**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# EX VİVO GEN TERAPİSİYLE HİPOPARATİROİDİZM TEDAVİSİ MODELİ OLUŞTURMA

**DOKTORA TEZİ**

**Öykü ZEYBEK**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Doktora Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahri AKBAŞ**

**ŞUBAT 2022**

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# EX VİVO GEN TERAPİSİYLE HİPOPARATİROİDİZM TEDAVİSİ MODELİ OLUŞTURMA

**DOKTORA TEZİ**

**Öykü ZEYBEK**
**140305113**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Doktora Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fahri Akbaş**

**ŞUBAT 2022**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 140305113 numaralı Doktora Öğrencisi Öykü ZEYBEK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "Ex Vivo Gen Terapisiyle Hipoparatiroidizm Tedavisi Modeli Oluşturma" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

| | | |
|---|---|---|
| **Tez Danışmanı :** | **Prof. Dr. Fahri AKBAŞ**<br>Bezmialem Vakıf Üniversitesi | ..... |
| **Jüri Üyeleri :** | **Prof. Dr. Neslihan ABACI**<br>İstanbul Üniversitesi - DETAE | ..... |
| | **Prof. Dr. İlhan ONARAN**<br>İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa | ..... |
| | **Prof. Dr. İsmail MERAL**<br>Bezmialem Üniversitesi | ..... |
| | **Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ**<br>Bezmialem Üniversitesi | ..... |

**Teslim Tarihi : 01 Mart 2022**
**Savunma Tarihi : 01 Şubat 2022**

***Varoluşun sebebini sorgulayan tüm insanlara,***

## ÖNSÖZ

Doktora programının başlangıcından itibaren çalışmamı yönlendiren; bilgi, tecrübe, emek ve yardımlarıyla daima yanımda olan, en zor zamanlarımda bana moral veren kıymetli hocam Prof. Dr. Fahri AKBAŞ'a,

Bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, sevgili hocam Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ'ye,

Tez savunma sınavıma katılarak bana emek ve vakit ayıran hocalarım Prof. Dr. Neslihan ABACI, Prof. Dr. İlhan ONARAN ve Prof. Dr. Binnur TEMEL'e,

Deney hayvanlarıyla çalışırken yardımlarını esirgemeyen Nurhayat POLAT ve Önder HÜSEYİNBAŞ'a,

Biyokimyal analiz süreçlerinde emeği geçen biyokimya ekibinden Muammer DARCIN, Ayça BACAK, Ayşe KARADAĞ, Sevgi KIRMIZI, Tağı POLAT ve sevgili hocam Ömer Faruk ÖZER'e,

Bezmialem Üniversitesi'nde geçirdiğim zaman boyunca desteklerini hissettiğim sevgili arkadaşlarım Seda SÜSGÜN, Ayşegül YABACI ve Aysu KILIÇ'a,

Her daim yanımda olup sevgileriyle beni destekleyen dostlarım Rıdvan KAPLAN, Cuma KÖYGÜLÜ, Canan EVECEN, Esma ZEKİROĞLU, Pınar KASAPOĞLU, Şeyma CEYLAN ve Murat KOŞER'e,

Hayatımın her döneminde koşulsuz sevgi ve şefkatiyle her daim yanımda olan annem Kıymet ZEYBEK'e tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 9.2017/23 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Şubat 2022 Öykü Zeybek

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Öykü ZEYBEK

**İÇİNDEKİLER**

**Sayfa**

**ÖNSÖZ** ..... **iv**
**BEYAN** ..... **v**
**İÇİNDEKİLER** ..... **vi**
**KISALTMALAR** ..... **x**
**SEMBOLLER** ..... **xiii**
**TABLO LİSTESİ** ..... **xiv**
**ŞEKİL LİSTESİ** ..... **xv**
**ÖZET** ..... **xvi**
**SUMMARY** ..... **xviii**
**1. GİRİŞ VE AMAÇ** ..... **1**
**2. GENEL BİLGİLER** ..... **6**
2.1 Paratiroid Bezleri ile İlgili Genel Bilgiler ..... 6
2.1.1 Paratiroid bezleri ile ilgili kısa tarihçe ..... 6
2.1.2 Paratiroid bezlerinin anatomisi ..... 7
2.1.3 Paratiroid bezlerinin embriyolojisi ..... 9
2.1.4 Paratiroid bezlerinin histolojisi ..... 10
2.1.5 Paratiroid bezlerinin genel fizyolojisi ..... 12
2.2 PTH ile İlgili Bilgiler ..... 13
2.2.1 PTH yapısı ve biyosentezi ..... 13
2.2.2 PTH salınımı ve salınımın kontrolü ..... 15
2.2.3 PTH fizyolojisi ve organlar üzerine etkileri ..... 18
2.2.3.1 Kemik dokusu üzerine etkileri ..... 18
2.2.3.2 Böbrekler üzerine etkileri ..... 21
2.2.3.3 Bağırsaklar üzerine etkileri ..... 22
2.2.3.4 Diğer etkileri ..... 22
2.2.4 PTH ve Ca Homeostazı ..... 22
2.2.5 PTH metabolizması ve eliminasyonu ..... 24
2.3 Hipoparatiroidizm ..... 25
2.3.1 Tanım ve etyopatogenez ..... 25
2.3.2 Hipoparatiroidizmin tanısı, klinik bulguları ve semptomları ..... 26
2.3.3 Günümüz tedavileri ve yan etkileri ..... 28
2.4 Gen Terapisi ..... 33
2.4.1 Gen terapisine genel bakış ..... 33
2.4.2 Gen terapisinin sınıflandırılması ..... 34
2.4.3 Viral vektörler ve türleri ..... 37
2.4.3.1 Adenoviral vektörler (AV vektörler) ..... 38
2.4.3.2 Adeno-asosiye virüs vektörleri (AAV vektörleri) ..... 40

2.4.3.3 Herpes simpleks virüs vektörleri (HSV vektörleri) ..... 41
2.4.3.4 Retroviral vektörler (RV vektörler) ..... 42
2.4.3.5 Lentiviral vektörler (LV vektörler) ..... 44
2.4.3.6 Lentiviral vektörlerin gelişim aşamaları ..... 47
2.4.4 Gen tedavisinin kısa tarihçesi ve günümüzdeki kullanımı ..... 50
**3. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 55**
3.1 Gereç ..... 55
3.1.1 Cihazlar ..... 55
3.1.2 Kimyasallar / İlaçlar ..... 57
3.1.3 Kitler / Enzimler ..... 59
3.1.4 Besiyerleri ..... 60
3.1.4.1 Doku besiyeri ..... 60
3.1.4.2 Hazırlık besiyeri ..... 60
3.1.4.3 Enzimatik parçalama besiyeri ..... 60
3.1.4.4 Primer kültür besiyeri ..... 61
3.1.4.5 LentiX besiyeri ..... 61
3.1.4.6 Kriyoprezervasyon besiyeri ..... 61
3.1.4.7 Transdüksiyon besiyeri ..... 62
3.1.4.8 Dekontaminasyon besiyeri ..... 62
3.1.4.9 Luria bertani sıvı besiyeri (LB broth) ..... 62
3.1.4.10 Luria bertani katı besiyeri (LB agar) ..... 63
3.1.5 Solüsyon ve Tamponlar ..... 63
3.1.5.1 TAE Tamponu ..... 63
3.1.5.2 Agaroz Jel ..... 64
3.1.6 Ökaryot hücreler ve mikroorganizmalar ..... 65
3.1.6.1 Ökaryot hücreler ..... 65
3.1.6.2 Mikroorganizmalar ..... 65
3.1.7 Plazmidler ..... 65
3.1.7.1 Transfer plazmidi: “pLenti-CMV-GFP-2A-Puro” (PLPT) ..... 66
3.1.7.2 Paketleme plazmidi: psPAX2 ..... 66
3.1.7.3 Zarf proteinlerini kodlayan plazmid: pMD.G ..... 66
3.1.8 Sarf Malzemeleri ..... 67
3.1.9 Deney hayvanları ..... 68
3.2 Yöntem ..... 69
3.2.1 Giriş: Tez yöntemin genel özeti ..... 69
3.2.1.1 Ex-vivo gen terapisi için otolog primer hücre kültürünün oluşturulması ..... 69
3.2.1.2 İnsan paratiroid dokusundan hPTH geninin eldesi, klonlanması ve purifikasyonu ..... 70
3.2.1.3 hPTH geninin transfer plazmidine entegrasyonu ..... 70
3.2.1.4 Lentiviral vektör üretiminde kullanılan plazmidlerin çoğaltımı ve purifikasyonu ..... 70
3.2.1.5 Lentiviral vektörlerin üretimi ..... 71
3.2.1.6 Otolog primer hücrelerin transdüksiyonu ..... 71
3.2.1.7 Terapötik geni taşıyan otolog primer hücrelerin sıçana geri enjeksiyonu ..... 71
3.2.2 Otolog Primer Hücre Kültürünün Oluşturulması ve Hücrelerin Çoğaltılması ..... 71
3.2.2.1 Doku numunesinin alınması ..... 71
3.2.2.2 Doku numunesinin dezenfeksiyonu ve hazırlanması ..... 72

3.2.2.3 Doku numunesinin mekanik ve enzimatik parçalanması ..... 73
3.2.2.4 Parçalanmış dokudan primer doku kültürü oluşturulması ..... 73
3.2.2.5 Kültürün tüm doku parçalarından arındırılması ve pasajlanması ..... 75
3.2.2.6 Olası bir kontaminasyon durumunda hücre kültürünün kurtarılması 77
3.2.3 hPTH geninin izolasyonu, PCR ile çoğaltılması ve saflaştırılması ..... 78
3.2.4 hPTH terapötik geninin PLPT transfer plazmidine entegrasyonu ..... 79
3.2.4.1 PLPT ve pEGFP-N1-hPTH plazmidlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi ..... 79
3.2.4.2 hPTH gen bölgesinin jelden ekstraksiyonu ve purifikasyonu ..... 79
3.2.4.3 PLPT plazmidinin purifikasyonu ..... 80
3.2.4.4 Transfer plazmidi (PLPT) ve terapötik gen bölgesinin (hPTH) ligasyonu ve rekombinant transfer plazmidi (PLPT+hPTH) eldesi ..... 81
3.2.4.5 E. coli hücrelerinin rekombinant transfer plazmidi ile (PLPT+hPTH) transforme edilmesi ..... 82
3.2.4.6 Ligasyon ve transformasyonun doğrulanması ..... 84
3.2.5 Lentiviral vektör üretiminde kullanılan plazmidlerin stoklanması, çoğaltımı, izolasyon ve purifikasyonu ..... 85
3.2.5.1 Transforme bakterilerin çoğaltılması ..... 86
3.2.5.2 Plazmid izolasyonu ve purifikasyonu ..... 86
3.2.5.3 Plazmid konsantrasyonlarının ve saflığının spektrofotometrik analizi ..... 88
3.2.5.4 Plazmidlerin restriksiyon kesimi ile doğrulanması ve genomik saflık analizi ..... 89
3.2.6 Lentiviral vektörlerin üretimi ..... 91
3.2.6.1 Transfeksiyon için kullanılacak yöntem ve hücre hattının seçimi ..... 91
3.2.6.2 LentiX hücre hattının temini ve çoğaltılarak stoklanması ..... 93
3.2.6.3 Transfeksiyon öncesi LentiX hücre hattının ve kültür plağının hazırlanması ..... 94
3.2.6.4 Transfeksiyon ve lentiviral vektörlerin eldesi ..... 94
3.2.6.5 Lentiviral vektörlerin etkinliğinin ve transdüksiyon konsantrasyonunun tesbiti ..... 97
3.2.7 Primer hücrelerin transdüksiyonu ve transdükte hücrelerin çoğaltılması . 99
3.2.8 Transdükte otolog hücrelerin sıçana geri enjeksiyonu, enjekte edilen hücre sayısının tespiti ve biyokimyasal testler ..... 102
3.2.8.1 Transdükte otolog hücrelerin sıçana geri enjeksiyonu ..... 102
3.2.8.2 Enjekte edilen canlı hücre sayısının tespiti ..... 103
3.2.8.3 Biyokimyasal testlerle sıçan vücudundaki hPTH'ın tespiti ..... 104
**4. BULGULAR ..... 105**
4.1 Sıçandan Deri Numunesinin Alınması ..... 105
4.2 Otolog Primer Hücrelerin Çoğaltılması ..... 106
4.3 Transfeksiyon Plazmidlerininin Kimyasal Saflığının Değerlendirilmesi ve Konsantrasyonlarının Ölçümü ..... 108
4.4 Transfeksiyon Plazmidlerinin Doğrulanması ve Genomik Saflığının Değerlendirilmesi ..... 109
4.5 LentiX Hücre Hattının Transfeksiyon Bulguları ..... 110
4.6 Lentiviral Vektörlerin Etkinliğinin ve Otolog Primer Hücrelere Uygulanacak Transdüksiyon Konsantrasyonunun Tesbiti ..... 112
4.7 Transdüksiyon Bulguları ..... 114
4.8 Enjeksiyon Öncesi Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi ve Hücre Sayımı ..... 117
4.9 Biyokimyasal Analizler ..... 118

**5. TARTIŞMA ..... 120**
**6. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 137**
**KAYNAKLAR ..... 140**
**EKLER ..... 153**
**ÖZGEÇMİŞ ..... 154**

## KISALTMALAR

| | |
|---|---|
| a.a | : Amino asit |
| AAV vektörleri | : Adeno asosiye virüs vektörleri |
| AAV | : Adeno asosiye virüs |
| ADA | : Adenozin deaminaz eksikliği |
| Atm | : Atmosferik basınç |
| AV vektörler | : Adenoviral vektörler |
| bkz | : Bakınız |
| bp | : Baz çifti |
| CALD | : Serebral adrenolökodistrofi |
| cAMP | : Adenilil siklaz |
| CAR-T hücresi | : Kimerik antijen reseptör T hücresi |
| CaSR | : Kalsiyuma duyarlı reseptörler |
| CMV promotor | : Sitomegalovirüs promotor bölgesi |
| cPPT | : Santral polipurine bölgesi dizileri |
| C-PTHR | : C-PTH reseptörleri |
| CTS | : Santral terminasyon dizisi |
| DAG | : Diaçil gliserol |
| ddH2O | : Çifte distile H2O |
| dk | : Dakika |
| DMEM-F12 | : Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyeri / F-12 Ham besiyeri karışımı |
| DMSO | : Dimetil sulfoksit |
| d-PBS | : Dulbecco'nun fosfat tamponlu izotonik çözeltisi |
| E. coli | : Escherichia coli |
| EcoRI | : Bir çeşit restriksiyon enzimi |
| EDTA | : Etilendiamin tetraasetik asit |
| EMA | : Avrupa ilaç dairesi |
| ER | : Endoplasmik retikulum |
| EtBr | : Etidyum bromür |
| EtOH | : Etanol |
| EU | : Avrupa birliği |
| FBS | : Fötal sığır serumu |
| FDA | : Birleşik devletler gıda ve ilaç dairesi |
| GARD | : Genetik ve nadir hastalıklar bilgilendirme merkezi |
| GFP | : Yeşil floresan protein |
| GİS | : Gastrointestinal sistem |
| GMP | : İyi üretim uygulamaları (good manufacturing process) |
| HEK 293T | : İnsan embriyonik böbrek 293T hücre hattı |
| HIV-1 | : Tip-1 insan immünyetmezlik virüsü |
| Hipo-PT | : Hipoparatiroidizm |
| hPTH | : İnsan parathormonu |

| | |
|---|---|
| HSV vektörleri | : Herpes simpleks virüs vektörleri |
| HSV vektörleri | : Herpes simpleks virüs vektörleri |
| HSV | : Herpes simplex virüsü |
| IP3 | : İnositol 1,4,5-trifosfat |
| i.m | : İntramüsküler |
| i.v | : İntravenöz |
| kb | : Kilo baz çifti |
| LB agar | : Luria bertani katı besiyeri |
| LB broth | : Luria bertani sıvı besiyeri |
| Liberase TL | : Düşük termolizin içerikli liberaz enzimi |
| LTR dizileri | : Uzun terminal tekrar dizileri (long terminal repeat) |
| LV vektörler | : Lentiviral vektörler |
| m.o | : Mikroorganizma |
| max | : Maksimum |
| min | : Mimimum |
| Mo-MLV | : Moloney murine leukemia virüs |
| MSS | : Merkezi sinir sistemi |
| NFAT | : Aktive T hücresinin nükleer faktörü |
| NF-κB | : Nukleer faktör kapa B |
| NIH | : Ulusal sağlık enstitüsü |
| OTC | : Ornitin transkarbamilaz |
| p53 | : Tümör protein 53 |
| pac | : Selektif amaçlı Puromisin direnç geni |
| PCR | : Polimeraz zincir reaksiyonu |
| pEGFP-N1 | : Bir tür memeli ekspresyon plazmidi |
| Pen-Strep | : Penisilin + Streptomisin |
| PLPT | : pLenti-CMV-GFP-2A-Puro plazmidi (lentiviral vektör üretiminde kullanılan boş transfer plazmidi) |
| PLPT+hPTH | : pLenti-CMV-GFP-2A-Puro + hPTH (terapötik hPTH genini taşıyan rekombinant transfer plazmidi) |
| pMD.G | : Lentiviral vektör üretiminde kullanılan VSVG zarf proteinlerini kodlayan plazmid |
| $PO_4^{3-}$ | : Fosfat |
| prepro PTH mRNA | : Pre pro parathormon mesajcı ribonukleik asidi |
| psPAX2 | : Lentiviral vektör üretiminde kullanılan paketleme plazmidi |
| PTB | : Paratiroid bezleri |
| PTH (1-34) | : Parathormonun N-terminal bölgesindeki ilk 34 a.a'lik dizisi |
| PTH 1-84 | : Parathormonun 84 a.a'lik dizisi (intakt PTH) |
| PTH | : Parathormon |
| PTH1R | : Tip 1 PTH/PTHrP reseptörleri |
| Rpm | : Dakikadaki devir sayısı |
| rPTH | : rekombinant PTH |
| RRE dizileri | : Rev responsive element dizileri |
| RV vektörler | : Retroviral vektörler |
| SCID | : Şiddetli kombine immun yetmezlik |
| SFDA | : Çin Hükümeti Gıda ve İlaç Dairesi |
| SIN vektörler | : Kendini inaktive eden vektörler |
| sn | : Saniye |

| | |
|---|---|
| Sp-1 | **:** Sp-1 transkripsiyon faktörü |
| TAE | **:** Tris + asetik asit + EDTA |
| trBac-PLPT+hPTH | **:** PLPT+hPTH ile transforme E. coli hücreleri |
| trBac-pMD.G | **:** pMD.G ile transforme E. coli hücreleri |
| trBac-psPAX2 | **:** psPAX2 ile transforme E. coli hücreleri |
| U.V | **:** Ultraviyole ışın |
| Vektör | **:** Gen taşıma aracı |
| VSV-G | **:** Vesiküler stomatitis virüs glikoproteinleri |
| WPRE | **:** Woodchuck hepatit B post-transkripsiyonel düzenleyici element |
| Xbal | **:** Bir çeşit restriksiyon enzimi |

**SEMBOLLER**

| | |
|---|---|
| µg | **:** Mikrogram |
| µl | **:** Mikrolitre |
| 1,25 $(OH)_2$ $D_3$ | **:** 1,25 dihidroksi kolekalsiferol |
| Ca | **:** Kalsiyum |
| $CO_2$ | **:** Karbondioksit |
| Da | **:** Dalton |
| dL | **:** Desilitre |
| g | **:** Gram |
| G | **:** Gravite (santrifüj için kullanılır) |
| $K^+$ | **:** Potasyum |
| mA | **:** Miliamper |
| mEq/L | **:** Miliekivalen / litre |
| mg | **:** Miligram |
| $Mg^{+2}$ | **:** Magnezyum |
| ml | **:** Mililitre |
| mM | **:** Milimol |
| $Na^+$ | **:** Sodyum |
| NaCl | **:** Sodyum klorür |
| ng | **:** Nanogram |
| nm | **:** Nanometre |
| $^oC$ | **:** Santigrat |
| P | **:** Fosfor |
| pg | **:** Pikogram |
| $PO_4^{-3}$ | **:** Fosfat |
| V | **:** Volt |

## TABLO LİSTESİ

**Sayfa**

**Tablo 2.1 :** Hipoparatiroidizmin başlıca sebepleri ..... 25
**Tablo 2.2 :** Hipokalseminin klinik bulguları ..... 27
**Tablo 2.3 :** 2021 yılına kadar onaylanarak piyasaya sürülmüş gen terapileri ..... 53
**Tablo 3.1 :** Tez deneylerinde kullanılan cihazlar / aletler ve kullanım amaçları ..... 55
**Tablo 3.2 :** Tez deneylerinde kullanılan kimyasallar / ilaçlar ve kullanım amaçları 57
**Tablo 3.3 :** Tez deneyleri ve ön çalışmalarda kullanılan ticari kitler / enzimler..... 59
**Tablo 3.4 :** Tez deneylerinde kullanılan sarf malzemeleri ve kullanım amaçları ..... 67
**Tablo 3.5 :** PLPT ve pEGFPN1-hPTH plazmidlerinin restriksiyon kesimi için kullanılan malzemeler ..... 79
**Tablo 3.6 :** PLPT plazmidi ve hPTH terapötik geninin ligasyonu için kullanılan malzemeler ..... 82
**Tablo 3.7 :** Koloni PCR için kullanılan malzemeler ve miktarları..... 84
**Tablo 3.8 :** Koloni PCR döngü ve süreleri ..... 84
**Tablo 3.9 :** Lentiviral vektör üretiminde kullanılan tüm plazmidlerin restriksiyon kesimi amacıyla kullanılan malzemeler ..... 90
**Tablo 3.10 :** Ko-transfeksiyonda kullanılan plazmid miktar ve hacimleri (6 kuyuluk plağın tek bir kuyusu için) ..... 96
**Tablo 3.11 :** Ko-transfeksiyonda kullanılan plazmid, reaksiyon tamponu ve polimer miktarları ..... 96
**Tablo 4.1 :** Farklı deney sıçanları için otolog olarak hazırlanıp, ex-vivo gen terapisi uygulanan primer hücrelerin, enjeksiyon öncesi durumları (genç / senesens) ve sayıları belirtilmektedir ..... 118
**Tablo 4.2 :** Gen terapisini takiben hücre enjeksiyonu sonrası deney sıçanlarında ölçülen hPTH değerleri ..... 119
**Tablo 4.3 :** Kontrol grubu sıçanlarında ölçülen hPTH değerleri..... 119

## ŞEKİL LİSTESİ

**Sayfa**

**Şekil 2.1 :** Paratiroid bezlerinin tiroid üzerindeki yerleşimi ..... 8
**Şekil 2.2 :**. Hücre içerisinde PTH biyosentezi ..... 14
**Şekil 2.3 :** PTH ve plazma Ca konsantrasyonu arasındaki ilişki ..... 23
**Şekil 2.4 :** Lentiviral vektörün genel yapısı ..... 45
**Şekil 3.1 :** pLenti-CMV-GFP-2A-Puro (PLPT) plazmidinin vektör haritası ..... 66
**Şekil 3.2 :** Tez çalışma yönteminin genel özeti ..... 69
**Şekil 4.1 :** Deri eksizyonu ve iyileşme aşaması ..... 105
**Şekil 4.2 :** Primer doku kültürünün 3. günü ışık mikroskobu görüntüleri ..... 106
**Şekil 4.3 :** Primer doku kültürünün 7. günü ışık mikroskobu görüntüleri ..... 107
**Şekil 4.4 :** İlk pasajlamayla doku kalıntılarından arındırılan hücrelerin 12. günü ışık mikroskobu görüntüleri ..... 108
**Şekil 4.5 :** PLPT+hPTH, psPAX2 ve pMD.G plazmiderinin EcoRI ile kesimi sonrası agaroz jel elektroforez görüntüleri ..... 110
**Şekil 4.6 :** Transfeksiyon sonrası LentiX hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri ..... 111
**Şekil 4.7 :** HEK 293T hücre hattında farklı konsantrasyonlarda transdüksiyon denemeleri ..... 113
**Şekil 4.8 :** İlk transdüksiyonu takiben 3 gün sonra hücrelerin floresan mikraskoptaki görünümü ..... 114
**Şekil 4.9 :** İkinci transdüksiyonu takiben 3 gün sonra hücrelerin floresan mikroskoptaki görünümü ..... 115
**Şekil 4.10 :** Kültür plağını %90-95 oranında konfliye etmiş olan, %98-100 oranında transdükte primer hücreler ..... 116
**Şekil 4.11 :** Genç ve senesens dönemi hücrelerinin ışık mikroskobunda morfolojik olarak kıyaslanması ..... 117

# EX VİVO GEN TERAPİSİYLE HİPOPARATİROİDİZM TEDAVİSİ MODELİ OLUŞTURMA

## ÖZET

Hipoparatiroidi (hipo-PT), vücuttaki parathormon (PTH) eksikliği sebebiyle başlıca kalsiyum seviyesindeki düşüş ve fosfat seviyesindeki artışın eşlik ettiği, yaşamın devamı için mutlaka tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır. Kronik hipo-PT'nin konvansiyonel tedavisinde yüksek dozlarda oral Ca ve D vitamini takviyelerinin ömür boyu kullanımı zorunludur. Söz konusu tedavi küratif olmayıp semptomatik olmakla beraber, uzun vadede kullanımında hastada çok ciddi yan etkiler görülebilmektedir. Bu sebeple hipo-PT için yeni ve alternatif terapi yaklaşımlarının geliştirilmesinin gerekliliği açıkça görülmektedir.

