

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ-ONKOLOJİ BİLİM DALI

59485

HEMOFİLİ A HASTALARINDA
İNHİBİTÖR VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

DR. HALE ÖREN
(UZMANLIK TEZİ)

TEZ YÖNETİCİSİ: PROF. DR. GÜLERSU İRKEN

İZMİR, 1997

Hematoloji uzmanlık eğitimim sırasında başta Prof. Dr. Gülersu İrken olmak üzere deneyim ve bilgilerinden yararlandığım tüm öğretim üyelerine, ortak bir çalışma yapmayı kabul eden ve her konuda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Işın Yaprak'a, hastaların ücretsiz mutasyon tiplerinin araştırılmasında yardımcı olan Doç. Dr. Hande Çağlayan'a, tezimin materyal ve metodunda büyük yardımları olan Kimyager Cahide Deveci'ye, istatistiksel analizlerde yardımcı olan Uzm. Dr. Hülya Ellidokuz'a, dostluk ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	2
MATERYAL VE METOD	29
BULGULAR	31
TARTIŞMA	37
SONUÇLAR	42
ÖZET	44
SUMMARY	45
KAYNAKLAR.....	46

GİRİŞ VE AMAÇ

Faktör VIII (F VIII) inhibitörleri hemofili A'lı hastalarda F VIII içeren değişik kan ürünlerine karşı gelişen antikorlardır. Genel hemofili A popülasyonunda inhibitör gelişme insidansı % 5-15 arasında değişirken prevalans % 4-20 dolayındadır (1,2). Özellikle ağır hemofili A hastalarında insidans % 18-52'ye yükselmekte ve inhibitör gelişme riski artmaktadır. F VIII inhibitörlerinin gelişmesi sıklıkla, hemofilik bir hastanın genellikle kullandığı faktör preparatını alırken beklenen cevabın azalması ve kanamanın sürmesi veya aniden kanamanın başlaması ile ortaya çıkmaktadır. F VIII inhibitörleri F VIII koagülan aktivitesini nötralize ederek kanayan hemofilik bir hastanın tedavisini güçleştirmekte ve mortaliteyi arttırmaktadır (3).

Son 10 yılda F VIII inhibitörleri hakkında daha çok bilgi edinilmiştir. Günümüzde inhibitörlerin immunokimyasal özellikleri, tepkiye girdikleri F VIII epitopları, F VIII' in fonksiyonları üzerine etkileri daha iyi anlaşılmaktadır. Daha az bilinenler ise inhibitör formasyonunu oluşturan nedenler, transfüze edilen F VIII'in bu sensitizasyondaki rolü ve F VIII'e karşı gelişen immun yanıtın doğasıdır (4,5). Özellikle konakçıya ait faktörlerin etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Hastaların F VIII düzeylerinin, klinik tiplerinin, yaşlarının, kullandıkları F VIII kaynağının, HLA haplotiplerinin, mutasyon tiplerinin inhibitör gelişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (2).

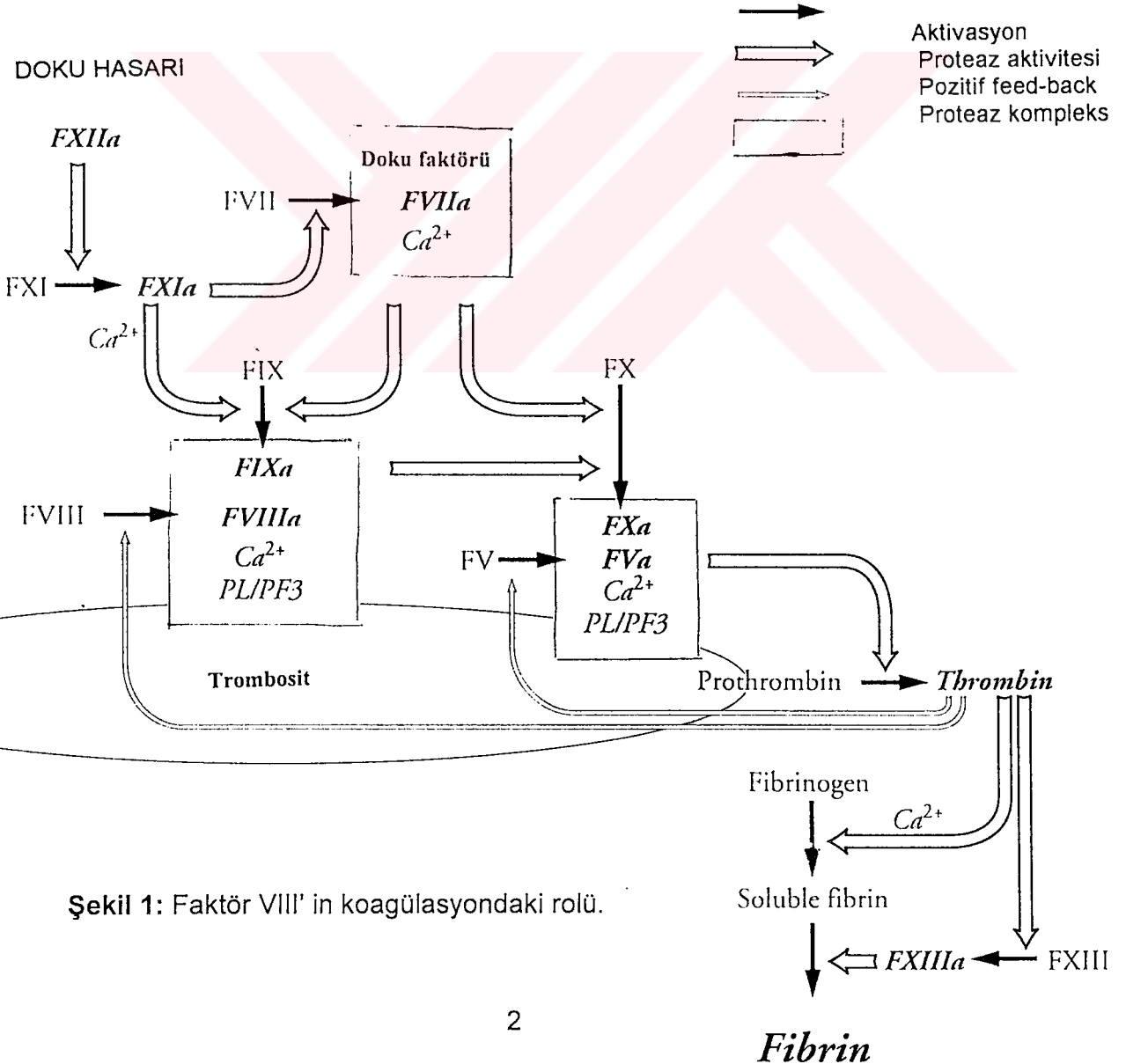
Bu çalışmamızda hemofili A hastalarında Bethesda metodu ile inhibitör varlığını araştırarak inhibitör olan hastalarda uygun tedaviyi yapabilmeyi, inhibitör gelişme prevalansını belirlemeyi ve hastaların yaşı, faktör VIII düzeyleri, klinik tipleri, F VIII kullanma süreleri, son 1 yıl içinde kaç kez F VIII kullandıkları, kaç gün F VIII'e maruz kaldıkları, kanama sayıları, kullandıkları F VIII kaynakları, mutasyon tipleri ile inhibitör gelişimi arasındaki ilişkiyi saptamayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Hemofili A'nın tanımı ve fizyopatolojisi

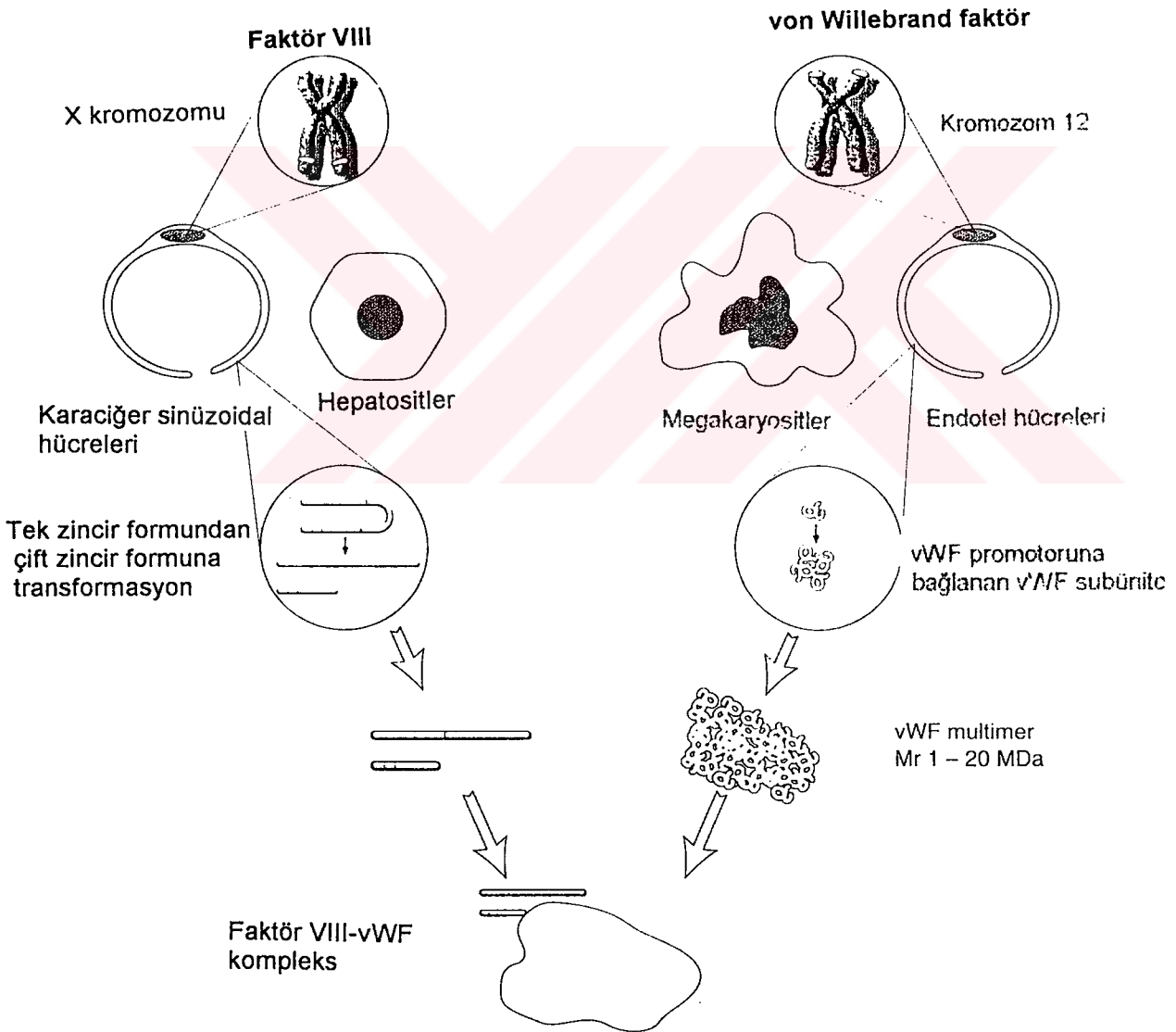
Hemofili A herediter pıhtılaşma bozuklarının % 80' ini kapsayan, koagülasyonun önemli komponentlerinden birisi olan faktör VIII (F VIII) aktivitesinde konjenital eksiklik sonucu ortaya çıkan, X'e bağlı resessif kalıtım gösteren bir kan hastalığıdır. Görülme sıklığı popülasyondaki erkek doğumların 5.000 ila 10.000de 1'i olarak kabul edilir. Taşıyıcı olan kadınların sıklığı hasta erkeklerin iki katı kadardır (6-10).

Normalde F X'un aktivasyonu ile pıhtı oluşabilmesi için aktive F VIII (F VIII), F IXa, kalsiyum iyonları ve aktive olmuş trombositlerden gelen fosfolipidlere ihtiyaç vardır. Hemofili A'da F VIII eksikliği sonucu F X aktive olamamakta ve pıhtı oluşamamaktadır (Şekil 1)(13).



Şekil 1: Faktör VIII' in koagülasyondaki rolü.

F VIII en çok karaciğer sinüzoidal hücrelerinde ve endotel hücrelerinde sentezlenmektedir. F VIII' in plazmada taşınması ve proteolitik parçalanmadan korunması için von Willebrand faktöre (vWF) gereksinimi vardır (11-13)(Şekil 2). F VIII' in aktivitesinde azalma, FVIII genindeki bozukluklara bağlı olarak F VIII protein miktarında eksiklik, proteinin anormal fonksiyon yapması veya bu ikisinin kombinasyonu sonucu ortaya çıkabilir. Hastalarda sıklıkla dolaşımda F VIII düzeyinde eksiklik ön plandadır. Hastaların pek az bir kısmında (% 5) fonksiyonel olarak defektif protein vardır. Immunoradioaktif metodlar geliştirilmeden önce böyle hastalar hemofili A varyantları veya plazmalarında cross reaktif materyal pozitif (CRM+) hastalar, F VIII proteinin olmadığı hastalar ise cross reaktif materyal negatif (CRM-) hastalar olarak adlandırılmıştır (14,15).



Şekil 2: Faktör VIII ve vWF'ün sentezi ve kompleks oluşumu.

Hemofili A'da klinik bulgular

Hemofili A'da klinik bulgular ve F VIII düzeyi birbiriyle yakından ilişkilidir (6,12,16) (Tablo 1).

Tablo 1: Hemofili A'da F VIII düzeyi ve klinik bulguların ilişkisi.

Hemofili A Tipi	Ağır	Orta	Hafif
F VIII düzeyi	% 0-<2	% 2-5	% 6-30
Hemofili A'lı hastaların %si	% 70	% 15	% 15
Kanamaların başlama yaşı	≤ 1 yaş	1-2 yaş	2 yaş-erişkin
Yenidoğan döneminde intrakranial kanama	bazen (% 2-5)	nadir	çok nadir
Sünnet ile kanama	sık	sık	nadir
Eklem-kas içine kanama	spontan	minör travmalarla	major travmalarla
SSS kanaması	yüksek risk (%2-8)	orta risk	nadir
Proflaksi yapılmadan cerrahi sonrası kanama	ağır	orta	hafif
Travma - diş çekimi sonrası kanama	sık	sık	genellikle
Hematüri	+	±	-

F VIII düzeyindeki eksikliğin derecesi aynı aile bireyleri içinde benzer bulgular gösterir, tip ve klinik problemlerin sıklığı aynıdır. Nadir varyantlar dışında konsantrasyonları yaşam boyunca sabit kalır (10,11,16). Hemofili A'nın ortalama tanı yaşı ağır tip için 9 ay, orta tip için 22 aydır. İlk başvuru semptomu % 30 vakada sünnet kanaması, % 2 vakada ise yenidoğan döneminde intrakranial kanamadır. F VIII plasentadan geçmediği için ağır hemofilik yenidoğanlarda enjeksiyon yerinde kanama, sefal hematoma, umbilikal korddan kanama olabilir (%10). Hastalığın en sık semptomları olan eklem içi kanama ve yumuşak dokulara kanama ilk başvuruda bulunmayabilir, genellikle çocuk yürümeye başladıktan sonra semptomlar başlar. Eklem içi kanamalar tüm eklemlerde görülebilirse de en sık tuttuğu eklemler sırasıyla diz, ayak bileği ve dirsekler, daha az sıklıkta omuz ve kalça eklemidir. Kanayan eklem çok ağrılı, şiş, sıcak ve dokunmaya hassas hale gelir. Uygun tedavi ile ağrının hemen geçmesi tipiktir, şişlik ve kızarıklık daha uzun sürede iyileşir. Aynı eklemde

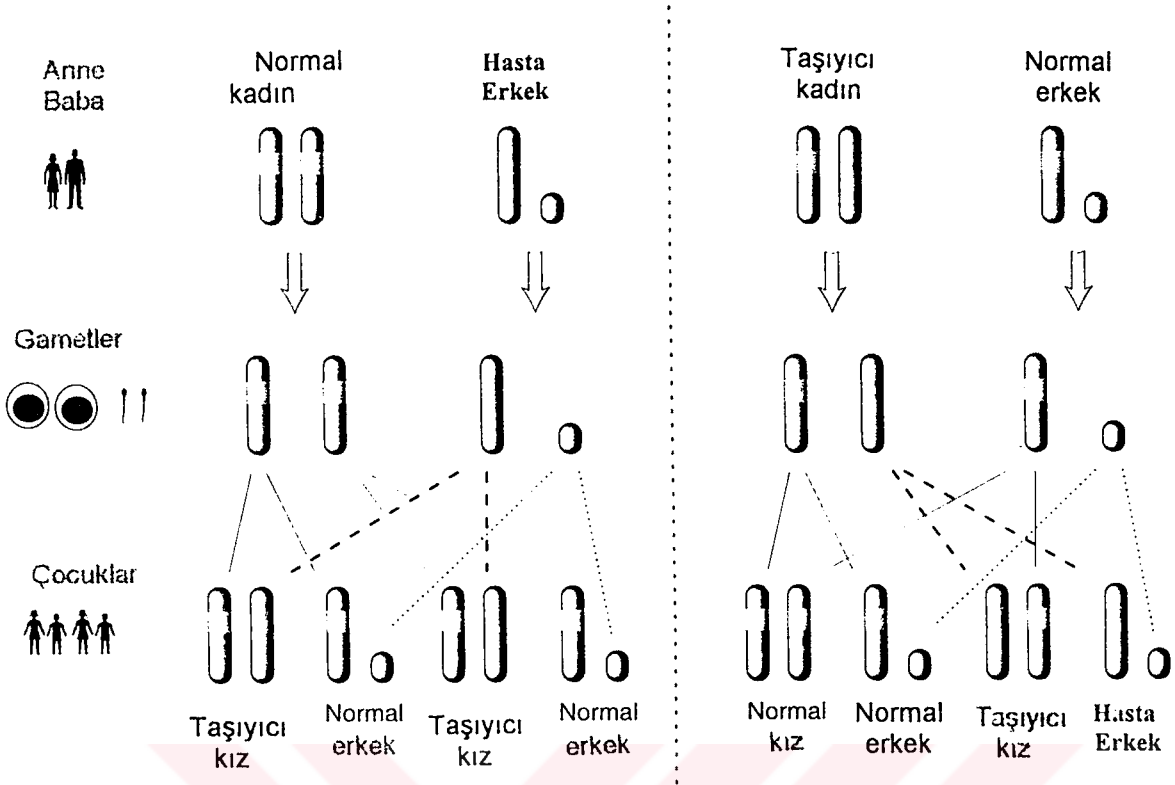
tekrarlayan kanamalar eklem kapsülünde kalınlaşma ve dejenerasyon, sonuçta eklem kontraktürüne yol açar. Bunun sonucunda komşu kemik dokusunda osteoporoz ve kas güçsüzlüğü, ankiloz gelişebilir. Yumuşak doku ve mukoza kanamaları da sık görülür. Özellikle diş çekimi sonrası ve dilin ısırılmasıyla oluşan kanama hafif hemofiliklerde bile tedavi edilmezse hayatı tehdit edebilir. Kas içine kanamalar ile kas kontraktürleri gelişebilir. İliopsoas, gluteus, gastroknemius, perineus, ön kol fleksör kasları içine olan kanamalar periferik sinir lezyonlarına yol açabilir. En sık ölüm nedeni intrakranial kanamalardır, ayrıca trakea çevresine massif kanamalar ve gastrointestinal kanamalar hayatı tehdit edicidir (9,11,12,17,18).

