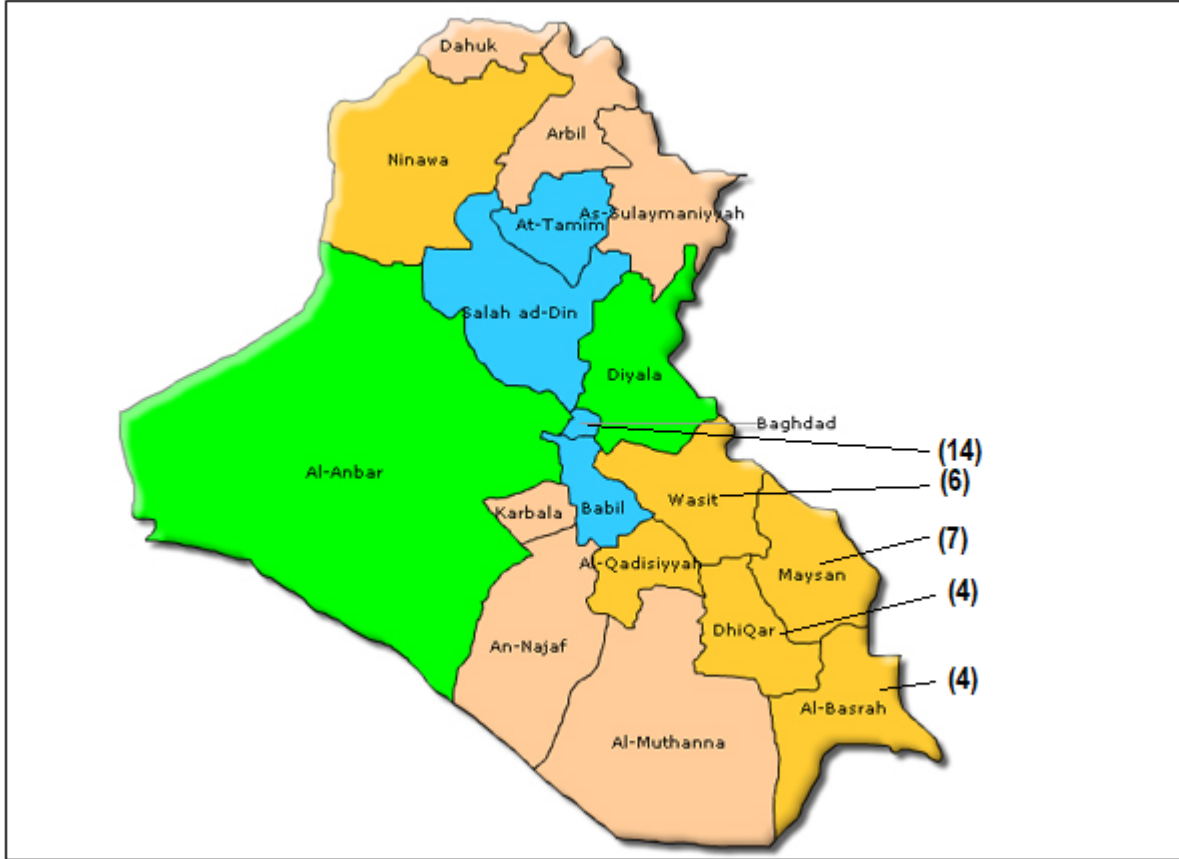
3.15. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, $p < 0,05$ belirlenmiş bir anlamlılık ile parametrik olmayan Mann-Whitney testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Tüm hesaplamalar GraphPad InStat programı (sürüm 3.05 GraphPad Software, Inc.) kullanılarak yapıldı. (Truong 2019).

4. BULGULAR

4.1. Dahil edilen vakaların demografisi

Irak'ın beş vilayetinden hemofili hastası olan 35 aileden toplam 64 hasta dahil edildi (Şekil 4.1), 14'ü Bağdat'tan, 6'sı Wasit'ten, 7'si Maysan'dan, 4'ü Zikar'dan ve 4'ü Basra valiliğinden.



Şekil 15 Çalışmaya dahil edilen Hemofili vakalarının valiliklerin menşe bölgelerine göre dağılımı (https://www.longwarjournal.org/archives/2007/12/mapping_the_concerne.php) . () arasındaki değer, her bölgedeki toplam hasta sayısını temsil eder. Çalışmaya dahil edilen 65 hastanın 35'i (35 aile) Hemofili A ve 30'u (30 aile) Hemofili B tanısı ile doğrulandı. Hastalar F8 veya F9'a karşı inhibitörlerin varlığı açısından analiz edildi. İnhibitörlerin varlığı (en az bir durumda 0,6 UB/mL'nin üzerinde) 32 şiddetli A Hemofili hastasının 6'sında (%20,0) saptandı ve bunların 16'sına yüksek yanıtı inhibitör teşhisi konuldu. İnhibitörler, orta ve hafif Hemofili A hastalarının yanı sıra B Hemofili hastaları arasında tanımlanmamıştır.

4.2. İnhibitörlerin immünoglobulin reaktivitesine ve alt sınıf sınıfına göre karakterizasyonu.

İnhibitör varlığı açısından pozitif olan 35 hastanın 30'undan alınan plazma örnekleri, inhibitörün ait olduğu immünoglobulin (Ig) IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ve IgM sınıfını ve alt sınıfını belirlemek için analiz edildi. Bu karakterizasyon ELISA yöntemi ile yapılmış ve ülkemizde Hemofili A tedavisinde yaygın olarak kullanılan faktör VIII konsantresinin üç farklı ticari ürününde reaktivitesi araştırılmıştır: a) F8 konsantresi Octavi SD Optimun® (Octapharma -Fransa); b) F8 8Y® konsantresi (Bio Products Laboratory-UK); c) F8 Hemofil® konsantresi (Baxter Healthcare Corporation-ABD). Bulunan Ig (kalibrasyon eğrisi) değerlerini ve konsantrasyonlarını belirlemek için benimsenebilecek bir normallik standardının olmaması nedeniyle, bulunan dilüsyonlara göre pozitiflik analizi kriter olarak benimsenmiştir, numune, reaktivite yoğunluğu negatif kontrole (BSA %4) eşit veya daha düşük olduğunda negatif ve negatif kontrolden büyük olduğunda pozitifdir. Pozitiflik yoğunluğu kullanılan dilüsyonlara göre + ile ++++ arasında değişmekte olup: +1:10; ++ 1:40; +++ 1:80 ve ++++ 1:320.

İncelenen 35 vakadan 27 vakada Ig alt sınıfını belirlemek mümkün olmuştur. Çoğu vaka, IgG1 ve IgG4 alt sınıfları için aynı anda %25 pozitifliği. Diğer %15.62 (n=5) vakası sadece IgG1 sınıfı için ve 3 sadece IgG4 için pozitifliği. Literatürde zaten gösterildiği gibi, vakaların %28.12'si (n=9) IgG2 sınıfı için bir miktar pozitifliğe sahip olsa da, bu IgG1 ve/veya IgG4 ile ilişkili olarak meydana geldi (Lu ve diğerleri, 1993). Sadece %9.37 vaka IgG3 için pozitifliği ve yine sadece IgG1 ve/veya IgG4 ile ilişkiliydi. Bu, interferon-gama gibi pro-inflamatuar sitokinleri salgılayan Th1'in, yardımcı T hücrelerinin iki alt kümesinin dahil olduğunu göstermektedir. IgG1 ve interlökin-4 ve interlökin-10 ile anti-inflamatuar sitokinler salgılayan hücreler Th2 gibi kompleman-F9 antikörlerinin sentezine yardımcı olan tümör nekroz faktörü ve interlökin-2, IgG4 alt sınıfı gibi antikörler üretmek için B hücrelerini uyarabilir . Vakaların hiçbirinde IgM'ye reaktivite yoktu.

Farklı ürünlerin analizinde, F8 8Y® konsantresine (Bio Products Laboratory-UK) yönelik reaktivitede önemli bir azalma oldu. Bu ürün orta saflık olarak sınıflandırılmıştır, yani bileşiminde önemli bir VWF konsantrasyonu vardır. Aslında, VWF'nin varlığının,

muhtemelen olası epitopları "gizleme" veya F8 ve FVW arasında bir bağlantı olduğunda F8 konformasyonunu değiştirme gerçeğiyle ilişkili olarak, inhibitörlerin aktivitesini azaltabileceği iddia edilmektedir.

4.3. F8 genindeki moleküler değişikliklerin tanımlanması.

Şiddetli A hemofili hastalarının n=14'ünde (%43.75) ve n=5'inde (%25.92) sırasıyla intron 22 inversiyonu ve intron 1 inversiyonu varlığının analizi pozitif. Şiddetli AH'li, INV-1 ve INV-22 negatif olan hastalardan 26 aileye ait %56,2 (n=18) olguda F8 geninde hemofili A varlığına bağlı mutasyon saptandı. Şiddetli AH'li aileler arasında tespit edilen mutasyonlar arasında 10'u stop kondom tipi, 12'si missense ve 4'ü çerçeve kayması tipindeydi. Sekiz mutasyon (2 yanlış, 4 durak ve 2 çerçeve kayması) literatürde veya hemofili A mutasyon veritabanında ([//europium.csc.mrc.ac.uk](http://europium.csc.mrc.ac.uk)) henüz tanımlanmamıştır. Orta ve hafif hemofilik A hasta gruplarına ait ailelerde sırasıyla 7 ve 9 mutasyon tespit edildi, tüm yanlış tipler. Bu veriler Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

F8 gen mutasyonları, inhibitör geliştirme açısından yüksek risk ve düşük risk olarak ikiye ayrılabilir (Oldenburg ve ark., 2002). Bu çalışmaya dahil edilen şiddetli Hemofili A vakaları arasında 32 aileden 26'sında mutasyon tespit edildi. Bu vakalardan 6'sında (%18.75) inhibitör gelişti. Bir inhibitörü olan hastalar arasında, mutasyonu tespit edilen vakaların %100'ünde inhibitör gelişimi için yüksek risk olarak kabul edilen mutasyonlar vardı. İnhibitör açısından yüksek risk olarak tanımlanan mutasyonlu olguların toplamını incelediğimizde, 33/125'inde (%26,4) inhibitör vardı.

Çizelge 7 Hemofili hastalarında tanımlanan F8 gen mutasyonları A.

Aile	HA tipi	Mutasyon	F8 geninin eksonu
F-31-35	CİDDİ	p-W2229Dur*	22
F-22	HAFİF	p-v266G	8
F-23	Ilıman	p-v266G	8
F-26	Ilıman	p-R372H	9
F-14	CİDDİ	p-R336Dur	9
F-18	Ilıman	p-R336DUR	9
F-21	CİDDİ	p-R336Dur	9
F-32	CİDDİ	p-R2307Dur	29
F-13	HAFİF	p-R21C	25
F-12	HAFİF	p-R210H	25
F-10	CİDDİ	p-R2147Dur	25
F-17	CİDDİ	p-R1997W	21
F-19	CİDDİ	p-R1997W	21
F-9	CİDDİ	p-R1997T	21
F-30	CİDDİ	p-R1997T	21
F-11	CİDDİ	p-R1941Dur	20
F-2	Ilıman	p-R1941Q	20
F-3	CİDDİ	p-N618D	14
F-7	HAFİF	p-M208V	28
F-24	CİDDİ	p-M208V	28
F-4	HAFİF	p-L1789F	18
F 16	CİDDİ	p-L1021Dur*	15
F-8	CİDDİ	p-I2262T	28
F-1	Ilıman	p-H94R	3
F-27	CİDDİ	p-H94R	3
F-5	Ilıman	p-H1848P	19
F-20	CİDDİ	pG151V*	17
F-29	CİDDİ	p-G1659Dur*	15
F-15	CİDDİ	p-D56V*	2

F-6	CİDDİ	c-2800_2802del	15
F-28	CİDDİ	c.4866_4868del*	15
F-25	CİDDİ	c.4379_4380insA	15

* Mutasyon veritabanında tanımlanmadı

4.4. Şiddetli A hemofili hastalarında F8 gen haplotiplerinin sıklığı ve inhibitör riski ile korelasyonu.

Son zamanlarda Viel ve ark. (2009), F8 geninde dört SNP'nin (R484H, R776G, M208V ve D1241E) mevcudiyeti ile belirlenen altı farklı haplotipin (H1 ila H6) varlığının, kuzey siyahlarında yüksek bir inhibitör gelişme riskine farmakogenetik olarak katkıda bulunduğunu açıklamıştır. -Amerikalılar. Bu çalışmada, altı haplotipin varlığı için 148 şiddetli HA analizi, H1 haplotipinin 104'ünde (%70), H2'nin 35'inde (%24) ve H3'ün 9'unda (%6) bulunduğunu göstermiştir. Bu hastalarda R484H ve R776G değişiklikleri gözlenmedi, dolayısıyla H4, H5 ve H6 ekspresyonu yoktu. Üç haplotipin tümü, H1 haplotipi %62, H2 %26 ve H3 %12 prevalansı ile şiddetli AH'si olan siyahlarda ifade edildi. Şiddetli AH'si olan Kafkasyalılarda, sırasıyla %74 ve %26 prevalans ile sadece H1 ve H2 haplotipi.