Gen terapisi, özellikle küratif tedavisi bulunmayan hastalıklar için kullanılabilecek olan, son yıllarda yenilenen vektör tasarımlarıyla birlikte hem güvenilirliğinin hem de etkinliğinin arttırılmış olduğu bir terapi metodudur. Bu sebeple çalışmamızda, sıçanlar üzerinde *ex vivo* gen terapisi metoduyla hipoparatiroidi tedavisi modeli oluşturabilmenin mümkün olabileceğinin gösterilebilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamız hipo-PT tedaviside hem "otolog primer hücrelerin kullanıldığı ilk ex vivo gen terapisi" çalışması olup, hem de söz konusu hastalığın tedavisinde vektör olarak "lentiviral vektörler"in kullanılmış olduğu ilk çalışmadır. Daha önce sıçanlar üzerinde hipo-PT için gen terapisi çalışmaları gerçekleştirilmiş olsa bile, söz konusu çalışmalarda *in vivo* yöntem kullanıldığından, terapötik genin vücutta dağılabileceği hücreleri/dokuları tahmin edebilmek mümkün değildir. Oysa *ex vivo* gen terapisi çok daha güvenli ve kontrollü bir uygulama sağlayabilmektedir. Çalışmamızda ayrıca otolog hücrelerin kullanımı sayesinde immun reddin de önüne geçilebilmesi amaçlanmıştır.

Tezimizde her bir deney hayvanından alınan deri parçasından, hayvanın kendine ait otolog primer hücreler kültüre edilerek çoğaltılmış ve insan parathormon geni (hPTH) taşıyan lentiviral vektörler üretilerek, söz konusu otolog hücreler lentiviral vektörlerle transdükte edilmiştir. Transdüksiyon sonrası hücrelerin hPTH genini genomlarına entegre ederek yüksek miktarda biyolojik aktif hPTH üretimi ve salgılaması yaptığı floresan mikroskop görüntüleri ve biyokimyasal testler sayesinde doğrulanmıştır. Söz konusu hücreler sıçan vücuduna subkutan olarak enjekte edildikten sonra ise tüm deney hayvanlarında hPTH üretimi doğrulanarak, sıçanlarda ex vivo gen terapisi ile hipo-PT tedavisinin mümkün olabileceği gösterilmiştir. Ancak terapi sonrası sıçan serumundan ölçülen hPTH değerlerinin, sıçanlardaki fizyolojik PTH referans değer aralığının altında kaldığı görülmektedir. Bunun sebebinin terapötik hücrelerin enjeksiyon sonrasında sadece çok az bir kısmının vücuda engrafte olabilmesi, büyük bir kısmının ise engrafte olamadığı için vücuttan uzaklaştırılması ve bu yüzden hormon seviyelerinin fizyolojik referans değer aralığının altında kalması olduğu düşünülmektedir.

Sonraki çalışmalarda, çalışma yönteminin optimize edilerek terapötik hücreler için uygun bir hücresel taşıyıcıyla beraber enjeksiyon uygulanması, bu sayede terapötik hücrelerin sıçan vücuduna engrafte olabilme oranlarının ve dolayısıyla hPTH üretim miktarlarının yükseltilebilmesi planlanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Hipoparatiroidizm, gen terapisi, ex vivo gen terapisi, lentiviral vektör, otolog primer hücre

## CREATING A TREATMENT MODEL FOR HYPOPARATHYROIDISM VIA EX-VIVO GENE THERAPY

## SUMMARY

Hypoparathyroidism (hypo-PT) is a disease, caused by the lack of parathormone (PTH) and accompanied by a decrease in the calcium and an increase in the phosphate levels in serum. Lifelong use of high doses of oral Ca and vitamin D supplements are mandatory in the conventional treatment of chronic hypo-PT. Although the conventional treatment is symptomatic but not curative, it may cause very serious side effects in long-term use. Therefore, the necessity of developing new alternative therapies for hypo-PT is clearly seen.

Gene therapy is a therapy method that can be preferred especially for the diseases that do not have a curative or effective treatment. Both its reliability and effectiveness have been increased in recent years due to the renewed gene transfer vector designs. Therefore it's aimed to show that it is possible to create an ex vivo gene therapy method for hypo-PT treatment on rats

Our study is both the "first ex vivo gene therapy using autologous primary cells" and the "first study using lentiviral vectors for gene delivery" in the treatment of hypo-PT. Even if, *in vivo* gene therapy studies for hypo-PT have been performed before, "*ex vivo* method" which is preferred in our study, is more safer and manageable than "*in vivo* method". In our study, it was also aimed to prevent immune rejection by using autologous primary cells.

In our thesis, seperate skin biopsies were excised from experimental animals and seperate autologous cell cultures were created for each animal. At the same time, lentiviral vector particles which are carrying "hPTH therapeutic gene" was constructed and then the autologous cells were transduced by lentiviral vectors to integrate the therepeutic gene hPTH into their genomes. Following transduction, high amounts of biologically active hPTH production and secretion from autologous cells was confirmed by both flourescent microscope images and biochemical tests. Thereafter therapeutic cells were injected subcutaneously into the rat body and hPTH production was confirmed in all experimental animals, demonstrating that "treatment of hypo-PT with ex vivo gene therapy in rats" may be feasible.

However, it is observed that the hPTH values measured from the serum of rats after the therapy, remained below the physiological PTH reference range, it is estimated that the reason for this is that only a small amount of the therapeutic cells could engraft in the body after the injection, and the vast majority of them are removed due to the fact that they couldn't engraft into the body. As a result, due to the inadequate engraftment ratios of therapeutic cells, it is thought that hPTH levels remained below the physiological PTH reference ranges.

In our future studies, it is planned to optimize the study protocol and to apply the injection of therapeutic cells with a suitable cellular matrix, thereby increasing the engraftment ratios of therapeutic cells into the rat body and thus the amount of hPTH production.

**Keywords:** Hypoparathyroidism, gene therapy, ex vivo gene therapy, lentiviral vector, autologous primary cells

# 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hipoparatiroidizm (hipo-PT), serumda PTH yokluğu veya seviyesinin düşüklüğü ile karakterize, bu duruma serumdaki Ca seviyesindeki düşüşün ve $PO_4^{3-}$ seviyesindeki yükselişin de eşlik ettiği bir hastalıktır. Hipo-PT, konjenital ya da sonradan edinilmiş sebeplerle meydana gelebilmekle beraber, sonradan edinilmiş hipo-PT'nin en sık görülme sebebi, tiroidektomi, paratiroidektomi veya boyun bölgesi operasyonları esnasında paratiroid bezlerinin çıkarılması veya geri dönüşümsüz olarak hasar görmesidir. Total tiroidektomi sonrasında kalıcı hipo-PT görülme sıklığı ortalama % 0,8-3 civarındadır.

Hipo-PT kaynaklı hipokalseminin konvansiyonel tedavisi, durumun semptomatik, asemptomatik, akut veya kronik gelişimine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Kronik hipo-PT'nin günümüzdeki konvansiyonel tedavisinde ömür boyu yüksek dozlarda oral Ca ve D vitamini takviyeleri kullanımı zorunludur. Hipo-PT'nin konvansiyonel tedavisinde eksik olan parathormon (PTH), replasman tedavisiyle yerine konulamadığından, tedavi küratif değil, semptomatiktir. Bu sebeple serum Ca, $PO_4^{3-}$ ve D vitamini seviyeleri, tedavi sayesinde fizyolojik referans değer aralığına getirilmeye çalışılsa bile, PTH'un diğer hedef dokularındaki etkisi taklit edilememekte, genel kemik yapısı bozulabilmekte, kognitif fonksiyonlarda olumsuz değişiklikler görülebilmekte ve hastalardaki genel hayat kalitesinin düştüğü tespit edilmektedir. Tedavi için yüksek dozlarda oral Ca ve D vitamini kullanılmasına rağmen, bu dozlar bazı hastalardaki semptomları kontrol altına alabilmekte yetersiz kalmakta ve uzun dönem kullanımlarında çok ciddi yan etkilere sebep olarak (böbrek ve beyinde kalsifikasyonlar, şiddetli GİS yan etkileri vs…) tedaviyi tolere edilemez hale getirebilmektedir. Cerrahi yaklaşımda uygulanan allotransplantasyon yönteminde ise greft bulmanın zorluğu, rejeksiyon riski, ömrünün sınırlı olabilmesi, greftin tam olarak fonksiyon gösterememesi, ve post-opere hastalara uygulanan immunsupresanların yan etkileri gibi sebeplerden dolayı, operasyonun başarı oranları değişkenlik göstermektedir. Tüm bunlar sebebiyle 2015 yılında FDA tarafından onaylanmış olup, hipo-PT'nin tedavisinde konvansiyonel tedaviye destek amaçlı

olarak kullanılabilen “rekombinant intakt insan parathormonu (PTH 1-84)” piyasaya sürülmüştür. Ancak söz konusu rekombinant hPTH’ın tek başına tedavide yeterli olamaması, yarılanma ömrünün oldukça kısa oluşu, her gün enjeksiyonla uygulanmasının zorunluluğu ve yan etki profili, tedavinin kısıtlayıcı yönleri olarak sayılabilmektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında, hipo-PT için yeni ve güvenli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin zorunlu olduğu görülmektedir. Bu paragrafta kısaca söz edilmiş olan hipo-PT, tedavi yöntemleri ve tedavinin yan etkileri ile ilgili çok daha detaylı bilgiler, referanslarıyla beraber tezin “Genel Bilgiler” bölümü altında sunulmaktadır.

Gen terapisi bir hastalığı tedavi etmek amacıyla bir kişinin genlerinde değişim yaratarak, hastalığa sebep olan geni sağlıklı olan kopyasıyla değiştirmek, işlevsiz hale getirmek veya hastalığın tedavisi amacıyla canlıya yeni bir geni nakletmek amaçlarından biri için kullanılan bir terapi yöntemidir. Gen terapisi, özellikle küratif tedavisi bulunmayan hastalıklar için, konvansiyonel tedaviyle kıyaslandığında çok açık bir avantaj sunmaktadır. Bunun sebebi hastalığın semptomlarını baskılamak yerine, genetik seviyeye inerek, direk olarak hastalığın sebebini ortadan kaldırabilmesi veya düzeltebilmesidir. Son yapılan klinik araştırmalar, gen terapisinin pek çok hastalığın tedavisinde hem etkili hem de güvenli olduğunu göstermektedir. Bunun sebebi ise son yıllarda etkinliği ve güvenilirliği arttırılan gen taşıma araçları olan vektörlerin tasarımlarının yenilenerek geliştirilmesidir. Bahsedilen sebeplerle günümüzde küratif bir tedavisi bulunmayan hipo-PT tedavisine yönelik olarak, gen terapisi yöntemini mümkün olan en güvenli şekle uyarlayarak, sıçanlar üzerinde bir terapi metodunun geliştirilebilmesi amaçlanmıştır.

Terapötik genin vücuda nakledilme stratejisine göre gen terapisi *in vivo* ve *ex vivo* olmak üzere ikiye ayrılır. *In vivo* yöntemde terapötik gen direk olarak vücuda enjekte edilirken, *ex vivo* yöntemde ise terapötik gen, kültür ortamındaki hücrelere nakledilerek genetik yapıları değiştirildikten sonra, söz konusu hücreler canlı vücuduna aktarılır. Bu tez çalışmasında, daha komplike ve uygulaması daha zahmetli bir yöntem olmasına rağmen, çok daha güvenli olduğu, kontrollü bir uygulama sağladığı, ayrıca canlıda vektör kaynaklı olası bir immünolojik reaksiyona sebebiyet vermediği için *ex vivo* yöntem tercih edilmiştir. *Ex vivo* yöntemde allojenik veya otolog kaynaklı hücreler tercih edilebilmektedir. Allojenik kaynaklı hücrelerin temini, çoğaltımı ve manipülasyonları daha kolay olup, kontaminasyon riski çok daha az

olmasına karşın, canlı vücuduna enjekte edildikten sonra olası bir immun red sebebiyle vücuttan uzaklaştırılıp tedavinin etkisini yitirebilmesi riski daha yüksektir. Oysa, otolog hücreler canlının kendinden alınan dokudan üretilen hücreler olduğundan, immun red riski çok daha az ve kullanımları daha güvenlidir. Buna karşın kültüre edilip çoğaltılabilmeleri zahmetli, zaman alıcı ve masraflı olmasının yanında kontaminasyon riski de yüksektir ve en önemli dezavantajları belirli bir bölünme sayısı sınırına sahip oldukları için (Hayflick limit) sadece belli bir limite kadar çoğaltılabilmeleridir. Tüm bu dezavantajlarına rağmen kullanımlarının daha güvenli oluşu ve uygulanan canlıda olası bir immun red oluşmaması için dermal kökenli otolog primer hücrelerle çalışılması tercih edilmiştir.

Gen terapisinde vektörler "viral kökenli vektörler" ve "non-viral vektörler" olmak üzere iki geniş kategoriye ayrılmaktadır. Viral kökenli vektörler, vektör olarak tercih edilen virüsün tüm patojenik genlerinin çıkarılması ve yerine terapötik genin yerleştirilmesiyle oluşturulmakta olup, non-viral vektörlerle kıyaslandığında daha yüksek gen transfer verimine sahiptir. Günümüzde yürütülen klinik araştırmaların çok büyük bir çoğunluğunda viral kökenli vektörlerin non-viral vektörlere tercih edilmesinin sebebi, hem etkinliklerinin hem de güvenilirliklerinin yüksek oluşundan kaynaklanmaktadır. Bu sebeplerle çalışmamızda viral bir vektör olan son jenerasyon lentiviral vektörler tercih edilmiştir. Gen terapisinde kullanılan viral vektörler arasından sadece "gama retroviral vektörler" (sadece "retroviral vektörler" olarak da adlandırılabilmektedir) ve lentiviral vektörler, hedef hücre genomuna entegre olabilme özelliğine sahip olup, bu sayede terapötik genin daha uzun süreler boyunca eksprese olabilmesine olanak vermektedirler. Ancak lentiviral vektörler, hem bölünebilen hem de bölünemeyen hücrelerin ikisini birden transdükte edebilme yetenekleri ve genoma entegrasyon profillerinin gama retroviral vektörlere kıyasla daha güvenli oluşu sebebiyle avantajlı olduklarından dolayı tercih edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan son jenerasyon ve transdüksiyon sonrası kendisini inaktive etme yeteneğine sahip olan "SIN özellikli lentiviral vektörler" güvenilirliklerini kanıtlamış olup, günümüze kadar pek çok klinik araştırmada, hatta FDA tarafından onay almış birkaç gen terapisinde de kullanılmaktadırlar. Şimdiye kadar kısaca söz edilmiş olan "gen terapisi, gen terapisinin çeşitleri, kullanılan vektör türleri, farklı vektör türlerinin avantajları / dezavantajları" ile ilgili çok daha detaylı bilgiler, referanslarıyla beraber tezin "Genel Bilgiler" bölümü altında sunulmuştur

Literatürde şimdiye kadar hipo-PT tedavisi amacıyla yürütülen 9 adet gen terapisi çalışması bulunmakla beraber, tez çalışmamız hipo-PT tedavisi amacıyla "otolog primer hücrelerin kullanıldığı ilk *ex vivo* gen terapisi" çalışmasıdır. Ayrıca hipo-PT için gerçekleştirilen gen terapisi çalışmaları arasında vektör olarak "lentiviral vektörler"in kullanıldığı ilk çalışmadır. Söz konusu 9 adet çalışmanın 8'inde *in vivo* metod kullanılmış olup, *ex vivo* metodun kullanıldığı tek çalışmada ise allojenik kaynaklı hematopoietik kök hücreler kullanılmıştır. Bahsedilen çalışmalarla ilgili daha detaylı bilgiler, referanslarıyla beraber tezin "Tartışma" bölümü altında sunulmuştur.

Gerçekleştirilmiş olan bu tezde "ex vivo gen terapisiyle hipoparatiroidi tedavisi modeli" oluşturabilmek amacıyla her bir deney hayvanından alınan deri parçasından, doku kültürü yoluyla otolog primer hücreler çoğaltılmış ve gen transferine hazır hale getirilmiştir. Diğer yandan LentiX konakçı hücre hattında, üçlü plazmid ko-transfeksiyonu metoduyla insan parathormon geni (hPTH) taşıyan lentiviral vektörler üretilmiş olup, etkinlikleri ve kullanım oranları HEK293T hücre hattı üzerinde denenilmiştir. Çoğaltılmış olan otolog primer hücreler, hPTH geni taşıyan lentiviral vektörlerle transdükte edildikten sonra terapötik genin hücre genomuna entegrasyonu ve yüksek miktarda biyolojik aktif hPTH üretim / salgılanması hem floresan mikroskop görüntüleriyle hem de yapılan biyokimyasal testlerle doğrulanmıştır. hPTH üreten otolog hücreler, sıçan vücuduna subkutan olarak enjekte edildikten sonra ise tüm deney hayvanlarında hPTH üretimi doğrulanarak, sıçanlarda *ex vivo* gen terapisi ile hipo-PT tedavisinin mümkün olabileceği gösterilmiştir. Ancak terapi sonrası sıçan serumlarından ölçülen hPTH değerlerinin, sıçanlardaki fizyolojik PTH referans değer aralığının altında kalmış olduğu görülmüş olup, bunun sebebinin ise terapötik hücrelerin enjeksiyon sonrasında sadece çok az bir kısmının sıçan vücuduna engrafte olabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışma metodolojisinin ayrıntıları "Gereç ve Yöntem" bölümünde, elde edilen veriler ise "Sonuçlar" bölümünde detaylarıyla sunulmuştur.

Tezimizin primer amacı, sıçan otolog primer hücrelerine başarılı şekilde hPTH gen transferinin yapılarak hücrelerde hormon üretiminin gösterilmesi ve daha sonra söz konusu otolog hücrelerin sıçan vücuduna geri enjeksiyonuyla, sıçan vücudunda hPTH üretiminin doğrulanabilmesidir. Bu sayede "sıçanlarda *ex vivo* gen terapisi ile hipo-PT tedavisi"nin mümkün olabileceğinin ve güvenilir olduğunun gösterilebilmesidir. Daha sonraki çalışmalardaki hedefimiz ise kullanılan çalışma metodolojisinin tam olarak

optimize edilmesiyle, terapötik hücrelerin uygun bir hücresel taşıyıcıyla beraber sıçan vücuduna enjekte edilmesi sayesinde, terapötik hücrelerin sıçan vücudundaki engrafman oranlarının ve dolayısıyla hPTH üretim miktarlarının yükseltilebilmesidir. Tüm bunlardan sonra uygun terapötik hücre dozajlarının belirlenmesi için gerekli hücre dozaj çalışmaları yapılması da klinik araştırma fazına geçilmeden önce gerçekleştirilmesi gerekenler arasındadır.

*Ex vivo* gen terapisiyle hipo-PT tedavisi modeli, ilerleyen çalışmalarla beraber geliştirilerek optimize edilebilirse, diğer hormon veya enzim eksikliklerine bağlı hastalıklar için de uyarlanarak, yeni tedavi modellerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Paratiroid Bezleri ile İlgili Genel Bilgiler

### 2.1.1. Paratiroid bezleri ile ilgili kısa tarihçe

Paratiroid bezleri (PTB), tiroid bezininin hemen arka kısmına bitişik olarak bulunan, tiroidin her iki tarafında ikişer adet olacak şekilde konumlanmış olan, her insanda genellikle 4 adet bulunan endokrin bezlerdir. [1].

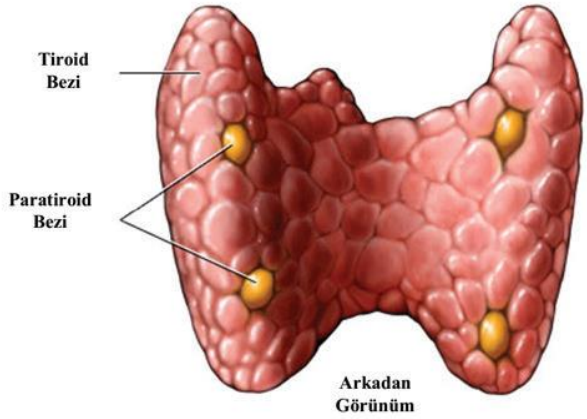
Günümüzde PTB'nin konumları, fonksiyonları ve fonksiyon bozukluklarının sebep olabileceği hastalıklar iyi tanımlanmakla beraber, bu bezlerin anatomik yapılarının ayırt edilmesindeki güçlük sebebiyle ilk kez keşfedilmeleri 19. yüzyıl içerisinde olmuştur. 1850 yılında Sir Richard Owens bir gergedan üzerinde yaptığı otopside tiroid bezinin arkasında, vaskülarizasyonun arttığı bölgeye yapışık olarak bulunan, küçük boyutlarda ve sarı bezelere benzeyen yapılar keşfetmiştir, fakat ne olduklarını tam anlamıyla tanımlayamamıştır [2]. 1880 yılında, 25 yaşındaki İsveçli bir tıp öğrencisi olan Ivar Sandström, pek çok farklı hayvan türünde ve 50 adet insan otopsisinde PTB'nin varlığını ilk kez açıkça ortaya koymuş, bu bezleri tiroidin üzerinde bulunmalarından dolayı "paratiroid" olarak adlandırmıştır. PTB'nin bulundukları yeri, morfolojilerini ve varyasyonlarını tam olarak ortaya koymasına rağmen, hazırlamış olduğu 50 sayfalık raporu, uluslararası editörler tarafından reddedilmiş ve makalesini ancak kendi ülkesindeki yerel bir dergide yayınlayabilmiştir. Araştırma ve bulgularının değeri ancak yıllar sonra anlaşılabilmiştir [3]. Owens ve Sandström'ün araştırmaları, Eugene Gley adlı hekimin PTB'nin fizyolojik ve patolojik önemini keşfetmesine kadar çok ciddiye alınmamıştır. Gley, 1891 yılında yaptığı çalışmalarda paratiroidektomi yapılan köpeklerde tetani oluştuğunu ve bir süre sonra öldüklerini öne sürerek, bu bezlerin hayati fonksiyonlarının olduğunu göstermiştir. Ayrıca makalelerinde, bu bezleri ilk kez açıkça tanımlayan fakat makaleleri hakettiği değeri göremeyen Sandström'e referansta bulunmuştur [4]. 1909 yılında Mac Callum ve Voeghin ise PTB'nin asıl işlevlerinin

kandaki kalsiyum (Ca) seviyesini düzenlemek olduğunu, paratiroidektomi sonucu serum Ca seviyelerinin düştüğünü ve bunun tetaniye yol açtığını göstermişlerdir. 1925 yılında ise Collip adlı araştırmacı, hipoparatiroidi hastalarına parathormon (PTH) uygulanmasının kandaki Ca seviyelerini normal seviyeye getirerek, hipoparatiroidi kaynaklı tetaninin tedavi edilebileceğini göstermiştir [4].

### 2.1.2. Paratiroid bezlerinin anatomisi

PTB, tiroid bezinin sağ ve sol loblarının arka kısmında yer alan ve her iki lobda da biri altta, biri üstte olacak şekilde ikişer adet bulunan, genelde her insanda toplamda dört tane olan, küçük endokrin bezlerdir. Üstte yer alan bezlere superior PTB, altta yer alan bezlere ise inferior PTB denilmektedir [5]. Bezlerin boyutu kişiler arası farklılıklar gösterebilmekle beraber, ortalama 6 mm uzunluğunda, 2 mm kalınlığında ve 3 mm genişliğindedir. Boyutları oldukça küçük olduğundan, tiroide bitişik olduklarından ve kahverengi-sarımsı bir yağ yapısına benzediklerinden dolayı makroskopik olarak ayırt edilmeleri oldukça güçtür [1].

PTB'nin anatomik yerleşimleri ve sayıları kişiden kişiye oldukça fazla değişkenlik göstermekte olsa da, insanların ortalama %81'inde dört adet bez bulunmaktadır [6]. İnsanların geri kalanında PTB'nin sayıları iki ile altı arasında değişebilmektedir [5]. Hatta bazı insanlarda 12 adet bez bulunduğu bile tespit edilmiştir [6, 7]. Renkleri sarı ile kahverengi arasında değişkenlik gösteren bu bezlerin ağırlıkları da kişiden kişiye göre ve özellikle cinsiyetler arasında farklılık gösterebilmektedir. Yapılan pek çok çalışmadan toplanan verilere göre, erkeklerdeki tüm PTB'nin toplam ağırlıkları 106 ile 166 mg arasında değişmekteyken, kadınlarda ise 130 ile 168 mg arasında değişkenlik göstermektedir. Ortalama olarak her bir bez 30 ile 40 mg arasında farklılık göstermekteyken, eğer kişide dört adetten fazla bez varsa, fazladan bulunan bezler genellikle tam gelişmemiş olup, ortalama 5 mg ağırlığında olabilmektedirler [8]. Superior PTB, inferior PTB'ne kıyasla biraz daha küçük boyuttadırlar [9].




**Şekil 2.1:** Paratiroid bezlerinin tiroid üzerindeki yerleşimi (arkadan görünüm) – Grey's Anatomy [9].

Beklenen anatomik yerleşime sahip superior PTB, tiroidin üst posteriyolateral kısmında yer alıp [10], rekürran laringeal sinir ile inferior tiroid arterin kesiştiği bölgenin üzerinde bulunurlar [7]. Inferior PTB ise tiroidin alt posteriyolateral kısmında ve sıklıkla inferior arter ile rekurran laringeal sinirin kesişimlerinin ortalama olarak 1 cm altında bulunurlar [10]. Bununla beraber daha önce de bahsedildiği gibi söz konusu bezlerin yerleşim yerleri kişiden kişiye değişebilmekte ve ektopik bezler de bulunabilmektedir. Ektopik bezlerin oluşumu, erken embriyonal gelişim evresindeki bazı anormalliklerden veya bu evrelerde paratiroid dokusunun diğer dokulardan beklenildiği şekilde ve beklenildiği yönde ayrılamamasından kaynaklanmaktadır [11].