Hemofili A'da laboratuvar bulguları

Hemofili A'da başlangıçta yapılması gereken testler protrombin zamanı (PT) ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT) olmalıdır. Hemofili A'da PT normal, APTT uzamıştır. F VIII ve FIX eksikliğini ayırmada tromboplastin jenerasyon testi (TGT) yapılabilir. Kanama zamanı normaldir. Kesin tanı F VIII düzeyi ölçümü ile konur. Faktör düzeyi en az 2 kez bakılmalıdır (12-14). F VIII aktivitesi koagülasyon yöntemi ile ölçülebilir ve ölçülen miktar F VIII:C olarak adlandırılır. Ayrıca immunolojik yöntemlerle plazmadaki miktarı kantitatif olarak ölçülebilir ve bu yöntemle ölçülen miktar F VIII:Ag olarak adlandırılır. Çoğunlukla F VIII:C ile F VIII:Ag arasında iyi bir korrelasyon vardır.

Hemofili A'da genetik geçiş ve prenatal tanı

X'e bağlı resessif geçiş ile ortaya çıkan hemofili A'da vakaların tümüne yakını erkektir. Hasta bir erkek genotipik olarak sağlam bir kadınla evlendiği takdirde, bu çiftin tüm kız çocukları X kromozomlarından birini mutlaka babalarından almak zorunda olduklarından taşıyıcı, erkek çocuklar babadan Y kromozomunu, anneden X kromozomunu alacakları için normal olacaklardır. Taşıyıcı bir kadınla normal bir erkek evlendiği zaman ise bu çiftin kız çocukları % 50 olasılıkla genotipik olarak normal, % 50 olasılıkla taşıyıcı, erkek çocukları ise % 50 olasılıkla genotipik olarak normal, % 50 olasılıkla hemofili A olacaklardır (Şekil 3)(13). Çok ender olarak taşıyıcı bir kadınla hasta bir erkek evlenebilir. Bu durumda erkek çocuklar % 50 olasılıkla normal, %50 olasılıkla hasta, kız çocuklar ise % 50 olasılıkla hasta %50 olasılıkla taşıyıcı olacaktır (13,15).



Şekil 3: Hemofilide herediter geçiş.

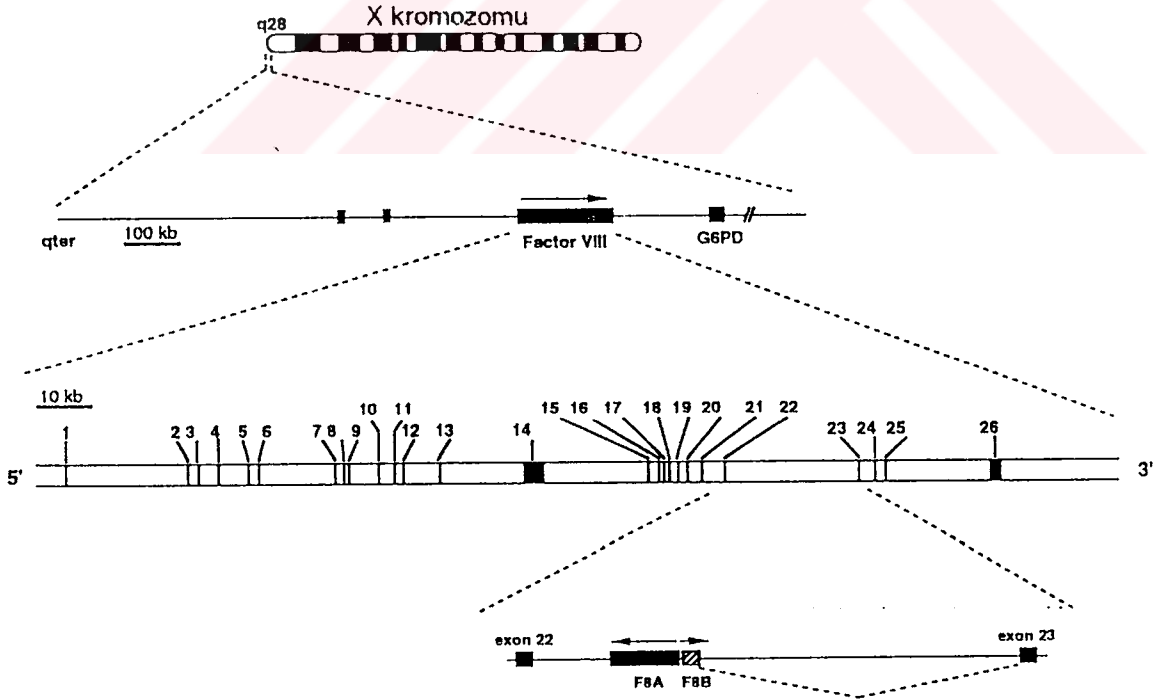
Ailelerin yaklaşık % 30-50'sinde başka hasta bir erkek birey bulunamaz. Bunun nedeni ya mutant genin birkaç kuşak boyunca kadın bireyler tarafından geçirilmiş olması ya da hastalığın, hasta bireyin annesinde olan yeni bir mutasyon sonucu ortaya çıkmasıdır. Yeni mutasyon annenin tüm hücrelerinde heterozigot olarak (gerçek taşıyıcılık) veya sadece ovumda (anne taşıyıcı değildir) meydana gelmiş olabilir. Hemofilide spontan mutasyon hızı ($1.3-4.2 \times 10^{-5}$) oldukça yüksektir (7,9,15,19). Bir kadın hemofili A geni için taşıyıcı ise F VIII düzeyi normalin % 50'si kadar bulunur. Embriyogenez sırasında kadınlardaki X kromozomlarından biri rastgele inaktive olur. Normal F VIII geni taşıyan X kromozomlarının çoğu inaktive olursa taşıyıcı kadındaki F VIII:C düzeyi oldukça düşük olacaktır. F VIII:C konsantrasyonunun, vWF Ag'ne oranı taşıyıcılığı gösterme açısından daha anlamlıdır. Ancak bunu doğru saptayabilmek için o toplumdaki normal ve taşıyıcı kişilerde F VIII:C / vWF Ag oranının bilinmesi gerekir. Hemofili A'da vWF Ag düzeyi normaldir. Bu oranın 0,6 ve daha az olması taşıyıcılığı düşündürür; 0,6 ila 0,9 arasında olması bir anlam ifade etmez; 0,9 üzerinde ise sıklıkla taşıyıcı olmadığını gösterir (20).

Ailedeki hemofili A mutasyon tipi biliniyorsa DNA analiz yöntemleri ile % 100'e yakın bir olasılıkla hasta kişiler, taşıyıcılar doğru tanımlanabilir ve prenatal tanı

yapılabilir. Ancak mutasyon tipi bilinmiyorsa DNA polimorfizminden yararlanılarak genotipik araştırma yapılır. F VIII geni içinde ve dışında tanımlanan polimorfik markerlar taranarak % 99 olguda taşıyıcılık ve prenatal tanı doğru olarak saptanabilir (21-23).

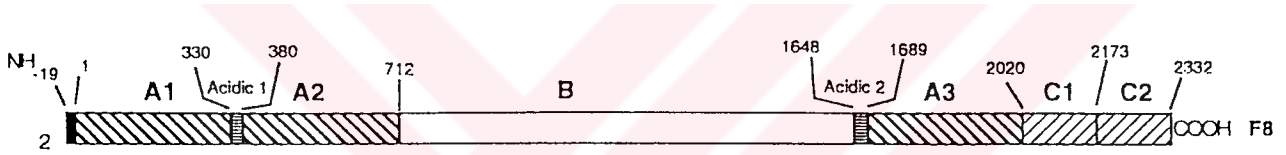
Faktör VIII geni

F VIII geni ilk kez 1984 yılında çeşitli araştırmacılar tarafından klonlanmıştır (24-26). X korozomunun uzun kolunda telemore yakın bir bölgede (Xq 28), G-6-PD lokusuna yakın yer alan F VIII geninin 186 kb uzunluğunda (yaklaşık X kromozom DNA'sının % 0,1'i kadar) olduğu saptanmış, 26 ekzon ve 25 intron içerdiği gösterilmiştir. Ekzon uzunlukları 14. ve 26. ekzon dışında 69-262 bp arasındadır. Ekzon 14 ve 26 ise sırasıyla 3106 bp ve 1958 bp uzunluktadır. Bazı sekanslar oldukça geniş yer tutar; intron 22, 32 kb iken intron 1, 6, 13, 14 ve 25, 14-23 kb uzunluğundadır. Intron 22'de 2 ek transkript içeren CpG adası bulunur. Birinci transkript F VIII ile ilişkili gen A (F8A) diğeri F VIII ile ilişkili gen B (F8B) dir. Bu transkriptlerin fonksiyonu ve proteinlerinin potansiyeli henüz bilinmemektedir (Şekil 4) (20).



Şekil 4: F VIII geninin lokalizasyonu ve yapısı.

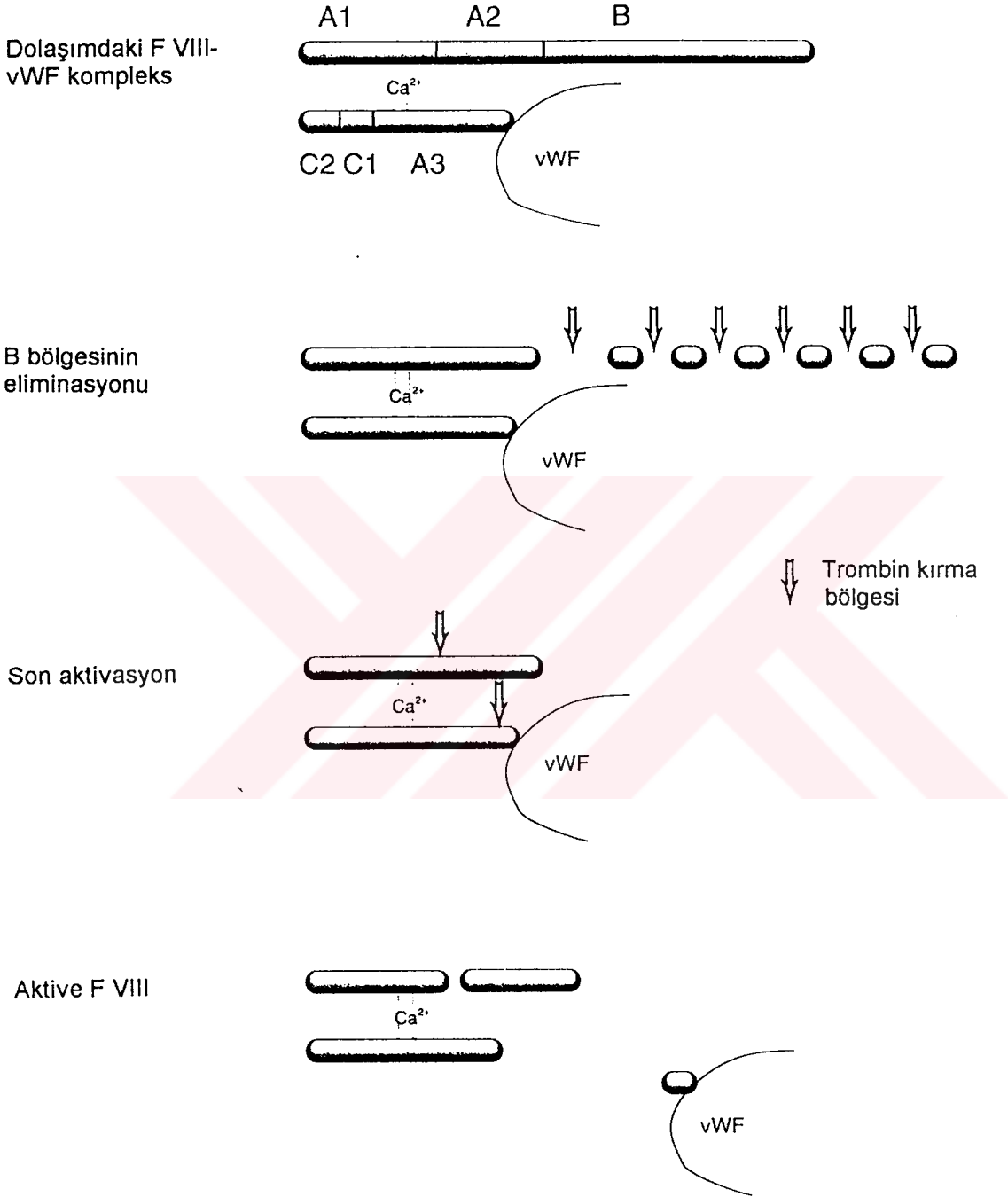
Bu genden sentezlenen mRNA 9 kb uzunluktadır ve 7053 nükleotid tarafından kodlanır. F VIII cDNA'sının kodladığı prekürsör protein 2351 aminoasid (AA) uzunluktadır; ilk 19 AA öncü peptid dizisinde yer alır; matür protein 2332 AA içerir ve moleküler ağırlığı 264.763'dür (26). A₁ (AA 1-329), A₂ (AA 380-711) ve A₃ (AA 1649-2019) bölgeleri genin yaklaşık % 30'unu kapsar. A₂ ve A₃ bölgeleri arasında yer alan ve N-glikozilasyon kısımları içeren B bölgesinin bilinen bir fonksiyonu yoktur. N-glikozilasyonun F VIII biosentezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. C₁ (AA 2020-2172) ve C₂ (AA 2173-2332) bölgeleri terminal uçta yer alır. FVIII proteininde ayrıca 2 asidik bölge vardır (Şekil 5)(20). A₁ bölgesi F VIII geninin ekzon 1-8, A₂ bölgesi ekzon 9-13 ve ekzon 14'ün küçük bir kısmı, A₃ bölgesi ekzon 14'ün 3' ucu ve ekzon 15-18, C₁ bölgesi ekzon 20-23, C₂ bölgesi ekzon 24-26'dan kodlanır.



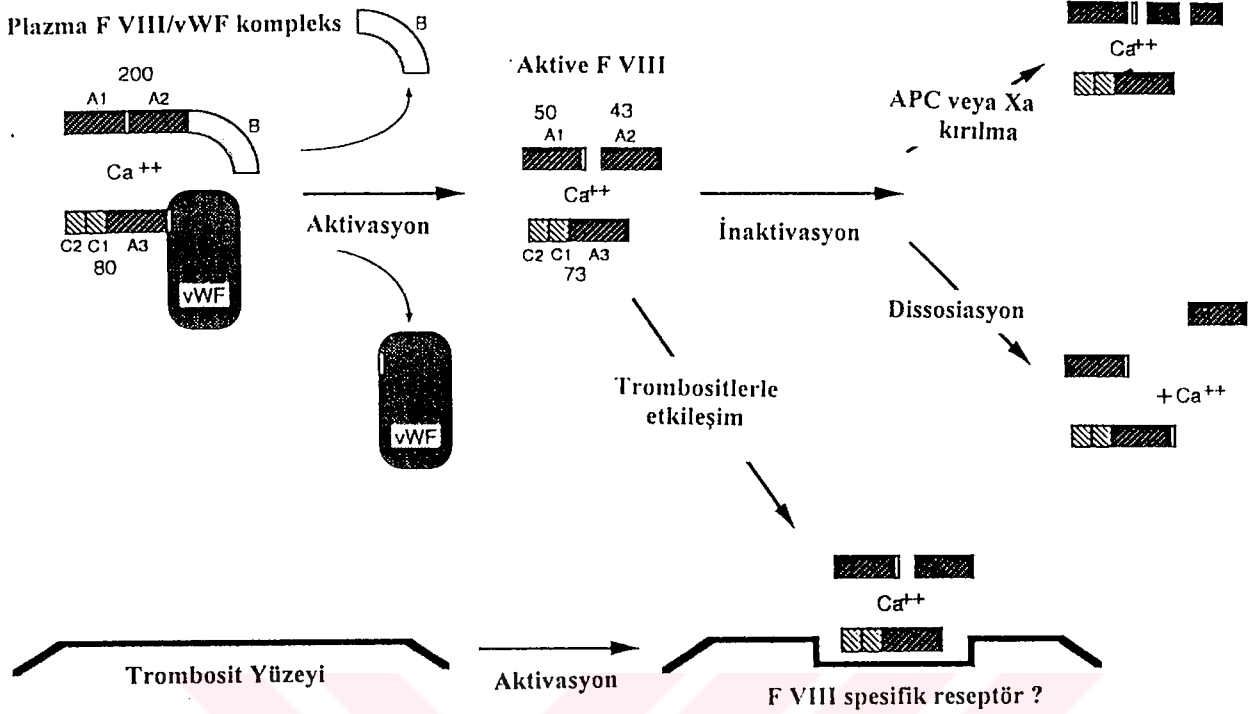
Şekil 5: F VIII gen bölgelerinin aminoasid dağılımı.

F VIII'in biosentezi, proteolitik kırılması, aktivasyonu ve inaktivasyonu

F VIII'in tek zincir formu Golgi apparatusunda proteolize olarak 2 zincir formuna dönüşür (27). Plazmada F VIII, 90-280 kDa'luk ağır zincir ve 80 kDa'luk hafif zincir formunda bulunur. F VIII plazma konsantrasyonu sadece 150 ng/ml kadardır (13). F VIII' in F IXa'ya etkili bir kofaktör olabilmesi için öncelikle ağır ve hafif zincirlerde Arg 372 ve Arg 1689 kısmından trombin (F IIa) ile proteolitik kırılması gerekmektedir (Şekil 6)(13). Daha sonra F VIII, F IXa, Ca⁺⁺ iyonları ve aktive trombositlerden sağlanan fosfolipidler trombosit yüzeyinde fonksiyonel F X-aktive kompleksini (X-ase=Tenaz kompleks) oluştururlar. F VIII eksikliğinde tenaz aktivitesinin ortaya çıkmaması nedeniyle koagülasyon bozukluğu ortaya çıkar (14). Şekil 7'de F VIII' in aktivasyon ve inaktivasyon modeli izlenmektedir (20). Özellikle A₂ bölgesinde dissosiasyon veya delesyonların F VIII aktivasyonunu etkilediği, bu nedenle prokoagülan aktivite için A₂ bölgesinin önemli olduğu saptanmıştır (28,29).



Şekil 6: Proteolitik kırılma ile Faktör VIII'in aktivasyonu.



Şekil 7: Faktör VIII'in aktivasyon ve inaktivasyon modeli.

F VIII aktivitesinin fizyolojik inaktivasyonu için proteolitik bir olayın veya A₂ bölgesinin dissosiasyonunun gerekliliği tam olarak bilinmemektedir (30). Ancak aktive protein C ve F Xa 'nın F VIII'i inaktive ettiği düşünülmektedir (30,31).

Hemofili A'da moleküler patoloji

Hemofili A'da F VIII eksikliğine F VIII genindeki çeşitli mutasyonların neden olduğu gösterilmiştir. F VIII geninin çok büyük bir gen olması, mutasyon sayısının fazla olması, yeni mutasyonların saptanması bu konuda çalışmalarını güçleştirmektedir. Hastalarda klinik bulguların çeşitli olması mutasyon yapısının fenotip üzerinde etkili olduğunu ve çok çeşitli mutasyonların hastalığa yol açtığını göstermektedir. Hemofili hastalarının % 95'inde F VIII geninde nokta mutasyonu, % 5' inde delesyon varlığı belirlenmiş ve 1996 sonuna dek 148 değişik nokta mutasyonu bildirilmiştir (20,32,33). Delesyonlar genelde F VIII aktivitesinin tamamen kaybı ile sonuçlanan ağır hemofili A tablosuna yol açarlar. İstisna olarak 156 bp lik ekzon 22'deki delesyonlar orta şiddette hemofiliye neden olur (34). Bugüne kadar hemofili A hastalığına yol açan ve

büyüklikleri 2 ila > 210 kb arasında değişen 78 büyük delesyona rastlanmıştır; birçoğunun kırılma noktaları bilinmemektedir. Ayrıca F VIII geninde kodon 339-341 arasında yer alan 39 mikrolelesyon saptanmıştır (35,36).