F8 haplotiplerinin sonuçları ve her etnik grupta inhibitörün prevalansı. Analiz edilen 21 şiddetli AH'nin %32'sinde en az bir anda tespit edilen >0.5 UB/mL inhibitörler vardı. İnhibitör prevalansı, şiddetli AH'si olan siyahlar arasında en yüksekti (%68). Thi qar şiddetli AH hasta grubunda inhibitör varlığı daha fazla olmasına rağmen, bu durum F8 haplotiplerinin varlığı ile açıklanamaz. Etnik gruplar tarafından bütünlükleri veya tabakalar halinde analiz edildiğinde, inhibitörlerin varlığı ve farklı faktör VIII haplotiplerinin varlığı ile ilgili istatistiksel bir fark yoktu.

4.5 RT-PCR kullanılarak gen ekspresyonu analizi sonuçları.

Codelink platformu aracılığıyla seçilen 66 gen arasından, RT-PCR kullanılarak diferansiyel gen ekspresyonunu doğrulamak için 6 gen seçildi (CAMK1, CST7, IL18RAP, LYPLA3, IL-10, PDE4A). Biyolojik dizilerin sonuçlarına göre seçilen altı gene ek olarak, diğer çalışmalarda açıklanan diğer dört gen seçildi (IL-8, C4BPA, CXCL9, PTGS1)

4.6 RT-PCR kullanılarak analiz için seçilen genlerin tanımı. CAMK1 (NM_003656)

Kalmodulin bağımlı protein kinaz tip 1, çok sayıda organda eksprese edilen kalmodulin bağımlı protein kinaz kaskadının bir bileşenidir. CaMK1'i (CaMK2 ve CaMK4'ün yanı sıra) içeren Ca²⁺/kalmodulin bağımlı protein kinaz (CaMK) ailesi, hücre içi kalsiyum (2+) artışına (alfa, beta, gama ve delta) yanıt olarak aktive edilir. CaMK1, çok çeşitli hücre tiplerinde bulunur ve bir dizi hücrel işlevde yer alabilir. CaMK1 ve 2, endometriyal kanser hücrelerinde eksprese edilir ve tümörün malignite potansiyeli ile ilişkilidir. (Anam ve diğerleri, 1999)

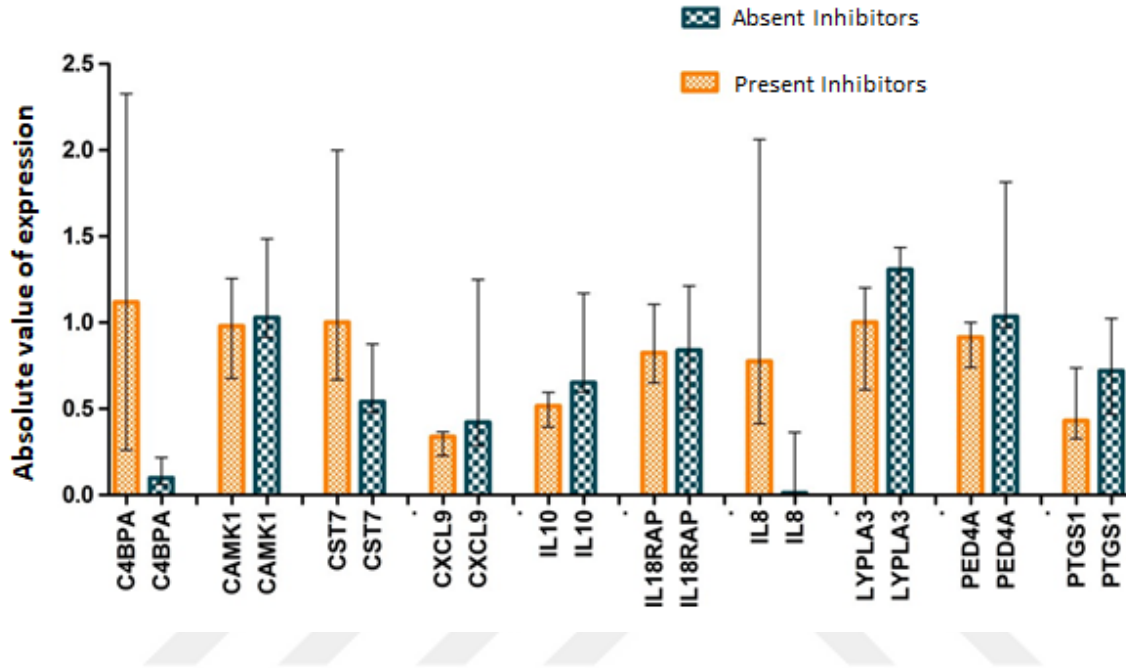
- **CST7: NM_003650:**Sistatin F. Sistatinler, en az 11 üyeli bir proteaz inhibitör ailesidir. Bazıları sitoplazmada bulunurken, çoğu salgı yolunda bulunan sinyal dizileridir. Sistatinlerin çeşitli vücut sıvılarında keşfedilmesi, bunların hücre dışı ortamda proteazın düzenlenmesinde bir işlevi olduğunu gösterir. Sistatinlerin, hücrelerin istemeden serbest bırakabileceği proteazları bastırmak için hücre dışı ortama salgılandığı varsayılır. Sistatin F, spesifik olarak immün hücrelerde eksprese edilen bir sistein proteaz inhibitörüdür. Katepsin C, CST7'nin birincil hedefi olduğundan, çeşitli immün hücre efektör eylemlerini kontrol edebilir. (Nienhuis ve diğerleri, 2017).
- **IL18RAP: NM_003853:** İnterlökin 18 aksesuar reseptörü (IL18) İmmünomodülasyonda, IL18 çok önemli ve yeni bir işlev gerçekleştirir. IL-18, hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklığı düzenleyen bir pleiotropik sitokindir. IL-1 reseptörüne benzer ve bir bağlayıcı protein olan IL-18Ralpha ve bir yardımcı protein olan IL-18RAP'den (IL-18Rbeta) oluşan bir reseptör kompleksi aracılığıyla çalışarak otoimmün, enflamatuar ve bulaşıcı hastalıklarda önemlidir. . Reseptör zincirinde, IL-18 sinyal iletimi ve IL-18Ralpha ligandına bağlanma afinitesi için IL-18RAP gereklidir (Shao ve diğerleri, 2009).
- **LYPLA3: NM_012320.2:** Lizofosfolipaz 3, bir lizofosfolipaz enzimidir (lizozomal fosfolipaz A2). Bu gen, kromozom 16'nın 16. bölgesindeki uzun kolunda bulunur. Lizofosfolipazlar (LPLA), biyolojik zarlar üzerinde hareket ederek çok işlevli lizofosfolipidleri kontrol eden enzimlerdir. Bu gen, gliserofosforilkolin ve bir serbest yağ asidi üretmek için lizofosfolipidleri hidrolize eden bir proteini kodlar. Bu enzim plazmada bulunur ve yüksek yoğunluklu lipoproteinlerle bağlantılıdır. Çalışmalar, bu genin bir lizofosfolipaz yerine bir lizozomal enzim ürettiğini ve hem kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A2 hem de transaçilaz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Murtazamustafa, ve diğeri. (2016), forbol ester ile uyarıldığında THP-1 hücrelerinin makrofaj benzeri özellikler kazandığını ve LPLA ekspresyonunun arttığını buldu.

- **IL-10: NM_000572.2:**İnterlökin 10. Bu gen, inhibitörlü dört hastadan üçünde yüksek oranda eksprese edilmesine rağmen, interlökin 10'un inhibitörlerin oluşumunda rol oynadığını gösteren çalışmalar olduğundan (Astermark ve diğeri, 2006) seçilmiştir ve bu nedenle önemlidir. Bu hasta grubunda ifadesini analiz etmek.
- **PDE4A:NM_001111307:**Fosfodiesterazlar (PDE), siklik nükleotidlerin hücrel konsantrasyonunu düzenler ve sinyal iletiminde rol oynar. PDE4A, sınıf IV cAMP-PDE'ye özgüdür (Milatovich ve diğeri, 1994). Dong et al. (2009) seçici PDE3, PDE4 veya PDE7 inhibitörlerinin tek başına hücre canlılığı üzerinde çok az etkisi vardır, ancak üçünün birlikte inhibisyonu, insan akut lenfoblastik lösemi (EMC) hücre dizilerinde glukokortikoid kaynaklı apoptozu önemli ölçüde artırır.
- **IL-8: NM_000584:**Interleukin-8, CXC kemokin ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler proinflamatuvar bir role sahiptir ve esas olarak dokudaki nötrofillerin periferik kandan aktivasyonuna ve göçüne aracılık eder.
- **C4BPA: NM_000715:**Kompleman bileşen 4 bağlayıcı protein alfa zinciri, CD54 ve CD86 ve IL4'e bağımlı ve IgE izotipinin proliferasyonunu ve ekspresyonunu indükler.
- **CXCL9: NM_002416:**CXC Kemokin Ligand 9 Bu gen, gelişim, homeostaz ve bağışıklık sistemi aktivitelerinde de büyük rol oynayan ve ayrıca merkezi sinir sistemi hücrelerini etkileyen ve merkezi sinir sistemi hücrelerini etkileyen kemokinler ailesindedir. .
- **PTGS1: NM_080591:**Prostaglandin üretiminin ana enzimi, hem dioksijenaz hem de peroksidaz olarak işlev gören prostaglandin endoperoksid sentezidir (PTGS). İki PTGS izoenzimi mevcuttur: doku ekspresyonu ve dağılım düzenlemelerinde değişiklik gösteren bir PTGS1 bileşeni ve bir PTGS2 indüklenmiş. PTGS1, endotelial hücrelerde anjiyogenezi kontrol eder ve aspirin gibi anti-inflamatuvar steroid olmayan ilaçlar tarafından baskılanır. PTGS1'in hücre sinyallerine ve doku homeostazının korunmasına katıldığı görülmektedir. Alternatif gen ekleme, iki transkripsiyonel varyant oluşturur ve sitokin ve büyüme faktörleri, iki transkriptin üretimini ayrı ayrı yönetir.

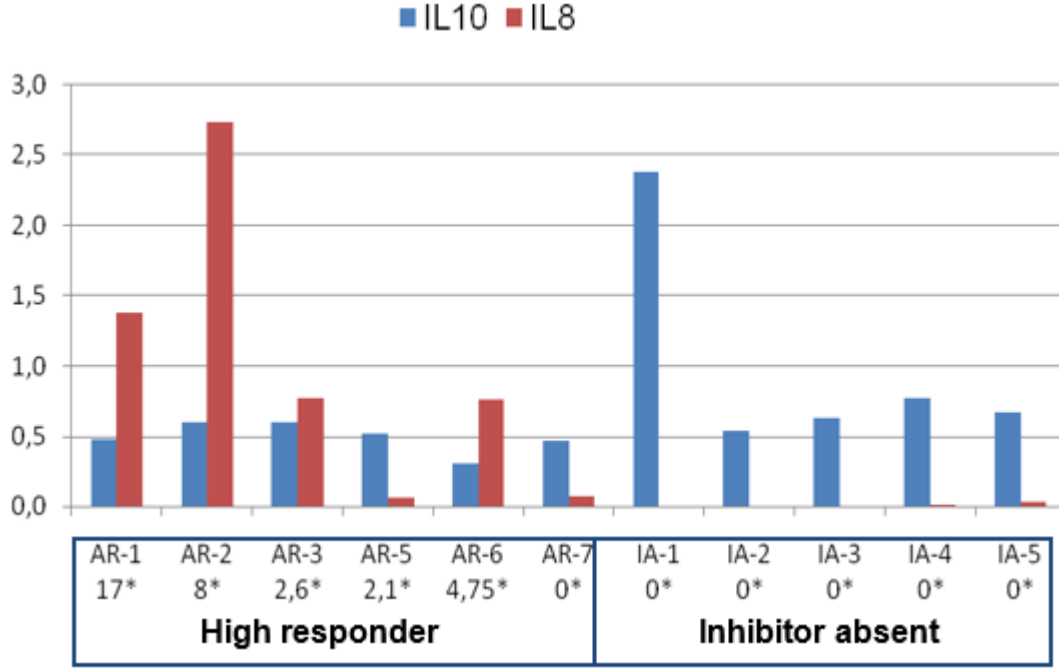
4.7 RT-PCR analizi ile elde edilen sonuçlar.