Embriyonal gelişimleri esnasında superior bezlerin hareket etmeleri gereken mesafe, inferior bezlere kıyasla daha kısa olduğu için, kişiden kişiye konumlanmaları arasında görülen farklılıklar genellikle daha azdır [6]. Superior PTB'nin ektopik yerleşimleri en sık trakeoözofageal bölgede (trake ve özofagus arasındaki olukta) veya retroözofageal bölgede gözlemlenir. Bunlardan daha farklı ektopik yerleşim bölgeleri olabileceği tespit edilmiş olsa bile, oldukça nadir gözlenir. Inferior PTB'nin en sık görülen ektopik yerleşimleri ise ön mediasten, timus bezi veya tiroid bezi içerisindedir. Daha nadir olarak ise tirotimik bağ dokuda ve submandibular bölgede hatta superior PTB'nin daha üstünde bile yer alabilirler [11]. Çok daha nadir olmakla beraber karotid çatalında, vagus siniri içerisinde, hipoglosseal sinir içerisinde, perikardiyumda, sağ üst diyafram duvarında, supraklavikular bölgede ve hatta kafatasının altında da paratiroid doku yerleşimleri bulunabildiği rapor edilmiştir [11, 12].

Buraya kadar bahsedilen bilgiler, insanlardaki PTB'nin anatomik yerleşimleriyle ilgilidir. Bununla beraber sıçanlardaki PTB pek çok bakımdan, insanlardakilere kıyasla bir takım farklılıklar göstermektedir. Örneğin insanlarda 4 adet bez olmasına rağmen, sıçanlarda tiroidin sağında ve solunda olmak üzere sadece iki adet paratiroid bezi bulunmaktadır [13]. Renkleri soluk beyaz-sarı olup, morfolojileri oval-uzun arasındadır. Ortalama boyutları 1-2 mm, ortalama ağırlıkları ise 1-2 mg'dır. Ayrıca dişi sıçanlardaki PTB'nin ağırlıklarının, erkek sıçanlara kıyasla iki katı olduğu tespit edilmiştir. Tıpkı insanlarda olduğu gibi sıçanlarda da ektopik yerleşimli bezler görülebilmektedir. Sıçanlardaki ektopik yerleşim bölgeleri ise en sık olarak timus veya larinkste (özofagusa yakın alanda) yer almaktadır [14].

### 2.1.3. Paratiroid bezlerinin embriyolojisi

PTB'nin anatomik yerleşimleri ve sayıları kişiden kişiye farklılık göstermekte olduğu için, vücuttaki yerleşimlerinin daha kolay tespit edilebilmesi amacıyla embriyolojik gelişim aşamalarının bilinmesi önemlidir. PTB, embriyonal gelişimin 5-6. haftasında üçüncü ve dördüncü faringeal poşlardan köken alır [15, 16]. Faringeal poşlar, birbirini takip eden faringeal arkların arasına yerleşmiş olan, embriyonal ön bağırsağın endoderm kökenli çıkıntılarıdır. İnferior PTB üçüncü faringeal poştan, superior PTB ise dördüncü faringeal poştan köken almaktadır. PTB, gebeliğin 6. haftası itibariyle söz konusu poşlardan ayrılmaya başlayarak vücudun aşağısına doğru göç etmeye ve gebeliğin ortalama 7. haftasında tiroidin arkasındaki yerlerini almaya başlarlar [16].

Embriyonal gelişimin ilk aşamasında inferior PTB, superior PTB'den daha yukarıda kalmasına rağmen, gelişim esnasında superior bezlerin önünden geçerek onlardan daha alt konuma göç ederler ve tiroidin alt kutbuna yerleşirler. Dolayısıyla inferior PTB, gelişim sırasında superior PTB'ne kıyasla daha uzun bir mesafe katettikleri için, herhangi bir gelişim aksaklığında veya düzensizliğinde yerleşebilecekleri anatomik alan çok daha geniştir [15]. Dördüncü faringeal poşun dorsal parçasından superior paratiroid meydana gelirken, ventral parçasından ise lateral tiroid köken almaktadır, dolayısıyla superior PTB ile lateral tiroidin kökeni aynıdır. Bunun yanında üçüncü faringeal poşun dorsal parçasından inferior PTB köken alırken, ventral parçasından ise timüs köken almaktadır ve bu sebeple de inferior PTB ile timüsün kökeni aynıdır. Gelişim esnasında timüs ve inferior PTB beraberce kaudale doğru göç ederlerken, alt tiroid kutbuna gelindiğinde inferior PTB bu bölgede ayrılarak tiroidin alt bölgesi

civarında yerleşir, timüs ise boynun daha altına ve mediyastene iniş yapmaya devam eder [17]. Bazı durumlarda inferior PTB timüsten ayrılmadan onunla beraber kaudale doğru göç etmeye devam ederler. Bu sebeple inferior PTB'nin %15-50'sinin timüste yer alabildiği tespit edilmiştir. Kaudale göç edemeyen inferior bezler, kafa tasının hemen altında, mandibula civarında ya da superior bezlerden daha yukarıda olabileceği gibi; timüsten ayrılmayarak kaudale fazla göç eden inferior bezler ise timüs içerisinde ve ön mediasten civarında bulunabilirler [11, 18]. Rodentlerde iki çift değil sadece bir çift paratiroid bez olduğundan bahsedilmiştir. Bu bezler de embriyonal gelişim esnasında üçüncü faringeal poştan meydana gelmekte olup, insanlardaki inferior PTB'ne tekabül etmektedirler, rodentlerde superior PTB bulunmamaktadır [19].

### 2.1.4. Paratiroid bezlerinin histolojisi

Pek çok canlı türündeki PTB, morfolojik ve histolojik olarak ufak farklılıklar sergilemesinin yanında, genel olarak birbirine benzerlik göstermektedir. Histolojik açıdan incelendiğinde PTB, kendilerini tiroid dokusundan ayıran ince bir kapsülle çevrilmiştirler ve bu kapsülün hemen altında adipoz doku, kan damarları ve parankim dokudan oluşan ince bir ağ yer almaktadır. Söz konusu bu fibroadipoz doku, yaşlılıkla birlikte kalınlaşarak, hacim olarak tüm PTB'nin yarısını kaplayabilmektedir [20]. Yaşın ilerlemesi sebebiyle bezlerin çeperinde artan yağ miktarı, dokunun rengini koyulaştırarak normal adipoz doku ile karıştırılmalarına ve cerrahi operasyonlarda yanlışlıkla gözden kaçırılarak tiroidektomi ile beraber cerrahi olarak çıkarılmalarına sebep olabilmektedir [21]. PTB de tiroidi besleyen aynı arterlerle beslenmekte ve aynı venlerle drene edilmektedir. Tiroid bezi nasıl ki superior ve inferior arterlerle besleniyorsa, PTB de bu arterlerle beslenmektedir. Mediyastene yerleşmiş, ektopik PTB ise bulundukları bölgeye göre değişkenlik göstermekle beraber, genellikle subklavyen arter, internal mamarian arter veya direkt olarak aortanın dalları ile beslenebilmektedirler [21].

Eski kaynaklar incelendiğinde, hatta bazı güncel ve popüler ders kitaplarında bile PTB'nde temel olarak iki farklı hücre çeşidinin bulunduğundan bahseder. Bunlar esas hücreler (şef hücreler) ve oksifil hücrelerdir [1, 22]. Oysa daha güncel bilgiler ışığından bakıldığında, PTB'de temel olarak 3 hücre çeşidi bulunmakta olduğu gösterilmiş olup, üçüncü hücre türü berrak hücreler olarak adlandırılmaktadır. Bu üç

temel hücre türüne ilaveten bazı farklı hücre türlerinin daha bulunduğu da tespit edilmiştir [20].

**Esas hücreler (şef hücreler):** Bu hücreler adlarından da anlaşılabileceği gibi paratiroid dokusunun temel hücreleri olup, sağlıklı bireylerde en sık görülen hücre tipidir. Temel görevleri, hücre zarlarındaki reseptörler sayesinde kandaki Ca miktarını ölçerek, serum Ca konsantrasyonunu optimum düzeyde tutabilmek adına, gerektiğinde PTH salgılamaktır. Kandaki Ca miktarı düştüğünde aktive olan esas hücreler, PTH salgılamaya başlarlarken, kandaki Ca miktarının yüksek veya yeterli olduğu zamanlarda ise inaktif durumda kalırlar ve hormon salgılaması yapmazlar. İnaktif durumlarında genellikle kübik yapıda olan esas hücreler, aktive olduklarında oval veya poligonal şekilli görünürler [20]. Esas hücreler aktive olduklarında elektron mikroskobu altındaki görüntülerinde oval veya yuvarlak bir nukleusa ve nukleusun içerisinde çift nukleolusa sahip oldukları, çok iyi gelişmiş granüllü endoplasmik retikulum ve golgi aygıtı sistemine sahip oldukları, sitoplazmalarında küçük yağ damlacıkları içerdikleri ve hücre zarlarının girinti-çıkıntılar bir yapı sergilediği gözlemlenmektedir. İnaktif durumdaki esas hücrelere mikroskop altında bakıldığında ise, granüllü endoplasmik retikulum yapılarının ve golgi aygıtlarının aktif hücrelerdeki kadar belirgin olmadığı, lipid vakuollerinin daha geniş olduğu ve hücre membranlarının daha düzgün olduğu görülebilir [23].

**Oksifil hücreler:** Bu hücre türü insanlar dahil pek çok gelişmiş canlı türünde görülmekle beraber, sıçanlarda ve filogenetik olarak daha alt bazı türlerde görülmemektedir. Oldukça fazla sayıda ve bazıları büyük boylarda mitokondriler içerirler. Bu hücrelerin mitokondrilerinin D vitamini metabolizmasıyla yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Oksifil hücrelerde granüllü endoplasmik retikulum iyi gelişmiş olmasına rağmen, golgi aygıtı çok iyi gelişmemiştir [20]. Mikroskop altında bakıldığında, oksifil hücreler esas hücrelere göre daha büyük boyutları, "sitoplazma / nukleus" hacimlerinin daha fazla olması, daha küçük ve kompakt bir nukleolusa sahip olmaları ve çok daha fazla sayıda mitokondri içermeleriyle ayırt edilebilirler. Tek başlarına veya gruplar halinde esas hücrelerin aralarında bulunabilirler [22]. Yaşlanma ve kronik böbrek hastalığı gibi bir takım metabolik dengesizlikler sonucu oksifil hücrelerin sayılarının arttığı tespit edilmiştir. Bazı bulgular, oksifil hücrelerin esas hücrelerden köken alan bir hücre türü olduğunun düşünülmesine sebep olmuştur. Bu bulgular oksifil hücrelerin içeriğinde de tıpkı esas hücreler gibi immunreaktif PTH

tespit edilmesi, esas hücreler ve oksifil hücrelerin arasında bir ara form olan "oksifil-geçiş hücre türü"nün gözlenmesi, rodentler gibi pek çok hayvan türünde oksifil hücrelerin bulunmaması, bu hücrelerin fizyolojik fonksiyonlarının tam bilinmemesi ve genç bireylerde sayılarının çok az olması şeklinde sıralanılabilir [20, 21].

**Berrak hücreler (water-clear hücreler):** Bu hücre türünün mikroskobik yapısı ilk kez 1963 yılında Holzmann ve Lange tarafından, sonra onları takiben Sheldon tarafından incelenerek ortaya konulmuştur. Bu yayınlarda söz konusu hücrelerin oldukça büyük ve çok miktarda vakuol içerdiklerinden ve diğer hücrelere kıyasla saydam görünümlü hücreler olduklarından bahsedilmektedir [24]. Berrak hücreler sağlıklı insanlarda oldukça nadir görülürler veya hiç görülmeyebilirler, bununla beraber hamster ve tavşan gibi laboratuvar hayvanlarında bulunmaktadırlar. Ayrıca tıpkı oksifil hücreler gibi sayılarının yaşlanmaya bağlı olarak arttığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir [20, 25]. Bu hücrelerin görevleri tam olarak bilinememekle beraber, tıpkı oksifil hücrelerde olduğu gibi, esas hücrelerle berrak hücreler arasında geçiş formu olan hücreler tespit edilmiştir [20]. Berrak hücre hiperplazisinin primer hiperparatiroidinin sebeplerinden biri olabilmesi [24] ve bazı fare türlerinde berrak hücrelerin paratiroid dokusunda bulunmasının PTB'nin hiperfonksiyonunu işaret etmesi [25], söz konusu hücrelerin hiperparatiroidi ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Yukarıda bahsedilen temel hücre tiplerinin haricinde, yağ depo eden hücreler ve immun sistem hücrelerinden mast hücreleri ile bazı makrofaj türleri de paratiroid dokusunda bulunabilmektedir [20].

### 2.1.5. Paratiroid bezlerinin genel fizyolojisi

PTB, vücuttaki fizyolojik etkilerini, esas hücreler tarafından salgıladıkları PTH aracılığıyla gösterirler. PTH'ın farklı organ ve dokular üzerine olan fizyolojik etkileri ayrı bir alt başlıkta açıklanacak olduğu için, bu bölümde PTB'nin fizyolojik işlevleri özet olarak açıklanmaktadır.

PTH'ın en temel işlevi, tiroid bezinden salınan kalsitonin ve kalsitriolle beraber iş görerek, plazmadaki kalsiyum homeostazını sağlamaktır [14]. PTB'nde bulunan esas hücreler, plazmadaki iyonize Ca seviyesi 1,2 mM'ın altına düştüğünde bunu algılayarak hızlı şekilde PTH sentezi ve salgılaması yapmaya başlarlar [26]. PTH başlıca kemikler, böbrekler ve bağırsaklar üzerine etki ederek görevini yerine getirir

[27]. Hormon, kemiklerdeki osteosit ve osteoklastları etkileyerek kemik dokusunda depolanan Ca tuzlarının kana salınımını tetikler. Bunun yanında, böbreklere etki ederek proksimal tübüllerden fosfat ($PO_4^{3-}$) geri emilimini büyük ölçüde engelleyerek $PO_4^{3-}$ atılımını ve distal tübüllerden Ca geri emilimini arttırarak kana Ca geçişini arttırır. Ayrıca D vitamini metabolizmasında çok önemli bir role sahip olan PTH, böbrekler üzerine etki göstererek D vitamininin aktif formu olan 1,25-dihidroksikolekalsiferol [$1,25(OH)_2D_3$] sentezine de yardım eder. $1,25(OH)_2D_3$ sentezini arttırarak, bağırsaklardan Ca ve $PO_4^{3-}$ emilimini de arttırmış olur. Bu sayede plazmadaki total ve iyonize Ca miktarlarını arttırırken, $PO_4^{3-}$ seviyesini düşürmüş olur [1, 14, 26, 27]. Ca ve PTH seviyeleri arasında negatif feedback ilişkisi olduğundan, serumda artan Ca seviyesi, esas hücreler tarafından algılanarak, PTH üretimi ve salınımının durdurulmasına veya azaltılmasına sebep olur [27].

## 2.2. PTH ile İlgili Bilgiler

PTB hücreleri görevlerini, kandaki Ca miktarını algılayıp, buna göre salgıladıkları PTH sayesinde yerine getirirler. PTH'ın başlıca görevi serum Ca konsantrasyonunu oldukça dar bir optimal aralıkta stabil tutmaktır. Bunun haricinde artan serum $PO_4^{3-}$ seviyesini azaltmak ve $1,25(OH)_2D_3$ sentezine katkıda bulunmak da temel fonksiyonlarındandır. [1, 28].

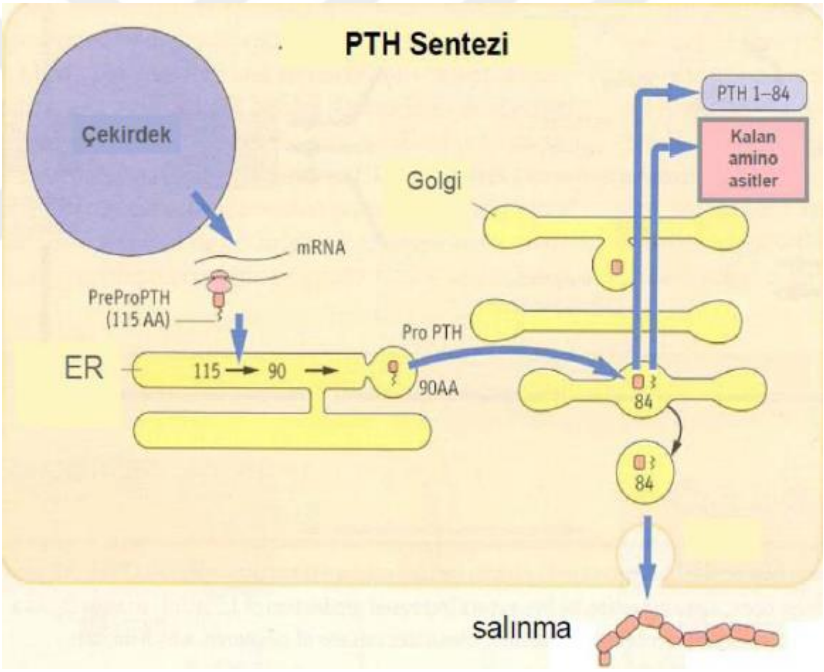
### 2.2.1. PTH yapısı ve biyosentezi

PTH, insanlarda 11. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan PTH geni tarafından kodlanan protein yapılı bir hormondur [29]. PTH gen bölgesi 4128 baz çiftinden (bp) oluşup, 3 exon içerir ve hormon ilk transle edildiğinde, pre-pro hormon olarak üretilip, daha sonra hücre içerisinde hormonun olgun haline dönüştürülür. 1. exon, translasyona uğramaz; 2. exon 25 amino asitlik (a.a) sinyal peptidini (pre bölümü ve pro bölümünün bir kısmını); 3. exon ise pro bölümünün geri kalan kısmını ve 84 a.a'lik işlevsel hormonu kodlar [30, 31].

84 a.a'ten oluşan, tek zincirli ve basit yapılı bir hormon olan PTH, kovalent bağlı yapılar veya karbonhidratlar içermez [32]. Tüm memeli türlerinde yapısal olarak oldukça yakın homoloji gösterip, hepsi için tek zincirli, 84 a.a uzunluğunda ve ortalama 9400 Dalton (Da) ağırlığındadır. Özellikle PTH'nın bilinen fizyolojik

etkilerinden sorumlu olan N-terminal bölümü, memeliler haricinde omurgalılarda da yüksek homoloji göstermektedir [33].

Bir paratiroid hücresinde olgun PTH'un oluşumu, birbirini takip eden iki proteolitik kesim sonrası meydana gelir. PTH mRNA'sı önce 115 a.a'ten oluşan "pre-pro PTH"u kodlar. Peptidin başındaki 25 a.a'lik pre sinyal dizisi, ribozomlarda sentezlenen "pre-pro hormonu", endoplasmik retikulumun (E.R) içerisine yönlendirir ve söz konusu dizi, E.R'un içerisinde kesime uğrayarak "pro PTH" serbest kalır [34, 35]. "Pro PTH" ise golgi kompleksinde ikinci proteolitik kesime uğrayarak 6 a.a'lik pro kısmından da serbestleşir. Sonuçta oluşan 84 a.a'lik olgun ve işlevsel PTH (1-84) hücre içinde salgı granüllerinde depolanır. "pre-pro PTH"dan "pro PTH" oluşumunun yaklaşık 1 dakikada; "pro PTH"dan olgun "PTH (1-84)" oluşumunun ise 15-20 dakika içerisinde gerçekleştiği tespit edilmiştir [35].




**Şekil 2.2:** Hücre içerisinde PTH biyosentezi [36].

PTH'un paratiroid hücreleri tarafından üretildiği bilinen ve klasik fizyolojik etkileri gösteren en temel formu 84 a.a'ten oluşan PTH(1-84)'tür. PTH(1-84), hücrelerden salgılanmadan hemen önce, bir takım proteazlarla kesilerek farklı boyutlardaki peptid türevleri oluşabileceği gibi, kana salgılandıktan sonra karaciğer ve böbrekler gibi perifer organlarda da kesime uğrar ve son olarak metabolize olur. Normokalsemik durumlarda, dolaşımdaki PTH'un sadece %20'si PTH(1-84)'tür, geri kalan %80'i

PTH(1-84)'ün proteazlarla kesilmiş olan daha kısa peptid zincirli türevleridir. Farklı PTH türevleri, hedef hücrelerdeki farklı reseptörlere bağlanarak, farklı etkilere - hatta birbirlerine zıt etkilere - sebebiyet verebilmektedir [29, 34].

PTH'un bilinen klasik biyolojik etkilerini gösterebilmesi açısından N-terminal ucundaki 34 a.a'lik kısmı yeterli olup, C-terminal ucundaki a.a dizilerine ihtiyaç yoktur. N-terminal uçtaki a.a dizileri, hedef organ hücreleri üzerindeki Tip 1 PTH/PTHrP reseptörlerine (PTH1R) bağlanarak, protein kinaz A ve C yolaklarının ikisini birden aktive eder. Bu sayede plazmadaki Ca seviyesini yükseltip, $PO_4^{3-}$ seviyesini düşürmede etkin rol oynar. [37]. Bununla beraber özellikle hormonun N-terminalindeki ilk 2 a.a'in varlığı çok önemlidir. Çünkü bu ilk iki a.a, proteazlar tarafından uzaklaştırılırsa hormon, PTH1R'ye bağlanamaz ve fizyolojik etkisini gösteremez [32]. N-terminalindeki a.a'leri degrede olmuş PTH fragmanlarına C-terminal PTH fragmanları denilmektedir ve bunların PTH1R'ye bağlanarak klasik PTH sinyal yolağını başlatabilme özellikleri yoktur [34]. Eski tarihli yayınlarda C-terminal PTH fragmanlarının biyolojik olarak inaktif olduğu ve herhangi bir hücresel yolakta etkili olmadıklarından bahsedilse bile [29], günümüzde bu şekilde olmadığı bilinmektedir. C-terminal PTH fragmanları, henüz iyi bir şekilde karakterize edilememiş bir reseptör türü olan C-PTH reseptörlerine (C-PTHR) bağlanarak etki göstermekte ve PTH(1-84) ve PTH(1-34) gibi N-terminali taşıyan fizyolojik aktif PTH fragmanlarının etkisini antagonize etmektedir. Bu etkiyi PTH1R'nin hücre içine alınarak down regüle edilmesini teşvik ederek gerçekleştirdikleri ve dolaylı yolla PTH(1-84) ve N-terminal PTH fragmanlarının (fizyolojik aktif PTH fragmanları) PTHR1'e bağlanma oranını azaltarak, klasik yolağın etkisini inhibe ettikleri bilinmektedir [34]. Ancak C-PTHR ile ilgili daha fazla çalışma yapılmasına, söz konusu farklı PTH reseptör türlerinin birbirleriyle ilişkilerinin ve bu kapsamda etkin olan hücre içi yolakların daha fazla araştırılmasına gereksinim vardır.

### 2.2.2. PTH salınımı ve salınımın kontrolü

Memeliler ve tetrapodlardaki plazma Ca iyonunun homeostazı başta PTH olmak üzere ayrıca [$1,25(OH)_2D_3$] ve kalsitonin hormonlarının koordineli salınımıyla kontrol edilir. Söz konusu hormonlar en temel efektör organları olan kemik, böbrekler ve ince bağırsaklar üzerine etki ederek plazma Ca seviyesini optimum düzeyde tutmaya çalışırlar [38].

PTH sekresyonu ve sentezi, temel olarak ekstraselüler sıvıdaki Ca iyon konsantrasyonu sayesinde düzenlenmektedir. Serumdaki Ca ve PTH arasında negatif feed back ilişkisi olup, serumdaki çok hafif bir Ca iyon konsantrasyonu düşüklüğü bile, PTH sentez ve sekresyonunu oldukça hızlı bir şekilde tetiklemekte ve arttırmaktadır. Plazma total Ca seviyesi 7 mg/dL'nin (iyonize Ca seviyesi 3,5 mg/dL'nin) altına düştüğünde, PTH salınımının hızı maksimum olmakla beraber; total Ca seviyesi 11 mg/dL'nin (iyonize Ca seviyesi 5,5 mg/dL'nin) üzerine çıktığında ise PTH salınımı hızla azalır ve stabil bazal seviyesine düşer. Ca konsantrasyonunun daha da artması belirli bir seviyeden sonra PTH salgısını daha da düşürür ancak sıfırlamaz. PTH salınımını belirleyen esas faktör iyonize Ca seviyesidir. Total Ca seviyesi sabit kalsa bile, iyonize Ca seviyesindeki minimal bir değişim, birkaç saniye içerisinde PTH salınım miktarını etkileyebilmektedir [39].