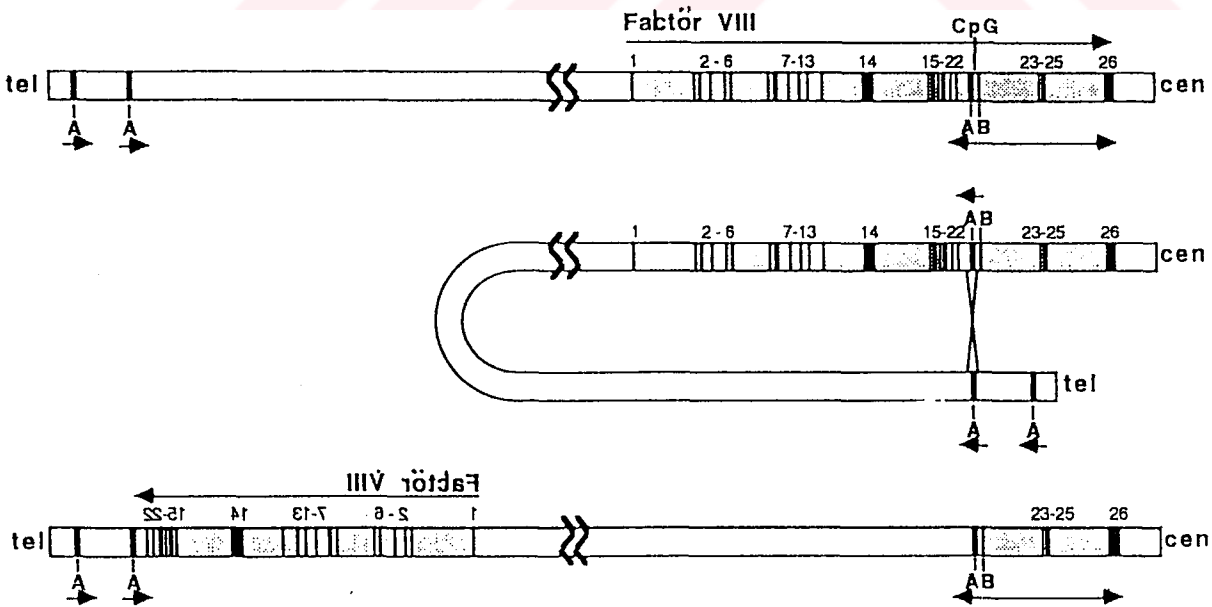
Nokta mutasyonları nükleotidlerin yer değişimi insersiyonu veya delesyonları şeklinde ortaya çıkabilir. Baz değişimleri F VIII geni boyunca hemen her bölgede olabilmekle birlikte genelde A₂ bölgesinde yoğunlaşmıştır (37). Yanlış anlamlı (missense) mutasyonların çoğunda plazma F VIII' ini azaltan mekanizma bilinmemekte, ancak sekizinde yapı-fonksiyon ilişkisi bilinmektedir. Trombin kesim bölgesinde 372. ve 1689. arjinin rezidüsünde mutasyonlar sonucu F VIII' in trombin tarafından aktivasyonu bloklanmakta, F VIII:Ag düzeyi normal CRM+ hemofili oluşmaktadır. Y 1680 olarak adlandırılan bir mutasyon tirozin sülfasyonunda bloklanma sonucu vWF' ün F VIII'e bağlanmasını engelleyerek hafif CRM- fenotipine neden olmaktadır. Buna çok yakın bir tirozinin başka aminoasid ile değişim sonucu (Y 1709 C) ağır hemofili A tablosu ortaya çıkmaktadır. Ağır hemofili A'ya neden olan iki diğer CRM+ mutasyon, F VIII proteininde yeni bir N-glikozilasyon bölgesi yaratmaktadır. Biri ağır zincirin A₂ bölgesinde 566. pozisyonunda, diğeri hafif zincirin A₃ bölgesinde 1772. pozisyonunda benzer bir N-glikozilasyon içermektedir. İki mutasyonda da plazma F VIII konsantrasyonu normaldir, ancak tamamen inaktiftir. F VIII düzeyi normal veya hafif azalmış, ama aktivitesi büyük oranda azalmış diğeri CRM+ hemofili mutasyonlarının F VIII'in F IXa, F Xa, APC, fosfolipid yüzeyleri ve kalsiyum iyonları gibi diğeri moleküllerle ilişkisi hakkında önemli ipuçları sağlayacağı düşünülmektedir. Bu CRM+ mutasyonlar S 289, R 527, S 558, V 634'tür. V 634 orta, diğeri hafif şiddette hastalık tablosu oluştururlar (38-43).

Bilinen CRM+ mutasyonlarının % 50'sinde mutasyonlar A₂ bölgesinde olduğu için bu bölgenin prokoagulan aktivitede önemli rol oynadığı moleküler çalışmalarda da gösterilmiştir. Mutasyonların çoğunu oluşturan CRM- hemofililerde büyük bir olasılıkla proteinin katlanması ve stabilitesi etkilenmektedir, ancak mekanizma tam olarak ortaya konamamıştır (43).

Okunma sırasında bir kayma ile gelişen anlamsız (nonsense) kodon mutasyonlarının patofizyolojisi son yıllarda aydınlanmış, bilinmeyen bir nedenle oluşan aberran RNA'nın işlevi sonucu ekzon atlanmasının meydana geldiği ortaya konmuştur (44). Anlamsız mutasyonlar ile ağır hemofili kliniği ortaya çıkmaktadır.

Hemofili A hastalığına yol açan mutasyonların % 5' i F VIII geninde Taq/I kesim bölgesindedir. CpG dinükleotidleri sıcak bölgeleri (hot spots) oluşturur. Anlamsız mutasyonlar daha siktir. Taq/I mutasyonlarının çoğu CGA arjinin kodonunda meydana gelmekte ve bu kodon hangi DNA dizisinin etkilendiğine bağlı olarak ya bitirme (stop) kodonu (TGA) veya glutamin kodonuna (CAA) dönüşmektedir. Bitirme kodonu mutasyonları F VIII proteininin normalden kısa olmasına yol açmakta ve ağır hemofili görülmektedir. Glutamin mutasyonları ise genellikle koagülasyon aktivitesinde azalma ile sonuçlanmaktadır (36).

Yine intron 22'de bir mutasyonun sıcak bölge olabileceği düşünülmüş, yakın zamanda ağır hemofili A hastalarının % 45' inde hastalığa yol açan mutasyonun büyük bir inversiyon olduğu gösterilmiştir. Bu inversiyon F VIII' in 22. intronunda bulunan gen A (F8A) ile bu genin F VIII geni dışında yer alan ve telomere doğru uzanan (Xq-ter) bir veya iki kopyası arasında meydana gelen rekombinasyon (cross-over) sonucu oluşmakta ve ilk 22 ekzonun inversiyonu ortaya çıkmaktadır (45-47) (Şekil 8). Gen A'nın distal kısmının kendi IVS 22si ile inversiyonu sonucu tip 1, proksimal kısmının kendi IVS 22'si ile inversiyonu sonucu tip 2 F VIII inversiyon oluşmaktadır (45). 14 ülkeden 22 moleküler tanı laboratuvarında yapılan bir araştırmada 2093 ağır hemofili A hastasının % 35'inde tip 1, % 7'sinde tip 2 inversiyon gözlemlendiği bildirilmiştir (48). Türkiye'de moleküler çalışması yapılabilen Hemofili A hastalarının % 36'sında ekzon 1-22 inversiyonu saptanmıştır (35).



Şekil 8: Faktör VIII genindeki inversiyonlar.

Diğer bir mutasyon ise insan genomunda % 5 oranında bulunan L1 elemanlarının F VIII geni ekzon 14 bölgesine insersiyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (49). Az sayıda vakada bildirilmiştir (32).

Hemofili A'da tedavi

Belirtilen çeşitli F VIII gen mutasyonları sonucu ortaya çıkan hemofili A'da tedavi kanama epizodlarında ve cerrahi müdahalelerde yerine koyma tedavisi, Desmopressin uygulanması, profilaktik tedavi ve gelecekte uygulanabilecek miniorgan transplantasyonları ve gen tedavisi şeklinde özetlenebilir. Yerine koyma tedavisi sırasında tablo 2'de izlenen kan ürünleri ve ilaçlar kullanılabilir (9,12,20,50).

Tablo 2: Hemofili A'da tedavide kullanılabilen kan ürünleri ve ilaçlar.

- 1- Normal plazma: Fibrinojen, F VIII, IX, X, XIII içerir.
- 2- Taze plazma ve taze donmuş plazma: Normal plazmaya ek olarak F V ve VII içerir. 1 Ünite 200-300 Ü F VIII vardır (1 ml' de 1 Ü F VIII).
- 3- Cryopresipitat: Birkaç kişinin plazmasından hazırlanır. 1 pakette 80-120 Ü; 1 ml'de 5-10 Ü F VIII vardır.
- 4- Faktör konsantreleri: 20.000-30.000 kişinin plazmasından hazırlanır, birim hacimde yüksek doz faktör içerir. 1 Ü F VIII alıcının F VIII düzeyini % 2 artırır.
- 5- Desmopressin (DDAVP): Trombosit ve damar endotelinden F VIII, vWF salınımını 2-10 misli artırır, doku plazminojen aktivatörü salınımını sağlar.
- 6- Epsilon amino kaproik asit (EACA): Oral kanamalarda lokal veya sistemik kullanılabilir.
- 7- Tranexamic asit: Oral kanamalarda etkilidir. 25 mg/kg/doz günde 3-4 kez kullanılır.
- 8- Kortikosteroid: Eklem harabiyetini engeller, F VIII düzeyini artırır.
- 9- Demir tedavisi: Hastanın hemoglobin durumuna göre başlanır.

Hemofili kanayan bir hastaya kan transfüzyonu ile kanamanın durduğu ilk kez 1840 yılında bildirilmiş (51), ancak ilişki kurulamadığı için ancak yıllar sonra F VIII kaynağı olarak plazma kullanılmaya başlanmıştır. Geçen yüzyılın sonlarında hemofiliğin ancak % 10'unun 20 yaşına geldiği, 1940-1950'lerde yaşama süresinin 15 yıl dolayında olduğu bildirilmiş, 1960'da sağlıklı kişiler ile hemofili hastalarda 11-12 yıllık yaşam farkının bulunduğu gösterilmiştir (52). 1960'lı yıllarda cryopresipitatın,

1970'lerde orta saflıkta preparatların, 1980'lerde yüksek saflıkta preparatların kullanıma girmesiyle bu fark ortadan kalkmış, 1990'larda rekombinant F VIII tedavisinin kullanıma girmesiyle yaşamı tehdit eden ciddi kanamalar engellenmiş, yaşam süresi ve kalitesi arttırılmıştır (52).Tablo 3'de çeşitli F VIII konsantreleri ve özellikleri (6,13,53), Tablo 4'de kanama tipine göre önerilen F VIII dozları izlenmektedir (6,50).

Tablo 3: F VIII konsantrelerinin özellikleri.

Saflık derecesi	Ürün (Firma)	Saflaştırma-viral inaktivasyon yöntemi	
Düşük	Cryopresipitat	-	
Orta	Hemate P (Centeon)	Presipitasyon + Pastörizasyon	
	Profilate OSD (Alpha)	Presipitasyon + solvent-deterjan	
	8 Y (BPL)	Presipitasyon + kuru ısı	
Yüksek	Alphanate (Alpha)	Kromotografik + solvent-deterjan+kuru ısı	
	Nordiate (Novo Nordisk)	Kromotografik +filtrasyon	
	Koate HP (Bayer)	Kromotografik + solvent-deterjan	
Çok Yüksek	a) Plazma kaynaklı monoklonal yöntemli	Antihemophilic Factor M (American Red Cross)	Solvent-deterjan
		Hemofil M (Baxter)	Solvent-deterjan
		Monoclate P (Centeon)	Pastörizasyon
		Replenate (BPL)	Solvent-deterjan
		Bioclate (Centeon)	Monoklonal antikor
	b) Rekombinant	Helixate (Centeon)	Monoklonal antikor
		Kogenate (Bayer)	Monoklonal antikor
		Recombinate (Baxter)	Monoklonal antikor

Tablo 4: Hemofili A'da kanama tipine göre istenen F VIII düzeyi, F VIII dozları ve diğer tedaviler.

Kanama tipi	Hemostatik F VIII düzeyi	F VIII dozu (Ü/kg)	Tekrar dozu (Ü/kg)	Diğer tedaviler
Akut hemartroz	Erken %30 Geç % 30-50	10 20	Nadiren gerekir 20, 12 saat ara ile	Buz uygulaması, atel, istirahat, nadiren eklem aspirasyonu
Adale içi kanama	Min. % 40-50	20-30	20, 12 saat ara ile birkaç gün	
Hayati tehdit edici kanama -İntrakranial -Major cerrahi -Major travma -Dil ve boyuna kanama	% 100, % 50- 100, 10-14 gün % 100, % 50 (yara iyileşmesi başlayınca % 30)	50	25-30, 8-12 saat ara ile veya 3-4 Ü/kg/saat gidecek şekilde devamlı infüzyon	Antikonvülzan gerekebilir
Ağrısız spontan gross hematüri	-	Verilmez		Ağızdan sıvı alımı arttırılır, F VIII bazen gerekir.
Ciddi karın ağrısı	% 50	20-40	20- 45, 12 saat ara ile	
Dil ve ağız lezerasyonları	% 50	20	20, 12 saat ara ile	Sıvı gıdalar, antifibrinolitik ajan (EACA, Tranexamic asit)
Diş çekimi	% 50	20	20, 12 saat ara ile tekrarlanabilir (gerekirse)	1 gün önce antifibrinolitik ajan başlanıp 7-10 gün verilir.

Ayrıca F VIII düzeyi % 1' in altında olan ağır hemofilik vakalara, 1-2 yaşından önce, hayati kanamalar ve eklem komplikasyonlarından korumak amacıyla haftada 2-3 kez düzenli F VIII kullanımı (20-50 Ü kg/doz, tek doz) ile primer profilaksi; daha ileri yaşlarda sık kanaması olan ve eklem sekelleri henüz gelişmemiş hastalara sekonder profilaksi uygulanabilmektedir (13,54). Profilaksinin uygulanması maliyeti arttırmaktadır, yapılan bir çalışmada son 6 ayda gerektiğinde F VIII tedavisi uygulandığında 18.033 (SD 7860) Alman markı, profilaktik tedavi verilenlerde 28.433 (SD 3212) Alman markı harcılandığı saptanmıştır (55).

F VIII yerine koyma tedavisinin çeşitli komplikasyonları günümüzde iyi bilinmektedir. Kan ürünleri ile HAV, HBV, HCV, HGV, HIV, HTLV, CMV, parvovirus gibi virusların bulaşı çeşitli yöntemlerle engellenmeye çalışılmaktadır. Önemli bir başka komplikasyon ise inhibitör oluşumudur (56,57).

Faktör VIII inhibitörleri: Genel bilgiler ve insidans

F VIII inhibitörleri hemofili A'lı hastalarda F VIII içeren değişik kan ürünlerine karşı gelişen antikordardır. Genel hemofili A popülasyonunda inhibitör gelişme insidansı 1980'li yıllarda % 5-10 olarak bildirilirken, son yıllarda % 25'e dek artmış, özellikle ağır hemofilik hastalarda % 52'ye dek yükselmiştir (1,58-61). F VIII inhibitörleri F VIII koagülan aktivitesini nötralize ederek kanama anındaki tedaviyi güçleştirmektedirler. İnhibitör düzeyi ≤ 10 Bethesda Ünitesi (BÜ) ise düşük titreli, > 10 BÜ ise yüksek titreli antikordan söz edilmektedir (2). İnhibitörü olan kişilere F VIII verildiğinde inhibitör düzeyinde artış az oluyorsa düşük immün cevaplı, belirgin bir artış oluyorsa yüksek immün cevaplı denmektedir. Düşük cevaplı olanlar genellikle düşük titreli inhibitörü olan hastalarda ve % 25 oranında, yüksek cevaplılar yüksek titreli inhibitörü olan hastalarda ve % 75 oranında görülmektedir (2,62,63). Çalışmaların çoğunda inhibitörlerin erken dönemde ortaya çıktığı, F VIII kullanımından median 9-11 gün sonra izlendiği, % 50'sinde düşük titreli ve geçici olduğu bildirilmektedir (64,65). Düşük titreli inhibitörler F VIII kesildikten 4-12 hafta sonra kaybolabilmekte, yüksek titreli inhibitörler 1-2 yıl hiç F VIII'e maruz kalınmasa bile halen saptanabilmektedir.

Patofizyoloji

İnhibitör oluşumunu konakçıya ait faktörler ve kullanılan ürün yüksek oranda etkilemektedir. Henüz konakçıya ait faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır. Genetik yatkınlığı düşündüren bir neden inhibitörlü hastalarda erkek kardeşlerde inhibitör gelişme oranının fazla olmasıdır, ancak erkek kardeşte inhibitör gelişmeyebileceği de gösterilmiştir (58,66,67). İnhibitör gelişimi ve HLA haplotipleri arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Bazı çalışmalarda istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanamazken, bazı çalışmalarda ilişki olabileceği öne sürülmüştür (68-72). HLA Cw5 sıklığı daha az olan hemofilikler ve HLA-A3, HLA-B7, HLA-C7, HLA-DQA-0102, HLA-DRB -1501, HLA-DQB-O602, HLA-DR 15, HLA-DR5, HLA-DRB1-01, DQB1-0501, DQA-0101 genotipi olanlarda inhibitör gelişiminin daha yüksek bulunduğu bildirilmiştir (70-72).

Yine F VIII inhibitörü olan hastalarda mutasyon tipi ile inhibitör gelişimi arasındaki ilişki yeterince ortaya çıkarılamamıştır. Eski literatürde F VIII gen delesyonları ile inhibitör gelişimi arasında korrelasyon olmadığı rapor edilmiştir (73,74). Ancak F VIII gen mutasyonları daha iyi tanımlandıkça ilişki olabileceği ortaya çıkmıştır. Tuddenham ve arkadaşları, anlamsız nokta mutasyonunda % 59, yanlış anlamlı nokta mutasyonunda % 14, geniş delesyonlarda % 27, küçük delesyonlarda % 9, inversiyonlarda % 40 oranında inhibitör geliştiğini bildirmişlerdir (75). Bir başka çalışmada inversiyon veya diğer bir gen mutasyonu gözlenenlerde inhibitör gelişmesinin relatif riski 3,8 kat daha yüksek bulunmuştur (76). Ağır gen defektlerinde dolaşımında F VIII' in yokluğu nedeniyle immun toleransın indüksiyonunda yoksunluk söz konusudur. Shapiro ve Hultin immun toleransın inhibitör gelişmesinde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (77). F VIII plasentadan geçmediği için tolerant hemofilikler in utero metarnal-fetal kanama olursa F VIII'e maruz kalmaktadırlar. Bu hipoteze göre sadece non-tolerant hemofilikler F VIII ile karşılaştıklarında inhibitör geliştirmektedirler. İnhibitörlü hastalarda toleransın indüksiyonu ile inhibitörün kaybolması da bu teoriyi desteklemektedir (66,78).