CST7, LYPLA3, PDE4A, CAMK1, IL18RAP, PTGS1 IL-10, CXCL9 , C4BPA ve IL-8 genlerinin ekspresyonu, ilişkisiz 10 şiddetli HA hastasında, inhibitör varlığı olan beş hastada ve inhibitörsüz beş şiddetli HA hastasında değerlendirildi. (Şekil 4.2).

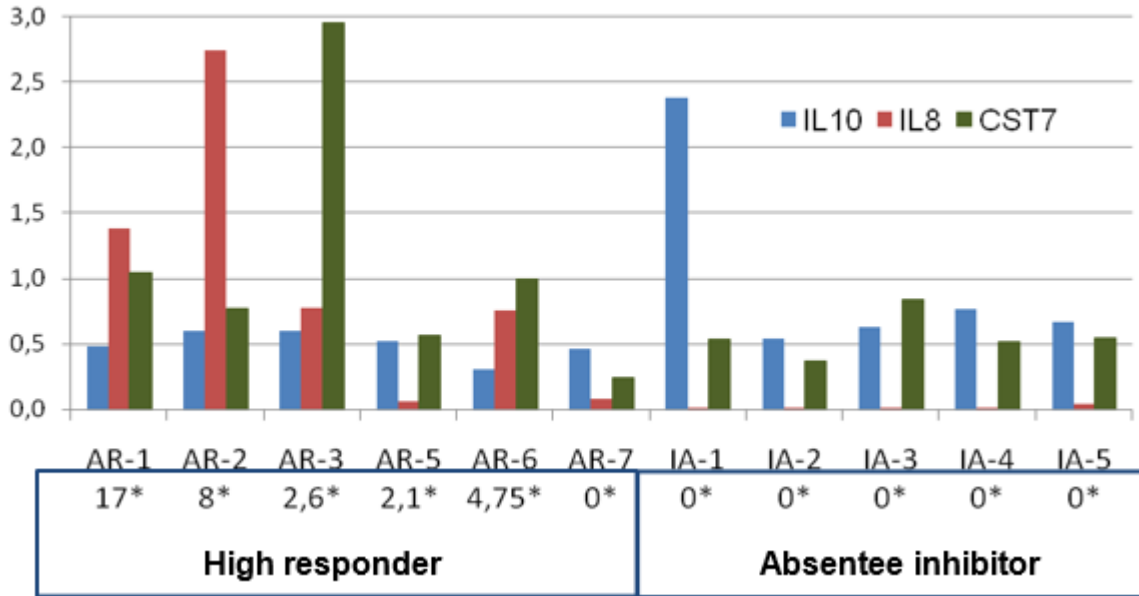


Şekil 16 edilen 65 hastanın 35'i (35 aile) Hemofili A ve 30'u (30 aile) Hemofili B tanısı ile doğrulandı. Hastalar F8 veya F9'a karşı inhibitörlerin varlığı açısından analiz edildi. İnhibitörlerin varlığı (en az bir durumda 0,6 UB/mL'nin üzerinde) 32 şiddetli A

Şekil 4.3, daha önce analiz edilen her hasta için IL-8 ve IL-10 genleri arasındaki karşılaştırmalı analizi göstermektedir. Bu analize bir hasta eklendi (Şekil 4.4, hasta AR-7), yüksek inhibitör yanıtı olan hasta grubuna ait olmasına rağmen, analiz sırasında inhibitör nicelenmesi negatifti. Böylece, her hasta için IL-10 ve IL-8 genlerinin ekspresyon modelini değerlendirmek ve bu genler arasında olası bir ilişkinin varlığını doğrulamak mümkün oldu. IL-8'in ekspresyonu için, bireysel AR-2'nin bu hasta hariç tutulsa bile bir aykırı değer olarak sunulmasına rağmen, IL-8 ekspresyonunun inhibitörlü grupta inhibitörsüz gruptan istatistiksel olarak daha yüksek kaldığını not etmek önemlidir. ($P < 0,007$). Aynısı, bireysel IA-1 ile IL-10 ekspresyonunun analizi için de gözlenir, inhibitörü olmayan gruptan, ayrıca bir aykırı değer. Bu durumda, hasta IA-1'i analizden çıkardıktan sonra, IL-10 ekspresyonu bu grupta istatistiksel olarak daha yüksek kalmıştır ($P < 0.037$).



Şekil 17 . Hasta başına IL-8 ve IL-10 genleri arasındaki karşılaştırmalı analizin grafik gösterimi. Yüksek yanıt veren grup: AR-1 ila AR-7 hastaları. Yok İnhibitör Grubu: IA-1 ila IA-5 arası hastalar. *mRNA toplama sırasında UB/mL cinsinden inhibitör nicelemesinin <https://books.openedition.org/oep/9068>



Şekil 18 gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç sunan IL-8, IL-10 ve CST7 birlikte üç gen için her hastanın analizini gösterir. <https://books.openedition.org/oep/9068>

. *mRNA toplama sırasında UB/mL cinsinden inhibitör nicelemesinin sonucu.

4.8 İncelenen polimorfizmlerin alel frekansları

Altı STR belirteci (daha önce tarif edilmiş) Irak nüfusunda kontrol grubu olarak kullanılan ve etkilenen ailelerle karşılaştırılacak bir veri tabanı oluşturan 35 kişiden oluşan bir örnekleme araştırıldı. Veriler, ilgisiz bireyler arasında aynı haplotipleri paylaşma olasılıklarını hesaplamak için üretildi. Bu veri tabanı, Irak nüfusundan bireyler arasında paylaşım olasılığı ile ilgili olarak, etkilenen kişinin akrabaları arasında haplotip paylaşım olasılığını belirlemek için gereklidir. Bu ilişki, etkilenenlerin akrabaları arasında mutasyona sahip kadınları tanımlamadaki gerçek gücün güvenilir bir tahminini gösterebilir. Daha sonra, Irak nüfusu için kontrol olarak alınan 35 birey arasında araştırılan her bir belirtecin değişkenliği tanımlandı.

4.8.1 HMF-01

HMF-01 işaretçisi, tekrarlama birimi CTT olan bir trinükleotide karşılık gelir. Analiz edilen bireyler arasında, hiçbiri %10'dan fazla sıklığa sahip olmayan 19 farklı alel tanımlandı. Dört alel en yüksek frekansa sahiptir (%9.1): 26 çift nükleotid bazının alel (59 tekrara karşılık gelen 26 bp); 267bp alel; 270bp alel; ve 27bp alel. Bu veriler, bu işaretçinin insanları ayırt etme (veya tanımlama) gücüne ilişkin istatistiksel parametreleri hesaplamak için kullanıldı. Bunun için hesaplanan tüm istatistiksel parametreler (ve diğer tüm belirteçler için) Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Analiz edilen istatistiksel parametreler aşağıdaki gibidir: i) İncelenen popülasyondaki (bu durumda Irak nüfusu) herhangi iki kadının aynı genotipe sahip olma olasılığını ölçen Kadınlar Arasında Ayrımcılık Gücü (PDM); ii) İncelenen popülasyondaki herhangi iki erkeğin aynı alele sahip olma olasılığını tahmin eden Erkekler Arasındaki Ayrım Gücü (PDH); iii) Araştırılan belirtecin olasılığını tahmin eden Üçlü Dışlama Gücü (PDT), popülasyondaki herhangi bir kız çocuk (veya yetişkin) ile ilgili olarak herhangi bir bireyin babalığını hariç tutmalıdır; iv) Araştırılan işaretçiye göre popülasyonun ortalama heterozigotluğuna karşılık gelen Lokus Çeşitliliği (LD).

HEMF-01 belirteci ile ilgili olarak, popülasyondaki iki kadının farklı genotiplere (PDM) sahip olma olasılığının %99.18'e karşılık geldiğini (yani aynı genotiplere sahip olma şanslarının %0.82 olduğunu) tahmin etmek mümkün olmuştur; popülasyondaki iki erkeğin farklı allellere (PDH) sahip olma şansının %93,44 (yani iki erkeğin aynı alele sahip olma şansının %6,56) olduğu; vakaların %58'inde yalnızca bu belirteç yanlış bir babalık suçlamasını hariç tutabilirken; ve bu işaretçinin gözlemlenen heterozigotluğunun yüksek olduğu (%94'e yakın).

Çizelge 8 HMF-01 markörünün her alelinin Frekansı ve Standart Sapması

alel işaretleyici	Sıklık	Standart sapma (SD)
23	0.0099	0.010
01:19	0.0198	0.014
24	0.0594	0.024
26	0.0495	0.022
23	0.0396	0.020
22	0.0495	0.022
25	0.0495	0.022
28	0.0297	0.017
26	0.1001	0.030
21	0.0704	0.026
27	0.1001	0.030
20	0.1001	0.030
19	0.0902	0.029
27	0.1001	0.030
29	0.0495	0.022
22	0.0605	0.024
25	0.0605	0.024
21	0.0495	0.022
29	0.0099	0.010

4.8.2 HMF-3:

HMF-3 markörü, tekrarlama birimi AAAT olan bir tetranükleotide karşılık gelir. Analiz edilen bireyler arasında, Irak nüfusunda sadece beş farklı alel tespit edildi. Bulunan alellerden biri, 11 AAAT tekrarı karşılık gelen alel 19, çok yüksek bir frekansa (%87.3) sahiptir ve diğer alellerin frekansı azaltılmıştır (%5'ten daha az).

İstatistiksel parametrelerle ilgili olarak, bu belirtecin diğer belirteçlere göre en düşük ortalama tahmin değerlerine (bireyler arasındaki ayırım gücü en düşük) sahip olduğunu belirlemek mümkündür: i) Kadınlar Arasında Ayrımcılığın Gücü (PDM)) bu işaretçinin oranı %40.5 civarındadır; Erkekler Arasındaki Ayrım Gücü (PDH) %23.4; Yanlış bir babalık

suçlamasını bu belirteçten hariç tutma gücü %13.2'dir; ve bu işaretçinin ortalama heterozigotluğunun sadece %23.4 olduğu.

Tablo 4.3, bu işaretleyici için tanımlanan alelleri, her biri için frekanslar ve standart sapmalarla birlikte gösterir.

Çizelge 9 Her bir HMF-03 işaretleyici alelinin Frekansı ve Standart Sapması

işaretleyici	Alel	Sıklık	Standart sapma
	16	0.01	0.01
HMF-03	17	0.027	0.015
	15	0.045	0.019
	19	0.873	0.032
	18	0.045	0.019

4.8.3 HMF-02:

HMF02 markörü, tekrarlama birimi TTTA olan bir tetranükleotide karşılık gelir. Analiz edilen bireyler arasında Irak nüfusunda yedi farklı alel tespit edildi. Bulunan alellerden biri, altı TTTA tekrarına karşılık gelen alel 17'nin frekansı çok yüksektir (%52.7). İlginç bir şekilde, alellerin frekans dağılımı, %21.8'lik bir frekansa sahip olan alel 17 ve alel 17'nin yüksek frekans değerleri ile iki modludur.

Çizelge 10 Her bir HMF-02 işaretleyici alelinin frekansı ve SD'si

işaretleyici	Alel	Sıklık	Standart sapma (SD)
	12	0.054	0.0211
HMF-02	17	0,527	0.0478
	18	0.036	0.019
	14	0.082	0.0265
	17	0.218	0.0359
	19	0.073	0.0274
	16	0.009	0.0090

İstatistiksel parametrelerle ilgili olarak, bu belirtecin diğer belirteçlere göre ortalama tahmin değerlerini sunduğunu belirlemek mümkündür: i) Bu belirtecin Kadınlar Arasındaki Ayrımcılık Gücü (PDM) %84,6; Erkekler Arasındaki Ayrım Gücü (PDH) %65,8; Bu belirteçten yanlış bir babalık suçlamasını hariç tutma gücü %62'dir; ve bu işaretçinin ortalama heterozigotluğu %66'dır.

4.8.4 DXS10011:

DXS10011 markörü, insan evrimi sırasında bir dinükleotidin bir ekleme veya delesyon olayı ile birlikte tetranükleotit tekrarlarına (GAAA) sahip bir markör olarak kendini gösterdiğinden, STR olarak adlandırılan bir işarete karşılık gelir. Bu gerçek, dört veya iki çift nükleotidin alelik farklılıklarını takiben değişebilen çok sayıda alel üretir. Bu tür varyasyon, Irak'ın Bağdat şehri de dahil olmak üzere dünyanın tüm popülasyonlarında çok yüksek sayıda alel oluşmasına neden oldu (Edelmann ve diğerleri, 2008). Bu çalışmada, analiz edilen 32 birey arasında, hiçbiri %10'dan fazla sıklığa sahip olmayan 26 farklı alel tanımlandı. Dört alel en yüksek alel frekanslarına sahiptir: %9,1'lik frekansla alel 36 ve alel 16; ve her ikisi de %8,2 sıklıkta olan 30 ve 374 alelleri.