Ekstraselüler Ca seviyesindeki bir düşüş, PTB hücreleri membranlarında bulunan "kalsiyuma duyarlı reseptörler" (CaSR) tarafından algılanarak, ilgili hücre içi sinyalizasyon yolakları aktive olur. İlk olarak hücrelerin sekretuar granüllerinde depo edilmiş olan PTH, saniyeler içerisinde kana salgılanır. Ca seviyesi optimize edilemezse, 60-90 dakika içerisinde tüm granüllerdeki hormon salınmış olduğundan, PTB'nin esas hücreleri bir dizi adaptif değişiklik geçirerek biyolojik olarak aktif PTH üretimini arttırırlar. Birkaç saatten 24 saate kadar uzayan hipokalsemi durumlarında, PTH geninin ekspresyonu ve preproPTH mRNA'sının stabilitesi arttırılır. Bunun haricinde, sekresyonda görevli organel sentezinde de (ER ve golgi aygıtı) belirgin bir artış meydana gelerek hormon üretimi arttırılır. Eğer günler veya haftalar sonrasında hipokalsemi halen devam ediyorsa, o zaman PTB'nin esas hücrelerinin proliferasyonu ve bölünmesi teşvik edilerek hücre sayısında artış meydana gelir, PTB hipertrofiye uğrar ve bu sayede daha fazla PTH üretimi sağlanmış olur [38]. Örnek verecek olursak raşitizm hastalarının serum Ca seviyeleri hafifçe düşük olduğundan dolayı PTB sağlıklı bireylere kıyasla daha büyüktür. Benzer şekilde hem gebelik hem de emzirme esnasında Ca seviyesi oldukça minimal bir düşüş gösterse bile PTB'nde önemli ölçüde hipertrofi meydana gelebilir. Diğer taraftan serumdaki iyonize Ca seviyesini arttıran herhangi bir durum, PTH salgısını azalttığı gibi, eğer uzun süre devam ederse PTB'nin aktivitesini de azaltarak bezlerin atrofisine sebep olur [1].

Ekstraselüler sıvıdaki Ca iyon değişikliklerinin, PTB hücrelerinin membranlarında bulunan (özellikle esas hücreler başta olmak üzere) CaSR tarafından algılandığından

bahsedilmiştir. CaSR, bir G proteinine bağımlı reseptör olup, sadece paratiroid hücrelerinde değil, özellikle Ca homeostazının kritik olduğu doku ve organlarda da bulunur. CaSR, başlıca tiroid bezinin C hücrelerinin, böbrek, kemik, kıkırdak, bağırsak, plasenta, beyin, akciğer gibi organ ve dokulardaki hücrelerin ve keratinositlerin membranlarında da bulunmaktadır [40].

Plazmadaki Ca seviyesi normalin üzerine çıktığında CaSR'e bağlanan Ca iyonları, reseptörde konformasyonel bir değişikliğe sebep olarak, çeşitli hücre içi yolakları aktive/inhibe eder. Ca iyonlarıyla aktive olan reseptör, bir yandan adenilil siklaz (cAMP) üretimini inhibe eden bir G proteinine bağlanır ve sonuç olarak hücre içi cAMP miktarı düşer. Diğer yandan da fosfolipaz C'yi aktive eden bir G proteinine bağlanarak, sırasıyla hücre içindeki fosfolipaz C'yi arttırır ve inositol 1,4,5-trifosfat ($IP_3$) ile diaçil gliserol (DAG) üretimini tetikler. $IP_3$ ve DAG ise intraselüler Ca miktarında artışa sebep olur. Sonuç olarak ekstraselüler Ca konsantrasyonunun artması, CaSR aracılığıyla intraselüler Ca miktarındaki artış ve cAMP miktarındaki düşüşe sebep olarak, PTH salgı granüllerinin ekzositozunu ve salgılanmasını azaltır. Bunun tam tersi olarak ise ekstraselüler Ca miktarının düşük olması, intraselüler Ca miktarının azalması ve cAMP miktarının artmasıyla daha fazla PTH salgılanmasına sebep olur [1, 39, 41, 42]. CaSR başlıca paratiroid hücrelerindeki PTH salgılanmasını kontrol etmek ve böbrekteki Ca geri emilimini düzenlemenin yanı sıra, ekstraselüler Ca konsantrasyonlarına bağlı olarak hücresel gelişimi, hücre farklılaşmasını ve apoptozu da yönlendirir [41].

Ekstraselüler sıvıda Ca miktarının artması sadece PTH sentez ve salgısını azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda hücre içi proteazları tetikleyerek, fizyolojik aktif olan N-terminal PTH fragmanları ve PTH (1-84)'ün N-terminal kısımlarının hücre içinde degrede olmasını da arttırmaktadır. Böylece hücre içinde biyolojik aktivitesi olmayan (ve hatta fizyolojik PTH'ın etki mekanizmasını antagonize eden) C-terminal PTH miktarı artarken, fizyolojik aktif PTH miktarı azalmış olur. Ekstraselüler Ca miktarındaki düşüş ise, CaSR tarafından algılanarak tam tersi etki görülür ve biyolojik aktif PTH'ın degredasyonu azalır [34, 37].

Ca haricinde başta magnezyum (Mg) olmak üzere bazı çok değerlikli katyonların da paratiroid hücrelerini depolarize edebildikleri, Ca ile aynı reseptöre bağlandıkları ve PTH salınımını etkiledikleri bilinmektedir. PTH salınımı başlıca Ca iyonları tarafından kontrol edilmekle beraber, Mg iyonları da Ca ile benzer şekilde etki göstererek CaSR

reseptörüne bağlanmakta ve düşük Mg konsantrasyonları, tıpkı düşük Ca konsantrasyonları gibi PTH salgılanmasını arttırabilmektedir. Fakat yapılan çalışmalar sonucu Mg'un söz konusu etkisinin Ca'a kıyasla ortalama 3 kat daha az olduğu görülmüştür. PTH'ın, böbreklerdeki Ca geri emilimini arttırdığı gibi, Mg geri emiliminde ve atılımında da yardımcı rol oynadığı bilinmektedir. Mg'un düşük konsantrasyonlarının PTH salgısını arttırmasına rağmen, çok düşük Mg konsantrasyonlarının ise paradoksal olarak PTH sentezini inhibe ettiği bilinmektedir. Bunun sebebi Mg'un PTH salgılanabilmesi için düzenleyici etkiye sahip olmasıdır. [43, 44].

Serumdaki D vitamininin aktif formu olan $1,25(OH)_2D_3$ konsantrasyonu arttığında, direk olarak paratiroid hücrelerine etki ederek preproPTH mRNA miktarını ve dolayısıyla PTH üretimini azaltır. Plazmadaki $PO_4^{3-}$ miktarının artması ise Ca konsantrasyonunu azaltarak ve $1,25(OH)_2D_3$ oluşumunu bir miktar engelleyerek, dolaylı yoldan PTH salınımını arttırır [45]. Bunun yanı sıra yapılan bazı çalışmalar, artan $PO_4^{3-}$ seviyelerinin, serumdaki Ca ve $1,25(OH)_2D_3$ konsantrasyonlarından bağımsız olacak şekilde, direk etki mekanizmasıyla da PTH mRNA miktarlarının düzenlenmesinde etkili olabileceğini göstermektedir [46].

PTH salgılanması pulsatif olup, Ca konsantrasyonlarından bağımsız olacak şekilde gece artış göstermektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak ise Ca emilimi azaldığından dolayı plazma Ca miktarları düşmekte ve bu sebeple daha fazla PTH salınarak, yaşlılıkta kemik rezorbsiyonu artmaktadır. Şimdiye kadar bahsedilen mineral, iyon ve $1,25(OH)_2D_3$ haricinde PTH salınımını etkileyen bazı farmakolojik ajanlar ve hormonlar da mevcuttur. Bunlardan fosfodiesteraz inhibitörleri, histamin, dopamin ve epinefrinin PTH salınımını uyarırken; alfa adrenerjik agonister ve prostoglandinlerin PTH salınımını inhibe ettiği bilinmektedir [39].

### 2.2.3. PTH fizyolojisi ve organlar üzerine etkileri

PTH en temel fizyolojik etkilerini başlıca üç organ üzerinde gösterir. Kemik dokusu ve böbreklere direk olarak etki gösterirken, barsaklara indirekt etkide bulunur.

#### 2.2.3.1. Kemik dokusu üzerine etkileri

Kemik dokusu başlıca osteoblast, osteosit ve osteoklast adlarındaki özelleşmiş kemik hücreleri ve bu hücreler tarafından üretilerek onları kuşatan, sertleşip kalsifiye olmuş

bir kemik matriksinden meydana gelmiştir. Kemik dokusu ortalama %25 su, %30 organik madde ve %45 inorganik madde içermektedir [47]. Osteoklastlar başlıca kemik matriksinin rezorbsiyonundan sorumlu hücreler olup, gereken durumlarda aktive olarak sertleşmiş kemik matriksindeki kalsiyum ve fosfat tuzlarının kemikten mobilize olmasına ve kemikte mikro boşlukların oluşmasına sebep olurlar. Osteoblastlar ise kemik matriksinin yapımından sorumlu hücreler olup, kemik mineralizasyonunu ve matriks proteinlerinin sekresyonunu sağlamakla görevlidirler. Osteositler, eski osteoblastlar olup, temel kemik dokusu hücreleri olarak adlandırılır ve kemik hücrelerinin %90'ından fazlasını meydana getirirler. Mineralize olup sertleşmiş kemik matriksi içerisinde genellikle homojen bir dağılım gösterip, temel görevleri çeşitli hormonal ve mekanik yanıtlara göre osteoblast ve osteoklastların görevlerini düzenlemektir [48].

Kemik dokusu sürekli bir yıkım ve yapım döngüsünde olup, "yeniden yapılanma" süreci içerisindedir. Bu sürecin hızı ve kemik dokusunun miktarı, osteoblast ve osteoklast aktiviteleriyle direk olarak ilişki içerisindedir. Osteoblastlar ve osteosit membranlarında PTH reseptörleri bulunmakta ve PTH bu hücrelere direkt etki göstermekte; osteoklastlara ise osteoblast ve osteositler üzerinden indirekt etki göstermektedir. PTH, tüm kemik hücreleri üzerine etki gösterebilmekte ve başlıca salınım süresi, periyodu ve miktarına göre anabolik veya katabolik etkiye sebep olabilmektedir. PTH, her koşulda kemikte yeniden yapılanma sürecini hızlandırmakla beraber, yüksek konsantrasyonlarda ve sürekli PTH maruziyeti sonucunda kemik rezorbsiyonu meydana gelmektedir. Örnek olarak hipoparatiroidi hastalarında kemik rezorbsiyonunun daha az olduğu gözlenmektedir. Düşük miktarda ve aralıklı olarak PTH maruziyeti ise anabolik etkiye sebep olmakta ve kemik kütlesini ve yoğunluğunu arttırmaktadır. PTH maruziyetinin iki formu olan sürekli ve aralıklı maruziyet, kemik hücrelerindeki farklı gen gruplarını, farklı sıralarla uyararak kemikte anabolik veya katabolik etkiye sebep olabilmektedir [28, 49].

Daha önceki başlıklarda yüksek konsantrasyonda PTH salgılanması ya da uygulanmasının sadece birkaç dakikada plazma Ca miktarının yükselmesine sebep olduğundan bahsedilmiştir. PTH, söz konusu bu hızlı etkisini ilk olarak osteolizi tetikleyerek meydana getirmekte, Ca'un kemik kanalcıklarının içindeki sıvıdan osteositlerin içine ve oradan da ekstraselüler sıvıya geçişine sebep olarak, serum Ca konsantrasyonunu arttırmaktadır. Dolayısıyla akut olarak yüksek dozda PTH

uygulanması dakikalar içerisinde gerçekleşen hızlı bir osteolize sebep olabilmektedir [39]. Eğer PTH uzun süreler boyunca ve sürekli olarak salgılanmaya devam ederse o zaman halihazırda bulunan osteoklastları aktive ederek ve preosteoklastlardan yeni osteoklastların oluşumunu tetikleyerek uzun süreler boyunca devam edecek olan bir kemik rezorbsiyonuna sebebiyet verir. Bu sayede yüksek miktarda Ca ve $PO_4^{3-}$ kemiklerden mobilize olarak kana geçer ve söz konusu durum birkaç ay boyunca (veya daha uzun süreler) devam ettiği takdirde kemik matriksinin zayıflamasına sebep olabilir [1]. PTH'un uzun dönemde osteoklastları aktive ederek kemik rezorbsiyonuna sebep olması, matrix büyüme faktörlerini aktive ederek progenitor osteoblastların, olgun osteoblastlara dönüşümünü ve sayılarının artmasını tetikler. Sayıca artan ve aktive olan osteoblastlar ise kemik matriksinin yeniden yapılanması için büyüme faktörleri ve matriks proteinleri sentez ederler [50]. Ancak söz konusu bu geç evrede PTH halen sürekli ve yüksek miktarlarda salgılanmaya devam ederse total kemik yıkım oranı, yapım oranından daha yüksek olduğundan kemik Ca depoları boşalmaya başlar. Bununla beraber kemik matriksindeki Ca konsantrasyonu, ekstraselüler sıvıdan 1000 kat fazla olduğu için, PTH kemiklerden kana Ca mobilizasyonunu yüksek oranda arttırsa bile, bu durum kemik yoğunluğunda ani bir düşüşe sebep olmaz. Fakat aylar ve hatta yıllar boyu devam eden uzun süreli ve yükek konsantrasyonda PTH salgılanması, tüm kemiklerde yüksek oranda rezorbsiyona ve çok çekirdekli osteoklastlarla dolu olan geniş kemik boşluklarının oluşumuna yol açabilir [1].

Yüksek dozda ve uzun süreli PTH salgılanması genel anlamda kemik dokusunda rezorbsiyona yol açsa bile, düşük miktarda ve aralıklı PTH uygulamalarının kemikte anabolik etkiyi arttırdığı görülmüştür. Söz konusu anabolik etkiyi temel olarak üç mekanizmayla gerçekleştirdiği tahmin edilmektedir: 1) pre-osteoblastların osteoblastlara proliferasyonunu tetikleyerek 2) pre-osteoblastların ve osteoblastların farklılaşmasını sağlayarak 3) osteoblastların apoptozunu önleyerek (en önemli anabolik etkisinin bu olduğunu iddia eden yayınlar mevcuttur) [51]. PTH'un aralıklı uygulamasının anabolik etkileri pek çok pre-klinik ve klinik çalışmada kanıtlandığı için, rekombinant insan PTH'u olan teriparatid [hPTH(1-34)] FDA tarafından onaylanmış olan bir osteoporoz tedavi ajanıdır. Teriparatid haricindeki diğer tüm osteoporoz tedavi ajanları, etkilerinini kemik rezorbsiyonunu önlemeye çalışarak gösterirlerken, anabolik etkili tek osteoporoz tedavisi ajanı teriparatid olup, günde tek doz enjeksiyonla hastaya uygulanmaktadır [52].

### 2.2.3.2. Böbrekler üzerine etkileri

PTH direk olarak Henle'nin kalın çıkıcı kolu, distal tübüller ve toplayıcı kanallar üzerine etki ederek, nefronun bu bölgelerinde Ca geri emilimini arttırarak, idrarla Ca kaybının önüne geçilmesini sağlar. Ca geri emilimi artmış olmasına karşın, yine de bazı durumlarda idrarla atılan Ca miktarı yüksek olabilir. Bunun sebebi akut şekilde artan PTH konsantrasyonunun diğer mekanizmalar yoluyla kandaki Ca seviyesini arttırması ve dolayısıyla süzülen filtrattaki Ca yükü de artacağı için, geri emilimin artmasına rağmen, bir miktar Ca'un idrarla atılmasıdır [53]. PTH'un Ca geri emilimini arttırıcı etkisi olmasa, idrarla sürekli Ca kaybedilerek ekstraselüler sıvıda ve kemik dokusunda şiddetli Ca kaybının sebep olduğu komplikasyonların meydana gelişi kaçınılmazdır.

PTH'un böbrekler üzerindeki diğer bir önemli etkisi ise idrarla $PO_4^{3-}$ atılımını arttırmaktır. Oldukça hızlı bir etkiyle proksimal tübüllerden $PO_4^{3-}$ geri emilimini azaltarak idrarla yüksek miktarda $PO_4^{3-}$ atılımına ve serumdaki seviyesinin azalmasına sebep olur. Bu sayede dolaylı yoldan kandaki iyonize Ca miktarı arttırılmış olur. Çünkü serumdaki $PO_4^{3-}$ iyonlarının bir kısmının Ca ile birleşerek çözünmeyen tuzlar oluşturması, iyonize Ca miktarının düşmesine sebep olur [27].

PTH'un böbrekler üzerindeki oldukça önemli etkilerinden bir diğeri de D vitamini metabolizması üzerinedir. Hormon, proksimal tübül hücreleri üzerine etki ederek bu hücrelerin mitokondrilerindeki 1-alfa hidroksilaz enziminin aktivitesini arttırır. Söz konusu enzim dolaşımda bulunan ve D vitamininin inaktif formu olan "25-hidroksi vitamin D3"ü hidroksilleyerek, D vitamininin aktif formu olan "1,25 dihidroksi vitamin D3"e [1,25 $(OH)_2$ $D_3$] metabolize olmasını sağlar [40].

Yukarıda bahsedilen etkilerinin yanı sıra, PTH tıpkı Ca gibi çok değerlikli bir iyon olan Mg'un ve kısmen hidrojen iyonlarının da geri emilimini arttırırken; sodyum ve potasyum iyonları ile a.a'lerin geri emilimini azaltır [1]. PTH seviyelerindeki ani dalgalanmalar, serum ve idrardaki asit-baz dengesini de etkileyebilir. PTH'un aşırı yükselmesi, bikarbonat geri emilimini azaltarak idrarın biraz daha alkali olmasına, kanda ise bir miktar asidoza sebebiyet verebilir. Bu nedenle sekonder hiperparatiroidizm hastalarındaki klinik tabloya asidoz da eşlik edebilir [54].

### 2.2.3.3. Bağırsaklar üzerine etkileri

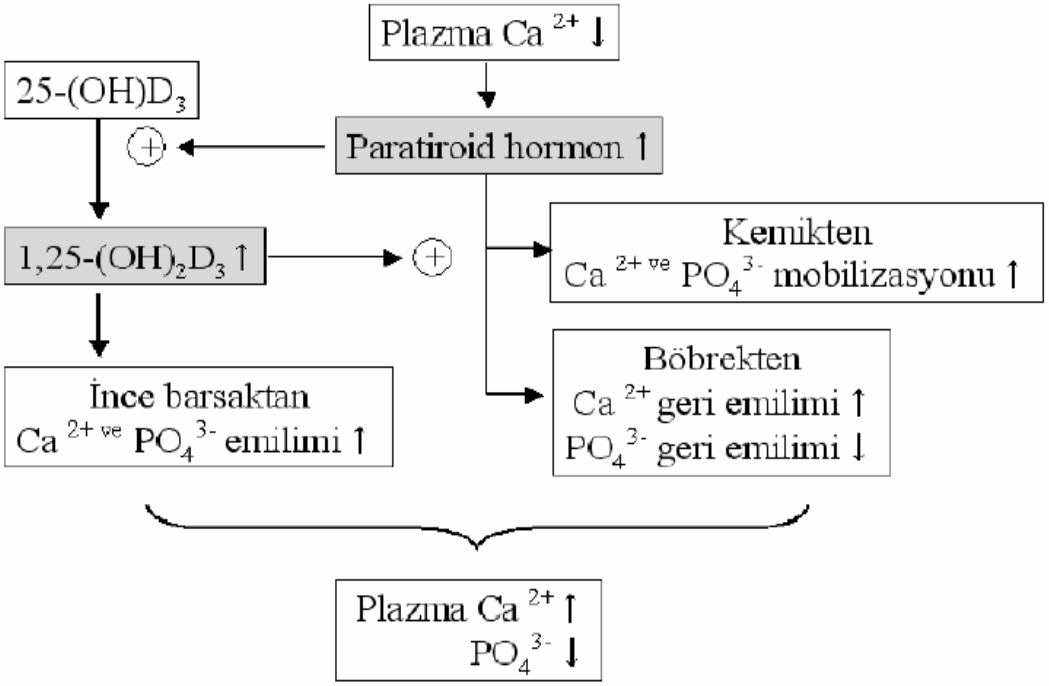
$1,25(OH)_2D_3$, barsaklardan Ca emilimi için temel bir düzenleyici olup, Ca emilimi için yeterli miktarda $1,25(OH)_2D_3$'e gereksinim olduğu bilinmektedir. Pek çok kaynakta PTH'un barsaklar üzerine direk bir etkisinin olmadığından, böbreklerdeki $1,25(OH)_2D_3$'ün sentezini arttırarak dolaylı yolla Ca absorbsiyonunu arttırdığından bahsedilmektedir. $1,25(OH)_2D_3$ eksikliği olan hayvanlarda Ca emiliminin %75'ten daha fazla azaldığı görülmüştür [53, 55]. Bununla beraber, son zamanlarda yapılan araştırmalar, PTH'un barsaklardaki sinyal iletimini, gen transkripsiyonunu ve hücre proliferasyonunu etkileyerek, bağırsaklar üzerinde direk bir etki gösterebildiğini de ortaya koymuştur [56].

### 2.2.3.4. Diğer etkileri

Uzun yıllar boyunca PTH'un direk etkisinin sadece bazı kemik hücreleri ile proksimal ve distal tübüllerin bazı segmentlerindeki hücreler üzerine olduğu düşünülmüştür. Fakat günümüzde PTH'un başlıca kardiyak miyositler, adrenal korteks hücreleri ve endotel düz kas hücreleri başta olmak üzere diğer bazı hücreler üzerine de direk etki gösterdiği bilinmektedir. Sentetik PTH infüzyonlarının düz kasları gevşetmesi ile hızlı ve geçici bir hipotansif etkiye sebep olduğu gözlenmiştir. Buna karşın PTH'un in vitro ortamda angiyotensin-II kaynaklı aldosteron salınımını uyardığı tespit edilmiştir. Söz konusu etkinin primer hiperparatiroidi hastalarında daha sık rastlanabilen hipertansiyon durumunun sebebi olabileceği düşünülmektedir [40]. PTH'un adipositlerdeki lipoliz ve karaciğer ile böbreklerdeki glukoneogenez gibi biyokimyasal süreçleri hızlandırabileceğine ilişkin çalışmalar da mevcuttur [53]. Bahsedilenlerin yanı sıra, PTH'un tüm etkileri, moleküler çalışma prensipleri ve etki ettikleri yolakların henüz halen tam olarak aydınlatılamadığı bilinmekte ve bunlar hakkında her geçen gün yeni çalışmalar yapılarak yeni bilgiler elde edilmektedir.

### 2.2.4. PTH ve Ca Homeostazı

Önceki bölümlerde PTH'un Ca homeostazını sağlamak için en önemli hormon olduğundan ve PTH ile plazma Ca konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon olduğundan bahsedilmişti. Aşağıdaki şekilde PTH ve Ca arasındaki söz konusu ilişki en temel şekliyle özetlenmiştir.




**Şekil 2.3:** PTH ve plazma Ca konsantrasyonu arasındaki ilişki [36].

Ca diğer katyonlara kıyasla insan vücudunda daha yüksek oranda bulunmakla beraber, sadece hücre dışı konsantrasyonu değil hücre içi konsantrasyonu da sıkı kontrol altında tutulmaktadır. Hücre dışı Ca, uyarılabilir hücrelerdeki eksitasyon - kontraksiyon ilişkisinin kurulabilmesinde, koagülasyon olaylarında, sinaptik iletimde ve bazı hormonların salgılanma mekanizmasının düzenlenmesi gibi görevlerde yer almaktadır. Hücre içi Ca ise, hücre motilitesi ve bölünmesinde, maddelerin hücre membranlarından transportunda, uyarılabilir hücrelerin kontraksiyonunda ve hücresel sekresyonun düzenlenmesi gibi pek çok faaliyette ikincil haberci olarak görev almaktadır [57].

Ortalama bir insan vücudunda yaklaşık 1100 g. Ca bulunmasına rağmen tüm Ca'un ortalama %99'u kemiklerde hidroksiapatit formunda depo edilmekte, geri kalanı ise ekstraselüler ve intraselüler sıvılarda bulunmaktadır. Ekstraselüler Ca düzeyi, intraselüler düzeye kıyasla yaklaşık 10.000 kat daha yüksektir. Eğer şiddetli bir hipokalsemi meydana gelirse ve ekstraselüler Ca miktarı PTH tarafından kontrol altına alınıp yükseltilemezse, özellikle sinir ve kas hücrelerinde ciddi eksitatör etkiler ortaya çıkabilir. Eğer çok şiddetli bir hipokalsemi söz konusuysa, kaslarda yoğun spazmların eşlik ettiği bir hipokalsemik tetani meydana gelerek, vücuttaki larinks kaslarını

etkileyebilir ve laringospazma yol açarak hava yollarını tıkayabilir. Bu sebeple ölümcül asfiksi meydana gelebilir [45, 57].

Ortalama bir bireyde total serum Ca konsantrasyonu 8,5-10,5 mg/dL arasında bulunmaktadır (4,3-5,3 mEq/L veya 2,2-2,7 mmol/L). Ancak serumdaki tüm Ca serbest formda değildir, bir kısmı albumin ve globulin gibi serum proteinlerine bağlı olarak bulunur ki söz konusu bağlı formdaki Ca, fizyolojik etkisini gösteremez. Geri kalan Ca ise iyonize olarak bulunabileceği gibi, bikarbonat ya da sitrat gibi anyonlarla birleşerek Ca kompleksleri de oluşturabilir. Serumdaki Ca'un sadece serbest, iyonik formu fizyolojik aktiviteye sahiptir [58]. Diyelim ki ortalama bir bireyde total Ca konsantrasyonu 10 mg/dL ise, bunun yaklaşık yarısı (ortalama 4,72 mg/dL) serbest iyonize Ca olarak, diğer yarısı (ortalama 4,64 mg/dL) serum proteinlerine bağlı olarak, az bir miktarı ise bazı anyonlarla kompleksler oluşturmuş şekilde bulunmaktadır. İnsan serumundaki aktif formdaki PTH referans değeri ise 10-55pg/mL arasında değişkenlik göstermektedir [45].