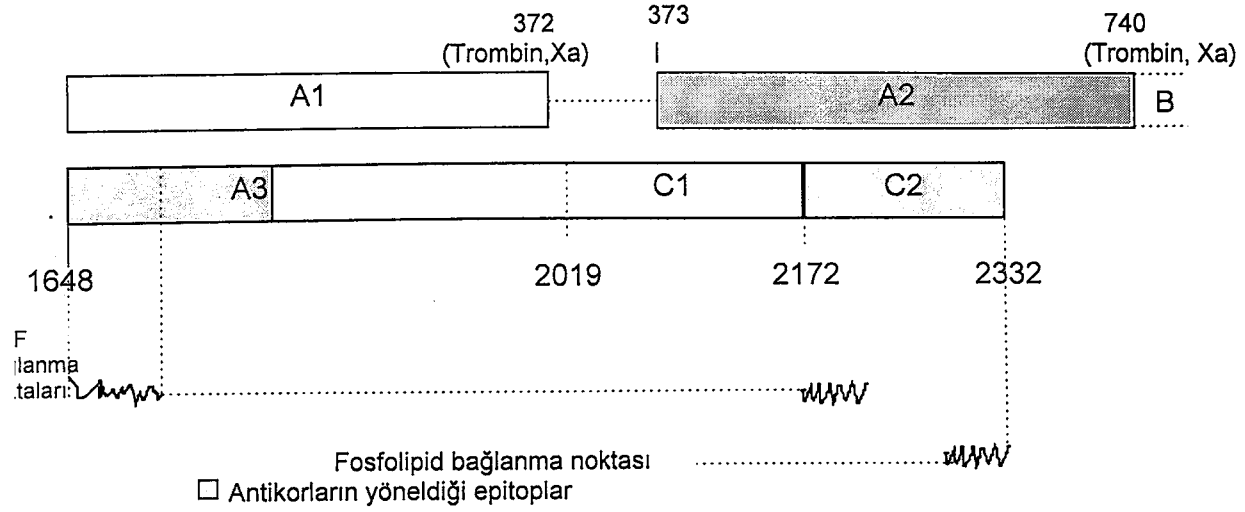
İnhibitör gelişiminde önemli bir başka faktör kullanılan F VIII ürünleridir. Nedeni kesin belli olmamakla birlikte F VIII hafif zincirinde yer alan determinantlara karşı antikorların kısıtlı spesifikliği nedeniyle F VIII'deki değişimin sınırlı olduğu düşünülmekte, ancak bazı hastalarda bunun immunojenik tanınma için yeterli olabileceği ve F VIII preparatının immunreaktivitesinin önemli olduğu öne sürülmektedir

(4,79). Düşük ve orta saflıktaki F VIII preparatları ile % 10-28, pastörizasyon ile elde edilmiş orta saflıkta bir F VIII preparatı ile % 52, monoklonal yöntemle elde edilmiş preparatlarla % 9-18, rekombinant F VIII preparatları ile % 7-24 oranında inhibitör gelişimi bildirilmektedir (2,4,80-84).

Hastanın yaşı inhibitör gelişimini etkileyen faktörlerden birisidir. Bir çalışmada inhibitörlerin en fazla 3-7 yaşta geliştiği, orta ve ağır hemofiliklerde 25 yaşında inhibitör gelişmesinin kümülatif riskinin % 24 olduğu bildirilirken diğer bir çalışmada tüm inhibitörlerin 1 ay -5,2 yaşta geliştiği rapor edilmiştir (61,85).

İnhibitörlerin yapısı ve karakterleri

Önceleri F VIII inhibitörlerinin IgG4 ve daha az oranda IgG1 isotipinde olduğu düşünülürken, son yıllarda IgG'nin tüm alt sınıflarından olabileceği gösterilmiştir (86,87). IgG4 plazmadaki total IgG konsantrasyonunun sadece % 3'ünü oluşturmasına karşılık F VIII inhibitörleri çoğunlukla bu isotiptedir. Bunun nedeni belli değildir. IgM'den IgG4 isotipine dönüşüm IL-4 ve/veya IL-13 ve IgE antikorlarının oluşumunda rol oynayan benzer sitokinlerin varlığına bağlıdır. F VIII'e karşı gelişen IgE antikorları hiç gösterilmemiş olmasına karşılık F IX inhibitörü olan vakalarda IgE tipi antikorlar saptanmıştır. IgG4 antijenlere uzun süreli maruz kalma ile ilişkilidir ve bu da hemofili A hastalarındaki inhibitörlerin uzun süreli olması ile karakterize bir durum yaratmaktadır (87). IgG4'ün komplemanla bağlanmaması hemofiliklerin neden immun kompleks oluşturmadığını açıklamaktadır (66). Ayrıca F VIII ve inhibitör arasındaki reaksiyonun zaman ve ısıya bağımlı olduğu ortaya konmuştur (66). F VIII'e karşı immun cevabın poliklonal olmasına ve antikorların hemen her bir bölgeye yönelebilmesine rağmen inhibitörlerin az sayıda bölgeye kümelenmeye eğilimi olduğu gösterilmiştir (4) (Şekil 9). Anti F VIII antikorlarının jel elektroforez yöntemi veya son yıllarda daha çok kullanılan cDNA kaynaklı F VIII fragmanları kullanılarak incelenmesinde antikorların çoğunun C2 bölgesinin karboksi-terminal ucuna yerleşmiş 17,3 kD'luk kısmına ve/veya A₂ bölgesinin amino-terminal ucuna yerleşmiş 18,3 kD'luk kısmına yöneldiği gösterilmiştir (88,89). Fare monoklonal antikorları ile yapılan immunoassay çalışmalarında 3. bir hedef bölge saptanmış, A₃ bölgesinin amino-terminal ucuna yerleşmiş bir kısmının da hedef bölge olduğu bildirilmiştir (87)



Şekil 9: Antikorların çoğu F VIII geninin A₂, C₂ ve A₃ bölgesine doğru yönelir.

Hemofili A'da sıklıkla 2 tip F VIII antikoruna saptanmaktadır. Tip 1 antikorları (alloantikor) F VIII prokoagülan aktivitesini tamamen inhibe ederken, tip 2 antikorları (otoantikor) daha karmaşık bir kinetiğe sahiptir ve F VIII'i tamamen inhibe etmez. Bu farklılığın nedeni henüz izah edilememiştir (90). Tip 2'de in vitro rezidüel F VIII aktivitesi belirgin miktarda görülse de, in vivo hasta koagülan fonksiyonu hiç yokmuş gibi kanar. Tip 1 inhibitör gibi davranan insan poliklonal antikorlarının anti-idiotipik antikorlar eklenmesiyle tip 2 antikor gibi davranabileceği bildirilmektedir. Tip 1 antikorları sıklıkla F VIII infüzyonlarına karşı yüksek titreli antikorlar yapan ağır hemofilik hastalarda, tip 2 antikorlar ise az oranda hafif veya orta hemofilik hastalarda gösterilmiştir (87). Tip 2 antikorlar daha çok nonhemofilik hastalarda F VIII'e karşı spontan antikorların gelişimi ile ortaya çıkmaktadır. Gebelik, sistemik lupus eritematozus ve romatoid artrit gibi immunolojik hastalıklar, lenfoproliferatif ve nonhematolojik malignansiler, ilaç reaksiyonları ve ilerlemiş yaşta idiyomatik olarak gelişen tip 2 antikorlar kazanılmış hemofili A'ya neden olmaktadır (91). Tip 1 ve tip 2 antikorların ortak özellikleri çoğunlukla IgG4 isotipinde olmaları, sıklıkla F VIII geni A₂ ve/veya C₂ bölgesine bağlanmalarıdır. Bazı karakterleri ile bu 2 tip antikor arasında farklılık olduğu görülmüştür. Bu farklılıklardan birisi otoantikorlarda hafif zincirle bağlantı yeri kesin bir sınırla not edilemezken alloantikorlarda bu sınırın çoğunlukla gösterilmiş olmasıdır. Farklılıklardan diğeri ise daha önce belirtildiği gibi tip 1 antikorların daha çok konjenital hemofili A'da, tip 2 antikorların akkiz hemofili A'da

saptanmasıdır (5). Tip 1 antikorlar F VIII ile tepkiye girdiklerinde F VIII daimi olarak inaktive olmakta ve antikor tüketilmekte, bu da antijen-antikor arasında sağlam bir bağ olduğunu düşündürmektedir. Tip 2 antikorla - FVIII arasındaki bağ ise sağlam değildir, antikor F VIII'i tümüyle inaktive etmeyebilir. Bu tip inhibitörlerin kantitatif ölçümü daha zor olmaktadır (5).

Inhibitörlerin tipi tedavide önem taşımaktadır. Tip 2 inhibitörlü hastalar yüksek doz F VIII infüzyonlarına iyi yanıt verirken tip 1 inhibitörlü hastalarda iyi yanıt beklenmemektedir (87).

Inhibitörlerin F VIII'i inaktive etme mekanizması

FVIII'in aktivasyon ve inaktivasyonu proteolitik bölünmeye dayandığından (Şekil 6 ve 7) böyle bir bölünmeye karışan antikorlar molekülün fonksiyonunu etkileyebilir. F VIII'in aktivasyonunda antikorlar proteolitik bölünme kısmına bağlanarak veya F VIII'in 3 bölgesinin (A₂, C₂, A₃) yapısında değişiklik yaratarak proteoliz kabiliyetini azaltırlar (4). Trombin bölme noktalarının yakınında yer alan a1 ve a2 asidik bölgelerine de antikorlar lokalize olabilmekte ve F VIII' in aktivasyonu engellenebilmektedir. Diğer bir yanda F VIII plazmada korunma ve tenaz kompleksin etkin formasyonu için vWF, F IX, fosfolipidler gibi değişik yardımcılarla ilişkiye girmektedir. Bunu engelleyen antikorlar da F VIII fonksiyonunu bozmaktadır (92- 94). Antikor F VIII'in vWF ile bağlanma bölgesini tanıyarak ve vWF ile bağlanmasını engellerse F VIII çok çabuk inaktive olmaktadır. C₂ ve A₃ bölgeleri F VIII' in vWF ile bağlanmasında önem taşıyan 2 kısmıdır. C₂ vWF bağlanma bölgesindeki antikorlar F VIII'in inaktivasyonunu artırır (94). Ayrıca C2 domaininin diğer epitoplarına lokalize olan bazı antikorlar aktive F VIII' in fosfolipidlere bağlanmasını engelleyerek tenaz kompleksin oluşmasını önlemektedirler (Şekil 9) (93). A₃ bağlanma noktasına lokalize olan antikorlar son yıllarda gösterilmiştir (87). Trombin ile aktive edilen F VIII' in vWF' den ayrılma oranını azalttıkları belirlenmiştir (95). Ek olarak fare monoklonal antikorunun A3 bağlanma noktasına uyan bölgeye bağlanmasıyla F VIII' in F IX'a bağlanmasının etkilendiği de bildirilmiştir (4). A2 bölgesine bağlanan antikorlar yine hızla F VIII'i inaktive etmektedirler (88).

ELİSA ile yapılan bir çalışmada normal kan donörlerinde F VIII molekülüne IgG' nin bağlandığı gösterilmiştir. Ancak inhibitörlü hastalarda F VIII molekülüne bağlanan IgG'nin miktarının daha yüksek olduğu izlenmiş, aynı zamanda inhibitörsüz 10 hastada IgG miktarı oldukça yüksek seviyede bulunmuştur. Bu sonuçlar inhibitör varlığının F

VIII'e bağlanan IgG miktarı ile değil, daha çok immuglobulinler tarafından tanınan epitoplara ve bunların belirtilen fonksiyonel bölgelere yakın lokalizasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir (96).

Bu mekanizmalara ek olarak son araştırma yöntemleri ile faktör VIII antikorlarının çoğunun direkt F VIII' in fonksiyonuna etki etmediği gösterilmiştir. Bu nonfonksiyonel antikorların patofizyolojik rolü olup olmadığı henüz belli değildir; antikorların F VIII'in dolaşımdan uzaklaştırılma oranını arttırdığı öne sürülmektedir. Bu etkiye, retiküloendotelial sistemdeki fagositik hücrelerce F VIII+immunglobulin komplekslerinin tutulmasında artış yaparak neden oldukları düşünülmektedir (97, 98).

F VIII inhibitörü bulunan hemofilik hastalarda laboratuvar bulguları

F VIII antikorlarının tespitinde kullanılan testler şunlardır (3,5):

- 1- Tarama testleri
- 2- F VIII inhibitörünün kantitatif tayini
- 3- Protein A sefaroza ile inhibitör tayini
- 4- Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Elektroforezi (SDS-PAGE) sonrası immunblotting analizi
- 5- İşaretli F VIII veya F VIII fragmanları kullanılarak yapılan immuno-presipitasyon yöntemi
- 6- F VIII veya F VIII fragmanları kullanılarak yapılan ELISA yöntemi.

Tarama testlerinden biri APTT testi, diğeri ise koagülasyon testleridir.

APTT testi: Normal plazmada APTT 37°C' da 2 saat enkübe edilince F VIII' in kullanımına bağlı hafif uzamaktadır. Ancak eşit oranda normal plazma ve F VIII inhibitörü içeren hasta plazması 37°C' da 2 saat enkübe edilince APTT'deki uzama belirgin olmaktadır (Normal plazmadaki F VIII, hasta plazmasındaki inhibitör tarafından bağlanacak ve aktivitesi nötralize edilmiş olacaktır). Lupus antikoagulantı veya diğeri bir pıhtılaşma faktörüne karşı gelişmiş inhibitörlerin bu metodla APTT'yi uzatabileceği unutulmamalıdır (3).

Koagülasyon testi: İnhibitörden şüphelenildiği zaman pıhtılaşma faktörleri birden çok dilüsyonda çalışılmalıdır. Eğer inhibitör tek bir pıhtılaşma faktörüne karşı spesifikse herhangi bir dilüsyonda o faktör eksikliği eşit miktarda bulunacaktır. Diğeri bir faktör ise artan dilüsyonlarda artmış olarak çıkacaktır (Tablo 5)(3). Laboratuvar raporunda inhibitör etkisi veya dilüsyonel etkinin görüldüğü belirtilir.

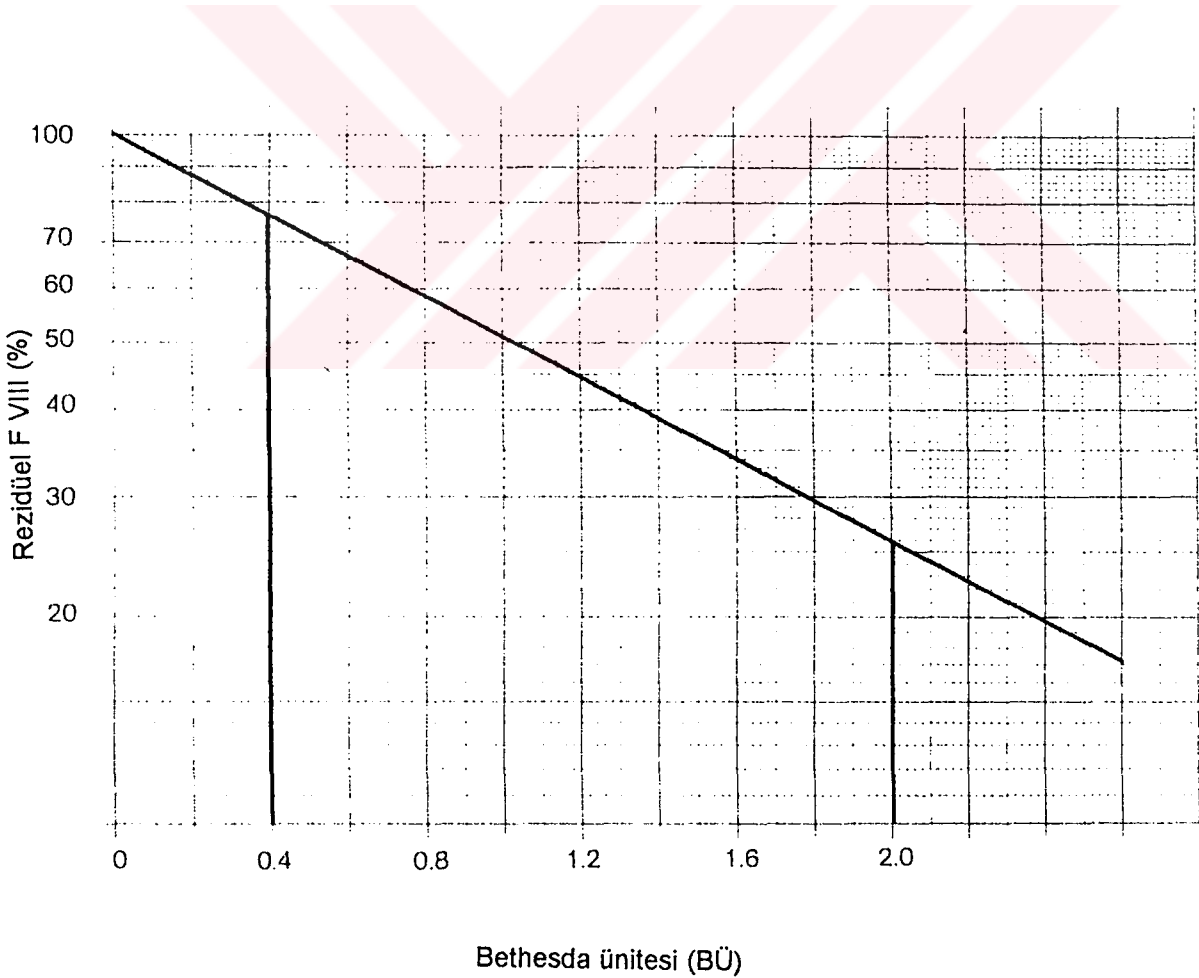
Tablo 5: Dört plazma faktörü ile dilusyonel etki ve F VIII inhibitör etkisinin gösterilmesi.

Plazma dilüsyonu	Faktör düzeyleri (U/dl)			
	F VIII	F IX	F XI	F XII
1:5	1	28	20	38
1:10	1	35	29	47
1:20	1	42	38	54
1:50	1	60	51	72
1:100	1	74	63	84

F VIII inhibitörünün kantitatif tayini: Bugün için dünyada en çok kullanılan Bethesda metodudur. Bethesda yönteminin temeli 1959' da Biggs ve Bidwell'in tarif ettiği karıştırma yöntemi ile 1974'de Biggs ve Rizza'nın tanımladığı New Oxford metoduna dayanmaktadır (99,100). 1974 sonbaharında Bethesda'da bir toplantıda biraraya gelen Amerika'lı hematologlar inhibitör tayinini standardize etmişler ve bunun sonucunda 1975 yılında Thrombosis et Diathesis Heamorrhagica dergisinde Bethesda metodu tarif edilmiştir (101). F VIII inhibitörleri ısı ve zamana bağımlı olduğundan inhibitör içeren plazmaya F VIII:C ilave edildiğinde ve belli bir süre enkübe edildiğinde F VIII:C progressif olarak nötralize olur. Eğer eklenen F VIII:C miktarı, ısı ve enkübasyon süresi sabit tutulursa F VIII:C' nin ne kadarının zarar gördüğüne dayanılarak inhibitör düzeyi ölçülebilir. F VIII kaynağı olarak % 100 F VIII içeren normal plazma ve eşit oranda dilue edilmemiş hasta plazması 2 saat 37°C' da enkübe edildikten sonra, bu karışımdaki F VIII'in % 50' sini inaktive eden inhibitör miktarına 1 Bethesda ünitesi (BÜ) denmektedir. Rezidüel F VIII' in düzeltilmesi bu karışımdaki F VIII düzeyinin yine 2 saat 37°C' da enkübe edilmiş, eşit oranda normal plazma ve tampon solüsyon karışımındaki F VIII düzeyi ile kıyaslanmasıyla yapılmaktadır (3,101,102). Bir tüpte 1:10 sitratlı kandan elde edilen dilue edilmemiş hasta plazması (0.2 ml) aynı oranda sitratlı normal insan plazması ile eşit oranda karıştırılır. Eş zamanda aynı sitratlı 0.2 ml normal insan plazması ile eşit miktarda F VIII ölçümünde

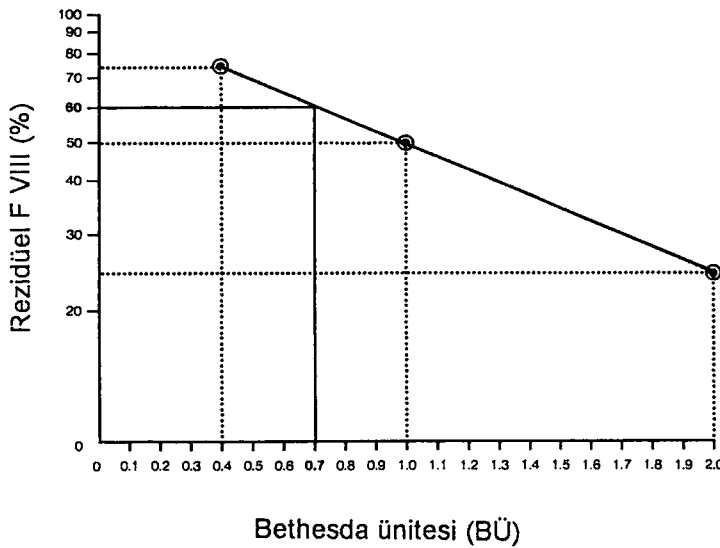
kullanılan tampon solüsyon bir başka tübe konularak karıştırılır. Bu iki tüp ağzı kapatılarak 37°C'da 2 saat enkübe edilir. 2 saat sonunda tüpler reaksiyonu durdurmak amacıyla buzlu suya konur ve hemen her 2 tüpteki F VIII düzeyi koagülometre ile ölçülür. Normal+Hasta plazması içeren karışımın rezidüel F VIII düzeyi, Normal plazma + Tampon solüsyon içeren karışımın rezidüel F VIII düzeyine bölünürse düzeltilmiş rezidüel faktör aktivitesi (%) bulunur. Bundan sonra standart grafikten yararlanılır (Grafik 1). Bulunan rezidüel faktör yüzdesinin hizasındaki nokta inhibitör miktarını verir (BÜ/mL plazma).