İstatistiksel parametrelerle ilgili olarak, bu belirtecin diğer belirteçlere göre en yüksek tahminlere sahip olduğunu belirlemek mümkündür: i) bu belirtecin Kadınlar Arasındaki Ayrım Gücü (PDM) %99,5 düzeyindedir; Erkekler Arasındaki Ayrım Gücü (PDH) %94,8'dir; Yanlış bir babalık suçlamasını bu belirteçten hariç tutma gücü %94,6'dır; ve bu işaretçinin ortalama heterozigotluğu %95,2'dir.

Çizelge 11 DXS10011 işaretçisinin her alelinin Frekansı ve Standart Sapması

İşaretleyici	Alel	Sıklık	Standart sapma
	31	0.036	0.0361
DXS 10011	34	0.027	0.015601
	33	0.009	0.009091
	30	0.064	0.02301
	30	0.018	0.01297
	34	0.018	0.01297
	34	0.027	0.015601
	35	0.045	0.019951
	30	0.082	0.026253
	35	0.27	0.015601
	32	0.036	0.0193
	34	0.036	0.0193
	35	0.018	0.01297
	38	0.045	0.019951
	30	0.018	0.01297
	36	0.045	0.019951
	36	0.036	0.0193
	36	0.091	0.027536
	34	0.082	0.026253
	16	0.091	0.027536
	38	0.027	0.015601
	38	0.018	0.01297
	30	0.027	0.015601
	33	0.027	0.015601
	08	0.018	0.01297
	10	0.009	0.009091

4.8.5 DXS7423:

DXS7423 işaretçisi, tekrarlayan birimi GGAT olan bir tetranükleotide karşılık gelir. Analiz edilen bireyler arasında Irak nüfusunda beş farklı alel tespit edildi. Bulunan alellerden biri olan 22 GGAT tekrarına karşılık gelen alel 21 en yüksek frekansa (%47,2) sahiptir, bunu alel 211 (%34,5) takip eder. Diğer aleller azaltılmış bir frekansa sahiptir.

Çizelge 12 DXS7423 işaretçisinin her alelinin frekansı ve standart sapması

işaretleyici	Alel	Sıklık	Standart sapma
	20	0.018	0.0128
	11	0,345	0.04555
DXS 7423	21	0.472	0.04776
	21	0.1	0.02874
	20	0.063	0.0230

İstatistiksel parametrelerle ilgili olarak, bu işaretçinin nispeten düşük tahmin değerlerine sahip olduğunu belirlemek mümkündür (bireyler arasında en düşük ikinci ayırım gücüdür): i) bu işaretçinin Kadınlar Arasındaki Ayırım Gücü (PDM) %81 mertebesinde; Erkekler Arasındaki Ayırım Gücü (PDH) %64,3; Yanlış bir babalık suçlamasını bu belirteçten hariç tutma gücü %58'dir; ve bu işaretçinin ortalama heterozigotluğu %64,5'tir.

4.8.6 GATA31E08:

GATA31E08 işaretçisi, tekrarlayan birimi GATA olan bir tetranükleotide karşılık gelir. Analiz edilen bireyler arasında, Irak nüfusunda sekiz farklı alel tespit edildi. Bulunan alellerden biri, 12 GATA tekrarına karşılık gelen 21 alel, en yüksek frekansa (%23,6) sahiptir ve yalnızca iki alel azaltılmış bir frekansa sahiptir: %2 sıklıkta alel 21 ve %1 sıklıkta alel 29 .

Çizelge 13 GATA31E08 işaretçisinin her alelinin Frekansı ve Standart Sapması

İşaretleyici	Alel	Sıklık	Standart sapma
	21	0.02	0.0128
GATA 31E08	25	0.136	0.0328
	29	0.109	0.0298
	24	0.136	0.0328
	27	0.209	0.0389
	21	0.236	0.0406
	25	0.145	0.0337
	29	0.01	0.001

İstatistiksel parametrelerle ilgili olarak, bu işaretçinin nispeten yüksek tahmin değerlerine sahip olduğunu belirlemek mümkündür (bireyler arasındaki üçüncü en büyük ayırım gücüdür): i) bu işaretçinin Kadınlar Arasındaki Ayırım Gücü (PDM) 94, 8% mertebesinde; Erkekler Arasındaki Ayırım Gücü (PDH) %83; Yanlış bir babalık suçlamasını bu belirteçten hariç tutma gücü 80,7'dir; ve bu işaretçinin ortalama heterozigotluğu %83'tür. Bireyler arasındaki farklılaşma parametrelerinin tüm tahminleri gruplandı ve tüm veriler, altı belirteç kümesini dikkate alarak aynı önlemleri tahmin etmek için kullanıldı. Veriler Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 14 Her bir belirteç için bireyler arasındaki farklılaşma parametreleri

İşaretleyici/	HEMF	HEMF	HEMF	DXS	DXS	GATA	AYAR LAMA K
Parametre	1	2	3	11012.1	8165.3	3.10E+09	0
polis kadın	1.091	0.446	0.93	1.094	0.89	1.043	1.1
polis memuru	1.028	0.257	0.724	1.043	0.707	0.913	1.1
PEX-C. üçlü	1.024	0.23	0.683	1.04	0.638	0.888	1.1
LD	1.032	0.258	0.727	1.047	0.709	0.917	0.782

PD: Ayrımcılık Gücü; PEX-C: Dışlama Gücü; LD: Lokus Çeşitliliği

Yukarıdaki veriler, araştırılan akrabalar arasında mutasyonlu kadınları belirleme olasılığı hakkında çıkarım yapmak amacıyla, araştırılan belirteçlere dayalı olarak yapılan tahminlerin genişliğini anlamaya yardımcı olabilecek çıkarımlara izin verir.

1. Kısaca, araştırılan altı markör ile elde edilen veriler şu sonuca varmamızı sağlar: i) Araştırılan markörlerin ortalama heterozigotluğu %71'dir.
2. Kadınlar Arasındaki Ayrımcılığın Gücü %99,9 mertebesindedir. Bu, bu belirteçleri kullanarak, Irak nüfusundan rastgele seçilen iki kadının altı belirteç için aynı genotipe sahip olma şansının 100.000.000 (yüz milyon) kadında 4 olduğu anlamına gelir.
3. Erkekler arasındaki tahmini ayırım gücü %99,995 düzeyindedir. Bu, altı belirteç kullanıldığında, Irak nüfusundan iki erkeğin aynı haplotipe sahip olma şansının, nüfusun 100.000 (yüz bin) erkeğinde 5 mertebesinde olduğu anlamına gelir.
4. Yanlış bir babalık suçlamasını bu belirteçler kümesinden hariç tutma gücü, ülkedeki çoğu mahkemede gerekenden çok daha yüksek olan %99,991 düzeyindedir.

Sunulan veriler, adli analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve kadın taşıyıcıların tanımlanması durumlarında mükemmel şekilde uygulanabilir.

4.9 İncelenen ailelerin analizi

Katılan 35 hasta arasında, sadece 35 aile temsil edilen iki çift kardeş vardı. Anneleri zaten ölmüş, ancak kızları olduğu için zorunlu taşıyıcı olan iki hasta, hasta aile üyeleri grubuna katılmaya kabul edildi ve metodolojinin etkinliğinin kanıtlanmasına yardımcı oldu. İncelenen 35 aileden beş ailede teşhis gerektiren olası taşıyıcılar vardı. Diğer 17 aile, metodolojiyi doğrulamak için kullanılan sadece anne ve çocuktan oluşuyordu.

4.10 Hasta örneğinin karakterizasyonu

Hastaların yaş ortalaması 38.5 yıl olup, iki ile yetmiş beş yıl arasında değişmekteydi. Hastaların klinik belirtilerinin ciddiyetine göre, üç hastada (%8.57) hafif hemofili, üç hastada (%8.57) orta derecede hemofili ve yirmi hastada (%57.17) şiddetli hemofili vardı. Dört hasta (%11.42), tümü İmmünolerans İndüksiyonunda (ITI) bulunan F8 Pozitif için bir inhibitör arayışına girdi.

Tablo 4.9, her birinin haplotipine ek olarak, yaş, hastalığın klinik tezahürü ve bir Faktör VIII inhibitörü arayışı ile ilgili olarak incelenen hastalara ilişkin verileri göstermektedir. Etkilenenler arasında tam olarak aynı iki haplotip bulamadığımızı belirtmekte fayda var.

Çizelge 15 Yaş, Hemofili sınıflandırması, inhibitör ve haplotip araştırması ile ilgili çalışılan hastaların verileri

Hasta	Yaşam yılları)	Klinik Sınıflandırma	İnhibitör Araştırması	Haplotip
F-1	8	CİDDİ	OLUMSUZ	27; 17; 18; 38; 20; 27
F-2	11	CİDDİ	POZİTİF	25; 17; 15; 38; 21; 27
F-3	3	ILIMAN	OLUMSUZ	26; 17; 18; 38; 21; 21
F-4	15	CİDDİ	OLUMSUZ	19; 17; 18; 32; 21; 29
F-5	8	CİDDİ	POZİTİF	29; 15; 17; 36; 21; 25
F-7,35	27	CİDDİ	OLUMSUZ	26; 17; 18; 32; 21; 27
F-8, 34	26	CİDDİ	OLUMSUZ	23; 17; 15; 32; 21; 25
F-9	12	CİDDİ	OLUMSUZ	25; 17; 15; 38; 20; 24
F-10	12	CİDDİ	OLUMSUZ	26; 17; 15; 36; 21; 21
F-11	14	CİDDİ	OLUMSUZ	22; 17; 19; 31; 21; 21
F-12	29	CİDDİ	OLUMSUZ	28; 17; 15; 30; 20; 27
F-13	26	CİDDİ	OLUMSUZ	21; 17; 17; 16; 21; 25
F-14	6	CİDDİ	POZİTİF	25; 17; 12; 302; 21; 29
F-15,33	60	CİDDİ	OLUMSUZ	21; 17; 15; 32; 21; 25
F 16	29	CİDDİ	OLUMSUZ	19; 17; 18; 36; 21; 27
F-17, 28-30	33	CİDDİ	OLUMSUZ	29; 17; 15; 38; 21; 27
F-18	73	IŞIK	OLUMSUZ	23; 17; 15; 34; 21; 27
F-19	6	IŞIK	OLUMSUZ	29; 17; 15; 36; 21; 24
F-20, 31-32	14	CİDDİ	POZİTİF	19; 17; 15; 24; 21; 27
F-21	6	CİDDİ	OLUMSUZ	22; 15; 17; 16; 21; 27
F-22	5	ILIMAN	OLUMSUZ	19; 17; 15; 36; 21; 24

F-23	20	İLİMAN	OLUMSUZ	19; 15; 18; 35; 21; 27
F-24	18	CİDDİ	OLUMSUZ	19; 15; 18; 30; 21; 29
F-25	6	IŞIK	OLUMSUZ	23; 17; 15; 30; 21; 27
F-26	6	CİDDİ	OLUMSUZ	29; 17; 18; 30; 21; 27
F-27	9	CİDDİ	OLUMSUZ	24; 17; 18; 36; 21; 24

Gösterge F = etkilenen



4.11 Aile haplotipleri

Her aile, ilişkiye göre 1'den 35'e kadar bir kimlik numarası aldı ve ardından bir harf aldı: anneler X harfi aldı, etkilenenler Y harfi aldı, kız kardeşler Z, D, E harflerini aldı, teyzeler F harfini aldı ve basın B harfi ve ardından 1 rakamı (B1). Etkilenen kişilerin kızları, 1 ve 2 (Y1, Y2) sayılarıyla Y harfini aldı. Etkilenen kardeşler Z harfini ve 1 sayısını (Z1) aldı.

Etkilenenlerin ve ailelerinin haplotiplerinin analizine dayanarak, olası taşıyıcı karaktere sahip kadınlara sahip yedi ailedeki taşıyıcıları belirlemek veya hariç tutmak mümkün oldu, bu da anneleri tanımlamanın yanı sıra zorunlu taşıyıcıları da doğruladı. Tablo 4.1'de görülebileceği gibi taşıyıcı olarak etkilenenler.

Bu yedi ailede incelenen on bir kadından yedisi (%63,7) taşıyıcıydı ve dördü (%36,3) taşıyıcı değildi ve belirlenen yedi taşıyıcıdan üçü, hastalıktan etkilenen kişilerin kızları oldukları için zorunlu taşıyıcılardı. etkilenen babadan mutant gen alınabilir.