İnsanlara kıyasla sıçanlardaki ortalama serum Ca referans aralığı biraz değişkenlik gösterip, 9,5-10,9 mg/dL aralığındadır. Ca ve PTH ile genellikle ters korelasyon gösteren fosfor (P) seviyeleri ise sıçanlarda 2.3–7.0 mg/dL aralığında değişkenlik göstermektedir [59]. Erişkin sıçanlardaki fizyolojik PTH ölçüm referans aralığı ise 10-15 pg/ml arasındadır [60].

### 2.2.5. PTH metabolizması ve eliminasyonu

Intakt formdaki PTH [PTH (1-84)], bir kez dolaşıma karıştıktan sonra oldukça hızlı bir şekilde karaciğere uğrayarak buradaki Kupffer hücrelerindeki çeşitli endoproteazlarla metabolize edilir ve sonrasında parçalanmış PTH fragmanları böbrekler tarafından elimine edilerek vücuttan atılır. Karaciğerde biyolojik aktif form olan PTH(1-84) ve N-terminal PTH fragmanlarının tümü metabolize edilir ve biyolojik aktif PTH fragmanları karaciğerden tekrar dolaşıma salınmaz. Bununla beraber karaciğerde meydana gelen söz konusu degredasyon sonunda, biyolojik aktif olmayan C-terminal PTH formları ortaya çıkarak, karaciğerden tekrar dolaşıma salınır. PTH (1-84)'ün yarılanma ömrü sadece 2-5 dakika olmasına karşın; biyolojik inaktif C-terminal PTH'un yarılanma ömrü çok daha uzundur (5-10 kat daha uzun). Bu sebeple dolaşımda bulunan PTH formlarının ortalama %80'ini C-terminal PTH fragmanları oluşturur. Böbrekler, PTH'un metabolize edildiği ikinci organlar olup,

eliminasyonundan sorumludurlar. Bu sebeple bazı böbrek hastalarının serumlarındaki PTH fragmanlarının seviyeleri, normal bireylere kıyasla oldukça yüksek olabilir [61].

## 2.3. Hipoparatiroidizm

### 2.3.1. Tanım ve etyopatogenez

Hipo-PT, serumda PTH yokluğu veya seviyesinin düşüklüğü ile karakterize bir hastalık olmakla beraber, bu duruma serumdaki Ca seviyesindeki düşüş ve $PO_4^{3-}$ seviyesindeki yükselme de eşlik etmektedir [57]. Hipo-PT, konjenital ya da sonradan edinilmiş sebeplerle meydana gelebilir. Sonradan edinilen hipo-PT'nin görülmesinin en sık sebebi tiroidektomi, paratiroidektomi veya boyun bölgesine yapılan çeşitli operasyonlar esnasında PTB'nin hatayla çıkarılması veya geri dönüşümsüz olarak hasar görmesidir. Total tiroidektomi sonrasında geçici hipo-PT görülme oranı %20 civarındayken, kalıcı hipo-PT görülme sıklığı ortalama %0,8-3 civarındadır [62]. Postoperatif hipo-PT'yi takiben en sık rastlanan hipo-PT sebebi, PTB'nin otoimmun hastalıklarıdır. Bunun haricinde PTB'nin gelişim anomalileri, PTH sentez ve sekresyonunda bozukluklara sebep olan genetik hastalıklar, PTB'nin radyasyona maruziyeti ve infiltratif hastalıkları ile PTH etkisine direnç gibi çok çeşitli faktörler / hastalıklar da hipo-PT'nin görülme sebepleri arasındadır [63, 64].

**Tablo 2.1:** Hipoparatiroidizmin başlıca sebepleri [64].

| Hipoparatiroidizmin Başlıca Sebepleri | |
|---|---|
| Boyun ameliyatları | Tiroidektomi, paratiroidektomi, boyun disseksiyonu |
| Otoimmun sebepler | Otoimmun poliglandular sendrom (AIRE gen mutasyonu) |
| Genetik nedenler | -İzole hipoparatiroidi ile seyreden GCM2, PTH, CASR, GNA11 genlerindeki mutasyonlar<br>-Hipoparatiroidi ile seyreden sendromlar:<br>-Digeorge sendromu (kromozom 22q),<br>-HDR sendromu (GATA3),<br>- Sanjad-Sakati ve Kenny-Caffey tip 1 sendromları (1q42.3, TBCE),<br>- Mitokondrial DNA, X-linked (Xq26-27) |
| İnfiltrasyon | Metastazlar, hemokromatozis, Wilson hastalığı |

**Tablo 2.1:** Hipoparatiroidizmin başlıca sebepleri (devam)

| | |
|---|---|
| Radyasyon | Radyoaktif iyot tedavisi |
| Elektrolit bozuklukları | Hipermagnezemi, hipomagnezemi (akut hipoparatiroidizm) |
| Enfeksiyon | HIV enfeksiyonu |
| PTH'a direnç sendromları | Psödohipoparatiroidizm |

Yukarıdaki tabloda yer alan hastalıkların pek çoğu geri dönüşümsüz olarak PTB'ne zarar vermekte ve ömür boyu ilaç tedavisini zorunlu kılmaktadır.

### 2.3.2. Hipoparatiroidizmin tanısı, klinik bulguları ve semptomları

Gözlemlenen klinik bulgularla beraber, serumdaki immunreaktif PTH ve Ca seviyelerinin düşük, $PO_4^{3-}$ seviyesinin ise yüksek olması hipo-PT tanısı koymak için gereklidir [65]. Sadece tanının konulması yeterli olmayıp, tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi açısından hastalığın etyolojisinin de bilinmesi gerekmektedir. Eğer hastalık postoperatif olarak ortaya çıkmamışsa, "European Society of Endochrinology" genetik tarama testlerinin yapılmasını ve aile öyküsünün incelenmesini de tavsiye etmektedir [66].

PTH reseptörleri vücudun çok çeşitli organ ve dokularında bulunduğundan dolayı, hipo-PT ile ilgili hastalıklar sadece serum Ca ve $PO_4^{3-}$ seviyelerini etkilemekle kalmayıp, kalp, cilt ve kemik rahatsızlıklarına sebep olabileceği gibi nörolojik ve diğer sistemik hastalıklara da sebep olabilmektedir. Fakat hastalığın temel bulgu ve belirtileri esas olarak hipokalsemi sebebiyle ortaya çıkar. Gözlemlenen klinik tablo değişken olmakla beraber, tabloyu etkileyen faktörler hipokalseminin şiddeti, süresi ve gelişme hızıdır. Eşlik eden hipomagnezemi ve hiperkalemi de hastalığın durumunu şiddetlendirebilir. Hipokalsemide en belirgin olarak nöromüsküler semptomlar gözlemlenir. Kas krampları, kasılmaları, halsizlik, parestezi, seyirmeler ve uyuşmalar genellikle ilk gözlemlenen belirtiler olmakla beraber, çok daha ciddi vakalarda laringospazm, bronkospazm ve kalp yetmezliği gibi hayatı tehdit eden durumlar ve daha pek çok semptom ortaya çıkabilir [62, 63, 65].

Hipo-PT, etyolojisine göre geçici veya kalıcı olabilmektedir. Özellikle cerrahi bir girişimi takip eden ilk yılın sonunda, hipokalsemi halen devam ediyorsa, bu durum

genellikle kalıcı hipo-PT'yi işaret etmektedir [67]. Kalıcı hipo-PT, PTB'nin çıkarılması veya vasküler nekroz nedeniyle meydana gelmekle beraber, PTH seviyesindeki düşüşe göre tam ya da kısmi hipo-PT olarak sınıflandırılabilir. PTB'nin tümü çıkarılmış veya hasara uğramışsa tam hipo-PT meydana gelmekte ve serum Ca seviyesi 5 mg/dL'nin altına düşmekte olup, şiddetli tetani, konvülziyonlar ve laringospazmın eşlik ettiği çok ciddi bir tablo ortaya çıkabilmektedir. Kısmi hipo-PT ise tek veya iki paratiroid bezi kısmi hasar gördüğünde veya eksize edildiğinde ortaya çıkmakta olup, serum Ca seviyeleri ortalama 7,5-8 mg/dL civarında seyretmektedir [68].

Hipo-PT kaynaklı hipokalseminin şiddeti haricinde, gelişim hızı da klinik tabloda rol oynar ve hipokalsemi akut veya kronik olarak seyredebilir. Serum Ca seviyelerinin yavaşça düşüş gösterdiği hallerde, hipokalsemiye bağlı semptomlar hemen görülmeyeceğinden latent kalabilir ve tanı gecikebilir. Akut gelişen hipokalsemide ise semptomlar belirgin olmakla beraber, başlıca semptom nöromüsküler irritabilite ile karakterize olan tetanidir. Tetani, genellikle iyonize serum Ca düzeyi 4,3 mg/dL; total Ca düzeyi ise 7-7,5 mg/dL'nin altına düştüğünde gözlemlenir [62]. Akut gelişen hipokalsemide serum Ca seviyeleri normalin az bir miktar altına düşse bile hemen semptomlar kendini göstermesine karşın, kronik gelişen hipokalsemide Ca seviyeleri normalin çok daha altına düşmüş olmasına rağmen, semptomlar gözlenmeyebilir veya belirgin olmayabilir [64]. Aşağıdaki tabloda hipo-PT'nin sebep olduğı akut ve kronik hipokalsemi türlerinin klinik bulguları özetlenmiştir.

**Tablo 2.2:** Hipokalseminin klinik bulguları [62, 65].

| **Akut Hipokalsemi** | **Kronik Hipokalsemi** |
|---|---|
| -Nöromusküler irritabilite (tetani) | -Ektopik kalsifikasyonlar (bazal ganglion) |
| -Parestezi | -Ekstrapiramidal bozukluklar (nadiren) |
| -Kas seğirmesi | -Parkinsonizm |
| -Karpopedal spazm | -Demans, mental küntlük, depresyon, paranoya |
| -Trousseau bulgusu | -Lentiküler katarakt ve buna bağlı görme kaybı |
| -Chvostec bulgusu | -Anormal diş çıkarma (özellikle çocuklarda) |
| -Epileptik formda nöbetler | -Ciltte ve saçta kuruluk, tırnaklarda deformasyon |
| -Laringospazm | |
| -Bronkospazm | |
| -Kardiyak semptomlar (uzamış QT intervali, hipotansiyon, kalp yetmezliği, aritmi vs..) | |

### 2.3.3. Günümüz tedavileri ve yan etkileri

Hipo-PT kaynaklı hipokalseminin konvansiyonel tedavisi, durumun semptomatik, asemptomatik, akut veya kronik gelişimine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Tedaviye karar verirken hipokalseminin şiddeti, gelişme hızı ve hastadaki semptomların varlığı değerlendirilir [69]. Akut gelişen hipokalsemiye özellikle hayati tehdit oluşturan semptomlar eşlik ediyorsa (tetani, karpopedal spazm, konvulsiyonlar, kardiyak semptomlar) acilen intravenöz Ca tedavisine başlanılır ve serum Ca seviyeleri izlenerek, limit normal sınırın altına ulaşana kadar i.v tedaviye kontrollü olarak devam edilir[64, 69, 70]. Akut gelişen hipokalsemide hastadaki şiddetli semptomatik belirtilerin yanısıra serum Ca seviyeleri 7 mg/dL'nin altındaysa veya hasta asemptomatik/hafif semptomatik olmasına rağmen, serum Ca seviyeleri 7,5 mg/dL'nin altındaysa, acilen i.v Ca infüzyonuna başlanılır [57, 62]. Iv. infüzyonun tedavi protokolüne uygun olarak yavaş bir şekilde verilmesi gerekmekte olup, hızlı uygulandığında sistolik arrest gibi hayati tehdit oluşturan durumlar ortaya çıkabilir [70]. Hipokalsemiye hipomagnezemi de eşlik ediyorsa serum Mg seviyeleri normal seviyeye çıkarılmadığı sürece hipokalseminin tedavisi güç olduğundan, Ca infüzyonuna ek olarak Mg replasmanı da uygulanır [62].

Akut hipokalseminin tedavisi standardize edilebilmiş olmasına rağmen, kronik hipokalseminin konvansiyonel tedavisinde kullanılacak ilaç dozlarının hastanın durumuna göre ayarlanması gerekmekte olup, tedavi amacıyla izlenecek yol biraz daha komplikedir [71].

Kronik hipo-PT kaynaklı hipokalsemi hastalarında (albümin ile düzeltilmiş kalsiyum seviyesi 8.0 mg/dl'den düşükse) uzun süreli oral tedaviye başlanarak, serum iyonize Ca seviyeleri normal sınırın alt limitinde tutulur [64]. Hipo-PT'nin günümüzde uygulanan uzun süreli konvansiyonel tedavisi semptomatik olmakla beraber, temel olarak oral Ca takviyeleri (Ca sitrat veya Ca karbonat) ve D vitamini takviyeleriyle (kalsitriol altın standarttır) yapılmakta olup, hastanın durumuna göre fosfat bağlayıcıları, tiazid diüretikleri, düşük fosfat ve tuz diyetleriyle desteklenmektedir [62, 69]. Genellikle günlük uygulanan Ca dozajı 1-2 g. olmakla beraber, hastalığın şiddeti ve durumuna göre dozaj kişiden kişiye değişmekte ve günlük 10-12 grama kadar çıkabilmektedir. Tedavide çeşitli D vitamini formları kullanılmakla beraber, altın standart kalsitriol olup, günlük dozajı genelde 0,5-2 mg arasında değişmektedir [72]. Bunlara ilave olarak serum fosfat seviyeleri 6,5 mg/dL'nin üzerine çıkmışsa, fosfat

bağlayıcı ilaçlar ile düşük fosfat diyeti tavsiye edilir. Ayrıca uzun süreli hiperkalsiüri tespit edilmişse, tedaviye tiazid diüretikleri de eklenilerek tuz içeriği düşük diyetler önerilir [69].

Konvansiyonel tedavinin hedefleri hipokalsemi semptomlarını kontrol altında tutmak, serum Ca düzeylerini normal referansın alt sınırına yakın tutabilmek, serum $PO_4^{3-}$ seviyelerinin yükselmesine engel olabilmek ve tedavinin olası yan etkilerini azaltabilmek için mümkün olduğunca hiperkalsiüriyi kontrol altında tutabilmektir [71]. Konvansiyonel tedavi alan hastaların etkin tedavisi ve olası yan etkilerin azaltılabilmesi için düzenli takip esastır. Her 3-6 ayda bir biyokimyasal olarak serum Ca, $PO_4^{3-}$, Mg, kreatinin seviyelerinin ölçümünün yanı sıra, hipokalsemi veya hiperkalsemi kaynaklı olası semptomlar araştırılır. Bunların yanında 24 saatlik idrar takibi, böbrek görüntülemesi, katarakt oluşumuna karşı oftalmolojik muayene ve MSS kalsifikasyonlarına karşı MSS görüntülemelerinin yapılması da önerilmektedir [69].

Hipo-PT'nin konvansiyonel tedavisinde eksik olan PTH, replasman tedavisiyle yerine konulmadığından, tedavi semptomatiktir. Bu sebeple hastanın serumundaki Ca, $PO_4^{3-}$ ve D vitamini seviyeleri optimize edilmeye çalışılsa bile, PTH'un diğer hedef dokularındaki etkisi taklit edilememekte, genel kemik yapısı bozulabilmekte, kognitif fonksiyonlarda olumsuz değişiklikler görülebilmekte ve hastalardaki genel hayat kalitesinin düştüğü tespit edilmektedir. Tedavi için yüksek dozlarda oral Ca ve D vitamini kullanılmasına rağmen bu dozlar bazı hastalardaki semptomları kontrol altına almakta yetersiz kalmakta ve uzun dönem kullanımlarında çok ciddi yan etkilere sebep olarak tedaviyi tolere edilemez hale getirmektedir [62, 72, 73].

Konvansiyonel tedavideki diğer yan etki ise serum Ca seviyelerinin istenilen şekilde kontrol altına alınamayıp, istenmeyen dalgalanmalar oluşmasıdır (hiperkelsemi veya hipokalsemi). Özellikle yüksek doz D vitamini takviyesi alan hastaların %41'inde bir veya birden fazla hiperkalsemi atağının ortaya çıktığına dair bulgular mevcuttur [72].

Yüksek dozda oral Ca takviyesi kullanımı, diyetle alınması gereken günlük miktarın üzerine çıktığında, pek çok hastada ciddi GİS yan etkilerine sebep olmakta, terapötik dozun altında alındığındaysa hipokalseminin önüne geçilememektedir [72].

Konvansiyonel terapinin en ciddi yan etkilerinden biri böbrekler üzerine olup, uzun süreli D vitamini kullanımı hiperkalsiüriye sebep olarak bu durum da nefrolitiazis, nefrokalsinozis ve hatta ilerleyen evrelerde böbrek yetmezliğine bile sebep

olabilmektedir. Danimarkada yapılan bir çalışmada hipo-PT tedavisi alan hastalarda böbrek hastalıklarının görülme olasılığının kontrol grubuna kıyasla tam 4 kat arttığı belirtilmiştir [74]. Hiperkalsiüri, D vitamini toksisitesinin en erken görülen belirtisi olup, serumda hiperkalsemi gelişmeden bile ortaya çıkabilmektedir [62, 74]. Konvansiyonel terapinin diğer risklerinden bir diğeri de özellikle böbrek ve beyinde ektopik kalsifikasyonlara sebep olma ihtimalidir [70, 73].

Ca ve D vitamini takviyelerinin haricinde tedaviye tiazid diüretiklerinin eklenmesi durumunda hipokalemi, hiponatremi, hiperürisemi ve hiperlipidemi gibi yan etkiler de eşlik edebilmektedir [74]. Tedaviye eklenmesi gereken Mg takviyeleri de bazı hastalar tarafından iyi tolere edilemeyip GİS şikayetlerine sebep olabilmektedir [69].

Cerrahi yaklaşımda uygulanan allotransplantasyon yönteminde ise greft rejeksiyonu, greftin tam olarak fonksiyon görememesi, greft bulmanın zorluğu, greft ömrünün sınırlı oluşu ve post opere hastalara uygulanan immunsupresanların yan etkileri gibi sebeplerden dolayı operasyonun başarı oranı kısıtlı ve değişkendir [57].

Konvansiyonel terapilerin pek çok ciddi yan etkileri ve tedavi başarısının değişkenliği sebebiyle, yan etkileri daha az ve etkinliği daha yüksek yeni tedavilere acil ihtiyaç duyulduğu açıkça görülmektedir. Bu sebeple hipo-PT'de eksik olan PTH seviyesini yükseltebilmek ve PTH replasmanı yapabilmek için çeşitli rekombinant PTH (rPTH) formülasyonlarının üretimi yapılmıştır.

Günümüzde iki farklı rPTH formülasyonu mevcuttur. Bunlardan ilki rPTH(1-34) veya "teriparatide" olarak bilinen, fizyolojik PTH'un biyoaktif etki gösteren ilk 34 a.a'ini içeren formülasyondur (Forteo®, Forsteo®). Diğeri ise intakt fizyolojik hormonun analoğu olan PTH(1-84)'tür (US: Natpara®; EU: Preotact®) [72-74]. PTH'un polipeptid yapılı olması sebebiyle oral kullanımı uygun olmayıp, subkutan enjeksiyonla uygulanmakta ve absorbsiyon süresini mümkün olduğunca uzatmak için uyluk bölgesine enjeksiyon yapılmaktadır [75]. Yapılan pek çok klinik çalışmada rPTH uygulamalarının Ca ve D vitamini ihtiyacını azaltarak konvansiyonel terapiye destek sağladığı ve hastaların yaşam kalitelerini yükselttiği gözlenmiştir [62].

rPTH(1-34)'ün hipo-PT tedavisinde kullanımı amaçlı bir çok klinik araştırma yapılmış olsa bile, FDA tarafından sadece osteoporoz tedavisinde anabolik bir ilaç olarak kullanımı onaylanmış olup, hipo-PT tedavisinde kullanımı onaylanmamıştır. Olası bir osteosarkom riskine karşı kullanım dozu kısıtlı tutulmuş ve kullanım süresinin 2 yılı

aşmaması şart koşulmuştur [70, 72, 76]. rPTH(1-34)'ün enjeksiyon sonrası serum pik süresi 30 dakika, yarılanma ömrü 1 saat ve tetiklediği serum Ca pik süresi 4-6 saattir [74]. Oldukça kısa olan yarılanma ömrü sebebiyle hipo-PT tedavisinde optimum fizyolojik etkisini gösterebilmesi amacıyla bir pompa sayesinde vücuda düzenli aralıklarla sık olarak enjekte edilmesi gerektiği görülmüştür [62, 71, 74] Ancak söz konusu uygulamanın zorluğu önemli bir dezavantajdır. Bununla beraber bazı hastalarda pompa infüzyonunun bile yeterli olmayarak hipokalsemi gelişebileceği gözlenmiştir [74]. Ayrıca başka bir çalışmada rPTH(1-34) kullanımının hipositratüriye sebep olabileceği, bunun ise uzun dönemde nefrokalsinozis ve nefrolitiyazis için önemli bir risk faktörü oluşturabileceğinden bahsedilmektedir [72].

Natpara® [rPTH(1-84)], intakt insan parathormonu olan PTH(1-84)'ün analoğu olmakla beraber, rekombinant DNA teknolojisi sayesinde bir E. coli suşu vasıtasıyla üretilmektedir [77]. rPTH(1-84), konvansiyonel tedaviyle kontrol altına alınamayan kronik hipo-PT hastaları için konvansiyonel tedaviye (Ca ve D vit) ek olarak kullanılmak üzere FDA tarafından 2015 yılında onay almış olan çok yeni bir terapötiktir. Ambalajının üzerindeki osteosarkom riskine karşı uyarıcı bir yazıyla piyasaya sürülen ilacın tavsiye edilen kullanım şekli günde tek doz subkutan enjeksiyondur [70, 73, 76]. Bazı yayınlarda rPTH(1-84)'ün enjeksiyon sonrası serum pik süresinin 1-2 saat, yarılanma ömrünün 1,5 saat ve tetiklediği serum Ca pik süresinin 6-8 saat olduğu belirtilmektedir [74]. Bazı yayınlarda ise ise enjeksiyon sonrası serum pik süresinin 5-30 dakika, yarılanma ömrünün ise ortalama 3 saat olduğundan bahsedilmektedir [77]. İlacın farmakokinetiği ile ilgili bilgilerin yayınlar arasında göz ardı edilebilecek ufak farklılıklar göstermesine karşın, yarılanma ömrünün kısa oluşu, tedavi açısından bir dezavantaj olarak kabul edilebilir. Bununla beraber rPTH(1-84) kullanımının konvansiyonel terapide reçete edilen Ca ve D vitamini takviyelerinin dozajlarını anlamlı şekilde düşürebildiği, hatta bazı hastalarda D vitamini takviyesine gerek kalmadığı görülmekle birlikte, genel tedaviye oldukça olumlu bir destek sağladığı gözlenmektedir [73, 74, 78].

Kronik hipo-PT tedavisine sağladığı desteğin yanında rPTH(1-84) kullanımının bir takım yan etkileri de mevcuttur. Bunlar arasında ilk göze çarpanlardan biri "osteosarkom riski"dir. Bu sebeple ambalajının üzerinde yer alan siyah bir uyarı kutusuyla osteosarkom riski vurgulanarak piyasaya sürülmüştür [70, 73, 78].

rPTH(1-84), kronik hipo-PT tedavisine olumlu bir destek sağlamasına rağmen, tek başına kullanımı genellikle yeterli olmayıp konvansiyonel tedaviye destek sağlamak amacıyla, mevcut tedavinin yeterli gelmediği veya yan etki profilinden dolayı devam edemeyen hastalara reçete edilmesi için FDA tarafından onaylanmıştır [70, 76].

Kronik hipo-PT tedavisinde rPTH(1-84) kullanımının standart bir protokolü olmadığından dolayı, çok dikkat edilmesi gereken hususlardan biri de hastaya göre uygun dozaj ayarlaması yapılmasının ve hastanın düzenli olarak takip edilmesinin gerekliliğidir. Aksi takdirde serum Ca seviyelerinde istenmeyen dalgalanmalar oluşabilmekte ve bazı hastalarda hiperkalsemi episodları gelişebilmektedir [70, 73, 74, 78]. Bazı kaynaklarda hastanın 4 haftada bir biyokimyasal bulgularının incelenerek rPTH(1-84)'ün etkilerinin gözlenmesi ve buna göre uygulanan Ca ve D vitamini dozajlarının yeniden ayarlanması gerektiğinden bahsedilmektedir [70].

Yayımlanan bir derlemede, rPTH(1-84) kullanımının kemik mineral yoğunluğu ve iskelet sistemi üzerine olan etkileriyle ilgili çelişkili bulgular elde edilmiş olduğu, terapinin kemikler üzerine etkisinin, uygulanan doz sıklığına ve miktarına göre değişmesinden dolayı sık uygulanan dozların kemikler üzerine daha fazla katabolik etki yapabileceğini vurgulayan yayınların bulunduğundan bahsetmektedir. rPTH tedavisi uygulanan hastalarda konvansiyonel terapi alanlara kıyasla kemik ağrılarının görülme olasılığının arttığı ve bazı hastalarda kemik kırıklarının oluştuğu da rapor edilmiştir [74].