Grafik 1: Düzeltilmiş rezidüel faktör yüzdesi kullanılarak inhibitör miktarını bulmakta kullanılan standart grafik

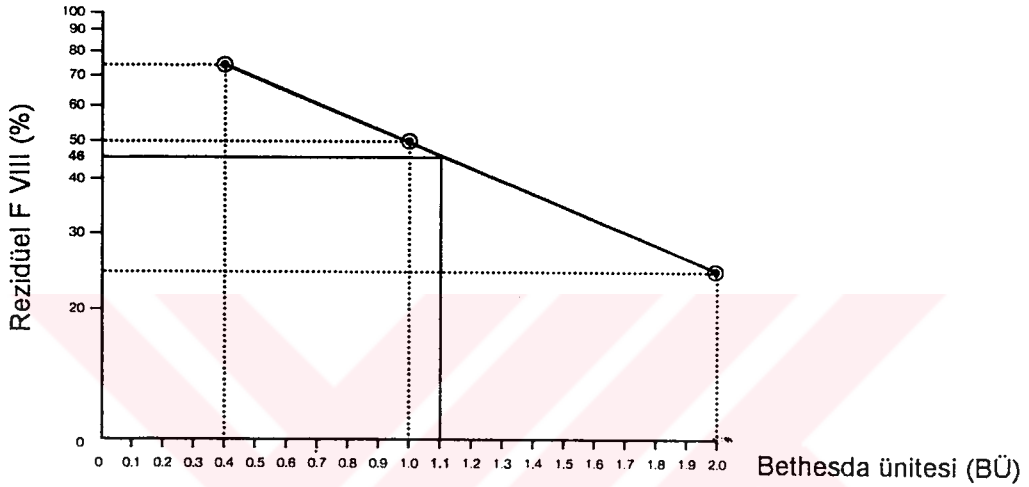


Rezidüel F VIII aktivitesi % 80-100 arası ise plazmanın inhibitör içermediği kabul edilir. Ancak hastanın kliniği ve tedaviye yanıtızsızlığı söz konusu ise inhibitör varlığı daha ileri testlerle taranmalıdır (antikor kompleks kinetikli, zayıf bağlı olabilir). Rezidüel F VIII aktivitesi % 60-80 arası ise şüpheli kabul edilip hastanın inhibitör düzeyi tekrar ölçülmelidir. Antikor titresini arttırmak amacıyla 1 birim normal plazma + 2 kat hasta plazması içeren karışım, 1 birim normal plazma + 2 kat tampon solüsyon içeren karışımla kıyaslanabilir. Rezidüel F VIII aktivitesi bulunup inhibitör düzeyi grafikten okunduktan sonra sonuç 2'ye bölünür, hasta plazmasındaki inhibitör düzeyi saptanmış olur. Rezidüel F VIII aktivitesi % 60'ın altında ise plazmada inhibitör olduğu kabul edilir. Başlangıçta rezidüel F VIII aktivitesi % 25' in altında ise inhibitör ölçümünün yapılabilmesi için bu kez hasta plazmasının dilue edilmesi gerekir (1:10, 1:20,1:200 gibi dilusyonlarda). Başlangıçtaki işlemler aynı şekilde yapıldıktan sonra grafikten bulunan inhibitör düzeyi dilusyon katı ile çarpılır, bundan sonra inhibitör düzeyi bulunmuş olunur. Grafik 2A ve 2B'de 2 hasta örneği gösterilmektedir. Hangi dilusyonla rezidül F VIII aktivitesi % 50' ye yakınsa o dilusyonun verdiği sonuç en doğru kabul edilir.

Örnek grafik 2A: Normal plazma + dilue edilmemiş hasta plazması 24 Ü F VIII/dl, normal plazma + tampon solüsyon 40 Ü F VIII/dl içeriyorsa; rezidüel F VIII yüzdesi= $24/40=\%60$ olur. Grafikten % 60 rezidüel F VIII hizasındaki nokta bulunur. Bu da 0,7 BÜ inhibitör olduğunu gösterir, hasta plazmanın dilue edilmesine gerek yoktur.



Örnek grafik 2B: Normal plazma+dilue edilmemiş hasta plazması 2 Ü F VIII/dl, normal plazma+tampon solüsyon 40 Ü F VIII/dl içeriyorsa, rezidüel F VIII yüzdesi= $2/40 = \% 5$ olur. $\% 25$ ' in altında olduğu için hasta plazması belirli konsantrasyonlarda dilue edilip test tekrarlanır. Normal plazma+ 1:2 oranında dilue edilmiş hasta plazması 11 Ü F VIII/dl içeriyorsa, rezidüel F VIII yüzdesi= $11/40 = \% 27$ olur ($\%50$ 'ye yakın değil). 1:4 oranında dilue edilmiş hasta plazması ile rezidüel faktör VIII aktivitesi $\% 46$ bulunduğundan grafikte $\% 46$ rezidüel F VIII, 1,1 BÜ' ne denk gelir, $1, 1 \times 4 = 4,4$ BÜ inhibitör olduğu rapor edilir.



Bethesda metodu monoklonal F VIII,porcine (domuz) F VIII (PF VIII) ve rekombinant F VIII kullanımından yıllar öncesine aittir.Test uygulanırken normal plazma yerine standart F VIII, monoklonal F VIII, rekombinant F VIII veya PF VIII konsantreleri de kullanılabilir. Ancak çeşitli F VIII konsantrelerinin içindeki fosfolipidler, F VIII ile antikorların tepkimeye girmesini engelleyerek inhibitör titresinde belirgin bir düşüşe yol açabilmektedirler (103). PF VIII konsantresi ile test yapıldığında yapısal değişiklik nedeniyle farklılık ortaya çıkmaktadır. Porcine ve insan F VIII' i koagulasyonda eşit oranda fonksiyon gösterirken yapısal farklılık nedeniyle insan F VIII'e karşı oluşan antikorlar PF VIII'i tanımayabilir veya az tanır. Potansiyel antijenik farklılıklar Bethesda testinde PF VIII kullanımı tedavide ayrı bir anlam kazandırır. Inhibitör gelişen hastalarda PF VIII kullanılmadan önce PF VIII konsantresi ile Bethesda yöntemi uygulandığında hastada ne kadar az titrede inhibitör tespit edildiyse hastanın PF VIII tedavisine o kadar iyi cevap verdiği, titre yüksek ise tedaviye yanıtın iyi olmadığı gösterilmiştir (104).

Inhibitörlerin saptanmasında Bethesda metodunun bazı eksiklikleri vardır. Nönnötralizan antikorların gösterilememesi, düşük düzeydeki nötralizan antikorların (A₂ ve C₂ bölgesi antikorları) bazen tespit edilememesi önemli eksiklikleridir, o zaman ek tetkikler yapmak gerekmektedir (105).

Protein A sefaroza ile inhibitör tayini: Bazı hastalarda Bethesda metodu ile inhibitör saptanmasa bile transfüze edilen FVIII hızla inaktive edilmektedir. Böyle hastalarda protein A sefaroza veya benzer bir ajan kullanılarak F VIII' e karşı noninhibitör antikorların varlığı araştırılmalıdır. Bu yaklaşım ilk kez Zettervall ve Nilsson tarafından akkiz von Willebrand hastalığı olan bir hastaya kullanılmış, ancak hemofili A'da da kullanılabileceği gösterilmiştir (5,106).

SDS-PAGE sonrası immunblotting analizi: İlk kez Fulcher ve arkadaşları bu yöntem ile F VIII epitoplarına lokalize antikorları tespit etmişler, böylece antikorların karakterleri daha iyi anlaşılabilmiştir (88).

İşaretli F VIII veya F VIII fragmanları kullanılarak yapılan immuno-presipitasyon yöntemi: Immunblotting analizinde önce SDS-PAGE ile protein denatürasyonu meydana geldiğinden sensitif epitoplara karşı antikorlar bu yöntemle bazen gösterilememiştir. Rekombinant F VIII A1 bölge fragmanının eklenmesi ile nötralize edilen inhibitörün bulunması böyle bir antifaktör VIII antikorunun varlığını düşündürmüştür. Böylece bazı antikorların zayıf bağlandığı veya denatüre F VIII'in tümüne bağlanmadığı ve düşük titreli antikorların immunoblotting ile gösterilemeyebileceği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle immuno presipitasyon yöntemi geliştirilmiştir (107). Uygun aminoasitleri şifreleyen F VIII cDNA bölgeleri öyle hazırlanmıştır ki çoğunluk ağır ve hafif zincir F VIII epitopları değerlendirilebilir. Bu fragmanlar baculovirus vektörü içine klonlandığında ve böcek hücrelerinde eksprese edildiğinde veya C₀₅₋₁ hücreleri içine transfekte edildiğinde soluble, gizlenmiş proteinler olarak eksprese edilirler. Fragmanlar biosentetik olarak 35S-metionin ile işaretlenir ve hastanın IgG'si ile enkübe edilir. Fragmanlar ve IgG birleştiğinde protein G-sefaroza ile bağlanır. Bu kompleksler alınıp SDS-PAGE ile analiz edilirler. Otoradiografik olarak izlenen bandlar faktör VIII antikorunca bağlanmış, işaretlenmiş antijenleri gösterirler. Bu test 0,5-1 BÜ/ml inhibitör aktivitesi olan IgG antikor miktarını gösterecek kadar sensitiftir.

F VIII veya F VIII fragmanları kullanılarak yapılan ELISA yöntemi: ELISA yöntemi ile antifaktör VIII antikorları araştırılmaktadır. Bu test de çok sensitif olup aynı yöntemle F VIII fragmanları da gösterilebilir (108).

Inhibitörü bulunan hemofili A hastalarında tedavi

Hemofilik hastada inhibitör mevcutsa ağır kanamalar sonucu mortalite riski yüksektir. Bu nedenle tedavi önem taşımaktadır. Düşük inhibitör titreli ve düşük cevaplı hastalarda kanama durumunda arttırılmış dozda yüksek saflıkta F VIII kullanılabilir. Düşük inhibitör titreli ve yüksek immun cevabı (>20 BÜ) olan hastalarda minor kanamalarda F VIII içeren kan ürünleri kullanılmamalı, anamnestik cevaptan kaçınılmalıdır. Böyle hastalarda F IX konsantreleri ve konservatif tedavi çoğunlukla yeterli olmaktadır. Yüksek immun cevabı olan ve kritik hemoraji nedeniyle tedavi gören hastalarda plazmaferez veya immunoadsorpsiyon uygulandıktan sonra yüksek saflıkta F VIII kullanılabilir. Hemostasis erken dönemde, anamnestik cevap oluşmadan (İlk 4-6 gün) sağlanmalıdır. F VIII inhibitör düzeyi yükseldiğinde F VIII'e sık intervallerle veya sürekli infüzyonla devam edilmelidir. F VIII' in yavaş nötralizasyon hızına bağlı olarak hemostazis sağlanabilmektedir. Yüksek titrede inhibitörü olan kanamalı hastalarda plazmaferez veya immunoadsorpsiyon uygulanması, "porcine factor VIII" (PF VIII) kullanımı, F VIIa konsantreleri, hemostazis sağlanamıyorsa antiinhibitör koagulan kompleks (aktif F IX kompleks) veya aktive olmayan orta saflıkta F IX kompleks konsantreleri önerilmektedir (2,13,66,109). Aktif F IX kompleks (Autoplex-Baxter, FEİBA-Immuno) konsantreleri daha çok by-passing madde içerir ve F VIII inhibitörü olan kişiler için özel imal edilmişlerdir. Ancak trombojenik potansiyelleri olması nedeniyle kullanımları kısıtlıdır. F VIIa konsantrelerinin, hiperkoagulabilite yan etkisinden dolayı hasta seçiminde ayrı bir özen göstermek gerekmektedir. PF VIII konsantreleri yüksek titreli hastalarda, özellikle PF VIII inhibitörleri <10 BÜ ise başarıyla uygulanmaktadır. PF VIII kullanımı ile trombositopeni, febril reaksiyonlar, anaflaktik reaksiyonlar görülebilmektedir (2,66,109).

Inhibitörlü hastalarda tedavinin bir başka amacı inhibitörü kalıcı olarak eradike etmek ve immun toleransı arttırmaktır. Sadece immunsupressif ajan kullanımı ile inhibitörlerin azaltılması veya anamnestik cevabın önlenmesinin mümkün olmadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (110). İntravenöz immunglobulin uygulandığında alloantikoru olan kişilerde etkisiz, otoantikoru hastalarda etkili olarak bulunmuştur.

Intravenöz immunglobulinde bulunan anti-idiotipik antikorların varlığı nötralizan etkiyi sağlamaktadır. Bu reaksiyon alloantikorlularda daha az, otoantikorlularda daha fazla olduğu için hastalarda cevap farklılık gösterilmektedir (111).

Hemofilik hastalarda immün toleransın artırılması için bazı protokoller mevcuttur. Tolerans inhibitörlerin eliminasyonu, infüze edilmiş F VIII' in yarı ömrünün normal seviyeye getirilmesi ve anamnestic cevabın yokluğu anlamındadır. İmmün tolerans hastalara F VIII' in düzenli olarak uzun süreli verilmesi sonucu sağlanabilmektedir. Düşük veya orta doz rejiminde F VIII 25-50 Ü/kg/g gün aşırı veya hergün 1-12 ay verilmiş, sonuçlar incelendiğinde düşük titreli inhibitörü olan hastalarda immün toleransın sağlandığı, ancak çoğunluk hastada proflaksi kesildiğinde inhibitörlerin tekrar ortaya çıktığı görülmüştür (78,112). Bu nedenle yüksek doz rejimleri veya F VIII, immunsupressif bir ajan ve intravenöz immunglobulin gibi çeşitli tedavi kombinasyonları uygulanmaktadır. Bonn protokolünde F VIII 200-300 Ü/kg/g tek başına veya F IX ile birlikte 1-3 yıl verilmektedir. Olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen çok uzun süreli ve çok pahalı olması düşündürücüdür (113,114). Malmö tedavi protokolünde ise uzun süre yüksek doz F VIII+10 gün cyclophosphamide+ 5 gün yüksek doz intravenöz immün globulin verilmiş, yüksek titreli inhibitörü olan hastalara başlangıçta ekstrakorporeal adsorpsiyon uygulanmış, başarılı sonuçlar alındığı rapor edilmiştir (110). Hemofilik bir hastanın 1 yıllık tedavi gideri ile inhibitörlü hemofilik bir hastanın aynı sürede tedavi giderleri karşılaştırıldığında, tedavi maliyetinin en az 3 kat arttığı gösterilmiştir (115).

MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Kasım 1995 - Eylül 1997 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji-Onkoloji kliniği ve İzmir Sosyal Sigortalar Kurumu Tepecik Eğitim Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji kliniğinde takip edilen Hemofili A hastalarında prospektif olarak yapıldı. Hemofili A tanısı olan hastaların cinsiyetleri, yaşları, F VIII düzeyleri, klinik tipleri, kaç yıldır F VIII (taze donmuş plazma veya F VIII konsantreleri) kullandıkları, inhibitör ölçümü yapılmadan son 1 yıl içindeki kanama (tedavi gerektiren) sayıları, son 1 yılda F VIII kaç kez kullandıkları, F VIII gerektiğinde kaç gün kullandıkları, tedavide hangi F VIII kaynağını kullandıkları, ek hastalık varlığı, daha önce inhibitör düzeylerinin bakılıp bakılmadığı araştırıldı. Bu hastalarda en az 2 kez olmak üzere 3-6 ay arayla inhibitör düzeyi ölçüldü. Inhibitör araştırmasına önceden tanı almış ve yeni tanı alan tüm hastalar dahil edildi. Inhibitör düzeyi için kan alınmadan önce hastaların F VIII kullanma durumları, kullandıysa kaç gün önce F VIII kullandıkları öğrenildi.

Inhibitör düzeyi ölçümü için hastalardan 1:10 dilusyonda 0.11 M sodyum sitratlı venöz kan alındı. Kanlar 2500 devirde 10 dakika santrifüje edildi. Elde edilen plazmalarda hastaların inhibitör düzeyi Bethesda metodu (101) ile çalışıldı. Rezidüel F VIII düzeyi % 80-100 olan hastalarda inhibitör olmadığı, % 60-80 arası olan hastalarda şüpheli inhibitör olduğu, % 60'ın altında olan hastalarda kesin inhibitör olduğu kabul edildi. Rezidüel F VIII % 60-80 arası ise bu hastalarda inhibitör düzeyi tekrar ölçüldü; $\geq 0,5$ BÜ inhibitör pozitif olarak kabul edildi. Inhibitör titresi ≤ 10 BÜ ise düşük titreli, >10 BÜ ise yüksek titreli inhibitör olarak değerlendirildi.

Hastaların rezidüel F VIII düzeyleri Bio Merieux Option 8 (Bio Merieux, Fransa) koagülometre cihazı ile Hemolab Cofac VIII KIT (Bio Merieux, Fransa) kullanılarak ölçüldü. Yine aynı metodla hastaların F VIII:C düzeyleri daha önce bakılmışsa 1 kez, ilk kez bakılıyorsa farklı zamanlarda 2 kez ölçüldü. F VIII:C düzeyleri < 2 olan hastalar ağır hemofilik, % 2-5 olanlar orta hemofilik, > 5 olanlar hafif hemofilik olarak sınıflandırıldı. Inhibitör olduğu saptanan vakalarda inhibitörün kalıcı mı, geçici mi, bakılabilen hastalarda F VIII kullanımını sonrasında bu kişilerin yüksek immun cevaplı mı, yoksa düşük cevaplı mı olduğu araştırıldı. Inhibitör saptanan hastalarda kanama sırasında F VIII tedavisine verdikleri cevap not edildi.

Hastaların mutasyon tipinin tayini için 10 cc EDTA'lı kan alınarak 24 saat içinde uygun şartlarda Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Tıbbi Genetik bölümüne gönderildi.

Hastalarda inhibitör gelişimi ile yaş, F VIII:C düzeyi, klinik tip, tanı anından itibaren F VIII kullanma süresi (yıl), inhibitör ölçümünden önceki son 1 yılda kanama sayısı, son 1 yıldır F VIII alma sayısı (her F VIII aldığı dönem 1 olarak kabul edildi), F VIII'e maruziyet günü, kullanılan F VIII kaynağı ve mutasyon tipi arasında ilişki araştırıldı.

Bu çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirmesinde Fisher kesin ki-kare testi ve SPSS istatistik paket programı (Windows 6.0) kullanıldı. SPSS istatistik paket programından Man Whitney-U testi, ki-kare testi ve logistik regresyon testi kullanıldı.