Çizelge 16 Belirlenen altı belirteç ve taşıyıcıda çalışılan her bireyin haplotipi

İşaretleyici / Bireysel No.	HMF 01		HMF 03		HMF 02		DXS10011		DXS7423		GATA 10011		Tanımlan mış Taşıyıcı
1X	13	14	9	9	9	9	17	19	10	11	12	12	EVET
1Y	26		18		19		38		21		25		
2 KERE	12	14	9	9	9	9	19	20	11	11	12	12	EVET
2Y	28		18		18		38		22		25		
3X	13	13	9	9	9	9	18	19	11	11	12	13	EVET
3Y	26		18		19		36		22		25		
4X	12	14	9	9	9	9	17	18	11	11	12	13	EVET
4Y	24		18		19		37		22		24		
5X	14	15	9	9	9	9	17	18	11	11	12	13	EVET
5Y	29		18		18		37		22		24		
5Z1	29		18		18		37		22		26		
7X, 35	13	14	9	9	9	9	17	18	11	11	12	13	EVET
7Y	26		18		19		37		22		25		
7F	13	13	9	9	9	9	18	19	11	11	12	12	HAYIR
8X, 34	12	12	9	9	9	9	17	18	11	11	12	12	EVET
8Y	25		18		18		37		21		24		
9X	13	14	9	9	9	9	18	20	11	11	12	13	EVET
9Y	28		18		18		36		22		24		
9Z	14	14	9	9	9	9	18	18	11	11	12	13	EVET
10X	13	14	9	9	9	9	17	19	11	11	13	13	EVET
10Y	16		18		18		34		22		25		
11X	13	14	9	9	9	10	16	21	11	11	13	13	EVET
11Y	25		17		19		33		22		26		
12X	14	14	9	9	9	9	15	17	11	11	12	12	EVET
12Y	29		18		18		34		22		25		
13X	13	14	9	9	9	9	18	19	11	11	12	13	EVET
13Y	26		18		18		38		22		24		
14X	14	14	9	9	9	9	15	18	11	11	12	12	EVET

14Y	18	18	17	30	22	24							
15Y	26	18	18	37	22	24							
15Y1,33	13	13	9	9	9	9	18	18	11	11	12	12	EVET*
16X	13	14	9	9	9	9	18	19	11	11	12	13	EVET
16Y	27	18	19	36	22	26							
17X,	14	14	9	9	9	9	19	20	11	11	12	12	EVET
17 yaşında,28-30	28	18	18	39	21	25							
17Z	13	14	9	9	9	9	18	19	11	11	12	12	EVET
17D	13	14	9	9	9	9	18	20	11	11	12	12	HAYIR
17E	13	14	9	9	9	9	18	20	11	11	12	12	HAYIR
18Y	25	18	18	34	21	26							
18Y1	12	14	9	9	9	9	17	19	11	11	12	13	EVET*
18Y2	12	14	9	9	9	9	17	19	11	11	12	13	EVET*
19X	14	15	9	9	9	9	17	17	11	11	12	12	EVET
19Y	29	18	18	34	21	24							
20X	14	14	9	9	9	9	17	17	11	11	12	12	EVET
31-32Y	27	18	18	33	21	25							
21X	13	14	9	9	9	9	17	19	10	11	12	12	EVET
21Y	28	18	18	38	22	25							
22X	12	14	9	9	9	9	18	18	11	11	12	13	EVET
22Y	27	18	18	36	21	24							
22F	12	14	9	9	9	9	18	18	11	11	12	13	EVET
22F1	12	14	9	9	9	9	18	18	11	11	12	13	HAYIR
23X	13	14	9	9	9	9	17	18	10	11	12	12	EVET
23Y	27	18	19	36	21	25							
23Z	14	14	9	9	9	9	18	19	11	11	12	13	EVET
24X	13	14	9	9	9	9	17	18	11	11	12	12	EVET
24Y	27	18	19	35	21	24							
25X	12	13	9	9	9	9	17	19	10	11	12	13	EVET
25Y	25	18	18	35	22	26							

26X	12	15	9	9	9	9	17	17	11	11	12	13	EVET
26Y	29		18		19		34		21		26		
27X	12	12	9	9	9	9	18	18	11	11	12	12	EVET
27Y	24		18		19		36		22		24		
27Z1	24		18		19		36		22		24		

Başlık: Y= Etkilenen Anne; Y = Etkilenen; Y1 = Etkilenen Kız; Y2 = Etkilenen Kız; Z = Etkilenen Kız Kardeşler; Z1 = Etkilenen Kardeş, * Zorunlu taşıyıcı; B = Etkilenen Teyze; B1 = B'nin Etkilenen Kuzeni ve Kızı; * Zorunlu taşıyıcı

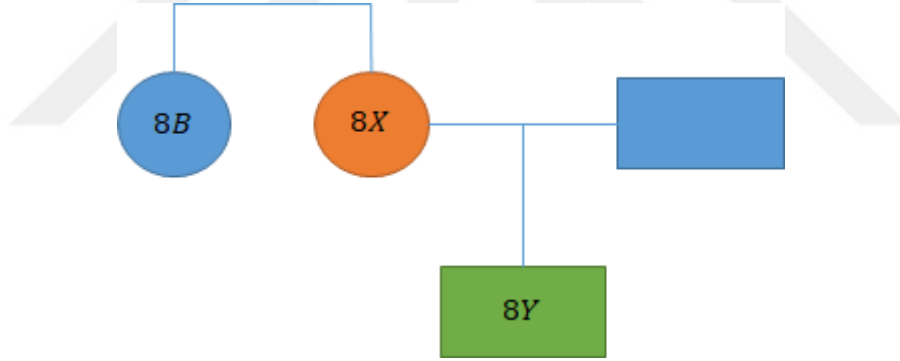


4.12 Olası taşıyıcıları olan ailelerin analizi

Etkilenen aileler arasında elde edilen sonuçları analiz ederek, aşağıdaki özellikleri belirlemek mümkün olmuştur. İki aile, her ikisi de babadan bir 'X' kromozomu almak zorunda oldukları sürece, zorunlu olarak taşıyıcı olan etkilenen kişilerin kızlarına atıfta bulunur. 15 (zorunlu taşıyıcı 15Y1) ve 18 (iki zorunlu taşıyıcı (18Y1 ve 18Y2)) ailelerine atıfta bulunurlar. Diğer beş aile (8, 10, 18, 23 ve 24), seçilen hastaları etkileyen aynı mutasyona sahip olma olasılığını araştırmayı amaçlayan bireylerden oluşuyordu.

Aşağıda her ailenin haplotipi ve heredogramı, bir taşıyıcının karakterine ilişkin analizleriyle birlikte sunulmaktadır.

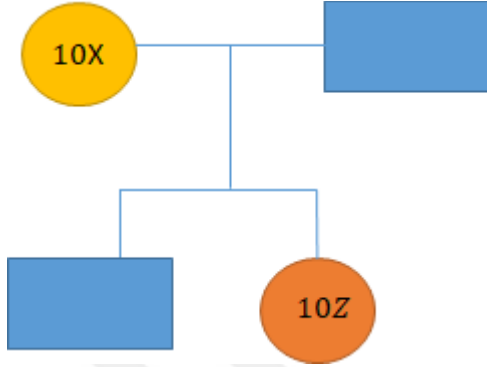
8X	26	26	19	19	17	17	34	36	21	21	27	29
8Y	26		19		17		36		21		27	
8B	26	26	19	19	17	17	36	34	21	21	27	27



Şekil 19 Aile haplotipi ve heredogram 8

Aile 8'de, bu araştırmada kullanılan belirteçler açısından üç kişi analiz edildi. 8Y bireyi hemofili hastasıdır, annesi (8X) zorunlu taşıyıcıdır (yeni bir mutasyon olmaması durumunda) ve annenin teyzesi (8Y) olup, bu kişinin taşıyıcı olma olasılığını araştırmak amaçlanmıştır. 8Y'yi etkileyen aynı mutasyonun Gözlemek mümkün olan dahilinde, 8Y, 8Y'yi etkileyen mutasyona eşlik eden aynı haplotipe sahip değildir. Mutasyon taşımadığı sonucuna varılabilir.

10X	22	27	19	19	12	17	38	33	21	20	24	25
10Y	27		19		17		38		20		24	
10X	27	29	15	19	17	17	38	36	21	20	24	25



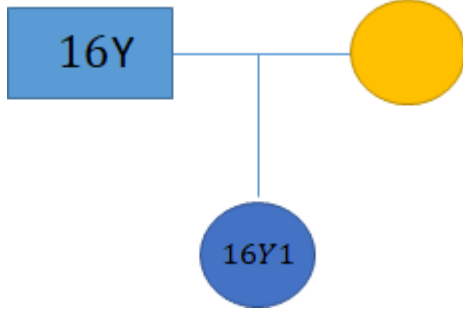
Şekil 20 Aile haplotipi ve heredogram 10

Aile 10'da, bu araştırmada kullanılan belirteçler açısından üç kişi analiz edildi. Bireysel 10Y, hemofiliden etkilenen kişidir, annesi (10X) zorunlu bir taşıyıcıdır (yeni bir mutasyon olmaması durumunda) ve etkilenen kişinin kız kardeşi (10Z) olup, aynı hastalığın taşıyıcısı olma olasılığını araştırmayı amaçlamaktadır. 10Y'yi etkileyen mutasyon. Gözlemlenebildiği kadarıyla, 10Z kardeş, 10Y'yi etkileyen mutasyona eşlik eden haplotipte bulunan tüm belirteçlere sahiptir ve bu da onun mutasyonun taşıyıcısı olarak kabul edilebileceğini gösterir.

Maternal genotipin araştırılmasının mümkün olduğu durumlarda (ki bu böyledir), etkilenen kız kardeşin taşıyıcı olma olasılığına ilişkin çıkarım daha açıktır. Annenin analiz için müsait olmadığı veya etkilenenlerin akrabalarıyla (örneğin kuzenler) çalışırken, tahminler biraz daha karmaşıktır.

Her ikisinin de annesine ilişkin veri olmaması durumunda, 10Y'de bulunan mutasyon eşlik etmeden 10Z'nin aynı haplotipe sahip olmasına yol açabilecek bir durum vardır. Bu koşul, bu haplotipi annesinden (10Y ile aynı anne) almadığını ve bu haplotipin, mutasyon olmadan aynı haplotipe sahip olduğu varsayımıyla biyolojik babasından geldiğini varsayar. Alel frekanslarına göre, popülasyonda akraba olmayan bireylerden kalıtılan benzer bir haplotip olma şansı 12/10-6, yani 1 milyon erkekte 12'dir.

16Y	21		19		17		36		21		25	
16Y1	28	21	19	19	17	17	36	36	21	21	21	25

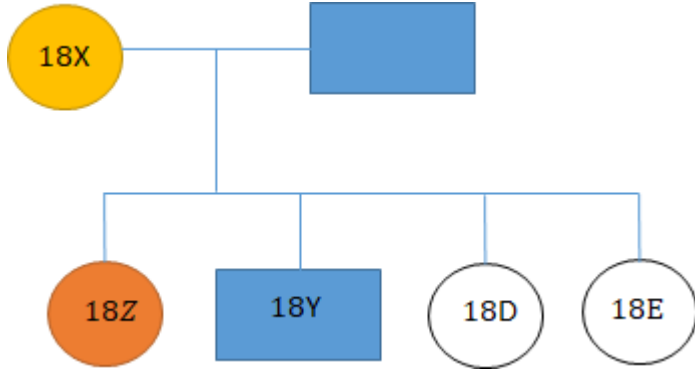


Şekil 21 Aile haplotipi ve heredogram 16

Ailede 16, bu araştırmada kullanılan belirteçler açısından iki birey analiz edildi. 16Y bireyi hemofili hastasıdır ve kızı (16Y1) zorunlu taşıyıcıdır. Beklendiği gibi, kızının (16Y1), 16Y'yi etkileyen mutasyona eşlik eden haplotipte bulunan tüm belirteçlere sahip olduğu görülebilir.

Tüm olası durumlar incelendiğinde, 16Y1 kızının, etkilenen 16Y'ninkine benzer bir haplotipe sahip olma, ancak bu haplotipi hemofilik bireyden almamış olma şansı vardır. Şans, etkilenen kişinin biyolojik kızı olmaması ve gerçek babanın söz konusu bireyle aynı haplotipe sahip olmasıdır. Her bir belirtecin alel frekanslarına dayalı olarak bu haplotiplerin sıklığını hesaplayarak, popülasyonda aynı haplotipi taşıyan iki erkeğin rastgele şansının (araştırılan altı belirteçle ilgili olarak) 85106 mertebesinde olduğunu belirlemek mümkündür. Bunların, ailelere dahil olan kişilerin kişisel verileriyle ilgili ilkel bilgileri dikkate almayan istatistiksel şanslar olduğu açıktır./

18X	29	22	19	19	17	17	38	33	211	21	27	27
18Y	29		19		17		38		21		27	
18Z	21	29	19	19	17	17	31	38	20	21	24	27
18D	21	22	19	19	17	17	30	33	21	21	24	27
18E	21	22	19	19	17	17	32	33	21	21	24	27

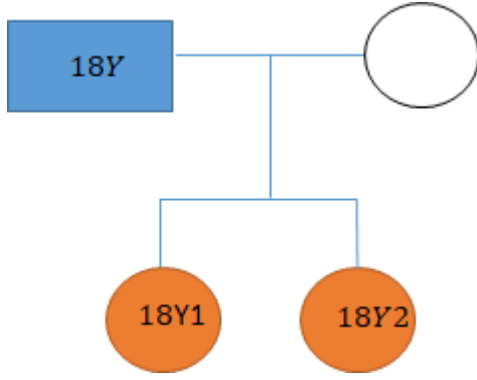


Şekil 22 Aile haplotipi ve heredogram 18

Burada incelenen en büyük aile olan Aile 18'de, bu araştırmada kullanılan belirteçler açısından beş birey analiz edilmiştir. 18Y bireyi hemofiliden etkilenir, annesi (18X) zorunlu bir taşıyıcıdır (yeni bir mutasyon olmaması durumunda) ve etkilenen kişinin üç kız kardeşi (18Z, 18D ve 18E) olup olmadığını araştırmayı amaçlamıştır. 10Y'yi etkileyen aynı mutasyonun taşıyıcıları olmak. Gözlemlenenlere göre, 18D ve 18E kardeşler, 18Y'yi etkileyen mutasyona eşlik eden aynı haplotipe sahip değiller. Sonuç, F8 gen mutasyonunu taşımadıklarıdır.