Bilindiği gibi konvansiyonel terapinin en ciddi yan etkilerinden biri uzun süreli hiperkalsiüri sonucu oluşan böbrek hastalıklarıdır. rPTH(1-84) tedavisi sayesinde bunun üstesinden gelinebilmesi amaçlanmıştır. Ancak bazı klinik araştırmalarda rPTH(1-84) tedavisi ve konvansiyonel tedavi alan hastalar kıyaslandığında, rPTH(1-84) grubundaki hastalarda kalsiüri miktarının belirgin olarak azalmadığı görülmüştür. Bunun sebebi olarak rPTH(1-84)'ün yarılanma ömrünün oldukça kısa olmasına karşın, tedavinin günde sadece 1 kez uygulanması olabileceği gösterilmektedir. PTH seviyeleri enjeksiyondan hemen sonra yükselmesine karşın, daha sonra düşüş göstermekte ve PTH'un böbrekler üzerine olan etkisi de sadece kısa bir süre devam etmektedir. Yapılan geniş ölçekli bir klinik araştırmada rPTH(1-84) enjeksiyonundan hemen sonra ilk 2-8 saat içinde kalsiüri miktarının düştüğü, ancak 24 saatlik periyotta idrarla atılan Ca seviyelerinde anlamlı bir azalma olmadığı belirtilmiştir [70, 76].

Kronik hipo-PT ömür boyu tedavi gerektiren bir hastalık olmasına rağmen rPTH(1–84)'ün olası etki ve yan etki profillerini incelemek için yapılan çalışmalar, 24 hafta ile 4 yıl aralığında değişmekte olup, çok daha uzun süreli klinik araştırmalara ihtiyaç mevcuttur. Tedavinin uzun dönemde kullanımının güvenilirliğine dair yeterli çalışma mevcut değildir [70, 74, 76, 77].

Önceki paragraflarda anlatılanları özetlemek gerekirse, rPTH(1-84) konvansiyonel tedaviye destek olarak kullanılan, diğer tedavilerle beraber ideal dozaj ve uygulama protokolü hastadan hastaya değişebilen, hastanın sürekli takibini esas kılan, muhtemel osteosarkom riskine karşı dikkatli kullanılması gereken, FDA tarafından 2015 yılında onaylanmış, oldukça yeni bir terapi yöntemidir. Yapılan klinik araştırmalarda tedavinin kemik yoğunluğu ve iskelet sistemi üzerindeki çelişkili bulgular elde edilmesine ilaveten bazı hastalarda kemik ağrılarının ve kırıklarının görülmesi, bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir. Ayrıca rPTH(1-84)'ün kısa olan yarılanma ömrü sebebiyle günde tez doz uygulanmasının hiperkalsiüriyi etkin şekilde azaltamayacağına dair klinik araştırmaların bulunması, tedavinin uzun dönemde böbrekler üzerindeki etkilerinin tartışmalı olabileceğinin işaretlerini vermekte olup, bahsedilen konularda uzun dönemi kapsayan yeni araştırmaların yapılmasının önemini ortaya konulmaktadır.

## 2.4. Gen Terapisi

### 2.4.1. Gen terapisine genel bakış

Amerika Gıda ve İlaç Dairesi Başkanlığı (FDA), gen terapisini bir hastalığı tedavi etmek amacıyla bir kişinin genlerinde değişim yaratmak olarak tanımlamakla beraber, söz konusu mekanizmanın şu stratejileri kullanabileceğinden bahsetmektedir:

- i)hastalığa sebep olan geni sağlıklı olan kopyasıyla değiştirmek,
- ii)hastalığa sebep olan geni işlevsiz hale getirmek,
- iii)hastalığın tedavisi amacıyla organizmaya yeni veya modifiye edilmiş bir geni nakletmek [79].

Yine FDA'in tanımına göre gen terapisinde kullanılan terapötikler; etkilerini transfer edilen genetik materyalin transkripsiyonunu veya translasyonunu sağlayarak ve/veya hastanın genomuna yerleşerek gösterirler ve nükleik asitler, virüsler ya da genetik olarak değiştirilmiş organizmalar tarafından hastaya nakledilirler. Avrupa İlaç

Dairesi'ne (EMA) göre ise gen terapisinde kullanılan bir terapötik, biyolojik bir ürün olup şu kriterleri karşılamalıdır: i)hastadaki genetik bir diziyi düzenlemek, yerine koymak, onarmak, eklemek veya çıkarmak için aktif madde olarak bir rekombinant nükleik asit içermeli ya da taşımalı ii)terapötik, diagnostik veya profilaktik etkilerini, taşıdığı ya da içerdiği rekombinant nükleik asit veya bu nükleik asidin genetik ekspresyonu sayesinde göstermelidir [80]. Gen terapisi sadece hastalıkları tedavi etmede kullanılmanın ötesinde bir hücre veya organizmaya daha önce sahip olmadığı genetik özellikleri ya da yetenekleri aktarmak için de kullanılabilir [81].

Son yapılan klinik araştırmalar, gen tedavisinin pek çok hastalığın tedavisinde hem etkili hem de güvenli olduğunu göstermektedir. Bunun sebebi ise son yıllarda tasarımı yenilenen, etkinliği ve güvenilirliği arttırılan gen taşıma araçlarıdır (vektörler) [82]. 2019 yılında yayınlanan bir yayına göre, söz konusu tarihe kadar gen terapisiyle ilgili 2500'den fazla klinik araştırma yürütülmüştür [83]. 2020 yılında yayınlanan bir diğer yayına göre ise dünyanın farklı ülkelerinde toplam 22 gen terapisi ilacı, ilgili ülkelerin ilaç daireleri tarafından onaylanarak piyasaya sürülmüştür ve yüzlerce insanın tedavisi için kullanılmaktadır [79]. Gen terapisi, özellikle küratif tedavisi bulunmayan hastalıklar için, konvansiyonel tedaviyle kıyaslandığında çok açık bir avantaj sunmaktadır. Bunun sebebi hastalığın semptomlarını baskılamak yerine, hastalığın genetik seviyesine inerek, direk olarak hastalığın sebebini ortadan kaldırabilmesi veya düzeltebilmesidir [84]. 2018 yılında yayınlanmış bir diğer yayına göre, gen terapisinin kullanıldığı klinik araştırmalarda en çok kanser (ort. %65), ikinci olarak tek gen hastalıkları (ort. %11), üçüncü olarak enfeksiyon hastalıkları (ort.%7), dördüncü olarak ise kardiyovasküler hastalıklar (ort.%7) üzerine araştırmalar yapılmaktadır. Bunlardan başka diğer bazı nörolojik, oftalmolojik, enflamatuar ve pek çok diğer hastalık üzerine de klinik araştırmalar mevcuttur [85].

### 2.4.2. Gen terapisinin sınıflandırılması

Gen terapisi, uygulanan hücre türüne, uygulama yöntemine, tercih edilen vektör türüne, kullanılan genetik materyalin genoma entegre olup olmayacağına göre farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Pek çok kaynak, uygulanan hücre türüne göre gen tedavisini somatik ve germ hattı (eşey hücresi) terapisi olarak ikiye ayırmaktadır. Germ hattı gen tedavisinde yumurta, sperm, zigot veya erken dönem embriyoda genetik değişim yapılarak söz konusu genetik değişimin gelecek nesillere aktarılması

amaçlanır. Bu yöntemin uygulanması pek çok ülkede etik sebepler yüzünden yasaklanmış olup, sadece bazı hayvan deneylerinde kullanılmasına izin verilmektedir. Somatik gen tedavisinde ise, tedavi somatik hücrelere uygulandığından, gelecek nesillere aktarılması söz konusu değildir [80, 86, 87].

Terapötik genin direk ya da indirekt olarak vücuda verilişine göre gen terapisi *in vivo* ve *ex vivo* olmak üzere ikiye ayrılır. *In vivo* yöntemde terapötik gen direk olarak vücuda enjekte edilirken *ex vivo* yöntemde ise terapötik gen, kültür ortamındaki hücrelere nakledilerek genetik yapıları değiştirildikten sonra, söz konusu hücreler canlı vücuduna enjekte edilmektedir [83]. Bu tez çalışmasında, daha komplike ve uygulaması daha zahmetli bir yöntem olmasına rağmen, daha güvenli ve kontrollü bir uygulama sağladığı, ayrıca canlıda olası bir immünolojik reaksiyona sebebiyet vermediği için *ex vivo* yöntem tercih edilmiştir.

Gen terapisinde terapötik gen, genellikle genetik olarak modifiye edilmiş bir vektöre (terapötik genin taşıyıcısı) yüklenerek hedef hücrelere / dokuya / vücuda uygulanmaktadır. Tercih edilen vektörler de viral vektörler ve non-viral vektörler olmak üzere iki geniş kategoriye ayrılmaktadır. Non-viral vektörler olarak lipozomlar ya da çeşitli nanopartiküller kullanılarak, terapötik gen bu moleküllere yüklenerek hedefe gönderilir. Bazen de terapötik gen herhangi bir vektöre yüklenmeden direk olarak vücuda enjekte edilir (çıplak DNA uygulaması). Ancak non-viral vektörler kullanıldığında ya da çıplak DNA'nın direk olarak enjekte edildiği durumlarda, transfeksiyon oranı genellikle düşük olmakta ve terapötik gen etkin bir şekilde hedefe ulaşamamaktadır. Viral vektörler, vektör olarak tercih edilen virüsün tüm patojenik genlerinin çıkarılması ve yerlerine terapötik genin yerleştirilmesiyle oluşturulur. Non-viral vektörlerle kıyaslandığında daha yüksek gen transfer verimine sahiptir ve bazı viral vektörler genoma entegre olabilme yeteneğindedir. Bu sebeplerle yürütülen klinik araştırmalarda da viral vektörler, non-viral vektörlere kıyasla daha fazla tercih edilmektedirler [86, 88, 89]. Tezimizde ise taşıdığı terapötik genin, hedef hücrelerin genomuna entegre olabilmesine olanak sağlayan lentiviral vektörler tercih edilmiştir.

Gen terapisinde kullanılan yöntemler, uygulama şekline göre fizikokimyasal yöntemler ve biyolojik yöntemler olmak üzere de sınıflandırılmaktadırlar [87]. Fizikokimyasal yöntemler kullanıldığında DNA doğrudan ya da bir takım kimyasallarla muamele edilerek uygulama yapılır. Elektroporasyon, mikroenjeksiyon, gen bombardımanı (gen tabancası), magnetofeksiyon ve sonoporasyon gibi fiziksel

yöntemler veya lipozom ve dendrimerler gibi nano boyutlu kimyasallar kullanılarak, terapötik gen hücre içerisine aktarılır. Söz konusu metodlar non-viral vektörlerle uygulama yapılacağında ya da çıplak DNA direk olarak uygulanılacağında tercih edilerek, transfeksiyon verimi arttırılmaya çalışılır [86, 87, 90]. Biyolojik yöntemlerle gen aktarımı için ise viral vektörler ya da plazmidler kullanılmaktadır [87].

Fizikokimyasal uygulama metodlarından kısaca bahsetmek gerekirse, elektroporasyonun prensibi, hedef genin nakledileceği hücrelere ya da dokuya kontrollü bir elektrik alan uygulanmasıyla, hücre membranının geçirgenliğini arttırmak ve hedef genin hücrenin içine girebilmesini tetiklemektir [89]. Mikroenjeksiyonda cam bir mikropipet kullanılarak hidrostatik basınç yardımıyla pipetin içine çekilen hedef gen, mikroskop altında hücrenin sitoplazmasına ya da nukleusuna direk olarak enjekte edilir. Söz konusu yöntem ile her enjeksiyonda sadece tek bir hücreye gen transferi yapıldığı için, yüksek kapasiteli transfeksiyon uygulamalarına elverişli değildir. Bu yöntem günümüzde daha çok transgenik hayvan üretiminde tercih edilmektedir [90]. Partikül bombardmanı tekniğinde, hedef gen biyo-uyumlu ve çok küçük çaplı (1-1,5 mikron) altın veya tungsten gibi bir ağır metale yüklenerek, gen taşıyıcı mikropartiküller üretilir. Söz konusu mikropartiküller gen tabancası sayesinde hızlandırılarak, hedef hücreler mikropartikül bombardımanına tutulur ve hedef genin hücrelerin sitoplazmalarına veya nukleuslarına giriş yapması hedeflenir [86, 87]. Sonoporasyon tekniğinde, hedef dokuya / hücrelere sonik ses dalgaları uygulanarak, hücre membranında geçici porların oluşumunun tetiklenmesi ve hedef genin bu porlardan geçerek sitoplazmaya girişi amaçlanır [86, 90]. Magnetofeksiyon yönteminde, manyetik nanopartiküller hedef gen ile kaplanılır. Hedef geni taşıyan manyetik nanopartiküllerin, oluşturulan manyetik alanın etkisiyle hedef hücrelere giriş yapması sağlanılır [90].

Fiziksel metodların yanı sıra, kimyasal yöntemler kullanılarak geliştirilen vektörlerle de terapötik genin, hedef hücrelere yönlendirilmesi sağlanılabilir. Bu konuda günümüze kadar yapılan pek çok çalışma ve vektör olarak geliştirilen farklı kimyasal nanopartiküller mevcuttur. Ancak genellemek gerekirse kimyasal vektörlerin hedef geni hücre içine nakledebilmek için kullandığı üç temel strateji mevcuttur: i)DNA'nın negatif yükünü maskeleyerek hücreye girişini kolaylaştırmak, ii)DNA'yı sıkıştırarak daha kompakt hale getirmek, iii)DNA'yı serumdaki ya da hücre içindeki nükleazların yıkıcı etkisinden koruyabilmek. En bilinen kimyasal vektör grupları, anyonik özellikli

DNA ile katyonik özellikli polimerlerin elektrostatik etkileşimleriyle oluşan polipleksler ve DNA ile lipidlerin etkileşimleriyle oluşan lipoplekslerdir [86, 89, 90].

### 2.4.3. Viral vektörler ve türleri

Gen terapisinde kullanılan vektör terimi, genel anlamda hedef genin hedef hücreye taşınmasında görevli bir araç olarak kullanılmaktadır. Önceki bölümde gen terapisinde kullanılan vektörlerin viral vektörler ve non-viral vektörler olmak üzere iki geniş kategoriye sınıflandırıldığından bahsedilerek, non-viral vektörler hakkında kısa açıklamalara yer verilmiştir. Bu bölümde ise klinik araştırmalarda en çok kullanılan viral vektörlerin türlerine değinildikten sonra, tezimizde kullanılan lentiviral vektörler ve gelişim aşamalarından bahsedilecektir.

Virüsler zorunlu hücre içi parazitler olup, taşıdıkları genetik materyali (DNA veya RNA) konakçı hücreye başarılı şekilde nakledebilecek özellikte olan yapılardır. Bu özelliklerinden dolayı bazı virüs türleri genetik olarak modifiye edilerek, terapötik geni hedef hücreye başarılı şekilde nakletmeye yönelik rekombinant viral vektörler geliştirilmiştir [91].

Gen terapisi amacıyla geliştirilen viral vektörlerde bir takım ortak özellikler bulunmaktadır: i) patojenik özellik taşıyan ve viral proteinleri kodlayan genlerin neredeyse tümü viral genomdan çıkarılmıştır. ii) viral replikasyon için gerekli cis etkili elementlerin bazıları vektör genomunda tutulmaya devam edilmiştir (paketleme sinyal bölgesi ψ gibi), bazı bölgeler ise güvenlik açısından silinmiştir. iii)virüsün paketlenmesinden sorumlu proteinleri kodlayan yapısal genler (nukleokapsid, kapsid ve matrix proteinlerini kodlayan genler) vektör genomunda tutulmaya devam edilmiştir [92].

Viral vektörler taşıdıkları genetik materyalin türüne göre DNA viral vektörleri ve RNA viral vektörleri olmak üzere sınıflandırılmakla beraber, bazıları tek zincirli genoma bazıları da çift zincirli genoma sahiptirler [93]. Viral vektörler ayrıca hedef hücrenin genomuna entegre olan ve entegre olmayan vektörler olarak da ikiye ayrılmaktadır. Entegre olan vektörler, taşıdıkları terapötik genin, hedef hücrenin genomuna kalıcı olarak entegre olmasını sağlarlar. Entegre olmayan vektörler ise taşıdıkları gen bölgesini sitoplazmanın veya nukleusun içine ulaştırmakla beraber, burada ekstrakromozomal bir genetik element (epizom) olarak kalmalarına aracılık ederler. Entegre olan vektörlerle taşınan genler, hedef hücreler veya hedef hücrelerin alt soyları

yaşamaya devam ettiği müddetçe eksprese olmaya ve hedef proteini üretmeye devam ederler. Bu sebeple uzun süreli kalıcı terapi uygulamaları için uygundurlar [88, 94, 95]. Gama retroviral vektörler ve lentiviral vektörler entegre olan vektörlere; adenoviral vektörler ve adeno assosiye virüs vektörleri entegre olmayan vektörlere örnek olarak verilebilirler [95].

Farklı terapilerde farklı viral vektörler tercih edilmelidir. Örneğin hedef genin uzun süre, hatta ömür boyu eksprese olması isteniliyorsa entegre olan vektörler tercih edilirken, kanser terapisi gibi kısa süreli terapilerde entegre olmayan vektörler tercih edilebilir. Bunun haricinde bazı vektörler sadece bölünebilen hücreleri transdükte etme yeteneğine sahipken, bazıları hem bölünebilen hem de bölünemeyen hücreleri transdükte edebilirler. Kullanılacak vektör seçiminde dikkate alınması gereken diğer konular arasında vektörün paketleme kapasitesi, hedef hücre türleri, ekspresyon profilleri ve immünolojik yanıtı uyarma özellikleri yer almaktadır [94, 95].

Tez çalışmamızda vektör olarak lentiviral vektörleri (LV vektörler) tercih etmemizin sebebi, taşıdıkları terapötik genin hedef hücre genomuna entegre olabilmesi sayesinde terapötik genin uzun süre eksprese edilebilmesini sağlamaları, hem bölünen hem bölünmeyen hücreleri transdükte edebilme yetenekleri, paketleme kapasitelerinin hPTH geni için yeterli olması ve entegre olabilen diğer bir vektör türü olan retroviral vektörlere (RV vektörler) kıyasla daha güvenli olmaları (çok daha düşük genotoksisite) şeklinde sıralanılabilir. Tez çalışmamızda kullandığımız LV vektörlerden bahsedilmeden önce, klinik araştırmalarda en çok kullanılan diğer viral vektörlerden kısaca bahsedilmektedir.

#### 2.4.3.1. Adenoviral vektörler (AV vektörler)

Adenovirüsler zarfsız, çift zincirli DNA virüsleri olup, insanlarda üst solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olurlar. İnsan adenovirüsleri çocuklardaki akut solunum yolu enfeksiyonlarının %5-10'undan sorumludur. 36 kb uzunluğunda DNA'ya sahip olan adenovirüsler, ortalama 90-100 nm boyutunda ve ikozahedral bir şekle sahiptirler [84, 92, 94, 96]. Adenoviruslerden üretilen adenoviral vektörler (AV vektörler) hücre genomuna entegre olmayan, bu yüzden insersiyonal mutageneze sebep olmayan vektörler olmakla beraber, yine bu sebepten ötürü çok uzun dönemli tedavi çalışmaları için uygun olmayabilirler. AV vektörler, hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri transdükte etme yeteneğine sahiptirler [84, 94].

Adenovirüsler, solunum sistemi, göz, mesane, böbrek, GİS ve karaciğer hücreleri gibi pek çok hücre türünü enfekte edebilme özelliğine sahiptirler. AV vektörler de adenovirüslerle aynı hücre türlerine tropizm göstererek transdükte edebilme yeteneğine sahiptirler [88, 96]. AV vektörlerin şimdiye kadar geliştirilmiş 3 jenerasyonu bulunmaktadır.

İlk jenerasyon AV vektörlerde E1 ve/veya E3 genleri silinerek yerine terapötik gen, bir promotor bölge ve poliadenilasyon dizilerinden oluşan bir ekspresyon kaseti yerleştirilmiştir [92]. Bununla beraber, bu ilk jenerasyon AV vektörler oldukça güçlü immun reaksiyonlara sebep olduğundan dolayı, hem uygulama yapılan hastalarda ciddi yan etkilere yol açabilmekte, hem de transdükte edilen hücreler, sitotoksik T lenfositleri tarafından elimine edilerek gen tedavisinin başarısı oldukça kısa süre içerisinde ortadan kalkmaktaydı. Bunun üzerine ikinci ve üçüncü jenerasyon AV vektörler geliştirilmiştir [94, 97].

İkinci jenerasyonda ise E1 genlerine ek olarak E4 ve/veya E2 viral genleri de silinerek tedavinin daha az immunojenik olması sağlanmıştır, fakat bu durum, terapötik gen ekspresyonunun süresini kısaltmış [84] ve viral vektör üretimi esnasında viral titrenin düşmesine de sebep olmuştur [97]. Üçüncü jenerasyon AV vektörlerde ise neredeyse tüm viral genler çıkarılarak sadece DNA replikasyonu için gerekli cis-etkili diziler ve paketleme için gerekli ψ dizileri bırakılarak, çıkarılan viral genlerin yerine terapötik gen ve ekspresyonu için gerekli diziler yerleştirilmiştir [92]. Üçüncü jenerasyon AV vektörler, bir nevi "omurgasız vektör" olarak adlandırılmakla beraber, replike olabilmeleri için yardımcı bir virüse ihtiyaç duymaktadırlar [94]. Tüm viral genleri çıkarıldığı için, çok daha düşük imunojenite göstermekte ve bu sebeple terapötik genin ekspresyon süresi de daha uzun olmaktadır [97].

2020 yılında yayınlanan güncel bir yayına göre AV vektörler, klinik araştırmalarda kullanılan tüm vektörler arasında %18,6'lık bir payla, tüm viral vektörler arasında en çok tercih edilen vektörlerdir [96]. Bazı yayınlarda gen terapilerinde en çok tercih edilen serotipin "Ad serotip 5" olduğu [94], bazılarında ise hem "Ad serotip 5"in hem de "Ad serotip 2"nin sıklıkla tercih edildiğinden bahsedilmektedir [84]. Bununla beraber tüm popülasyonun %50'sinden fazlası "Ad serotip 5"e karşı antikor taşıdığı için, söz konusu durum, gen terapisinin başarısını olumsuz etkileyebilmektedir [97].

Gen terapisinde AV vektörlerin en sık tercih edilme sebeplerinin başında, konakçı hücre hatlarında bol miktarlarda ve yüksek titrelerde üretilebilmelerinin kolaylığı yer almaktadır [97]. Ayrıca taşıdıkları terapötik genin yüksek miktarlarda ekspresyonuna imkan vermeleri de önemli bir avantajdır [98]. Hem bölünebilen hem de bölünemeyen hücreleri transdükte edebilme yetenekleri ve üçüncü nesil AV vektörlerin tam 37kb'ye kadar çıkartılmış kargo kapasiteleri, tercih edilme sebepleri arasındadır [96]. En önemli dezavantajlarının başında ise genoma entegre olamadıklarından dolayı, terapötik genin kısa süreli ekspresyonuna olanak sağlayabilmeleri ve güçlü immünojenik yanıtı uyarmaları yer almaktadır [93]. Üçüncü nesil AV vektörler sayesinde immunojenite büyük oranda azaltılmış olmasına rağmen, tamamen ortadan kaldırılamamıştır. Vektörün taşıdığı viral kapsid proteinleri bile enflamasyona sebep olabilmektedir [94]. Ayrıca adenovirüslerin kısıtlı hücre türlerine tropizm göstermeleri de kullanımları açısından bir dezavantaj olarak görülebilmektedir [98].

#### 2.4.3.2. Adeno-asosiye virüs vektörleri (AAV vektörleri)

Adeno-asosiye virüs vektörleri (AAV vektörleri) en sık kullanılan viral vektörlerden olup, tüm viral vektörler arasında en küçük boyuta sahiptirler ve yapıları oldukça basittir [92, 99]. Adeno-asosiye virüs (AAV) ikozohedral yapıda, 18-26 nm çapında [84], zarfsız, tek zincirli lineer DNA'ya ve 4,7 kb genoma sahip, Parvoviridae ailesine ait bir virüstür [99]. Oldukça basit bir genomik yapıya sahip olduğundan, tek başına replikasyon yeteneğine sahip değildir ve ancak adenovirüs ya da herpes virüs gibi yardımcı bir virüsün varlığında replike olarak çoğalabilir. Bu sebepten dolayı adeno-asosiye virüs olarak adlandırılmıştır [84]. Ortamda yardımcı bir virüs olmadığında memeli genomunun 19. kromozomundaki spesifik bir bölgeye entegre olarak latent şekilde hücrede varlığını sürdürür. Adenovirüs superenfeksiyonu sayesinde, önceden hedef hücre genomuna entegre olmuş olan AAV, kendini çevreleyen genomik diziden bağımsızlaştırarak, litik enfeksiyon dönemine geçiş yapar [99, 100].

AAV vektörlerinden, yabani tip virüste bulunan Rep geninin çıkarılması sebebiyle, vektörün taşıdığı terapötik genom bölgesi, genellikle hedef hücrenin genomuna entegre olamaz ve ekstrakromozomal olarak kalır [92]. Bununla beraber oldukça nadiren de olsa AAV vektörleri hedef hücrenin genomuna da entegre olabilirler [101]. Ayrıca taşıdıkları terapötik genin yıllarca olmasa da aylarca eksprese olabilmesini sağlarlar [84].

AAV'ün farklı serotipleri olmasına karşın, AAV serotip 2 en iyi karakterize edilerek gen terapisinde en çok tercih edilen serotiptir [88]. AAV vektörleri, yabani tip AAV serotip 2 ile aynı hücre türlerine tropizm gösterir [94]. Tropizm gösterdiği hücre türleri özellikle post-mitotik kas, retina, beyin, karaciğer ve akciğer hücreleridir [88, 92]. Yeni nesil AAV vektörlerinde yabanıl tip AAV genomunun başında ve sonundaki ITR dizileri hariç neredeyse tüm viral genler çıkarılmış ve yerine terapötik gene ait bir ekspresyon kaseti konulmuştur (promotor + terapötik gen + poliadenilasyon dizileri) [84].