BULGULAR

Kasım 1995 - Eylül 1997 tarihleri arasında 58 erkek hemofili A hastası bu çalışmaya alındı. Hiç bir hastada önemli ek bir hastalık saptanmadı. Hastaların 3'ünde (%5) ilk tanı anından itibaren inhibitör düzeyi ölçüldü, diğer 55 hasta (% 95) daha önceden tanı almış ve çeşitli kereler tedavi görmüş hastalardı. Hastaların hiçbirinde daha önce inhibitör düzeyi ölçülmemişti. Hastaların yaşları 1-18 yaş (ortalama $9,5 \pm 4,7$ yıl) olarak bulundu. 58 hastadan 16'sında (% 27) inhibitör geliştiği saptandı. Hafif hemofilik 14 hastadan hiçbirinde inhibitör bulunmadı, orta hemofilik 27 hastadan 9'unda (% 33), ağır hemofilik 17 hastadan 7'sinde (% 41) inhibitör varlığı tespit edildi. Orta ve ağır hemofili A hastalarında inhibitör gelişimi hafif hemofilik hastalara göre anlamlı yüksek ($p=0,02$) bulunurken, orta ve ağır hemofili A hastalarında istatistiksel olarak anlamlı ($p>0,05$) bir fark bulunamadı. Orta hemofilik hastalardan 7'sinde düşük (0,50-2,0 BÜ), 2'sinde yüksek titrede (44-500 BÜ) inhibitör bulunurken ağır hemofilik hastalardan 5'inde düşük (0,50-1,8 BÜ), 2'sinde yüksek titrede (50-358 BÜ) inhibitör saptandı. İnhibitör titresini ile hemofili klinik tipi arasında hasta sayısı az olduğu için istatistiksel bir değerlendirme yapılamadı. Tablo 6'da hastaların yaşı, F VIII düzeyleri, klinik tipleri, başlangıçtaki, maksimum ve son inhibitör düzeyleri izlenmektedir.

3-6 ay ara ile inhibitör düzeyi ölçümleri yapıp hastalar son olarak tekrar değerlendirildiğinde 58 hastadan 6 sında (% 10) inhibitör varlığının devam ettiği tespit edildi. Hafif hemofilik hastalarında inhibitör saptanmazken, 27 orta hemofilik hastadan 3'ünde (% 11), 17 ağır hemofilik hastadan 3'ünde (% 18) inhibitörlerin kaybolmadığı saptandı. İnhibitörü olan orta hemofiliklerden 2'sinde yüksek titrede (80 BÜ, 500 BÜ), 1 hastada düşük titrede (2 BÜ), ağır hemofiliklerden 2'sinde yüksek titrede (50 BÜ, 200 BÜ), 1'inde düşük titrede (0,50 BÜ) inhibitör olduğu izlendi. 10 hastada (% 10) geçici inhibitör olduğu tespit edildi (Tablo 7).

F VIII inhibitörü olduğu saptanan ve bakılabilme imkanı olan hastalar, F VIII kullanımı sonrası düşük immun cevaplı veya yüksek immun cevaplı olmaları açısından araştırıldığında 3, 24, 25, 33 numaralı hastalar yüksek cevaplı, 12, 26, 29, 47 numaralı hastalar düşük cevaplı kişiler olarak belirlendi. Diğer 8 hastada bu açıdan değerlendirme yapılamadı.

Tablo 6:Hastaların yaşları, F VIII düzeyleri, klinik tipleri, başlangıç, maksimum ve son inhibitör düzeyleri.

Hasta No	Yaş (yıl)	F VIII: C düzeyi (%)	Klinik Tip	Inhibitör düzeyi (BÜ)		
				Başlangıç	Maksimum	Son
1	12	2	Orta	0.62	0.72	0
2	1	2	Orta	0	0	0
3	8	2	Orta	358	500	500
4	6	2	Orta	0	0	0
5	7	7	Hafif	0	0	0
6	4	3	Orta	0	0	0
7	7	0.4	Ağır	0	0	0
8	6	1	Ağır	1.8	1.8	0
9	16	5	Orta	0	0	0
10	10	1	Ağır	0	0	0
11	10	1	Ağır	0.52	0.52	0
12	11	1	Ağır	0.62	0.62	0
13	15	1	Ağır	0	0	0
14	2	1	Ağır	0	0	0
15	11	1	Ağır	0	0	0
16	5	3	Orta	0	0	0
17	2	3	Orta	0.5	0.5	0
18	5	1	Ağır	0	0	0
19	8	1	Ağır	0	0	0
20	9	7	Hafif	0	0	0
21	5	6	Hafif	0	0	0
22	3	1	Ağır	0	0	0
23	10	10	Hafif	0	0	0
24	18	1	Ağır	50	230	50
25	9	1	Ağır	358	358	200
26	18	2	Orta	0.52	0.62	0
27	13	2	Orta	0.52	0.52	0
28	7	1	Ağır	0	0	0
29	16	2	Orta	0.6	2	2
30	10	7	Hafif	0	0	0
31	14	4	Orta	0	0	0
32	16	3	Orta	0	0	0
33	16	2	Orta	44	200	80
34	1	3	Orta	0	0	0
35	9	10	Hafif	0	0	0
36	12	8	Hafif	0	0	0
37	5	20	Hafif	0	0	0
38	6	2	Orta	0	0	0
39	11	4	Orta	0.74	0.74	0
40	9	4	Orta	0	0	0
41	18	2	Orta	0	0	0
42	12	2	Orta	0	0	0
43	14	8	Hafif	0	0	0
44	5	6	Hafif	0	0	0
45	17	2	Orta	0	0	0
46	7	5	Orta	0	0	0
47	18	0.6	Ağır	0.62	0.62	0.5
48	15	2	Orta	0.6	0.6	0
49	9	4	Orta	0	0	0
50	6	4	Orta	0	0	0
51	17	2	Orta	0	0	0
52	12	1	Ağır	0.52	0.52	0
53	8	6	Hafif	0	0	0
54	7	7	Hafif	0	0	0
55	12	10	Hafif	0	0	0
56	7	1	Ağır	0	0	0
57	7	3	Orta	0	0	0
58	5	20	Hafif	0	0	0

Tablo 7: İnhibitör gelişen hemofili A'lı hastalarda 3-6 ay ara ile inhibitör düzeyleri ve hemofilinin klinik tipi.

Hasta No	Hemofili A klinik tip	İnhibitör düzeyi			İnhibitör özelliği
		Başlangıç	Maksimum	Son	
1	Orta	0,62	0,72	0	geçici
17	Orta	0,50	0,50	0	geçici
26	Orta	0,52	0,62	0	geçici
27	Orta	0,52	0,52	0	geçici
39	Orta	0,74	0,74	0	geçici
48	Orta	0,60	0,60	0	geçici
3	Orta	358	500	500	kalıcı
29	Orta	0,60	2	2	kalıcı
33	Orta	44	200	80	kalıcı
8	Ağır	1,8	1,8	0	geçici
11	Ağır	0,52	0,52	0	geçici
12	Ağır	0,62	0,62	0	geçici
52	Ağır	0,52	0,52	0	geçici
24	Ağır	50	230	50	kalıcı
25	Ağır	358	358	200	kalıcı
47	Ağır	0,62	0,62	0,50	kalıcı

Kalıcı inhibitörü olan hastalarda F VIII tedavisine rağmen kanama bulgularının uzun sürdüğü gözlemlendi. Özellikle 3, 25, 29, 33 ve 47 numaralı hastalarda çeşitli kanamalar nedeniyle 7-30 gün arasında F VIII infüzyonu gerektiği not edildi.

En az 1 yıldır izlenen yeni tanı almış 3 hastadan hiçbirinde inhibitör gelişmediği görüldü. Tablo 8'de inhibitör gelişen hastaların yaşları, F VIII düzeyleri, kaç yıldır F VIII aldıkları, son 1 yıl içinde kaç kez ve kaç gün F VIII'e maruz kaldıkları, kullandıkları F VIII kaynakları izlenmektedir.

Tablo 8: İnhibitör bulunan hastaların yaşları, F VIII düzeyleri, kaç yıldır F VIII aldıkları;son 1 yıldır kaç kez ve kaç gün F VIII'e maruz kaldıkları, F VIII kaynakları.

Hasta No	Yaş (yıl)	F VIII düzeyi (%)	Kaç yıldır F VIII alıyor	1 yıl içinde		
				Kaç kez F VIII	Kaç gün F VIII	F VIII kaynağı
1	12	2	10	2	10	TDP+ Koate HP*
3	8	2	6	6	26	Nordiate
8	6	1	5	2	40	TDP+ Koate HP*
11	10	1	9	5	12	TDP+ Nordiate*
12	11	1	10	8	40	TDP+ Koate HP*
17	2	3	2	5	20	TDP+ Koate HP*
24	18	1	15	4	15	TDP+ Nordiate*
25	9	1	6	3	50	TDP+ Koate HP*
26	18	2	14	3	30	TDP+ Nordiate**
27	13	2	10	1	3	TDP+Nordiate**
29	16	2	13	SP***	Haftada 3	Nordiate
33	16	2	15	SP***	Haftada 3	Nordiate
39	11	4	8	4	18	TDP+ Koate HP*
47	18	0,6	17	10	40	TDP+ Koate HP*
48	15	2	13	14	35	TDP+ Koate HP*
52	12	1	11	10	70	TDP+ Koate HP*

* Sıklıkla son 1 yıldır F VIII kaynağı olarak F VIII konsantresi kullanmış

** Sıklıkla TDP kullanmış

*** Sekonder Profilakside

İnhibitör gelişen vakalarda yaş ortalama $12,4 \pm 4,5$ yıl, gelişmeyen vakalarda $8,7 \pm 2,9$ yıl olarak bulundu; yaşı daha büyük olan hastalarda inhibitör gelişme riski istatistiksel olarak anlamlı yüksek ($U=191, p=0,01$) bulundu. Son 1 yıl içinde F VIII kullanma sayıları inhibitör gelişenlerde ortalama $5,1 \pm 3,7$, inhibitör gelişmeyenlerde $3,1 \pm 1,5$ olarak saptandı; F VIII daha çok kullananlarda inhibitör gelişme riski istatistiksel olarak anlamlı yüksek ($U=74,5, p=0,001$) bulundu. Son 1 yılda F VIII

kullandıkları gün sayısı inhibitör gelişenlerde ortalama $25,9 \pm 17,0$ gün, inhibitör gelişmeyenlerde $6,6 \pm 13,3$ gün bulundu; F VIII daha fazla gün kullananlarda inhibitör gelişme oranı istatistiksel olarak anlamlı yüksek ($U=61,5, p=0,001$) saptandı. İnhibitör gelişen hastalarda son 1 yıldaki kanama sayısı ortalama $4,5 \pm 0,8$, inhibitör gelişmeyenlerde $0,9 \pm 1,2$ bulundu; kanama sayısı fazla olanlarda inhibitör gelişme riski istatistiksel olarak anlamlı yüksek ($U=64, p=0,001$) saptandı. F VIII aldıkları yıl değerlendirildiğinde inhibitör gelişenlerle gelişmeyenler arasında inhibitör gelişme riski açısından istatistiksel olarak anlamlı fark ($U=259, p>0,05$) bulunmadı.

F VIII düzeyine göre hemofili A'nın klinik tiplendirmesinde %2 değeri ağır ve orta tip hemofilikleri ayırmada cut-off değer olarak kullanılmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda orta ve ağır hemofilikler arasında inhibitör gelişme oranı açısından bir fark bulunmadığından cut-off değeri olarak % 2 ve altında F VIII düzeyi olanlarla, % 2'nin üstünde F VIII düzeyi olanlar arasında inhibitör gelişme riski tekrar değerlendirildi. F VIII düzeyi % 2 ve altında olan vakalarda, F VIII düzeyi %2'nin üzerinde olanlara göre, inhibitör gelişme riski istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,05$).

Kullanılan F VIII kaynakları açısından araştırıldığında son 1 yıldır hastaların yaklaşık % 27'sinin taze donmuş plazma ve/veya tam kan aldıkları, % 42'sinin Koate HP kullandığı, % 22'sinin Nordiate kullandığı, geri kalanların diğer F VIII preparatlarını kullandıkları, F VIII konsantresi kullanan hastaların zaman zaman daha az oranda olmak üzere taze donmuş plazma da kullandıkları görüldü. Koate HP veya Nordiate kullanan ve kullanmayan hastalarda inhibitör varlığı açısından istatistiksel bir fark bulunmazken ($p>0,05$), sadece taze donmuş plazma verilenlerde inhibitör saptanmaması istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulundu. F VIII konsantreleri kullanan hastaların median 3 yıldır çeşitli F VIII preparatlarını kullandığı saptandı.

İnhibitör düzeyi ölçümünden kaç gün önce hastaların F VIII'e maruz kaldıkları değerlendirildiğinde bu süre inhibitörü olmayanlarda median 24 gün, olanlarda median 8 gün olarak saptandı. F VIII'e daha kısa süre önce maruz kalanlarda inhibitör gelişme riski istatistiksel olarak anlamlı yüksek ($p<0,05$) bulundu.

Multivariate analiz testi olan logistik regresyon testi yapılarak hangi özelliklerin inhibitör gelişmesine neden olduğu incelendiğinde hastaların yaşının ($p=0,05$), son 1 yıl içinde F VIII kullanma sayısının ($p=0,02$), F VIII kullandığı gün sayısının ($p=0,02$), kanama sayısının ($p=0,01$) istatistiksel olarak inhibitör gelişmesinde önemli bir neden

olduğu, F VIII kullanma süresinin ise inhibitör geliştirmede önemli bir risk oluşturmadığı (p>0,05) saptandı.

Kanlar gönderildikten yaklaşık 10 ay sonra 3 hasta dışında diğer hastaların mutasyon tiplerinin henüz sonuçlanmadığı öğrenildi. 11, 24 ve 29 numaralı vakalarda intron 22'de inversiyon saptandığı bildirildi. İstatistiksel değerlendirme yapılamadı.



TARTIŞMA

F VIII inhibitörleri kişinin immun sistemi tarafından F VIII içeren değişik kan ürünlerine karşı oluşturulan protein yapısındaki antikorlardır. Bunlar infüze edilen faktörü yabancı kabul ederek henüz pıhtılaşma gerçekleşmeden nötralize etmektedirler (66,91,116). Hemofili A'lı olgularda inhibitör gelişme insidansı % 5-15 arasında değişirken prevalans % 4-20 dolayındadır (1,2). Özellikle ağır hemofili A hastalarında insidans % 18-52'ye yükselmekte ve inhibitör gelişme riski artmaktadır (2). Bizim çalışmamızda 58 hastadan 16'sında inhibitör saptanarak prevalans başlangıçta % 27 bulunmuş, ancak takiplerin sonunda 58 hastadan 6'sında inhibitörün kalıcı olması nedeniyle prevalansın % 10'a düştüğü, 58 hastadan 10'unda inhibitörün kaybolması nedeniyle %17 hastada geçici inhibitörlerin olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, başlangıçta prevalansın daha yüksek bulunması geçici inhibitörlerin varlığına bağlanmıştır. Literatürde de vakalarda 3 ayda bir düzenli inhibitör düzeyi bakıldığında daha fazla inhibitör saptandığı bildirilmektedir (83). Hastalarda F VIII rezistansı bulguları olmasa bile 3-6 ayda bir yapılan inhibitör taramalarında tesadüf olarak geçici inhibitörlerin çıkabileceği son yıllarda daha açık bir şekilde ortaya konmuştur (81,84,117,118). Ankara'da yapılan bir araştırmada 18 yaşından küçük hemofilik çocuklarda inhibitör prevalansı % 43 bulunmuş, bunların bir kısmının geçici olabileceği bildirilmiştir (119). Araştırmamızda hasta sayısının az olması nedeniyle hafif, orta ve ağır hemofilik hastalar birlikte değerlendirilmiştir. Sadece ağır hemofilik vakaların taranması durumunda prevalansın artacağı düşünülmüştür.

Inhibitörlerin F VIII tedavisinden 2-3 gün sonra saptanmaya başladığı, median 9-11 gün sonra izlendiği 7-21 günde maksimuma ulaştığı, F VIII kesildikten 4-12 hafta sonra kaybolduğu, yüksek titreli inhibitörlerin ise F VIII'e maruz kalınmasa dahi 1-2 yıl sonra halen saptanabileceği bildirilmektedir (66). Inhibitör saptanan hastalarımızda son F VIII tedavisi ve inhibitör düzeyi ölçümü arasındaki süre median 8 gün, inhibitör saptanmayan hastalarda bu süre 24 gün bulunmuştur. Ancak hemofili tanısı almasından itibaren belli aralıklarla inhibitör bakılarak takip edilemediği için inhibitör pozitif olan hastalarda daha önce uygulanan faktörlerden hangisi ile inhibitör geliştiğini söylemek mümkün değildir. Buna rağmen daha kısa süre içinde F VIII'e maruz kalanlarda inhibitör gelişmesi istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Literatürde geçici inhibitörlerin kaybolduktan sonra genellikle tekrar görülmediği

bildirilmektedir (66). Çalışmamızda takipler sırasında hastalar gerektiğinde F VIII tedavisi almalarına rağmen inhibitör prevalansının azalması da bunu desteklemektedir.

Sıklıkla düşük titreli inhibitörü olanlarda F VIII sonrası düşük immun cevap, yüksek titreli inhibitörü olanlarda % 87 oranında yüksek immun cevap görülmektedir (2,62,63). Çalışmamızda F VIII verilmesinden sonra immun cevabı değerlendirilebilen 8 hastadan 4'ünün yüksek titreli inhibitörü olduğu, klinik olarak daha uzun süreli kanadığı, yüksek immun cevaplı olduğu, diğer 4'ünün düşük titreli ve düşük immun cevaplı olduğu bulunmuştur. Yüksek titrede inhibitörü olan ve yüksek immun cevap gösteren kişilerde kanama sırasında mortalite riski yüksek olduğundan böyle hastaların önceden bilinmesi ve tedavinin buna göre yapılması gerekmektedir.

F VIII inhibitörlerinin gelişmesi sıklıkla, hemofilik bir hastanın genellikle kullandığı faktör preparatını alırken beklenen cevabın azalması ve kanamanın sürmesi veya aniden kanamanın başlaması ile ortaya çıkmaktadır (3). Kalıcı inhibitör saptadığımız 5 hastada kanama sırasında diğer hastalara göre F VIII'e daha geç yanıt alınması, kanama kontrolünün uzaması ve daha yüksek dozda F VIII gereksinimleri olması dikkati çekmiştir. Özellikle ağır hemofiliklerde F VIII tedavisine rağmen kanama devam ediyor ve cevap alınamıyorsa inhibitör olabileceği mutlaka akla getirilmelidir.

Son 10 yılda F VIII'i inaktive eden inhibitörler hakkında daha çok bilgi edinilmiştir. Günümüzde inhibitörlerin immunokimyasal özellikleri, tepkiye girdikleri F VIII epitopları, bu inhibitörlerin F VIII'in fonksiyonları üzerine etkileri daha iyi anlaşılmaktadır. Daha az bilinenler ise inhibitör formasyonunu oluşturan özellikler, transfüze edilen F VIII'in bu sensitizasyondaki rolü ve F VIII'e karşı gelişen immun yanıtın doğasıdır (4,5). Bunlardan konakçıya ait olanların halen araştırılması gerekmektedir. Konakçıya ait özelliklerden birisi hemofilinin klinik tipidir. Ağır hemofilik hastalarda inhibitör gelişme insidansının daha yüksek bulunması F VIII düzeyi ile inhibitör gelişimi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (2,117). Çalışmamızda orta ve ağır hemofilik hastalarda inhibitör varlığı açısından istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır. Hastalarımızdaki geçici inhibitörlerin ve hasta sayısının az olmasının bu sonucu etkilediği düşünülmüştür. Ayrıca F VIII düzeyleri % 2 olanlar orta hemofilik, %2'nin altında olanlar ağır hemofilik olarak değerlendirildiğinden % 2 değeri çok önem taşımaktadır. Çalışmamızda F VIII düzeyi % 2 ve altı olanlarda inhibitör gelişimi istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Yine F VIII düzeyi çeşitli laboratuvarlar ve kendi laboratuvarımızda % 2 bulunan bir hastamız orta hemofilik

olarak kabul edilmiş, ancak mutasyon tipi öğrenildiğinde bu hastada ağır hemofili A ile uyumlu intron 22 inversiyonu olduğu görülmüştür. Bu nedenle F VIII aktivitesi % 2 bulunan hastaların dikkatli değerlendirilmesi ve mutasyon tiplerinin mutlaka bakılması gerektiği düşünülmüştür.