Kardeş 18Z ile ilgili olarak, 18Y'yi etkileyen mutasyona eşlik eden haplotipte bulunan tüm belirteçlere sahip olduğu gözlemlenebilir, bu da onun mutasyonun taşıyıcısı olarak kabul edilebileceğini gösterir. Hastanın annesinin genotiplemesi mevcut olmasaydı, 18Z'nin aynı haplotipe sahip olduğu ancak mutasyonun eşlik etmediği bir durum olurdu. Aile 9 için alel frekanslarına göre hesaplanana benzer şekilde, popülasyonda akraba olmayan bireylerden kalıtılan benzer bir haplotip olma şansı 1210-5, yani 100 bin erkekten 12'si kadardır. ./

18B	23	19	17	34	21	25						
18B1	23	22	19	19	17	17	34	34	21	21	27	25
18B2	23	22	19	19	17	17	34	34	21	21	27	25

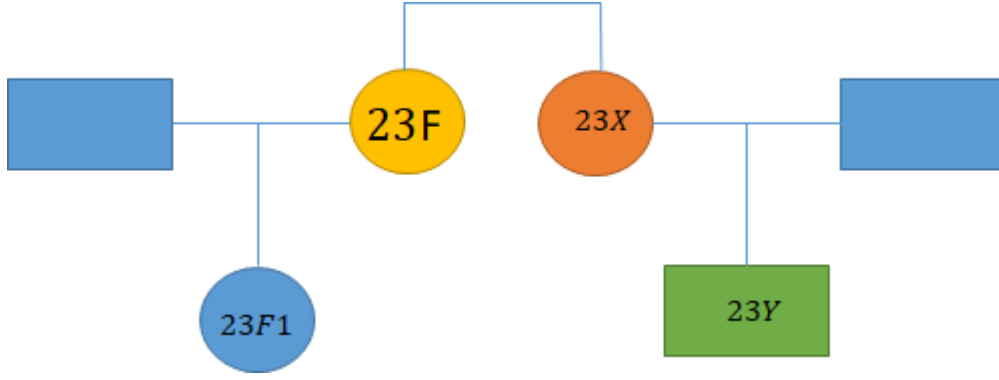


Şekil 23 Ailenin Haplotip ve Heredogramı 18

18. ailede, bu araştırmada kullanılan belirteçler açısından üç kişi analiz edildi. Bireysel 18Y, hemofiliden etkilenir ve kızları (18Y1 ve 18Y2) zorunlu taşıyıcıdır. Beklendiği gibi, 18Y1 ve 18Y2 kızlarının babadan X kromozomu aldıkları için 18Y'yi etkileyen mutasyona eşlik eden haplotipte bulunan tüm belirteçlere sahip oldukları gözlemlendi.

Tüm olası durumlar araştırıldığında, 18Y1 ve 18Y2 kızlarının, etkilenen 18Y'ninkine benzer haplotiplere sahip olma, ancak bu haplotipi hemofilik bireyden almama şansı vardır. Şans, etkilenen kişinin biyolojik kızları değil ve gerçek babanın söz konusu bireyle aynı haplotipe sahip olması. Bu haplotiplerin sıklığını her bir belirtecin alel frekanslarına göre hesaplayarak, popülasyonda aynı haplotipi taşıyan iki erkeğin rastgele şansının 51/10⁻⁷ mertebesinde olduğunu tespit etmek mümkündür. Tablo: Aile 23 haplotip analizi

23X	23	19	19	19	12	17	32	36	21	21	24	21
23Y	19	19	17	36	21	24						
23F	23	19	19	19	12	17	32	36	21	21	25	21
23F1	23	28	19	19	12	18	32	36	21	21	25	21

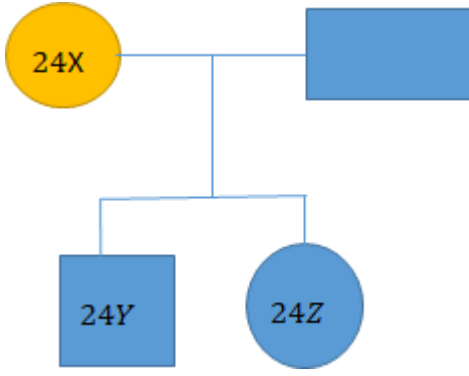


Şekil 24 Aile haplotipi ve heredogram 23

23. ailede, bu araştırmada kullanılan belirteçler açısından dört kişi analiz edildi. Birincisi, bireysel 23Y, hemofiliden etkilenen kişidir. Araştırılan ikinci kişi (23X) etkilenen kişinin annesidir ve bu nedenle zorunlu bir taşıyıcıdır (yeni bir mutasyonun yokluğunda). Araştırılan diğer ikisi, etkilenen kişinin (23B) anne tarafındaki bir teyze ve 23X'i etkileyen aynı mutasyona sahip olma olasılığını araştırmayı amaçlayan kızıydı (23B1). Gözlemleyebildiğimiz kadarıyla, etkilenen kuzen (23B1), 23Y'yi etkileyen mutasyona eşlik eden aynı haplotipe sahip değil, bu da onun bir taşıyıcı olarak kabul edilemeyeceğini gösteriyor. Etkilenen kişinin halası (23B) ile ilgili olarak farklı senaryo ortaya çıkmaktadır. Araştırılan altı belirteçten beşinde (HMF-01, HMF-02, HMF -03, DXS 7423, DXS 10011) 23Y'yi etkileyen mutasyona eşlik eden aynı haplotipe sahiptir. Hepsinden sadece F8 geninin en uzak lokasyonuna sahip olan GATA31E08 markörü hastanın haplotipinden farklıdır. Bu fark, maternal mayoz bölünme sırasında çaprazlama veya mutasyondan kaynaklanmış olabilir.

23X ve 23Y'de bulunan mutasyon eşlik etmeden aynı haplotipe (beş belirteç göz önüne alındığında) 23B'ye yol açabilecek bir durum vardır. Bu koşul, bu haplotipi annesinden almadığını ve bu haplotipin biyolojik babasından geldiğini (23X'in biyolojik babasından farklı olacaktır) varsayar. Alel frekanslarına göre, popülasyonda akraba olmayan bireylerden kalıtılan benzer bir haplotip olma şansı, popülasyondaki 100.000 erkekten 47 / 10⁻⁵ veya 47'dir.

24X	27	19	15	19	18	17	34	35	20	21	25	27
24Y	19		15		17		35		21		27	
24Z	19	28	15	18	17	17	35	16	21	21	27	21



Şekil 25 Aile haplotipi ve heredogram 24

24. ailede, bu araştırmada kullanılan belirteçler açısından üç kişi analiz edildi. 24B bireyi hemofiliden etkilenen kişidir, annesi (24A) zorunlu taşıyıcıdır (yeni bir mutasyon olmaması durumunda) ve etkilenen kişinin kız kardeşi (24C) olup, aynı hastalığın taşıyıcısı olma olasılığını araştırmayı amaçlamaktadır. 24B'yi etkileyen mutasyon. Gözlemleyebildiğimiz kadarıyla, 24C kardeş, 24B'yi etkileyen mutasyona eşlik eden haplotipte bulunan tüm belirteçlere sahiptir ve bu da onun mutasyonun taşıyıcısı olarak kabul edilebileceğini gösterir.

Hastanın annesi genotiplendirilmemiş olsaydı, 24C'nin aynı haplotipe sahip olduğu ancak mutasyonun eşlik etmediği bir durum olurdu. Aile 09 için alel frekanslarına göre hesaplanana benzer şekilde, popülasyonda akraba olmayan bireylerden kalıtılan benzer bir haplotip olma şansı $46/10^9$, yani milyarda 46 erkektir. .

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hemofili A, X kromozomu üzerinde bulunan F8 genindeki bir mutasyonun neden olduğu kalıtsal bir koagülopatidir. Mutasyon, normal kan pıhtılaşması için vazgeçilmez bir plazma glikoproteini olan Faktör VIII (F8) pıhtılaştırıcı aktivitesinde tam veya kısmi eksikliğe neden olur. Avrupa Hemofili ve Müttefik Bozukluklar Derneği'ne göre, F8 geninde 2.000'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyonların tanımlanması, hem genin büyüklüğü hem de karmaşık genomik organizasyonu nedeniyle yüksek derecede zorluk çeken tüm genin doğrudan dizilenmesi ile mümkündür. Bu nedenle, taşıyıcıların teşhisi için bu tekniğin rutin kullanımı, genin içinde veya yakınında bulunan polimorfik belirteçlerle bağlantının analiz edilmesiyle dolaylı tanımlama ile değiştirilebilen pratik olmaz hale gelir.

Muhtemel taşıyıcıların erişkinliğe ulaştıklarında, özellikle hastaların kanama tablosuyla her gün yaşayan etkilenen kardeşleri olanlarda, hemofili hastası çocuklar oluşturma olasılığı konusunda büyük endişe duyduklarını belirtmek önemlidir. Bu kadınlar için aile kurmadan önce taşıyıcılık durumunun teşhis edilmesi veya dışlanması ve taşıyıcı kadın tanımlamasındaki boşluğun doldurulması esastır.

Bu çalışma, Bağdat Hemoterapi ve Hematoloji Merkezi'nde kayıtlı, hemofili A'dan etkilenen 35 aileden oluşan kadınları belirlemeyi amaçlayan mutasyonun dolaylı analizi yoluyla F8 genindeki değişikliklerin moleküler tanımlanması için bir metodoloji oluşturmayı amaçladı. Eğitim Hastanesi, Irak.

Bu anlamda, STR'lerin kullanımının, F8 genindeki değişikliklerin moleküler tanımlanması için etkili olduğu kanıtlandı ve çalışılan popülasyondaki taşıyıcıların dolaylı olarak tanımlanmasına izin verdi. Altı STR'yi kullanarak, analiz edilen tüm durumlarda aile mutasyonunun taşıyıcılarını belirlemek veya onların taşıyıcı olma olasılığını ortadan kaldırmak mümkün oldu.

Kontrol grubunda, gözlemlenen değişkenliğe dayalı olarak Kadınlar Arası Ayrım Gücü (PDM), Erkekler Arası Ayrım Gücü (PDH), Üçlü Dışlama Gücü (PDT) ve Lokus Çeşitliliği (LD) dahil olmak üzere farklı ayrımcılık ölçütleri tahmin edildi. F8 genine yakın yerleştirilmiş altı Kısa Tandem Tekrarı (STR'ler). Bu belirteçlerde bulunan ortalama heterozigotluk %71 civarındaydı. PDM, PDH ve PDT parametrelerinin tümü %99,99'dan

büyükte ve bu, önerilen protokolün kadın taşıyıcıların tanımlanması durumlarında mükemmel şekilde uygulanabilir olduğunu kanıtladı.

Kullanılan altı işaretçinin (TTTA3 = HMF-2, TAAA3 = HMF - 3, DXS10011, CTT3 = HMF-01, GATA31E08 & DXS7423), tüm zorunlu taşıyıcılar dahil olmak üzere taşıyıcıların hem tanımlanmasında hem de hariç tutulmasında faydalı olduğu kanıtlanmıştır. tanımlandı.

Olası taşıyıcıların bulunduğu beş ailede toplam sekiz kadın, dört ailede toplam dört kadında bu karakter tespit edilmiş, yine toplam dört kadın olmak üzere üç ailede taşıyıcı karakter dışlanmıştır. .

Ayrıca, pozitif faktör VIII inhibitörü araştırması olan etkilenen bireylerde, bulunan haplotiplerde, bir inhibitörün gelişmesine yol açan aynı mutasyona sahip olma olasılığına bizi yönlendirecek bir model oluşturmanın mümkün olmadığı da gözlemlendi.