AAV vektörlerinin popüler olmasının sebepleri olarak insanlar için patojenik özellik göstermemesi, klinik kullanım için güvenli olması, hem bölünen hem bölünmeyen hücreleri transdükte edebilmesi ve terapötik genin uzun süreli ekspresyonunu sağlayabilmesi sayılabilir [84]. Bununla beraber AAV vektörleri sitotoksik değildirler ve diğer pek çok virüste görüldüğü kadar güçlü bir hücresel immun yanıta sebep olmazlar [100]. AAV vektörlerinin tercih edilmesinin önündeki en büyük dezavantaj ise maksimum 4,7 kb'ye kadar olan oldukça küçük kargo kapasitesidir. Bununla beraber son geliştirilen vektörlerde bu dezavantaj kısmen de olsa aşılmaya çalışılmaktadır [84]. AAV vektörlerin diğer dezavantajlarından biri de hastada düşük seviyeli de olsa hücresel veya hümoral immun yanıtı tetikleyebilmesidir. Hücresel immun yanıt tetiklendiğinde sitotoksik T lenfositleri, transdükte edilen hücreleri ortadan kaldırmakta, hümoral immun yanıt tetiklendiğindeyse vektöre karşı oluşan antikorlar, AAV vektörleri ve dolayısıyla terapiyi etkisiz hale getirebilmektedirler [99].

#### 2.4.3.3. Herpes simpleks virüs vektörleri (HSV vektörleri)

Herpesviridae ailesinden olan Herpes simplex virüsü (HSV) 152 kb uzunlukta çift zincirli DNA'ya sahip, 80 viral gen içeren komplike bir virüstür. HSV, özellikle nörotropizm göstermekte ve latent döneminde hedef hücrenin nukleusu içerisinde, tüm hücre yaşamı boyunca epizomal olarak kalabilmektedir. Bu sebeple Herpes simpleks viral vektörleri (HSV vektörleri) özellikle uzun dönem gen terapisi gerektiren nörolojik hastalıklarda kullanılmaya elverişli vektörler olarak görülmektedir [98, 102]. HSV vektörleri, nöronlar ve epitel hücreler haricinde kas ve karaciğer hücrelerini de enfekte etme yeteneğine sahiptir [103].

Günümüze kadar üç tür HSV tabanlı vektör üretilmiştir: amplikon vektörler, replikasyon defektif vektörler ve replikasyon kompetan vektörler. Replikasyon kompetan vektörler daha çok onkolojik terapilerde kullanılmaktayken, replikasyon defektif vektörler ve amplikonlar özellikle merkezi sinir sistemi hücrelerine gen transferi yapmak için tercih edilmektedirler. HSV vektörleri gen terapisinde kullanılan viral vektörler arasında en uzun gen bölgesini taşıma yeteneğine sahip vektörlerdir. Replikasyon defektif virüslerin 50 kb, amplikonların ise 150 kb'ye kadar çok uzun gen bölgelerini taşıma kapasiteleri vardır [104].

HSV vektörlerinin diğer viral vektörlere kıyasla çok daha uzun gen bölgeleri taşıyabilmeleri, oldukça önemli bir avantaj olmakla beraber, bunun yanında bölünmeyen hücreleri de transdükte edebilme yetenekleri, bazı hücre türlerinde latent olarak kalabilmeleri [103] ve transdüksiyon sonrası hedef hücre nukleusunda epizomal formda kaldıkları için insersiyonel mutageneze yol açmamaları da diğer avantajları olarak sıralanabilir [102].

HSV vektörlerinin en önemli dezavantajlarının başında pek çok hücre türü için sitotoksik olabilmeleri yer almaktadır. Neyse ki son dönemlerde geliştirilen HSV vektörlerinde pek çok viral genin vektörden silinmesiyle, toksisite ve antijenik özellikleri azaltılmıştır [103]. Diğer önemli bir dezavantaj ise HSV vektörleri ile gen terapisi sonrasında hedef hücredeki bazı mekanizmalar, nakledilen terapötik genin kısa sürede susturulmasına yol açabilmekte ve ekspresyonunu durdurabilmektedir [104].

#### 2.4.3.4. Retroviral vektörler (RV vektörler)

Retrovirüsler, Retroviridae ailesine mensup olup, temel olarak iki geniş gruba ayrılmaktadırlar: basit retrovirüsler ve kompleks retrovirüsler. Basit retrovirüsler alfa, beta ve gama retrovirüsler olmak üzere üç alt gruba ayrılırken; lentivirüsler kompleks retrovirüsler grubuna mensuptur. Basit retrovirüslerin genomunda sadece "gag, pol ve env" genleri mevcutken, kompleks retrovirüslerde bunlara ilaveten 6 aksesuar gen daha bulunmaktadır [105]. Retroviral vektör üretimi için en iyi karakterize edilen ve en çok çalışılan virüs, gama retrovirüs cinsine ait Moloney murine leukemia virüs (Mo-MLV) olup, klinik araştırmalarda kullanılan tüm RV vektörler bu virüsten geliştirilmiştir (lentiviral vektörler hariç) [84].

Retrovirüsler ortalama 100 nm çapında, zarflı, ikozahedral simetriye sahip, 7-11 kbp uzunluğunda, tek zincirli RNA virüsleridir. Retroviral genomun 5' ve 3' uçlarında

promotor ve enhancer bölgelerini barındıran LTR dizileri bulunurken; genomlarında sırasıyla yapısal proteinleri, replikasyon enzimlerini ve zarf glikoproteinlerini kodlayan "gag, pol, env" olmak üzere üç gen bölgesi mevcuttur [105, 106]. Konakçı hücre içine girdikten sonra ters transkriptaz enzimleri sayesinde tek zincirli genomik RNA'larından çift zincirli DNA sentezlerler ve daha sonra bu DNA'yı konakçı hücrenin genomuna entegre ederek, tüm hücre yaşamı boyunca ve hatta hücrenin alt nesillerinde de varlıklarını sürdürürler [84, 107].

RV vektörler geliştirilirken, orijinal virüse ait ve viral yapının oluşturulmasında görevli yapısal genler olan "gag, pol, env", transfer plazmidinden çıkarılarak trans pozisyonda farklı plazmidlere (paketleme plazmidine ve zarf proteini plazmidine) yüklenir. Transfer plazmidinden çıkarılan bu genlerin yerine terapötik geni eksprese eden bir kaset yerleştirilip, sadece orijinal virüsteki 5' ve 3' LTR dizilerinin bir bölümü genomda tutulmaya devam edilir. RV vektör üretimine elverişli bir hücre hattı, konakçı olarak kullanılıp, tüm plazmidlerle aynı anda ko-transfekte edildikten sonra, terapötik geni taşıyan replikasyon defektif RV vektörlerin üretimini sağlar. Bununla beraber orijinal retrovirüsteki yüzey glikoproteinlerinin üretiminden sorumlu "env" gen bölgesi, çok daha fazla hücre türüne tropizm gösteren "Vesicular stomatitis virüs (VSV)" gibi bir virüsün yüzey glikoproteinlerini kodlayan gen bölgesiyle yer değiştirilerek, vektörün tropizm gösterdiği ve transdükte edebileceği hücre türü skalası genişletilir. Bu olaya "pseudo-tipleme" adı verilmekte, tüm RV vektörlerde ve LV vektörlerde kullanılabilmektedir. VSV glikoproteinleri (VSV-G), memeli hücrelerindeki fosfolipidlere bağlanarak viral vektörün endositozunu teşvik eder, böylece vektörün neredeyse tüm memeli hücrelerini transdükte edebilmesini sağlar [92, 106, 107].

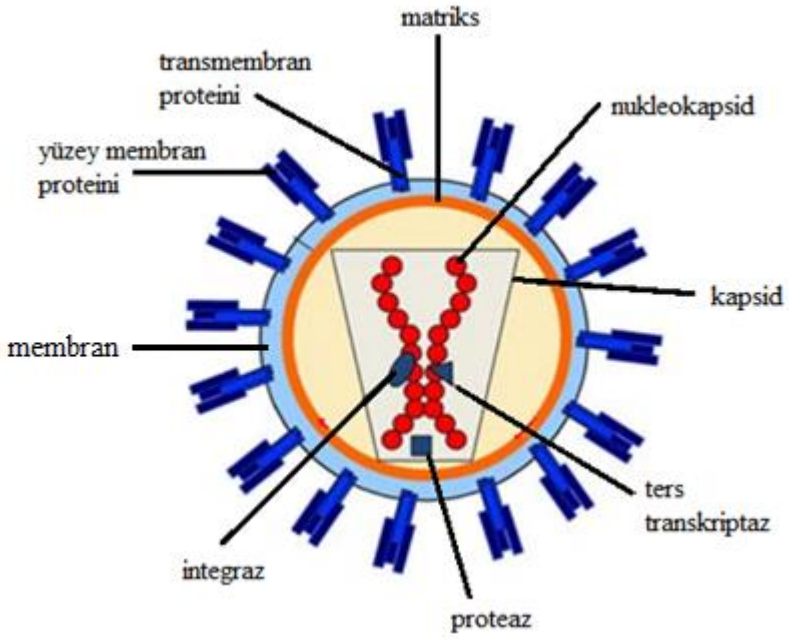
RV vektörlerin en önemli avantajlarından biri hedef hücrenin genomuna entegre olarak, tüm hücre yaşamında ve hatta hücre bölünmesinden sonraki yeni nesil hücrelerde de terapötik proteinin üretimine imkan tanımasıdır [98, 106]. Bunun yanında vektörün "env geni"nde yapılan pseudo-tipleme sayesinde pek çok farklı hücre türüne tropizm göstermesi de önemli bir avantajdır. Ayrıca 8 kb uzunluğa kadar kargo taşıma kapasitesine sahiptir [84]. İmmunolojik yanıtı düşük seviyede uyarması da avantajlarındandır [106].

Dezavantajlarının başında bölünmeyen ya da post-mitotik hücreleri transdükte edebilme yeteneğinin olmaması gelmektedir [84, 98]. Bunun haricinde hedef hücre genomunda zararlı entegrasyon paterni göstererek, insersiyonel mutageneze yol açma riskleri (genotoksisite) yüksektir. Neyse ki son jenerasyon vektörlerde yapılan düzenlemeler sayesinde genotoksik özellikleri önemli ölçüde azaltılmıştır [108].

**2.4.3.5. Lentiviral vektörler (LV vektörler)**

Pek çok viral vektör sistemi olmasına karşın, bunların büyük kısmı genoma entegre olamayan vektörler grubundan olup, hedef hücrenin genomunu kalıcı olarak değiştirme yeteneğine sahip değildirler. İlk kullanılan ve genoma entegre olabilen viral vektörler Retroviridae ailesinden basit RV vektörler (gama RV vektörler) olmasına rağmen, bu vektörlerin de sadece bölünebilen hücreleri transdükte edebilme özellikleri (bölünemeyen hücreleri transdükte edememeleri), kullanım alanlarını kısıtlamaktadır [109, 110]. Ancak Naldini ve arkadaşları, lentivirüs cinsinden olan HIV-1 tabanlı virüslerden geliştirilen vektörlerin, bölünmeyen hücreleri de transdükte edebildiğini gösterdiğinde, 1996 yılında lentiviral vektörler (LV vektörler) kullanım sahnesine çıkmıştır [111].

Lentivirüsler de tıpkı diğer retrovirüsler gibi, Retroviridae ailesine mensup olup, genetik materyallerini çevreleyen bir nuklear kapsid, kapsid, matrix ve onu çevreleyen bir membran, transmembran proteinleri, membran proteinleri ve bazı enzimler (integraz, proteaz, revers transkriptaz) ile bazı aksesuar proteinlerden oluşan, basit retrovirüslere kıyasla komplike bir yapıya sahip olan RNA virüslerdir [112]. Ortalama 110 nm çapında, dairesel bir yapıda olan lentivirüsler; genetik materyal olarak düz, tek zincirli, homodimer yapıda ve 9,7 kb uzunluğında bir RNA'ya sahiptirler [113]. Lentivirüslerin farklı türleri olmasına karşın, günümüz gen terapisinde kullanılan LV vektörlerin neredeyse tümü, tip-1 insan immünyetmezlik virüsü (HIV-1) temel alınarak geliştirilmiştir [114]. HIV-1 bilindiği gibi AIDS adlı hastalığın etyolojisinden sorumlu viral ajandır [111]. Aşağıdaki şekilde HIV-1 tabanlı bir LV vektörün genel yapısı gösterilmektedir.




**Şekil 2.4:** Lentiviral vektörün genel yapısı [91].

Lentivirüsler, dahil oldukları Retroviridae ailesinde bulunan üç temel gen bölesine (gag, pol, env) ilaveten, viral patogenez ve replikasyondan sorumlu iki düzenleyici gen ile (tat ve rev) aksesuar proteinleri kodlayan 4 gen bölgesi daha içerirler (vif, vpr, vpu ve nef) [111, 114]. "Gag" geni, nuklear kapsid, kapsid ve matrix proteinleri gibi yapısal proteinlerin tümünü; "Pol" geni, integraz, proteaz ve revers transkriptaz gibi viral entegrasyondan sorumlu enzimlerin tümünü; "env" geni ise viral zarf proteinlerini kodlayan temel genlerdir [114]. Başlıca öneme sahip olan iki düzenleyici proteinden "Rev", viral genomun nuklear eksportasyonunda, "tat" ise viral transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynar [88, 114]. Lentivirüsler de retrovirüslerle benzer yaşam döngüsüne sahiptirler (Retrovirüslerin yaşam döngüsünden bir önceki başlıkta kısaca bahsedilmiştir). Ancak retrovirüslerden avantajlı olarak, bölünmeyen hücrelerin genomuna da entegre olabilme yeteneğine sahiptirler. Basit retrovirüslerin sadece konakçı hücrenin mitoz sürecinde nuklear zarf yırtıldığında hücre genomuna ulaşabilmelerine karşın; lentivirüs genomu, konakçı hücrenin nuklear zarfı sağlamken de nuklear porlardan giriş yaparak hedef hücrenin genomuna entegre olabilmektedir [81]. Vücuttaki pek çok hücrenin bölünmeyen ya da dinlenme durumundaki terminal diferansiye hücreler olduğu göz önünde bulundurulduğunda, LV vektörlerin, RV vektörlere avantajı açıkça görülebilmektedir.

LV vektörler, terapötik geni taşıyacak şekilde geliştirilmiş, HIV-1 genomuna ait temel protein, enzim ve bazı düzenleyici dizileri taşıyan, bununla beraber hücre tropizminin daha geniş olabilmesi için, pseudo-tipleme imkanı sayeside farklı bir virüs türüne ait zarf glikoproteinlerini kodlayabilen [vesicular stomatitis virüs glikoproteinleri – (VSV-G)], replikasyon defektif, rekombinant viral partiküllerdir [113]. Vektör geliştirme aşamasında HIV-1 genomuna ait bazı genom bölgeleri, "replikatif virüsler"in oluşma riskine karşı çoklu genomik parçalara bölünerek farklı plazmidlere yüklenir: terapötik geni taşıyan transfer plazmidi, yapısal genleri kodlayan plazmid(ler) ve zarf proteinlerini kodlayan plazmid. Viral vektörlerin oluşturulmasında kullanılacak uygun hücre hattı, söz konusu plazmidlerle aynı anda ko-transfekte edilerek hedef geni taşıyan LV vektörler üretilir [109, 115].

LV vektörler, RV vektörlerle kıyaslandığında tek avantajları bölünebilen hücrelerin yanı sıra bölünemeyen hücreleri de transdükte edebilme yetenekleri değildir. Genoma entegre olabilme özelliği gösteren viral vektörlerin tümü, insersiyonel mutagenez kaynaklı onkogeneze sebep olabilme riski taşımasına rağmen, bu risk RV vektörlerde daha yüksek olup, LV vektörler ise çok daha güvenlidir. RV vektörler, genomdaki promotor ve enhancer bölgelere entegre olma eğilimindeyken, LV vektörlerin entegrasyon profilleri daha farklıdır. Bu sebeple onlarca yayında LV vektörlerin RV vektörlere kıyasla daha güvenli olduğundan bahsedilmektedir [91, 92, 114, 116, 117].

LV vektörlerin sağladığı avantajlardan bahsedecek olursak, bunların başında hedef hücrenin genomuna entegre olarak tüm hücre yaşamı boyunca, hatta hücrenin alt nesillerinde de terapötik genin ekspresyonuna olanak tanımaları ve hem bölünebilen hem de bölünemeyen hücreleri transdükte edebilme yetenekleri gelmekle beraber, RV vektörlere kıyasla genomik entegrasyon profillerinin farklı oluşu sayesinde insersiyonel mutageneze yol açma risklerinin çok daha düşük olması, özellikle "kendi kendini inaktive etme - SIN" özellikleri sayesinde güvenlik profillerinin yüksek oluşu, psödo-tipleme sayesinde çok geniş hücre türlerine tropizm göstermeleri ve transdükte edebilme yetenekleri, transdüksiyon sonrası patojenik viral protein üretmemeleri, 9kb uzunluğuna kadar kargo taşıma kapasiteleri, intron içeren veya polisistronik diziler gibi kompleks genetik dizileri bile taşıyabilme özellikleri, diğer avantajları olarak sıralanabilir [82, 113, 114, 118]. Bunların haricinde bazı viral vektörler (HSV vektörleri gibi) transdüksiyon sonrası hücresel mekanizmalar tarafından baskılanarak sessizleştirilebilirler ve bu yüzden taşıdıkları terapötik genin etkisi çok kısa süreli

olabilir. Ancak bu durum LV vektörlerde daha düşük oranda gözlemlenir. Böylece taşıdıkları terapötik genin hücrenin yaşamı boyunca nispeten daha uzun süreler boyunca eksprese edilebilmesini sağlarlar [113, 115].

LV vektörlerin dezavantajlarına bakıldığında, tüm genoma entegre olan vektörlerde görüldüğü gibi olası bir insersiyonel mutagenez riski taşıyabilecekleri göz önünde bulundurulmalıdır [113]. Bununla beraber yapılan pek çok klinik araştırmada yeni jenerasyon LV vektörlerde bu riskin minimize edildiği ve klinik araştırmaların yürütüldüğü vakalarda herhangi bir insersiyonel onkogenez riski oluşmadığı bildirilmiştir. İkinci dezavantaj olarak, LV vektörlerin GMP koşullarına uygun ve stabil olarak üretiminin RV vektörlere kıyasla daha zahmetli oluşu gösterilebilir [81].

Son zamanlarda LV vektörlerin kullanıldığı pek çok klinik araştırma yürütülmektedir. Bu sayede başta primer immün yetmezlikler, hemoglobinopatiler, nörometabolik bozukluklar ve kök hücre kaynaklı bazı anomaliler gibi hastalıklar olmak üzere pek çok hastalıkta LV vektörlerin kullanımının güvenli ve etkili olduğu görülmüştür. Bu araştırmaların sonucunda beta talasemi tedavisinde kullanılması için onaylanan "Zynteglo®" ve metakromatik lökodistropide kullanılmak için onaylanan "Libmeldi®" piyasaya sürülmüştür [115].

#### 2.4.3.6. Lentiviral vektörlerin gelişim aşamaları

Genel olarak bakıldığında LV vektörlerin üretimi için, HEK 293T hücre hatları üç farklı plazmid ile ko-transfekte edilir: i)transfer plazidi (terapötik geni ve HIV genomuna ait bazı cis etkili dizileri taşır), ii)paketleme plazmidi (yapısal viral proteinleri kodlayan genleri taşır), iii)zarf plazmidi (vektörün yüzeyindeki zarf proteinlerini kodlar). Ancak üçüncü jenerasyon LV vektörlerde paketleme plazmidi ikiye ayrılmıştır ve toplamda 4 adet plazmidle ko-transfeksiyon gerçekleştirilir [91]. LV vektörler temel olarak gelişim aşamalarına ve paketleme plazmidlerindeki farklılıklara göre jenerasyonlara ayrılırlar [91, 119].

Birinci jenerasyon LV vektörlerin üretiminde üç farklı plazmid kullanılır. Transfer plazmidi; terapötik gen bölgesine ilaveten HIV-1 genomundaki LTR bölgelerini, enkapsülasyon ve RRE dizilerini taşır. Paketleme plazmidinde ise gag ve pol genleri ile rev ve tat düzenleyici proteinlerini kodlayan genler, ayrıca HIV-1 genomundaki tüm diğer aksesuar genler (vpr, vpu, vif ve nef) bulunur. Zarf proteinlerini kodlayan plazmide ise HIV-1 genleri yerine VSV-G gen bölgeleri yerleştirilerek, LV vektörün

çok daha fazla hücre türüne tropizm göstermesi sağlanılır [112, 114, 119]. Birinci nesil vektörler güvenliği arttırma açısından her ne kadar üç farklı plazmide bölünse de, vektör üretimi esnasında "replikatif virüs" üretim riski de bulunabildiğinden ikinci ve üçüncü jenerasyon LV vektörler geliştirilmiştir. Bu sebeple günümüzde tercih edilen vektörler ikinci ya da üçüncü jenerasyon LV vektörlerdir [114].

İkinci jenerasyon vektörlerin üretiminde de tıpkı ilk jenerasyon gibi üç adet plazmid kullanılmasına rağmen, paketleme plazmidinde bulunan HIV-1 genomuna ait aksesuar genler olan "vpr, vpu, vif ve nef" tamamen silinerek virulans faktörleri ortadan kaldırılmış ve güvenlik arttırılmıştır [91, 114, 119]. İkinci jenerasyon vektörlerin paketleme plazmidinde sadece virüse ait yapısal ve enzimatik proteinleri kodlayan "gag ve pol" genleri ile, transkripsiyonel ve post transkripsiyonel düzenlemede görevli proteinleri kodlayan "rev ve tat" gen bölgeleri bulunmaktadır. Bu jenerasyonun transfer plazmidinde de HIV-1'e ait transkripsiyon, enkapsülasyon, revers transkripsiyon ve entegrasyon için gerekli olan "cis etkili diziler" bulunmaktadır. Zarf plazmidinde kullanılmak üzere ilk jenerasyonda olduğu gibi "VSV-G" gen bölgesi tercih edilir. Yapılan hassas testlerden elde edilen verilere göre ikinci jenerasyon plazmidlerlerle üretilen LV vektörler arasında replikatif özellikli virüslere rastlanmamıştır [94, 112].

Üçüncü jenerasyon LV vektör üretiminde kullanılan paketleme plazmidi iki ayrı plazmid olacak şekilde bölünmüş ve "tat" geni çıkarılmıştır, dolayısıyla vektör üretiminde 4 farklı plazmid kullanılır. Bu plazmidler: 1)transfer plazmidi (hedef geni taşıyan bu plazmidin etkinliğinin ve güvenilirliğinin arttırılması için önceki jenerasyonlardan farklı olarak LTR bölgelerinin bir kısmı modifiye edilmiş ve yeni cis-etkili diziler eklenilmiştir), 2)paketleme plazmidi-1 (sadece gag ve pol gen bölgeleri içerir), 3)paketleme plazmidi-2 (sadece rev gen bölgesini içerir) ve 4)zarf plazmidi (VSV-G gen bölgesini içerir) [91, 111, 114].

Üçüncü jenerasyon LV vektörlerin sadece paketleme plazmidlerinde değil transfer plazmidinde de bir takım değişiklikler yapılmıştır. Paketleme plazmidinden "tat" gen bölgesi çıkarıldığı için transfer plazmidinin 5' LTR ucundaki U3 bölgesine CMV veya RSV virüslerine ait güçlü promotor bölgeler yerleştirilmiş ve bu sayede HIV-1 genomundaki "tat" transaktivatörüne ihtiyaç ortadan kaldırılmıştır [94, 114]. HIV-1 viral genomunda bulunan 3' LTR ucundaki U3 bölgesi oldukça önemlidir, çünkü bu bölge HIV-1 virüsünün replikasyonu için gerekli güçlü promotor ve enhancer diziler

içermektedir. Ancak üçüncü jenerasyon vektörlerde (ayrıca bazı ikinci jenerasyon vektörlerde) 3' LTR ucundaki U3 bölgesindeki bazı diziler (TATA-box, Sp1, NF-κB ve NFAT) silinerek "kendini inaktive eden vektörler = SIN vektörler" üretilmiştir. Böylece vektör üretimi esnasında yabani tip HIV-1 benzeri replikatif özellikli virüslerin üretim riski daha da azaltılmış ve güvenlik arttırılmıştır [91, 94, 114]. Ancak güvenlik arttırılmasına rağmen viral üretim titresi 10 kat daha azalmış, bu yüzden üretim aşamaları daha da zorlaşmıştır [111]. Üçüncü jenerasyon SIN özellikli vektörlerin diğer avantajları, insersiyonel mutagenez kaynaklı hücresel proto-onkogenlerin aktivasyon riskini azaltmaları, entegre olan vektöre ait genlerin yabani tip bir virüs tarafından mobilizasyonunun önlenmesi ve promotor interferansı gibi problemlerin azaltılması olarak sıralanılabilir [111, 114, 119].