Hastanın yaşı, inhibitör gelişimi ile ilişkili özelliklerden birisidir. Inhibitörlerin çoğunluğunun 20 yaşından önce geliştiği, orta ve ağır hemofiliklerde 25 yaşında inhibitör gelişmesinin kümülatif riskinin % 24 olduğu bildirilmektedir (58,85). Bir çalışmada inhibitör gelişme riski en yüksek 3-7 yaşta, diğer bir çalışmada 1 ay-5,2 yaşta olarak verilmektedir (61,85). İngiltere'de yapılan bir çalışmada, değişik F VIII konsantreleri kullanan hastalarda yeni inhibitör geliştiren hastaların % 38'inin 10 yaştan sonra inhibitör geliştirdiği bildirilmektedir (120). Inhibitör saptanan hastalarımızın ortalama yaşı $12,4 \pm 4,5$ yıl olarak belirlenmiştir. Ancak inhibitörlerin hangi yaşta geliştiğini saptamak, tanı anından itibaren inhibitör bakılmadığı için mümkün olamamıştır. Ortalama yaşı literatürde bildirildiğinden daha geç bulunmasının bir nedeninin de hastaların çoğunun inhibitör gelişme riskini arttırdığı öne sürülen çeşitli F VIII preparatlarını yakın zamanlarda (median 3 yıl) kullanmaya başlaması olduğu düşünülmüştür ve çalışmamızda daha ileri yaşta olan hastalarda inhibitör riskinin anlamlı yüksek bulunması bu hastaların daha çok F VIII'e maruz kalmaları ile açıklanabilmiştir. Bunu destekleyen bir bulgu da son 1 yıl içinde hastaların kaç kez F VIII aldıkları, kaç gün F VIII kullandıkları ve F VIII kullanımı gerektiren kanama sayıları araştırıldığında daha fazla sayı ve sürede F VIII alanlar ve kanaması fazla olanlarda inhibitör gelişme riskinin anlamlı yüksek bulunmasıdır.

F VIII inhibitörlerinin gelişmesinde, kullanılan F VIII preparatlarının içeriği önem taşımaktadır. Sadece taze donmuş plazma ile tedavi edilen hastalarda daha az oranda inhibitör gelişimi olduğu ve cryopresipitat ile tedavi edilmiş hastalarda % 2-28 oranında inhibitör geliştiği gözlenirken, özellikle orta saflıkta F VIII preparatı kullananlarda % 52'ye varan yüksek insidans bildirilmiştir (61,83,121). Buna zıt olarak orta saflıkta bir F VIII preparatı ile inhibitör gelişme insidansının % 0 olduğunu bildiren literatür de vardır (82). 1990'da Hollanda ve Belçika'da kullanımına başlanan Factor VIII CPS-P adlı orta saflıkta bir preparatın 1991 yılında hastaların inhibitörlerinde bariz bir artışa neden olduğu fark edilmiş, plazmadan pastörizasyonla elde edilen bu ürün yeni antijenler içerdiği ve konsantrenin daha fazla immunojenik olduğu için bu etkiyi yaptığı düşünülmüştür. Preparat kullanımdan kalktıktan sonra inhibitör prevalansının eski

bazal seviyeye düştüğü bildirilmiştir (84). İzmir'de yapılan bir araştırmada sadece taze donmuş plazma ile tedavi edilen hemofiliklerde hiç inhibitör saptanmazken, F VIII konsantreleri alanlarda inhibitör gelişme prevalansı % 13 bulunmuştur (122). Daha önce F VIII kullanmamış hastalarda başlatılan çalışmalarda, yüksek saflıkta F VIII kullanan hastaların daha düşük oranda inhibitör geliştirdiği bulunmuştur (83, 118, 123-125). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak sadece taze donmuş plazma ile tedavi edilenlerde inhibitör hiç saptanmamış, çeşitli F VIII preparatları kullanan hastalarda inhibitör olduğu görülmüştür. Inhibitör bulunan hastalarda Koate HP adlı yüksek saflıkta preparat daha çok kullanılmış gibi gözükse de bu preparatı kullanan hastalarda kullanmayanlara göre inhibitör gelişimi açasından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Çalışmamızda inhibitör prevalansının çok yüksek olmamasının bir nedeni hastaların büyük bir kısmının Koate HP ve Nordiate gibi yüksek saflıkta F VIII preparatlarını kullanmaları, orta saflıkta pastörizasyonla elde edilmiş ürünleri kullanmamaları olabilir. Inhibitör gelişme insidansı en yüksek (% 52) bulunan bir araştırmada pastörizasyonla elde edilen bir ürün kullanılmış, F VIII elde edilirken yapılan işlemin yeni antijenlere neden olarak bu hastalarda immun cevabı etkilediği düşünölmüştür (61). Literatürde yüksek saflıkta ve monoklonal yöntemle elde edilmiş F VIII preparatları kullananlarda % 9-18, rekombinant F VIII preparatları kullananlarda %7-24 oranında inhibitör gelişimi olduğu bildirilmektedir (2,4,80,83).

F VIII gen mutasyonları tanımlandıkça mutasyon tipi ile inhibitör gelişimi arasında bazı ilişkiler ortaya çıkmaya başlamıştır. Daha önceleri sınırlı sayıda bilinen F VIII gen delesyonları ile inhibitör gelişimi arasında ilişki bulunamazken, son yıllarda yeni ortaya çıkarılan mutasyonlar da göz önüne alındığında bazı mutasyonlarda inhibitör gelişme riski anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (73-76, 117). Hastalarda inversiyon veya diğer bir gen mutasyonu varsa inhibitör gelişmesinin relatif riski inversiyon veya diğer bir gen mutasyonu saptanmayan hastalara göre 3,8 olarak bildirilmiştir (76). Aynı çalışmada mutasyon saptanan hastaların % 67'sinde inhibitör tespit edilmiş, özellikle distal A gen inversiyonunda inhibitör gelişmesi anlamlı bulunmuştur. Bu hastalarda inhibitör gelişme riskinin artmasına varyant mRNA'ların üretilmesinin neden olduğu düşünölmüştür. Bir başka çalışmada inhibitör gelişme insidansı inversiyonlarda % 34,4, geniş delesyonlarda % 37,5, bitirme mutasyonlarında % 38,4, yanlış anlamlı mutasyonlarda % 4,3, diğer küçük delesyonlarda % 7,4 bulunmuştur. İlk 3 mutasyonda inhibitör gelişme ihtimalinin anlamlı olarak yüksek

saptandığı bildirilmektedir (126). Yine son zamanlarda yapılan çalışmalarda genetik bulgular ve inhibitör gelişiminin korrelasyon gösterdiği rapor edilmektedir (48, 127-129). Bizim çalışmamızda da hastaların mutasyon tipleri ile inhibitör gelişmesi arasındaki korrelasyon araştırılmak istenmiş, ancak teknik nedenlerden dolayı mutasyon tiplerinin sonuçları yetiştirilememiştir. Yine de intron 22'de inversiyonu olduğu bildirilen 3 vakadan 2'sinde kalıcı inhibitör saptandığı dikkati çekmiştir. Hastaların mutasyon tipleri belirlendiğinde hastalarımızdaki gen mutasyonları ile inhibitör gelişme riskinin gözden geçirilmesi planlanmıştır.

Literatürde inhibitör gelişimi ile HLA haplotipleri arasındaki ilişki de araştırılmıştır. İnhibitör gelişimi bazı doku tipleri ile ilişkili (HLA-A3, HLA-B7, HLAC-7, HLA DQA 0102, HLA- DRB 1501, HLA-DR5, HLA-DR15, HLA-DRB1-01, DQB1-0501, DQA-0101, DQB-0602) bulunmuştur (70-72). Ancak altta yatan F VIII gen defektinin farklı olması nedeniyle çalışmanın homojen bir homofili A populasyonunda yapılması gerekmektedir. F VIII'e karşı gelişen antikorlar da farklılık göstermektedir. Bu nedenle HLA haplotipleri ile inhibitör gelişimi arasındaki ilgi araştırılırken hemofili tipi veya gen defekti ile ilişkisi değil, oluşan inhibitörlerin hangi tip olduğunun araştırılması daha uygun bulunmuştur (4). Böyle bir homojen hemofili A populasyonu olmadığından ve oluşan inhibitörlerin hangi tip olduğunu laboratuvar şartları nedeniyle gösteremediğimizden hastalarımızın HLA haplotiplerine bakılmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda hangi etyolojik faktörlerin inhibitör gelişmesi ile ilişkili olduğu ve inhibitör gelişimine neden olduğu değerlendirildiğinde F VIII düzeyi, yaş, belli bir sürede kaç kez F VIII kullandığı, kaç gün F VIII aldığı, kanama sayısının önemli olduğu ve F VIII konsantreleri kullananlarda sadece taze donmuş plazma kullananlara göre inhibitör gelişme riskinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bunların dışında inhibitör gelişmesini etkileyen diğer nedenler de göz önüne alındığında bu kompleks mekanizmanın ileriki yıllarda çalışma sayıları arttıkça, eklenen yeni verilerle daha iyi anlaşılacağı ve ortaya çıkarılabileceği sanılmaktadır.

SONUÇLAR

1. Çalışmaya alınan 58 hemofili A hastasında inhibitör gelişme prevalansı Bethesda metodu ile % 27 olarak saptanmıştır.
2. Orta ve ağır hemofili A hastalarında inhibitör gelişimi hafif hemofilik hastalara göre anlamlı yüksek ($p=0,02$) bulunurken orta ve ağır hemofili A hastalarında istatistiksel olarak anlamlı ($p>0,05$) bir fark bulunmamıştır.
3. Hastaların takipleri sonunda bazı hastalarda geçici inhibitörlerin kaybolması sonucunda prevalans % 10'a düşmüştür.
4. Geçici inhibitör prevalansı % 17 olarak ortaya çıkmıştır.
5. F VIII düzeyi % 2 ve daha altında olan hastalarda inhibitör gelişme riski anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
6. Daha ileri yaşta olan ($p=0,01$), son 1 yıl içinde kanama sayısı fazla olan ($p=0,001$), fazla F VIII infüzyonu gereken ($p=0,001$), daha fazla gün F VIII'e maruz kalan ($p=0,001$) hastalarda inhibitör gelişimi anlamlı saptanırken, F VIII kullanım süresi ile inhibitör gelişimi arasında anlamlı ($p>0,05$) bir ilişki saptanmamıştır.
7. Sadece taze donmuş plazma infüzyonu yapılan hastalarda inhibitör gelişmemesi anlamlı ($p<0,05$) bulunurken, Koate HP veya Nordiate kullanan ve kullanmayan hastalarda inhibitör varlığı açısından istatistiksel bir fark ($p>0,05$) bulunmamıştır.
8. Hastaların median 3 yıldır F VIII konsantreleri kullandığı saptanmıştır.
9. İnhibitör saptanmayan hastaların median 24 gün önce, inhibitör saptanan hastaların median 8 gün önce F VIII kullandıkları tespit edilmiş, daha kısa süre önce F VIII'e maruz kalanlarda inhibitör gelişme riski anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).
10. Kalıcı inhibitörü olan vakalarda kanamalar sırasında F VIII tedavisine cevapsızlık olduğu ve kanamaların daha uzun sürdüğü gözlenmiştir.
11. Düşük titreli inhibitörü olan 4 hastanın hepsinde F VIII tedavisiyle düşük immun cevap, yüksek titreli inhibitörü olan 4 hastanın hepsinde yüksek immun cevap saptanmıştır.
12. İntron 22'de inversiyonu olduğu bildirilen 3 hastadan ikisinde kalıcı inhibitör varlığı tespit edilmiştir.

13. Logistik regresyon testi ile multivariate analiz yapıldığında hastaların yaşının ($p=0,05$), son 1 yıldır kanama sayılarının ($p=0,01$), F VIII kullanma sayısı ve F VIII'e maruz kaldıkları gün sayısının ($p=0,02$) inhibitör gelişimine neden olduğu saptanmıştır. F VIII kullanma süresinin inhibitör geliştirmede önemli bir risk oluşturmadığı ($p>0,05$) bulunmuştur.



ÖZET

Kasım 1995-Eylül 1997 tarihleri arasında yaşları 1-18 yaş (ortalama $9,5\pm 4,7$ yıl) olan 58 hemofili A hastasında Bethesda metodu ile inhibitör gelişme prevalansı % 27 olarak saptanmıştır. Hafif hemofilik 14 hastadan hiçbirinde inhibitör bulunmazken orta hemofilik 27 hastadan 9'unda (% 33) ağır hemofilik 17 hastadan 7'sinde (% 41) inhibitör olduğu bulunmuştur. Orta ve ağır hemofilik hastalarda inhibitör gelişimi hafif hemofilik hastalara göre anlamlı yüksek ($p=0,02$) bulunurken, orta ve ağır hemofilik hastalar arasında anlamlı bir fark ($p>0,05$) bulunmamıştır. Orta hemofilik hastalardan 7'sinde düşük (0,50-2,0 BÜ), 2'sinde yüksek (44-500 BÜ) titrede inhibitör tespit edilirken ağır hemofilik hastalardan 5'inde düşük (0,50-1,8 BÜ), 2'sinde yüksek titrede (50-358 BÜ) inhibitör varlığı saptanmıştır. Takipler sonucunda hastaların % 17'sinde inhibitörün geçici olduğu, son değerlendirmede inhibitör gelişme prevalansının % 10 olduğu izlenmiştir.

Hastaların F VIII kullanma süresi inhibitör gelişimini etkilemezken, ileri yaşta olanlarda ($p=0,01$), son 1 yıl içinde kanama sayısı fazla olanlarda ($p=0,001$), F VIII kullanım sayısı fazla olanlarda ($p=0,001$), daha fazla gün F VIII alanlarda ($p=0,001$), F VIII düzeyi % 2 ve daha düşük olanlarda ($p<0,05$) inhibitör gelişimi ile anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Sadece taze donmuş plazma infüzyonu yapılanlarda inhibitör gelişimi sözkonusu değilken ($p<0,05$), F VIII konsantreleri kullananlarda inhibitör varlığı saptanmış, en çok kullanılan Koate HP veya Nordiate preparatlarını kullanan ve kullanmayanlar arasında inhibitör varlığı açısından istatistiksel bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Inhibitör saptanmayan hastaların ilk inhibitör ölçümünden median 24 gün önce, inhibitör saptanan hastaların median 8 gün önce F VIII'e maruz kaldıkları tespit edilmiş, F VIII'e daha kısa süre önce maruz kalanlarda inhibitör gelişme riski anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Kalıcı inhibitörü olan vakalarda kanamaların daha uzun süreli olduğu gözlenmiştir.

Logistik regresyon testi ile multivariate analiz yapıldığında hastaların yaşının ($p=0,05$), son 1 yıldır kanama sayılarının ($p=0,01$), F VIII kaç kez ($p=0,02$) ve kaç gün kullandıklarının ($p=0,02$) inhibitör gelişimine neden olduğu, F VIII kullanma süresinin inhibitör geliştirmede önemli bir risk oluşturmadığı ($p>0,05$) saptanmıştır.

SUMMARY

In 58 hemophilia A patients aged 1-18 years (mean 9.5 ± 4.7 years), the prevalence of inhibitor development was found 27% by Bethesda method during the time period between November 1995 and September 1997. Inhibitor activity was not detected in any of 14 mild hemophiliacs while it was present in 9 of 27 (33%) moderate and 7 of 17 (41%) severe cases. Development of inhibitors was significantly high ($p=0.02$) in moderately and severely affected patients when compared with mild cases. No significant difference was found between moderate and severe cases in this respect ($p>0.05$). Among moderate hemophiliacs, 7 had low titres (0.50-2.0 BU) and 2 had high titres (44-500 BU) of inhibitors, and among severe hemophiliacs, 5 had low titres (0.50-1.8 BU) and 2 had high titres (50-358 BU) of inhibitors. At follow-up of patients inhibitors were transient in 17% and the prevalence of inhibitor development was 10% at the end of the study.

Development of inhibitors was not affected by the amount of time the patients had been receiving F VIII ($p>0.05$), while it was significantly associated with the patient's age ($p=0.01$), number of bleeding episodes within the last year ($p=0.001$), frequency of F VIII administration ($p=0.001$), number of F VIII treatment days ($p=0.001$), and

F VIII level $\leq 2\%$ ($p<0.05$). Inhibitors did not develop in patients who received only fresh frozen plasma ($p<0.05$). Some of the patients who used F VIII concentrates had inhibitors. No significant difference in inhibitor development was found between the patients who used the most common products such as Koate HP or Nordiate and those who did not ($p>0.05$). The patients who had no inhibitors were exposed to F VIII median 24 days before, while those who had inhibitors were exposed to F VIII median 8 days before, and the difference was significant ($p<0.05$). Inhibitors were persistent in patients who had had longer bleeding episodes.

Logistic regression analysis showed that patient's age ($p=0.05$), number of bleeding episodes within the last year ($p=0.01$), frequency ($p=0.02$), and number of days of F VIII administration ($p=0.02$) significantly affect inhibitor development, but the duration of F VIII treatment does not affect ($p>0.05$) inhibitor development.

KAYNAKLAR

1. Kreuz W, Becker S, Lenz E, et al. Factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A: Epidemiology of inhibitor development and induction of immune tolerance for factor VIII. *Semin Thromb Hemostas* 1995; 21: 382-389.
2. Aledort L. Inhibitors in hemophilia patients: Current status and management. *Am J Hematol* 1994; 47: 208-217.
3. Kasper C. Diagnosis and measurement of factor VIII inhibitors. In: "Acquired Hemophilia" Continuing Medical Education Monograph, Porton Products, England, 1995, 1-5.
4. Gilles JGG, Jacquemin MG, Saint-Remy JMR. Factor VIII inhibitors. *Thromb Haemostas* 1997; 78: 641-646.
5. Hoyer LW, Scandella D. Factor VIII inhibitors: Structure and function in autoantibody and hemophilia A patients. *Semin Hematol* 1994; 31 supp 4, 1-5.
6. Di Michele D. Hemophilia 1996: New approach to an old disease. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43: 709-736.
7. Gitschier J, Kagan S, Diamond C, Levinson B. Genetic basis of hemophilia A. *Thromb Haemost* 1991; 66: 37-39.
8. Çağlar MK. Hemofili. *Katkı* 1982; 11: 1217-1227.
9. Bell B, Canty D, Audet M. Hemophilia: An updated review. *Pediatrics Review* 1995; 16:290-298.
10. Corrigan JJ. Hemorrhagic and thrombotic diseases. In: *Nelson Textbook of Pediatrics*, 15 th Edition. Nelson WE, Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM (eds). WB Saunders Co, Philadelphia, 1996, 1424-1427.
11. Bithell TC. Hereditary coagulation disorders. In: *Winthrobe's Clinical Hematology*. Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN (eds). Lea and Febiger Co, Philadelphia, 1993, 1422-1473.
12. Özbek N. Hemofili A ve Hemofili B. *Katkı* 1995; 6: 842-849.
13. Nilsson IM. Hemophilia. Pharmacia Plasma Products, Sweden, 1994.
14. Roberts HR, Hoffman M. Hemophilia and related conditions- inherited deficiencies of prothrombin, factor V, and factors VII to XII. In: *Williams Hematology*, Fifth Edition. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ (eds). McGraw-Hill Co, New York, 1995, 1413-1439.