F8 geninin 3 'bölgesinde yer alan belirteçler olarak altı STR kullanarak mutasyonun dolaylı olarak tanımlanmasına yönelik bu metodoloji, taşıyıcı izleme protokolü kadar bir tanımlama testi olarak önerilebilir.

5.1 SON DÜŞÜNCELER

Irak'taki çoğu Hemofili Tedavi Merkezinde hemofili A hastalarının teşhisi ve takibi hala uzak bir hedeftir. Bağdat valiliğinde uygulanabilir bir protokolün onaylanması, Irak'ın farklı bölgelerinde referans merkezlerinin kurulmasını başlatabilir ve Bağdat Eğitim Hastanesi Hemoterapi ve Hematoloji Merkezi rutininde taşıyıcıların teşhisini sağlayabilir.

Gözlenen ilgili bir faktör, aynı haplotipe sahip iki etkilenen bireyin bulunmamasıydı. Bu gerçek, araştırılan bireyler arasında daha sık mutasyon olmadığını göstermektedir ve seçilen Irak Valiliklerinde hemofili A'dan etkilenen hasta popülasyonunda mevcut mutasyonları tanımlayabilecek yeni araştırmaların geliştirilmesini teşvik edebilir.

Çalışmalar sırasında, özellikle semptomatik taşıyıcıların belirlenmesi ve genetik danışmanlık sağlanması konusunda, taşıyıcılara yeterli takibin sunulması için daha yapılacak çok şey olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, taşıyıcıların belirlenmesinde rutin olarak uygulanacak uygulanabilir bir metodoloji oluşturularak, hem etkilenen hem de taşıyıcıların erken teşhis ve tedavisini sağlayacak çok şey yapıldığı da görülmektedir.

Bu çalışmadan şu sonucu çıkarmak mümkündür:

- Bu Irak popülasyonunda Hemofili hastalarında inhibitörlerin gelişimine ilişkin epidemiyolojik verilerle ilgili olarak:
- Şiddetli Hemofilik A hastalarında inhibitörlerin prevalansı, diğer bölgesel gruplara kıyasla Thi Qar ve Wasit valiliği hastalarında daha yüksekti.
- Thi Qar ve Wasit vilayetindeki hemofili hastaları arasında daha yüksek inhibitör insidansı, Kuzey Amerikalılarda gözlemlendiği gibi F8 haplotipleri ile ilişkili değildi.
- Yerli bir geçmişi olan hemofilik hastalarda inhibitör gelişimi insidansı oldukça düşüktü.
- İnhibitörlü hastalarda bulunan mutasyonların tümü, inhibitör gelişimi için yüksek riskli mutasyonlar grubuna aitti.
- Dolaşımdaki mononükleer hücrelerin gen ekspresyonunun değerlendirilmesine dayanan inhibitörlerin gelişimi için risk faktörlerinin incelenmesiyle ilgili olarak:
- İlişkili (aynı ailenin uyumsuz çiftleri) ve ilişkisiz hastalardan alınan numunelerde biyo diziler kullanılarak yapılan tarama, inhibitörlü ve inhibitörsüz gruplar arasında farklı şekilde ifade edilen 66 genle sonuçlandı.
- Üç genin (IL-10, IL-8 ve CST7) gruplar arasında istatistiksel olarak farklı ekspresyon gösterdiği RT-PCR yöntemiyle değerlendirme için on gen seçildi.
- IL-10 inhibitörü olmayan hastalarda daha az ifade edildi. Bu sonuç daha önceki klinik çalışmalarda hiç tanımlanmamış olsa da, sonuçlarımız in vitro ve hayvan çalışmalarında IL-10'un etkisi ile uyumludur.
- IL-8, inhibitörleri olan hasta grubunda anlamlı olarak daha fazla ifade edildi. Bu daha önce hiç tarif edilmemiş bir korelasyon. İnhibitörlerin gelişiminde yeni bir mekanizmanın da dahil olması mümkündür.
- Sistatin F, inhibitörlü hastalarda istatistiksel olarak daha fazla eksprese edildi. Bu etkinliğe katılımımız, bu konuda gelecekte yapılacak çalışmalarla netleştirilmelidir.

6. KAYNAKLAR

- A., Al Saleh, M., Riash, M. A., ... & Amero, K. A. (2009). Molecular genotyping of hemophilia A in Saudi Arabia: report of 2 novel mutations. *Blood coagulation & fibrinolysis*, 20(6), 415-418.
- Abdulqader, A. M. R., Mohammed, A. I., Rachid, S., Ghoraishizadeh, P., & Mahmood, S. N. (2020). Identification of the intron 22 and intron 1 inversions of the factor VIII gene in Iraqi Kurdish patients with hemophilia A. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 26, 1076029619888293
- Abdulqader, A. M. R., Rachid, S., Mohammed, A. I., & Mahmood, S. N. (2019). Application of Indirect Linkage Analysis for Carrier Detection of Hemophilia A in Kurdistan Region of Iraq: Usefulness of Intron 18 Bcl I T> A, Intron 19 Hind III C> T, and IVS7 nt27 G> A Markers. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 25, 1076029619854545.
- Aledort, L. M. (2007). History of haemophilia. *Haemophilia*, 13, 1-2.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Amn AL-Zubaidy, A. M. N. (2014). Descriptive study of hemophilia in Al-Ramadi City. *Diyala Journal of Medicine*, 6(1), 55-59.
- Anam, K., Afrin, F., Banerjee, D., Pramanik, N., Guha, S. K., Goswami, R. P., ... & Ali, N. (1999). Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(2), 231-235.
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366-369

- Azimifar, S. B., Seyedna, S. Y., & Zeinali, S. (2006). Allele frequencies of three factor VIII gene polymorphisms in Iranian populations and their application in hemophilia A carrier detection. *American journal of hematology*, 81(5), 335-339.
- Aziz, I. H., & AL-Musawi, A. H. (2017). INVESTIGATION OF THE INHERITED MUTATIONS RELATED TO INVERSION PROCESS OF INTRON 22 IN A SAMPLE OF IRAQI PATIENTS WITH HEMOPHILIA. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 14(4), 817-821.
- BAGHERI, H., & ZARABADI, Z. S. S. (2015). Evaluating the effects of coastal tourism on the rural areas of Iranian southern islands based on the villagers survey: Case Study of Loft village, Qeshm Island. *Fen Bilimleri Dergisi (CFD)*, 36(6).
- BAGHERI, H., & ZARABADI, Z. S. S. (2015). Evaluating the effects of coastal tourism on the rural areas of Iranian southern islands based on the villagers survey: Case Study of Loft village, Qeshm Island. *Fen Bilimleri Dergisi (CFD)*, 36(6).
- Baker, P., Platton, S., Gibson, C., Gray, E., Jennings, I., Murphy, P., ... & British Society for Haematology. (2020). Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *British journal of haematology*, 191(3), 347-362.
- Bayat, A. E., & Shams, R. (2019). Appraising the impacts of SiO₂, ZnO and TiO₂ nanoparticles on rheological properties and shale inhibition of water-based drilling muds. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 581, 123792. Markerlerinin Yararlılığı. *Klinik ve Uygulamalı Tromboz/Hemostaz*. 25. 1-8. 10.1177/1076029619854545.
- Biocchi, M. P., Pasino, M., Lanza, T., Bottini, F., Boeri, E., Mori, P. G., ... & Acquila, M. (2003). Analysis of 18 novel mutations in the factor VIII gene. *British journal of haematology*, 122(5), 810-817..x.
- Calizzani, G., Vaglio, S., Arcieri, R., Menichini, I., Tagliaferri, A., Antoncetti, S., ... & Grazzini, G. (2013). Models for institutional and professional accreditation of haemophilia centres in Italy. *Haemophilia*, 19(4), e248-e255.
- Castellone, D. D., & Adcock, D. M. (2017, April). Factor VIII activity and inhibitor assays in the diagnosis and treatment of hemophilia A. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 43, No. 03, pp. 320-330). Thieme Medical Publishers.

- Chavali, S., Mahajan, A., Ghosh, S., Mondal, B., & Bharadwaj, D. (2011). Protein molecular function influences mutation rates in human genetic diseases with allelic heterogeneity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(4), 716-722
- Collins, P. W., Fischer, K., Morfini, M., Blanchette, V. S., Björkman, S., & International Prophylaxis Study Group (IPSG) Pharmacokinetics Expert Working Group. (2011). Implications of coagulation factor VIII and IX pharmacokinetics in the prophylactic treatment of haemophilia. *Haemophilia*, 17(1), 2-10.
- Cormier, M., Batty, P., Tarrant, J., & Lillicrap, D. (2020). Advances in knowledge of inhibitor formation in severe haemophilia A. *British journal of haematology*, 189(1), 39-53.
- Dasgupta, S., Repessé, Y., Bayry, J., Navarrete, A. M., Wootla, B., Delignat, S., ... & Lacroix-Desmazes, S. (2007). VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood*, 109(2), 610-612.
- Den Uijl, I. E. M., Fischer, K., Van Der Bom, J. G., Grobbee, D. E., Rosendaal, F. R., & Plug, I. (2011). Analysis of low frequency bleeding data: the association of joint bleeds according to baseline FVIII activity levels. *Haemophilia*, 17(1), 41-44.
- Dimichele, D., Rivard, G., Hay, C., & Antunes, S. (2004). Inhibitors in haemophilia: clinical aspects. *Haemophilia*, 10, 140-145.
- Duncan, E., Collocutt, M., & Street, A. (2013). Nijmegen-Bethesda assay to measure factor VIII inhibitors. In *Haemostasis* (pp. 321-333). Humana Press, Totowa, NJ.
- Dünya Hemofili Federasyonu. Hemofili nedir? <https://www.wfh.org/en/page.aspx?pid=646>.
- Durisová, M., Dedik, L., Bátorová, A., Sakalová, A., & Hedera, J. (1998). Pharmacokinetics of factor VIII in hemophilia A patients assessed by frequency response method. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 20(3), 217-226.
- Eckhardt, C. L., Loomans, J. I., Van Velzen, A. S., Peters, M., Astermark, J., Brons, P. P., ... & Fijnvandraat, K. (2014). Clinical presentation of inhibitor development in non-severe hemophilia A: half of patients have high titer inhibitors and present with bleeding complications. *Haemophilia*, 20, 55.

- Ef, S. J. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, Ithaca, NY.
- Esteve Codina, A., Niederstätter, H., & Parson, W. (2009). "GenderPlex" a PCR multiplex for reliable gender determination of degraded human DNA samples and complex gender constellations. *International Journal of Legal Medicine*, 123(6), 459-464.
- Eyster, M. E., Gill, F. M., Blatt, P. M., Hilgartner, M. W., Ballard, J. O., Kinney, T. R., & Hemophilia Study Group. (1978). Central nervous system bleeding in hemophiliacs. *Blood*, 51(6), 1179-1188.
- Fan, L. K., Wang, Z. W., Hua, B. L., Su, W., Wang, S. J., & Zhao, Y. Q. (2009). Comparison of modified Bethesda assay and Nijmegen assay in detecting FVII inhibitor in patients with hemophilia A. *Zhongguo yi xue ke xue Yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 31(5), 551-554.
- Fijnvandraat, K., Cnossen, M. H., Leebeek, F. W., & Peters, M. (2012). Diagnosis and management of haemophilia. *Bmj*, 344.
- Franchini, M., & Mannucci, P. M. (2014, July). The history of hemophilia. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 40, No. 05, pp. 571-576). Thieme Medical Publishers..
- Girolami, A., Luzzatto, G., Varvarikis, C., Pellati, D., Sartori, R., & Girolami, B. (2005). Main clinical manifestations of a bleeding diathesis: an often disregarded aspect of medical and surgical history taking. *Haemophilia*, 11(3), 193-202.
- Goodeve, A. (2008, September). Molecular genetic testing of hemophilia A. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 34, No. 06, pp. 491-501). © Thieme Medical Publishers..
- Goodeve, A. C., & Peake, I. R. (2003). The molecular basis of hemophilia A: genotype-phenotype relationships and inhibitor development. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 29, No. 01, pp. 023-030). Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662.
- Graham, J. B., Green, P. P., McGraw, R. A., & Davis, L. M. (1985). C ONSIDERABLE. *Blood*, 66(4), 759-764.

Hassan, M. M., & Jabber, A. D.(2016). Identification of Factor VIII Gene Mutations in Iraqi Patient with Hemophilia A..

Hedner, U., & Kisiel, W. (1983). Use of human factor VIIa in the treatment of two hemophilia A patients with high-titer inhibitors. *The Journal of clinical investigation*, 71(6), 1836-1841.

Herrmann, F & Wulff, Karin & Auerswald, Günter & Schulman, S & Astermark, J & Batorova, Angelika & Kreuz, W & Pollmann, Hartmut & Ruiz de Saez, Arlette & Bosch, N & Salazar-Sanchez, Lizbeth. (2008). Faktör VII eksikliği: Avrupa ve Latin Amerika'dan faktör 7 genindeki mutasyonları olan 717 deneğin klinik görünümü. *Hemofili: Dünya Hemofili Federasyonu'nun resmi dergisi*. 15. 267-80. 10.1111/j.1365-2516.2008.01910.x.