- 15.Özkınay F.Hemofili A ve B için genetik danışma ve prenatal tanı. Hemofilik Çocuk ve Sorunları 1. Nişli G (ed). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1995, 67-75.
- 16.Lusher JM, Warrier I. Hemophilia A. Hematol Oncol Clin North Am 1992; 6: 1021-1033.
- 17.Vergin C. Hemofilide klinik bulgular. Hemofilik Çocuk ve Sorunları 1. Nişli G (ed). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1995, 5-14.
- 18.Montgomery RR, Scott JP. Hemostasis: Diseases of the fluid phase. In: Hematology of Infancy and Childhood ,Fourth Edition. Nathan DG, Oski FA (eds). WB Saunders Co, Philadelphia, 1993, 1613-1620.
- 19.Ljung R, Kling S, Sjörin E, Nilsson IM. More than half the sporadic cases of hemophilia A in Sweden are due to a recent mutation. Acta Paediatr Scand 1991; 80: 843-348.
- 20.Kazazian HH, Tuddenham EG, Antonarakis SE. Hemophilia A and parahemophilia: Deficiencies of coagulation factors VIII and V. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Seventh Edition. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). Mc Graw-Hill Inc, New York , 1995, 3241-3267.
- 21.Brocker VAH, Bakker E, Kanhai HH. et al. The contribution of DNA analysis to carrier detection and prenatal diagnosis of hemophilia A and B. Ann Hematol 1992; 64: 2-10
- 22.Lillicrap DP, White BN, Holden JA, et al. Carrier detection in the hemophilias. Am J Hematol 1987; 26: 285-296.
- 23.Pecorara M, Casarino L, Mori PG, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis by DNA analysis. Blood 1997; 70: 531-535.
- 24.Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al.Characterization of the human factor VIII gene. Nature 1984; 312: 326.
- 25.Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. Nature 1984; 312: 242-244.
- 26.Vehar GA, Keyt B, Eaton D, et al. Structure of human factor VIII. Nature 1984; 312: 337-340.
- 27.Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing and secretion of recombinant human factor VIII. Nature 1984; 312: 337-339.

28. Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM. Human factor VIIIa subunit structure: Reconstitution of factor VIIIa from the isolated A₁/A₃-C₁-C₂ dimer and A₂ subunit. *J Biol Chem* 1991; 266: 8957-8961.
29. Pittman DD, Millenson M, Marquette K, et al. The A2 domain of human recombinant derived factor VIII is required for procoagulant activity but not for thrombin cleavage. *Blood*. In press (1997).
30. Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 1986; 25: 505-508.
31. Fay PJ, Walker FJ. Inactivation of human factor VIII by inactivated protein C. Evidence that the factor VIII light chain contains the activated protein C binding site. *Biochim Biophys Acta* 1989; 994: 142-145.
32. Furie B, Furie BC. Molecular basis of hemophilia. *Semin Hematol* 1990; 27: 270-285.
33. Higuchi M, Kochhan L, Schwaab R, et al. Molecular defects in hemophilia A. Identification and characterization of mutation in the factor VIII gene and family analysis. *Blood* 1989; 74: 1045-1051.
34. Youssoufian H, Antonarakis SE, Aronis S, Triftis G, Phillips DG, Kazazian HH. Characterization of five partial deletions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, 84: 3772-3777.
35. Çağlayan SH. Türkiye'de hemofili A ve B hastalığının moleküler patolojisi. *Hemofilik Çocuk ve Sorunları* 1. Nişli G (ed). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1995, 59-65.
36. Gitschier J. The molecular basis of hemophilia A. *Am NY Acad Sci* 1991; 614: 89-96.
37. Tuddenham EGD, Cooper DN, Gitschier J, et al. Hemophilia A: Database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4821-4827.
38. Higuchi M, Wong C, Kochhan L, et al. Characterization of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA. *Genomics* 1990; 65: 6-9.
39. Higuchi M, Kazazian HH, Kasch L, et al. Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding region

- and splice junctions of the factor VIII gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7405-7409.
40. O'Brien D, Pattinson JK, Tuddenham EGD. Purification and characterization of factor VIII 372-cys: A hypofunctional cofactor from a patient with moderately severe hemophilia A. *Blood* 1990; 75: 1664-1669.
41. Arai M, Higuchi M, Antonarakis SE, et al. Characterization of a thrombin cleavage site mutation (arg 1689 to cys) in the factor VIII gene of two unrelated patients with cross-reacting material positive hemophilia A. *Blood* 1990; 75: 384-387.
42. Aly AM, Higuchi M, Kasper CK, et al. Hemophilia A due to mutations that create new N-glycosylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4933-4935.
43. McGinniss MJ, Kazazian HH Jr, Hojer LW, et al. Spectrum of mutations in CRM positive and CRM reduced hemophilia A. *Genomics* 1993; 15: 392-395.
44. Naylor JA, Green PM, Rizza CR, Ginnelli F. Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in every one of 28 hemophilia A. *Hum Mol Genet* 1993; 2:11-13.
45. Lakich D, Kazazian HH, Antonavakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are common cause of severe hemophilia A. *Nature Genet* 1993; 5: 236-241.
46. Weinmann AF, Schoof JM, Thompson AR. Clinical correlates among 49 families with hemophilia A and factor VIII gene inversions. *Am J Hematol* 1996; 51: 192-199.
47. Naylor JA, Nicholson P, Goodeve A, et al. A novel DNA inversion causing severe hemophilia. *Blood* 1996; 87: 3255-3261.
48. Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: Results of a International Consortium Study. *Blood* 1995; 86: 2206-2212.
49. Kazazian HH Jr, Wong C, Youssoufian HG, et al. A novel mechanism of mutation in man: Hemophilia A due to de novo insertion of L1 sequences. *Nature* 1988; 332: 164-167.
50. İrken G. Hemofilide tedavi. Hemofilik Çocuk ve Sorunları 1. Nişli G (ed). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1995, 19-34.
51. Lane S. Haemorrhagic diathesis. Successful transfusion of blood. *Lancet* 1840; i: 185-188.
52. Schramm W. Towards the best use of safe clotting factor concentrates: Options and limits. *Hamostaseologie* 1996; 16: 269-273.

53. United Kingdom Haemophilia Centre Directors Organisation Executive Committee. Guidelines on therapeutic products to treat haemophilia and other hereditary coagulation disorders. *Haemophilia* 1997; 3: 63-77.
54. Manco-Johnson M, Nuss R, Geraghty S, Funh S. A prophylactic program in the United States: Experience and issues. *Semin Hematol* 1994; 31:10-12.
55. Szucs TD, Schramm W. The economics of replacement therapy. *Hemostaseologie* 1996; 16: 291-295.
56. Yaprak I. Hemofili tedavi komplikasyonları. *Hemofilik Çocuk ve Sorunları 1*. Nişli G (ed). Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1995, 51-58.
57. Kessler CM, Hoyer L, Feinstein DI. The hemophilias. *American Society of Hematology Congress Book*, Orlando, 1996, 95-105.
58. McMillan CW, Shapiro SS, Whitehurst D, et al. The natural history of F VIII:C inhibitors in patients with hemophilia A: A National Cooperative Study II. Observations on the initial development of factor VIII:C inhibitors. *Blood* 1988; 71:344-348.
59. Rizza CR, Matthews JM. Effect of frequent factor VIII replacement on the level of factor VIII antibodies in haemophiliacs. *Br J Haematol* 1982; 52: 13-24.
60. Battle J, Fomez E, Rendal E, et al. Antibodies to factor VIII in plasma of patients with hemophilia A and normal subjects. *Ann Hematol* 1996; 72: 321-326.
61. Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in hemophiliacs. *Lancet* 1992; 339: 594-598.
62. Allain JP, Frommel D. Antibodies to factor VIII. Patterns of immune response to factor VIII in hemophilia A. *Blood* 1976; 47: 973-982.
63. Kasper CK. Treatment of factor VIII inhibitors. *Prog Hemost Thromb* 1989; 9: 57-86
64. Lucher JM, Arkin S, Abilgaard CF, Schwartz RS. Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. *New Engl J Med* 1993; 328: 453-459.
65. Lusher J, Warrier I. Incidence of inhibitor development in infants and children with hemophilia A. *Clin Res* 1993; 41: 275 A.
66. Feinstein DI. Inhibitors in hemophilia. In: *Hematology: Basic Principles and Practice*, Second Edition. Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE (eds). Churchill Livingstone Inc, New York, 1995, 1686-1691.

67. Frommel D, Allain JP. Genetic predisposition to develop factor VIII antibody in classic hemophilia. *Clin Immunol Immunopathol* 1977; 8: 34-39.
68. Frommel D, Allain JP, Saint-Paul E, et al. HLA antigens and factor VIII antibody in classic hemophilia. *Thromb Haemostas* 1981; 46: 687-689.
69. Lippert LE, Fisher L, Schook LB. Relationship of major histocompatibility complex class II genes to inhibitor antibody formation in hemophilia A. *Thromb Haemostas* 1990; 64: 564-568.
70. Hay CRM, Ollier W, Pepper L, et al. HLA class II profile: A weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. *Thromb Haemostas* 1997; 77: 234-237.
71. Aly AM, Aledort LM, Lee TD, Hoyer LW. Histocompatibility antigen patterns in haemophilic patients with factor VIII antibodies. *Br J Haematol* 1990; 76: 238-241.
72. Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, et al. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemostas* 1997; 77: 238-242.
73. Antonarakis WE, Waber PG, Kittur SD, et al. Hemophilia A: Detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N Engl J Med* 1985; 313: 842-845.
74. Gitschier J, Wood WI, Tuddenham EGD, et al. Detection and sequence of mutations in the factor VIII gene of hemophiliacs. *Nature* 1983; 315: 427-431.
75. Tuddenham EGD, Schwaab R, Seehafer J, et al. Hemophilia A: Database of nucleotide substitutions, deletions, insertions, and rearrangements of the factor VIII gene, second edition. *Nucl Acids Res* 1994; 22: 3511-3533.
76. Vnencak-Jones CL, Phillips III JA, Janco RL, et al. Analysis of factor VIII gene inversion mutations in 166 unrelated haemophilia A families: Frequency and utility in genetic counselling. *Haemophilia* 1996; 2: 18-23.
77. Shapino SS, Huttin M. Acquired inhibitors to the blood coagulation factors. *Semin Thromb Hemost* 1975; 1: 336-338.
78. Ewing N, Sanders NL, Dietrich S, Kasper CK. Induction of immune tolerance to factor VIII in hemophiliacs with inhibitors. *JAMA* 1988; 259: 65-67.
79. Gilles JG, Saint-Remy JMR. Strategy for pre-clinical evaluation of factor VIII concentrates. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1995; 6 Supp 2: 558-561.
80. Brettler DB. Inhibitors of factor VIII and IX. *Haemophilia* 1995; 1 Supp 1; 35-39.

81. Addiego J, Kasper C, Abildgaard C, et al. Frequency of inhibitor development in haemophiliacs treated with low-purity factor VIII. *Lancet* 342; 1993: 462-464.
82. Schwarz HP. Zero incidence of inhibitors in previously untreated patients who received intermediate purity factor VIII concentrate or factor IX complex. *Thromb Haemostas* 1995; 73: 546-556.
83. Briet E, Rosendaal FR. Inhibitors in hemophilia A: Are some products safer? *Semin Hematol* 1994; 2 Supp 4, 11-15.
84. Peerlinck K, Arnour J, Gilles JG, et al. A higher than expected incidence of factor VIII inhibitors in multitransfused hemophilia A patients treated with intermediate purity pasteurized factor VIII concentrate. *Thromb Haemostas* 1993; 69: 115-119.
85. Schwarzinger I, Pabinger I, Korninger C, et al. Incidence of inhibitors in patients with severe and moderate hemophilia A treated with factor VIII concentrates. *Am J Hematol* 1987; 24: 241-245.
86. Fulcher C, De Graaf Mahoney S, Zimmerman T. Factor VIII inhibitor IgG subclass and F VIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood* 1987; 69: 1475-1480.
87. Gilles JG, Arnout J, Vermynen J, Saint-Remy JMR. Antifactor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood* 1993; 82: 2452-2461.
88. Fulcher C, De Graaf Mahoney S, Roberts J, Kasper C, Zimmerman T. Localisation of human factor VIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 7728-7732.
89. Scandella D, De Graaf Mahoney S, Mattinngly M, et al. Epitope mapping of human factor VIII inhibitor antibodies by deletion analysis of F VIII fragments expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6152-6157.
90. Gawryl M, Hoyer L. Inactivation of factor VIII coagulant activity by two different types of human antibodies. *Blood* 1982; 60: 1103-1108.
91. Ewenstein BM. Factor VIII and other coagulation factor inhibitors. In: *Thrombosis and Hemorrhage*. Loscalzo J, Schafer AI (eds). Blackwell Scientific Publications, Boston, 1994, 729-747.
92. Hultin M, Nemerson Y. Activation of factor X by factor IXa and VIII: A specific assay for factor IXa in the presence of thrombin activated factor VIII. *Blood* 1978; 52: 928-934.

93. Van Dieijen G, Tans G, Rosing J, et al. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem* 1981; 256: 3433-3436.
94. Shima M, Nakai H, Scandella D, et al. Common inhibitory effects of human anti-C₂ domain inhibitor alloantibodies on factor VIII binding to von Willebrand factor. *Br J Haematol* 1995; 91: 714-721.
95. Saenko E, Shima M, Gilbert G, et al. Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition. *J Biol Chem* 1996; 271: 27424-27431.
96. Algiman M, Dietrich G, Nydegger U, et al. Natural antibodies to factor VIII (antihemophilic factor) in healthy individuals. *Proc Natl Sci USA* 1992; 89: 3795-3799.
97. Nilsson I, Berntorp E, Zettervall O, et al. Noncoagulation inhibitory factor VIII antibodies after induction of tolerance to factor VIII in hemophilia A patients. *Blood* 1950; 75: 378-383.
98. Kesler C. An introduction to factor VIII inhibitors: The detection and quantitation. *Am J Med* 1991; 91 Supp 5A, 15-19.
99. Biggs R, Bidwell E. A method for the study of antihemophilic globulin inhibitors with reference to six cases. *Br J Haematol* 1959; 5: 379-385.
100. Rizza CR, Biggs R. The treatment of patients who have factor VIII antibodies. *Br J Haematol* 1974; 24: 65-82.
101. Kasper CK, Aledort LM, Counts RB, et al. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thrombos Diathes Haemorrh* 1975; 34: 869-871.
102. Laffan MA, Bradshaw AE. Investigation of a bleeding tendency. In: *Practical Haematology*, Eighth Edition. Dacie JV, Lewis SM (eds). ELBS-Churchill Livingstone Co, London, 1994; 340-341.
103. Littlewood JD, Beavan SA, Kembell-Cook G, et al. Variable inactivation of human factor VIII from different sources factor VIII for surgical procedures in hemophilia A patients with inhibitors. *Semin Hematol* 1993; 30 Supp 1: 10-12.
104. Lazier JN, Santagastino E, Kasper CK, et al. Use of porcine factor VIII for surgical procedures in hemophilia A patients with inhibitors. *Semin Hematol* 1993; 30 Supp 1: 10-12.
105. White GC. Factor VIII inhibitor assay: Quantitative and qualitative assay limitations and development needs. *Semin Hematol* 1994; 31 Supp 4: 6-10.

- 106.Zetterval O, Nilsson IM: Acquired von Willebrand's disease caused by a monoclonal antibody. *Acta Med Scand* 1978; 204: 251-528.
- 107.Scandella D, Timmons L, Mattingly M, et al. A soluble recombinant factor VIII fragment containing the A₂ domain binds to some human anti-factor VIII antibodies that are not detected by immunoblotting. *Thromb Haemost* 1992; 65: 665-671.
- 108.Mondorf W, Last J, Ehrenforth S, et al. Screening and monitoring of F VIII:C antibodies by an ELISA and the Bethesda method. *Thromb Haemost* 1993; 69: 847A.
- 109.Kessler CM. Factor VIII inhibitors-an algorithmic approach to treatment. *Semin Hematol* 1994; 31 supp 4: 33-36.
- 110.Nilsson IM. Immune tolerance. *Semin Hematol* 1994; 31 Supp 4: 44-48.
- 111.Sultan Y, Kazatchkine MD, Algiman M, et al. The use of intravenous immunoglobulins in the treatment of factor VIII inhibitors. *Semin Hematol* 1994; 31 Supp 4: 65-66.
- 112.van Leeuwen EF, Mauser-Bunschoten EP, van Dijken PJ, et al. Disappearance of factor VIII:C antibodies in patients with hemophilia A upon frequent administration of factor VIII in intermediate or low dose. *Br J Haematol* 1986; 64:291-297.
- 113.Brackmann HH. 16 years experience with the immuno-tolerance induction in hemophilia patients at the Bonn Hemophilia Center. XX International Congress of the World Federation of Hemophilia, Athens, Greece, 1992 (abstr 12).
- 114.Scheibel E, Ingerslev J, Dalsgaard-Nielsen J, et al. Continuous high-dose factor VIII for the induction of immune tolerance in hemophilia A patients with high responder state. *Thromb Haemost* 1987; 58: 1049-1052.
- 115.Rivard GE, Vick S. Economics of inhibitor treatment in Canada. *Semin Hematol* 1994; 31 Supp 4: 41-43.
- 116.Hedner V, Glazer S. Management of hemophilia patients with inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am* 1992; 90: 1035-1046.
- 117.Hoyer LW. Annotation: Why do so many haemophilia A patients develop an inhibitor? *Br J Haematol* 1995; 90: 498-501.
- 118.Bray GL, Gomperts ED, Courter S, et al. A multi-center study of recombinant factor VIII (Recombinate): Safety, efficacy and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. *Blood* 1994; 83: 2428-2435.

119. Gürsel T, Öztürk G, Koçak Ü. Prevalance of inhibitors in children with hemophilia. Turk J Hematol 1997; 14: p 15.
120. Colvin BT, Hay CRM, Hill FGT, Preston FE. The incidence of factor VIII inhibitors in the United Kingdom, 1990-93. Br J Haematol 1995; 89: 908-910.
121. Peerlinck K, Rosendaal FR, Vermynen J. Incidence of inhibitor development in a group of young hemophilia A patients treated exclusively with lyophilized cryoprecipitate. Blood 1993; 81: 3332-3335.
122. Kavaklı K, Gringeri A, Bader R, et al. Inhibitor development and substitution therapy in Turkish Children with hemophilia. Turk J Hematol 1997; 14: p16.
123. Guerois C, Laurian Y, Rothschild C, et al. Incidence of factor VIII inhibitor development in severe hemophilia A patients treated only with one brand of highly purified plasma-derived concentrate. Thromb Haemos 1995; 73: 215-218.
124. Lusher JM, Salzman PM, Monoclate Study Group. Viral safety and inhibitor development associated with factor VIII C ultra-purified from plasma in hemophiliacs previously unexposed to factor VIII C concentrates. Semin Hematol 1990; 27: 1-7.
125. Scharrer I, Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophiliacs. A review of the literature. Blood Coag Fibrinolysis 1993; 4: 753-758.
126. Schwaab R, Brackmann HH, Meyer C, et al. Haemophilia A: Mutation type determines risk of inhibitor formation. Thromb Haemostas 1995; 74: 1402-1406.
127. Weinmann AF, Schoof JM, Thompson AR. Clinical correlates among 49 families with hemophilia A and factor VIII gene inversions. Am J Hematol 1996, 51: 192-199.
128. Goodeve AC, Preston FE, Peake IR. Factor VIII gene rearrangements in patients with severe hemophilia A. Lancet 1994; 343: 329-330.
129. Ljung RCR. Intron 22 inversion and hemophilia. Lancet 1994; 343: 791.