Heyman, H. M., Senejoux, F., Seibert, I., Klimkait, T., Maharaj, V. J., & Meyer, J. J. M. (2015). Identification of anti-HIV active dicaffeoylquinic-and tricaffeoylquinic acids in *Helichrysum populifolium* by NMR-based metabolomic guided fractionation. *Fitoterapia*, 103, 155-164.

Hofbauer, C. J., Whelan, S. F., Hirschler, M., Allacher, P., Horling, F. M., Lawo, J. P., ... & Reipert, B. M. (2015). Affinity of FVIII-specific antibodies reveals major differences between neutralizing and nonneutralizing antibodies in humans. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(7), 1180-1188.

Hsiao, S. J., Zehir, A., Sireci, A. N., & Aisner, D. L. (2019). Detection of tumor NTRK gene fusions to identify patients who may benefit from tyrosine kinase (TRK) inhibitor therapy. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 21(4), 553-571.

ISO 690

Jayandharan, G. R., Shaji, R. V., Baidya, S., Nair, S. C., Chandy, M., & Srivastava, A. (2005). Molecular characterization of factor IX gene mutations in 53 patients with haemophilia B in India. *Thrombosis and haemostasis*, 94(10), 883-886.

Jayandharan, G. R., Srivastava, A., & Srivastava, A. (2012, February). Role of molecular genetics in hemophilia: from diagnosis to therapy. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 38, No. 01, pp. 64-78). Thieme Medical Publishers.

- Jayandharan, G. R., Viswabandya, A., Baidya, S., Nair, S. C., George, B., Mathews, V., ... & Srivastava, A. (2006). Mutations in coagulation factor XIII A gene in eight unrelated Indians. *Thrombosis and haemostasis*, 95(03), 551-556.
- Kadhim, K. A. R., Al-Lami, F. H., & Baldawi, K. H. (2019). Epidemiological profile of hemophilia in Baghdad-Iraq. *INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing*, 56, 0046958019845280..
- Kadhim, K. A. R., Al-Lami, F. H., & Baldawi, K. H. (2019). Epidemiological profile of hemophilia in Baghdad-Iraq. *INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing*, 56, 0046958019845280.
- Kadhim, K. A. R., Al-Lami, F. H., & Baldawi, K. H. (2019). Epidemiological profile of hemophilia in Baghdad-Iraq. *INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing*, 56, 0046958019845280.
- Kadhim, K. A. R., Al-Lami, F. H., & Baldawi, K. H. (2019). Epidemiological profile of hemophilia in Baghdad-Iraq. *INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing*, 56, 0046958019845280.
- Kazemi, B. (2011). Using Factor VII in Hemophilia Gene Therapy. In *Targets in Gene Therapy*. IntechOpen.
- Kim, S. Y., Kang, S. Y., & Lee, W. I. (2010). Comparative measurement of FVIII inhibitors in hemophilia A patients using ELISA and the Bethesda assay. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 30(3), 260-263.
- Korzeniewski, K. (2006). The epidemiological situation in Iraq. *Przegląd epidemiologiczny*, 60(4), 845.
- Lai, J. D., & Lillicrap, D. (2017). Factor VIII inhibitors: advances in basic and translational science. *International Journal of Laboratory Hematology*, 39, 6-13.
- Lateef, I. A., Hamood, H. J., & Khaleel, O. A. (2016). Spectrum of hemophilia in Diyala-Iraq. *Diyala Journal of Medicine*, 10(1), 53-58.
- Ljung, R. C. (2008). Intracranial haemorrhage in haemophilia A and B. *British journal of haematology*, 140(4), 378-384.

- Lu, H. O. N. G., Califano, J. V., Schenkein, H. A., & Tew, J. G. (1993). Immunoglobulin class and subclass distribution of antibodies reactive with the immunodominant antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infection and immunity*, 61(6), 2400-2407.
- Ludlam, C. A., Pasi, K. J., Bolton-Maggs, P., Collins, P. W., Cumming, A. M., Dolan, G., ... & UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation. (2005). A framework for genetic service provision for haemophilia and other inherited bleeding disorders. *Haemophilia*, 11(2), 145-163.
- Mensur, Montazer. (2021). Irak (Rodentia) Doplněný çorbasisis hlodavců v Iraku (Rodentia) kemirgenlerinin güncellenmiş kontrol listesi. *Lynx'in yeni serisi*. 51. 1804-6460 . 10.37520/lynx.20200.008.
- Miyashita, N., Endo, T., Onozawa, M., Hashimoto, D., Kondo, T., Fujimoto, K., ... & Teshima, T. (2017). Risk factors of human herpesvirus 6 encephalitis/myelitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant infectious disease*, 19(3), e12682.
- Muhammed, Maysoon. (2017). Wasit Eyaletindeki Iraklı Kadın Taşıyıcılarda Intron22 Mutasyonlarının Hemofili A. *Global Journal of Medical Research ile Saptanması*. 17. 13-24. 10.34257/GJMRFVOL17IS1PG13.
- Mustafa, M., Salih, A. F., Illzam, E. M., Sharifa, A. M., Suleiman, M., & Hussain, S. S. (2016). Prostate cancer: pathophysiology, diagnosis, and prognosis. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 15(6), 04-11.
- Mustafa, M., Salih, A. F., Illzam, E. M., Sharifa, A. M., Suleiman, M., & Hussain, S. S. (2016). Prostate cancer: pathophysiology, diagnosis, and prognosis. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 15(6), 04-11.
- Nienhuis, A. W., Nathwani, A. C., & Davidoff, A. M. (2017). Gene therapy for hemophilia. *Molecular Therapy*, 25(5), 1163-1167.
- Nikisha, G. N., & Menezes, G. A. (2014). Hemophilia and its treatment: Brief review. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 26(1), 277-83.

- Peyvandi, F., Oldenburg, J., & Friedman, K. D. (2016). A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(2), 248-261.
- Pinto, P., Ghosh, K., & Shetty, S. (2013). Factor VIII haplotypes in severe hemophilia A patients in India. *Annals of hematology*, 92(7), 999-1000.
- Qadir, O. H., Agi, E., Bolhassani, A., Saraji, A. A., Namvar, A., Alizadeh, S., & Shallal, A. F. (2020). Genotyping of intron 1 and 22 inversion of factor VIII gene using IS-PCR in Kurdish patients of Iraq. *EurAsian J Biosci*, 14, 1181-5.
- Rossetti, L. C., Radic, C. P., Larripa, I. B., & De Brasi, C. D. (2008). Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6(5), 830-836.
- Saal, L. H., Troein, C., Vallon-Christersson, J., Gruvberger, S., Borg, Å., & Peterson, C. (2002). BioArray Software Environment (BASE): a platform for comprehensive management and analysis of microarray data. *Genome biology*, 3(8), 1-6.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Schramm, W. (2014). The history of haemophilia—a short review. *Thrombosis research*, 134, S4-S9.
- Shao, X. T., Feng, L., Gu, L. J., Wu, L. J., Feng, T. T., Yang, Y. M., ... & Yao, H. P. (2009). Expression of interleukin-18, IL-18BP, and IL-18R in serum, synovial fluid, and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental medicine*, 9(3), 215-221
- Shima, M., Matsumoto, T., Fukuda, K., Kubota, Y., Tanaka, I., Nishiya, K., ... & Yoshioka, A. (2002). The utility of activated partial thromboplastin time (aPTT) clot waveform analysis in the investigation of hemophilia A patients with very low levels of factor VIII activity (FVIII: C). *Thrombosis and haemostasis*, 87(03), 436-441.
- Shin, H., Lee, H., Fejes, A. P., Baillie, D. L., Koo, H. S., & Jones, S. J. (2011). Gene expression profiling of oxidative stress response of *C. elegans* aging defective AMPK

- mutants using massively parallel transcriptome sequencing. *BMC research notes*, 4(1), 1-16.
- Shrestha, S., Dong, S., Li, Z., Huang, Z., & Zheng, F. (2016). Evaluation of factor VIII polymorphic short tandem repeat markers in linkage analysis for carrier diagnosis of hemophilia A. *Biomedical Reports*, 5(2), 228-232.
- Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., ... & Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321(6071), 674-679.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98(3), 503-517..
- Sung, J. J., Park, C. Y., Leem, J. W., Cho, M. S., & Kim, D. W. (2019). Restoration of FVIII expression by targeted gene insertion in the FVIII locus in hemophilia A patient-derived iPSCs. *Experimental & molecular medicine*, 51(4), 1-9.
- Taresh, A. K., & Hassan, M. K. (2019). Inhibitors among patients with hemophilia in Basra, Iraq—A single center experience. *Nigerian journal of clinical practice*, 22(3), 416-416.
- That Owaidah, T. M., Alkhail, H. A., Al Zahrani, H., Al Musa
- That Owaidah, T. M., Alkhail, H. A., Al Zahrani, H., Al Musa, A., Al Saleh, M., Riash, M. A., ... & Amero, K. A. (2009). Molecular genotyping of hemophilia A in Saudi Arabia: report of 2 novel mutations. *Blood coagulation & fibrinolysis*, 20(6), 415-418.
- Truong K 13-8 (2019). ["GraphPad acquires University of Chicago spinout SnapGene"](#)
- Viel, K. R., Ameri, A., Abshire, T. C., Iyer, R. V., Watts, R. G., Lutcher, C., ... & Howard, T. E. (2009). Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *New England Journal of Medicine*, 360(16), 1618-1627.
- Wacey, A. I., Kemball-Cook, G., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E., Schwaab, R., Lindley, P., & Tuddenham, E. G. D. (1996). The haemophilia A mutation search test and resource site, home page of the factor VIII mutation database: HAMSTeRS. *Nucleic acids research*, 24(1), 100-102.
- Wu, W., Dave, N., Tseng, G. C., Richards, T., Xing, E. P., & Kaminski, N. (2005). Comparison of normalization methods for CodeLink Bioarray data. *BMC bioinformatics*, 6(1), 1-14.

Wu, Y., Hu, Z., Li, Z., Pang, J., Feng, M., Hu, X., ... & Liang, D. (2016). In situ genetic correction of F8 intron 22 inversion in hemophilia A patient-specific iPSCs. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.

Zimmerman, B., & Valentino, L. A. (2013). Hemophilia: in review. *Pediatr Rev*, 34(7), 289-94.



EKLER



(1)

(2)

(3)



(4).

(5).

(6)

1-ELISA

2-BIOLYZER

3-MINIVIDAS

4-Hb ELECTROPHORESIS

5-STAGO COMPACT

6-SYSMEX CBC COULTER





الى / مستشفى الحسين التعليمي
م/ تسهيل مهمة

تحية طيبة ..

بناءً على الطلب المقدم من قبل طالب الدراسات العليا - الماجستير (سيف عبدالمهدي عويد) في جامعة اهي افران كيرشهير /تركيا / قسم التحليلات المرضية وبناءً على موافقتكم المبدئية على اصل الاستمارة المقدمة من الباحث .

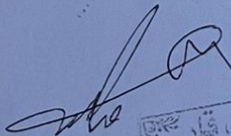
لا مانع لدينا من تسهيل مهمته لغرض الحصول على بيانات لاستكمال بحثه الموسوم :

(Determination of some gems and some immune markers for patient
with hemophilia)

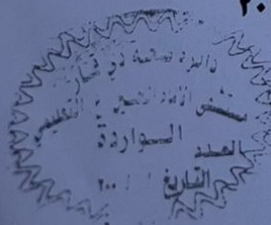
على ان لا تتحمل دائرتنا أي تبعات مالية او قانونية و على ان يلتزم الباحث بالاعتبارات الاخلاقية عند اجراء البحث.

تم استيفاء اجور تسهيل المهمة بموجب الوصل المرقم (٠٤١٨٠٧٤) في ٢٠٢١/٢/٢٣

...للتفضل بالاطلاع مع الاحترام ...


الدكتور
مرتضى كاظم ياسر
مدير القسم

٢٠٢١/٢/٢٣



نسخه منه الى :-

- الباحث سيف عبدالمهدي عويد / مع التقدير
- قسم التدريب و التنمية البشرية / شعبة ادارة البحوث و المعرفة ... مع الاوليات

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Saif Abdul Mehdi Awaid Awaid
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer:



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Mazaya üniversitesi
Fakülte	Tıbbi teknolojiler
Bölümü	Tıbbi laboratuvar teknolojisi
Mezuniyet Yılı	2015/2016

Yüksek Lisans	
Üniversite	KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
Enstitü Adı	FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anabilim Dalı	İLERİ TEKNOLOJİLER ABD
Programı	
Mezuniyet Tarihi	2022