Yabani tip HIV-1 genomunda bulunan "central polypurine tract (cPPT)" dizileri ve "central termination sequence (CTS)" dizileri, bölünmeyen hücrelerin enfekte edilebilmesi için önemlidir. Çünkü bu dizilerin HIV genomunun nuklear porlardan importasyonunu kolaylaştırdığı keşfedilmiştir [111]. İlk jenerasyon LV vektörlerde söz konusu dizilerin bulunmamasının sebebi, bu dizilerin öneminin henüz keşfedilmemesi kaynaklıdır. Ancak üçüncü nesil vektörlerin transfer plazmidine eklenen "cPPT ve CTS" dizilerinin hem viral vektör üretim titresinin hem de hedef hücrede terapötik gen ekspresyonunun artmasına yardımcı olduğu görülmüştür [91, 111, 119]. Üçüncü jenerasyon vektörlere ayrıca "WPRE" (woodchuck hepatitis B post-transcriptional regulatory element) gibi post transkripsiyonel düzenleyici diziler eklenerek, vektörün taşıdığı terapötik gene ait RNA'nın hem sitozolde hem de nukleus içerisinde daha uzun süre degrede olmadan kalabilmesi, böylece terapötik protein üretiminin arttırılması hedeflenmiştir. WPRE dizilerine sahip vektörlerin, sahip olmayanlara kıyasla terapötik geni 2 ile 5 kat daha fazla eksprese edebildikleri tespit edilmiştir [111, 114, 119].

İkinci ve üçüncü jenerasyon LV vektörler kıyaslandığında her ikisinin de güvenli olduğu bilinmektedir ve günümüzde her iki jenerasyon da kullanılmaktadır. Ancak ikinci jenerasyonda 3 plazmid olmasına karşın, üçüncü jenerasyonda dört plazmid olması, hedef hücrelerin ko-transfeksiyonunu güçleştirmekte ve lentiviral üretim titresini düşürmektedir. Bu sebeple bazı yayınlarda psPAX2 gibi ikinci jenerasyona ait paketleme plazmidlerinin kullanımı tavsiye edilmektedir [94]. Biz de bu sebeple tezimizde ikinci jenerasyona ait paketleme plazmidi olan "psPAX2"yi kullanarak daha

yüksek vektör titresi elde etmeyi amaçladık. Bunun yanı sıra "SIN özelliği" sayesinde güvenliği çok daha yüksek, ayrıca cPPT ve WPRE dizileri içeren üçüncü jenerasyon transfer plazmidi olan "pLenti-CMV-GFP-2A-puro"yu tercih ettik. Söz konusu ikinci jenerasyon paketleme plazmidi ve üçüncü jenerasyon transfer plazmidinin beraber kullanımları uyumludur.

### 2.4.4. Gen tedavisinin kısa tarihçesi ve günümüzdeki kullanımı

Genetik ve Nadir Hastalıklar Bilgilendirme Merkezi (GARD), günümüze kadar rapor edilen 7136 hastalığın %80'inden fazlasının disfonksiyonel genlerden kaynaklandığını, dünya genelinde 300 milyondan fazla kişinin genetik hastalıklardan etkilendiğini, buna karşın 7136 hastalığın sadece 500 tanesinin konvansiyonel ya da cerrahi yöntemlerle tedavi edilebildiğini, geri kalanı için tedavi yöntemi olmadığını rapor etmiştir [120]. Bu durum özellikle genetik temelli hastalıklar için yeni tedavi modellerinin geliştirilmesinin zorunlu olduğunu açıkça ortaya koymakta olup, araştırmacıları gen terapileri alanında çalışmaya sevketmektedir. Günümüzde sadece genetik temelli hastalıklar değil, başta kanser olmak üzere pek çok kardiyovasküler ve enfeksiyon hastalıkları için de çeşitli gen terapisi araştırmaları yürütülmektedir [121].

1980 yılında Kalifornia Üniversitesi'nden Martin Kline, iki beta talasemi hastası üzerinde ilk izinsiz gen terapisi çalışmasını yürütmüş, ancak daha sonra Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) düzenlemelerini çiğnediği için hakkında soruşturma açılmıştır [95]. FDA tarafından izin verilen ilk gen terapisi 1990 yılında Michael Blaese ve ekibi tarafından iki ADA-SCID hastası çocuk üzerinde gerçekleştirilmiş, vektör olarak gama RV vektörler kullanılmış, çocuklardan birinde geçici iyileşme gözlenmesine rağmen, diğerinde belirgin bir iyileşme görülememiştir [80, 91]. 1990'ların sonunda Fischer ve ekibi SCID-X1 hastalığı görülen çocuklar üzerinde, gama RV vektörler kullanarak, ilk başarılı gen terapisini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada çocuklarda immün sistemin kendini yeniden düzenlediği, mevcut enfeksiyonların ortadan kalktığı ve aşılamaların etki gösterdiği görülmüştür. Bununla beraber optimize edilmemiş vektör tasarımı sebebiyle yirmi çocuktan beşinde lösemi gelişmiş ve biri hayatını kaybetmiştir [83, 95]. Ayrıca 1999 yılında ornitin transkarbamilaz (OTC) eksikliği tedavisi için AV vektörlerin kullanıldığı bir klinik araştırmaya katılan Jesse Gelsinger hayatını kaybetmiş, bu olay gen terapisi alanında çalışan bilim insanlarında şok etkisi yaratmış ve gen terapisiyle ilgili klinik araştırmalara bir süre ara verilmesine sebep

olmuştur. Tedavide kullanılan AV vektörlerin direk vücuda uygulanması sonucunda, immun sistemin şiddetli ve ani bir reaksiyon geliştirdiği, bu durumun çoklu organ yetmezliği gelişimine ve ölüme yol açtığı rapor edilmiştir [79, 80, 121]. FDA ilk kez 1998 yılında HIV enfekte bireylerde gelişen sitomegalovirüs retiniti için "Vitravene" adıyla piyasaya sunulan ve lokal olarak uygulanan gen terapisini onaylamış, ancak daha sonra bu ilaç piyasadan geri çekilmiştir [79].

2003 yılında baş ve boyun kanserlerinde kullanım için Çin Hükümeti Gıda ve İlaç Dairesi (SFDA) tarafından onaylanan ilk gen terapisi "Gendicine TM" piyasaya sürülmüştür. Gendicine TM, tüm kanserlerin %50'sinden fazlasında görülen p53 mutasyonunu tedavi etmek amacıyla üretilmiş olup, p53 geni taşıyan AV vektörlerin tümör içerisine enjeksiyonuyla uygulanmaktadır. Bu olay, gen terapisi tarihinde önemli bir mihenk taşı olarak kabul edilmekle beraber, takip eden yıllarda yine Çin'de ve daha sonra diğer ülkelerde farklı hastalıklara yönelik yeni gen terapileri onaylanarak piyasaya sürülmeye başlamıştır [79, 120]. 2011 yılında Rusya Sağlık Bakanlığı, periferal vasküler hastalık ve ekstremite iskemisinde endike olan "Neovasculogen®" adlı gen terapisini onayladıktan sonra, dünya çapında gen terapisi alanındaki ön yargılar yavaş yavaş azalarak her yıl daha da fazla gen terapisi alanında klinik çalışmaya onay verilmiştir [120].

2012 yılında ilk kez EU EMA tarafından onaylanarak piyasaya sürülen "Glybera®", batı ülkelerinde onaylanan ilk gen terapisi olmasıyla önem taşımaktadır. Gylbera®, ailevi lipoprotein lipaz eksikliği tedavisinde endike olup, vektör olarak AAV vektör temelli bir tedavidir [80, 122]. Özellikle gen terapisi alanında onaylanan ilaçlar 2015 yılı itibarıyla hızla artmaya başlamış, neredeyse her yıl birden fazla yeni ilaç onay almaya başlamıştır. Sadece 2016 yılında 4 gen terapisi onaylanarak piyasaya sürülmüştür. "Strimvelis®" 2016 yılında onaylanarak piyasaya sürülen ilk "*ex vivo* gen terapisi" olup ADA-SCID hastalığında endikedir [79].

LV vektörler, ilk kez 2003 yılında HIV tedavisi amacıyla klinik araştırmalarda uygulanmaya başlamış olup, herhangi bir proto-onkogeni aktive etmedikleri ve onkolitik aktivite göstermedikleri gözlenmiştir [91, 95]. "Kymriah®" 2017 yılında FDA tarafından (takiben 2018 EMA) onaylanarak piyasaya sürülmüş olan "ilk LV vektör tabanlı otolog *ex vivo* gen terapisi"dir [79]. Kymriah®, lenfoblastik lösemi için geliştirilen, LV tabanlı bir CAR-T hücre (kimerik antijen reseptör T hücresi) tedavisidir. Bu tedavide hastadan toplanan T hücreleri, LV vektörler tarafından taşınan

terapötik bir genle transdükte edildikten sonra hastaya geri enjekte edilerek, vücuttaki CD19+ malign ve malign olmayan hücreleri tanıyarak yok etmeleri sağlanır. Söz konusu terapinin başarı oranının %83 civarında olduğu rapor edilmiştir [120]. 2019 yılında EMA tarafından beta talasemi tedavisi için onaylanarak piyasaya sürülen "Zynteglo®", dünya çapında piyasaya sürülen "ikinci LV vektör tabanlı otolog *ex vivo* gen terapisi"dir [122].

2019 yılında yayınlanmış bir yayında söz konusu tarihe kadar 204 ülkeden toplamda 3704 gen terapisi klinik çalışmasının onaylandığından bahsedilmektedir [120]. Aynı yıla ait başka bir yayında, son zamanlarda gen terapisi için *ex vivo* yöntem kullanılacaksa LV vektörlere, *in vivo* yöntem kullanılacaksa AAV vektörlere odaklanıldığından bahsedilmektedir [83]. 2021 yılında yayınlanan diğer bir yayında ise yine benzer şekilde gen terapisinde kullanılmak üzere en çok tercih edilen vektörlerin AV vektörler, AAV vektörleri ve LV vektörler olduğu belirtilmektedir [123].

Günümüz klinik araştırmalarında gen terapisinin en çok kullanıldığı hastalıkların başında açık ara farkla çeşitli kanser türleri gelmekte, bunu takiben sırasıyla çok çeşitli genetik hastalıklar, enfeksiyon hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve diğerleri yer almaktadır [121].

Mevcut klinik araştırmalarda LV vektörlerin kullanıldığı hastalıklar, akut lenfoblastik lösemi, ADA-SCID, yaşa bağımlı maküler dejenerasyon, non-Hodgkin lenfoma, serebral adrenolökodistrofi (CALD), beta talasemi, orak hücre anemisi, fankoni anemisi, HIV enfeksiyonu, lenfoma türleri, multipl miyeloma, Wiskott-Aldrich sendromu ve Covid-19 enfeksiyonu olarak sayılabilir [123].

Aşağıdaki tabloda 2020 yılına kadar dünya sağlık otoriteleri tarafından onay almış olan gen terapisi ilaçları yer almaktadır [121, 122].

**Tablo 2.3:** 2020 yılına kadar onaylanarak piyasaya sürülmüş gen terapileri [121, 122].

| İlaç adı | Endikasyonu | Tedavi alanı | Yılı | Ülke / Onaylayan Kurum | Vektör türü | Yöntem |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Vitravene | Sitomegalovirüs retinitis | Oftalmik hastalıklar | 1998/99 | US FDA ve EU EMA | Oligonükleotid | in vivo |
| Gendicine | Baş ve boyun kanseri | Kanser | 2003 | Çin/SFDA | Adenovirus tip 5-p53 | in vivo |
| Oncorine | Nazofaringeal kanser | Kanser | 2005 | Çin/SFDA | Adenovirus serotip 5 | in vivo |
| Rexin-G | Yumuşak doku sarkomu, Osteosarkom, pankreas CA | Kanser | 2007 | Filipinler BFAD | Retroviral dnG1 | in vivo |
| Neovasculogen | Aterosklerotik periferal arteriyel hastalık | Kardiyovasküler hastalıklar | 2011 | Rusya/Sağlık Bakanlığı | Plasmid-VEGF | in vivo |
| Gylbera | Familiyal lipoprotein lipaz | Nadir hastalıklar | 2012 | EU EMA | rAAV1-LPL | in vivo |
| Kynamro | Homozigot familyal hiperkolesterolemi | Nadir hastalıklar | 2013 | US FDA | Oligonukleotid | in vivo |
| Imlygic | Melanoma | Kanser | 2015 | US FDA | HSV-1-GM-CSF | in vivo |
| Strimvelis** | ADA SCID | Nadir hastalıklar | 2016 | EU EMA | Retroviral-ADA | ex vivo (otolog hücreler) |
| Zalmoxis* | Immun sistem HSCT transplant | Nadir hastalıklar | 2016 | EU EMA | Retroviral-ΔLNGFR | ex vivo (allojenik hücreler) |
| Exondys 51 | Duschenne müsküler distrofi | Nadir hastalıklar | 2016 | US FDA | Oligonukleotid | in vivo |
| Spinraza | Spinal müsküler distrofi | Nadir hastalıklar | 2016/17 | US FDA ve EU EMA | Oligonukleotid | in vivo |
| Invossa* | Diz osteoartrit | Osteoartrit | 2017 | Kore MFSD | Retroviral-TGF | ex vivo (allojenik hücreler) |
| Kymriah*** | Akut lenfoblastik lösemi | Nadir hastalıklar | 2017/18 | US FDA ve EU EMA | Lentiviral-CD19 | ex vivo (otolog hücreler) |
| Yescarta** | Büyük B hücreli lenfoma | Nadir hastalıklar | 2017 | US FDA ve EU EMA | Retroviral-CD20 | ex vivo (otolog hücreler) |
| Luxturna | RPE65 mutasyon kaynaklı retinal distrofi | Nadir hastalıklar | 2017/18 | US FDA ve EU EMA | rAAV2-PRE65 | in vivo |

**Tablo 2.3:** 2020 yılına kadar onaylanarak piyasaya sürülmüş gen terapileri (devam)

| **İlaç adı** | **Endikasyonu** | **Tedavi alanı** | **Yılı** | **Ülke / Onaylayan Kurum** | **Vektör türü** | **Yöntem** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tegsedi | Amiloidoz | Nadir hastalıklar | 2018 | EU EMA | Oligonukleotid | in vivo |
| Onpattro | Amiloidoz | Nadir hastalıklar | 2018 | US FDA ve EU EMA | Lipid comlex-siRNA | in vivo |
| Collategene | Ekstremite iskemisi | Kardiyovasküler hastalıklar | 2019 | Japonya MHLV | Plazmid-HGF | in vivo |
| Waylivra | Ailevi şilomikronemi sendrom | Nadir hastalıklar | 2019 | EU EMA | Oligonukleotid | in vivo |
| Zolgensma | Spinal müsküler atrofi | Nadir hastalıklar | 2019 | US FDA | rAAV9-SMN1 | in vivo |
| Zynteglo*** | Beta talasemi | Nadir hastalıklar | 2019 | EU EMA | Lentiviral-beta globulin | ex vivo (otolog hücre) |
| Givlaari | Akut hepatik porfiri | Nadir hastalıklar | 2019 | US FDA ve EU EMA | Oligonukleotid | in vivo |

*: Allojenik hücrelerin kullanıldığı ex vivo gen terapileri

**: Otolog hücrelerin kullanıldığı ex vivo gen terapileri

***: Hem lentiviral vektörlerin hem de otolog hücrelerin kullanıldığı ex vivo gen terapileri

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 3.1. Gereç

### 3.1.1. Cihazlar

Aşağıdaki tabloda tez deneylerinde kullanılan cihazlar ve aletler yer almaktadır.

**Tablo 3.1:** Tez deneylerinde kullanılan cihazlar / aletler ve kullanım amaçları

| **Cihaz adı** | **Marka** | **Kullanım amacı** |
|---|---|---|
| Otomatik pipetler | CAPP, Eppendorf | Tüm moleküler çalışmalar |
| Otoklav | Nüve | Besiyerleri ve laboratuvar malzemelerinin sterilizasyonu |
| Distile su cihazı | Sartarius Stedim | Tüm moleküler çalışmalar |
| Ultra saf su cihazı | Sartarius Stedim | dd$H_2O$ gerektiren tüm moleküler çalışmalar |
| Analitik terazi | Precisa | Kimyasal madde miktarı ölçümü |
| Vorteks | Stuart | Küçük hacimli solüsyon/süspansiyonların homojenizasyonu |
| Spin cihazı | Labnet | Küçük hacimli solüsyon/süspansiyonların karıştırılarak dibe çöktürülmesi |
| Santrifüj | Hettich | Düşük hacimli süspansiyonların yüksek hızda ayrıştırılması (max:14000 rpm) |
| Santrifüj | Nüve | Büyük hacimli süspansiyonların ayrıştırılması |
| Santrifüj | Hermle | Hücre kültürü çalışmalarında hücre ve dokuların çöktürülmesi |
| Isıtıcı blok | Denville Scientific | Küçük hacimli solüsyon/süspansiyonların ısıtılması |
| Buz makinesi | Scotsman | Düşük sıcaklıkta çalışılması gereken koşullar için kırık buz eldesi |
| Derin dondurucu (-20˚C) | Uğur | Numunelerin uzun süreli muhafazası |
| Derin dondurucu (-80˚C) | Haier | Numunelerin uzun süreli muhafazası |
| Buzdolabı (+4˚C) | Arçelik | Numunelerin uzun süreli muhafazası |
| pH metre | Hanna Instruments | Tampon / solüsyonların pH ölçümü |
| Isıtıcılı manyetik karıştırıcı | Stuart | Çözeltilerin hazırlanması |
| Çalkalayıcılı inkübatör | Benchmark | Mikroorganizmaların uygun sıcaklıklarda kültüre edilip çoğaltılması, dokuların enzimatik parçalanması |
| Etüv | Nüve | Katı besiyerine ekilen bakterilerin uygun sıcaklıkta kültüre edilip çoğaltılması |

**Tablo 3.1:** Tez deneylerinde kullanılan cihazlar / aletler ve kullanım amaçları (devam)

| **Cihaz adı** | **Marka** | **Kullanım amacı** |
|---|---|---|
| PCR cihazı | Sacem | PCR yapımı ve restriksiyon kesimi aşamaları |
| Çeker ocak | Vortice | Agaroz jel hazırlama aşamalarında EtBr gibi toksik kimyasallardan korunabilmek |
| Yatay jel elektroforez sistemi | Major Science | Agaroz jele yüklenen PCR fragmanlarının yürütülmesi |
| Jel görüntüleme sistemi | Fusion Fx7 | Agaroz jelde yürütülen PCR fragmanlarının görüntülenmesi |
| UV-vis spektrofotometre | Thermo Scientific | DNA miktarı ve saflık ölçümleri |
| Vakum manifoldu | Welch | Plazmid purifikasyonunda yıkama solüsyonları ve atıkların uzaklaştırılması |
| Su banyosu | Nüve | Hücre kültüründe kullanılacak solüsyon ve besiyerlerinin 37 ˚C'ye ısıtılması |
| Laminar hava akışlı steril kabin | Nüve | Tüm hücre kültürü çalışmaları |
| $CO_2$'li memeli hücre kültürü inkübatörü | Nüve | Hücrelerin çoğaltılması amacıyla memeli hücre kültürlerinin inkübasyonu |
| Elektrikli otomatik pipet pompası | Isolab | Hücre kültürü çalışmalarında besiyeri değişimi |
| Işık mikroskobu | Zeiss | Hücrelerin görüntülenmesi |
| Floresan mikroskop | Zeiss | Hücrelerin görüntülenmesi |
| Mikrodalga fırın | Altus | LB besiyeri ve agaroz jel hazırlığı |
| Biyokimya otoanalizör | Architect ci 16200 | PTH ölçümü |

### 3.1.2. Kimyasallar / İlaçlar

Aşağıdaki tabloda tez deneylerinde kullanılan kimyasallar ve ilaçlar yer almaktadır.

**Tablo 3.2:** Tez deneylerinde kullanılan kimyasallar / ilaçlar / kullanım amaçları

| **Kimyasal/İlaç Adı** | **Marka** | **Kullanım Amacı** |
|---|---|---|
| DMEM/F-12 | Wisent Multicell | Memeli hücre kültüründe kullanılan bazal medyum |
| d-PBS(1x) | Wisent Multicell | Memeli hücre kültüründe hücrelerin arındırılması için kullanılan solüsyon |
| Fötal sığır serumu (FBS) | Gibco | Memeli hücre kültüründe kullanılan, çeşitli büyüme faktörleri ve besleyici maddeleri içeren serum |
| Primocin | Invivogen | Primer hücre kültüründe kontaminasyonun önlenmesi |
| Pen-Strep | Biological Industries (BI) | Hücre kültüründe kontaminasyonun önlenmesi |
| Ampisilin | Sigma-Aldrich | Hücre kültüründe kontaminasyonun önlenmesi ve bakteri kültüründe seçici ortam oluşturulması |
| Kanamisin | Sigma-Aldrich | Hücre kültüründe kontaminasyonun önlenmesi ve bakteri kültüründe seçici ortam oluşturulması |
| Puromisin | Cayman Chemical Company | Transdükte olan hücrelerin seçici olarak çoğaltılması ve diğer hücrelerin öldürülmesi |
| Polybrene | EMD Millipore | Transdüksiyon veriminin yükseltilmesi |
| Dimetil sulfoksit (DMSO) | Chem Cruz | Kriyoprezervasyon besiyeri hazırlığı |
| Absolut etanol | EMD Millipore | Bazı ticari kit solüsyonlarına ilave amaçlı, sıçan deri dezenfeksiyonu |
| Etanol (EtOH) | Emsure | Tüm malzemelerin dış yüzey dezenfeksiyonu |
| Sodyum hipoklorit | Domestos | Yüzey dezenfeksiyonu ve viral vektörlerin inhibe edilerek imhası |
| Su banyosu dezenfektanı | Isolab | Su banyosu suyu dezenfektanı |
| Hücre kültür inkübatör dezenfektanı | Eco Tech | Memeli hücre kültürü inkübatöründeki su haznesine katılan dezenfektan |
| Povidin iyot çözeltisi (%10) | Poviideks | Sıçan deri dokusunun dezenfeksiyonu |
| Povidin iyot çözeltili yıkama köpüğü (%7,5) | Betadix | Sıçan deri dokusunun yıkanması ve traşa hazırlanması |
| Steril izotonik | Turk Tipsan (TTS) | Sıçan deri dokusunun arındırılması, steril solüsyonların hazırlanması, hücre süspansiyonunun hazırlanması |

**Tablo 3.2:** Tez deneylerinde kullanılan kimyasallar / ilaçlar / kullanım amaçları (devam)

| **Kimyasal/İlaç Adı** | **Marka** | **Kullanım Amacı** |
|---|---|---|
| Tripan mavisi | Sigma-Aldrich | Canlı hücre sayımı |
| LB broth | Sigma-Aldrich | Bakteri kültürü için sıvı besiyeri hazırlanması |
| LB agar | Sigma-Aldrich | Bakteri kültürü için katı besiyeri hazırlanması |
| Agaroz | Invitrogen | Agaroz jel yapımında kullanılan temel bileşen |
| Etidyum bromür | Invitrogen | Agaroz jel yapımında, DNA moleküllerinin floresan olarak işaretlenmesi |
| DNA jel yükleme boyası (6x) | Thermo Fisher Scientific | DNA içerikli solüsyonların elektroforez öncesi boyanması |
| DNA markörü | Thermo Fisher Scientific | Agaroz jel elektroforezinde DNA fragmanlarının boyutlarının karşılaştırılmasında kullanılan markör |
| Tris bazı | Thermo Fisher Scientific | TAE tamponunun hazırlanması |
| EDTA | Thermo Fisher Scientific | TAE tamponunun hazırlanması |
| Glasiyal asetik asit | Sigma-Aldrich | TAE tamponunun hazırlanması |
| Kolajen kaplama solüsyonu | Cell Applications | 6 kuyulu kültür plaklarının tabanının kolajen ile kaplanması (primer doku kültürü ve LentiX hücrelerinin kültürü amacıyla) |
| Isofluran | Adeka ilaç | Hücre enjeksiyonu ve kan alımı öncesi inhalasyon yoluyla ve sedasyon amacıyla uygulanan anestezik |
| Rompun (%2) | Bayer | Tam kat deri eksizyonu öncesi i.m enjeksiyonla uygulanan anestezik |
| Ketamin HCl | Doğa İlaç | Tam kat deri eksizyonu öncesi i.m enjeksiyonla uygulanan anestezik |
| Dikloron | Deva İlaç | Deri eksizyonu sonrası uygulanan ağrı kesici |
| Clamoxyl | Zoetis İlaç | Deri eksizyonu sonrası olası bir enfeksiyonu önleme amaçlı kullanılan antimikrobiyal |
| Gliserol | Sigma-Aldrich | Transforme bakterilerin -80 °C'de muhafazası |

### 3.1.3. Kitler / Enzimler

Aşağıdaki tabloda tez deneylerinde kullanılan kitler ve enzimler yer almaktadır.

**Tablo 3.3**: Tez deneyleri ve ön çalışmalarda kullanılan ticari kitler / enzimler

| **Kitler / Enzimler** | **Marka** | **Kullanım amacı** |
|---|---|---|
| Midiprep plazmid izolasyon ve purifikasyon kiti | Zymo | Plazmid izolasyon ve purifikasyonu (Tez çalışmasında kullanılmıştır) |
| Midiprep plazmid izolasyon ve purifikasyon kiti | Qiagen | Plazmid izolasyon ve purifikasyonu (Ön çalışmalarda kullanılıp tüketilmiştir) |
| Transfeksiyon kiti | Takara X-fect | LentiX hücrelerinin transfeksiyonu (Yüksek transfeksiyon verimi alınmış, tez çalışmasında tercih edilmiştir) |
| Transfeksiyon kiti | Thermo Fisher TurboFect | HEK 293T hücrelerinin transfeksiyonu (Ön çalışmalarda denenmiş, istenilen verim alınamamıştır) |
| Transfeksiyon kiti | Invitrogen Lipofectamine 2000 | HEK 293T hücrelerinin transfeksiyonu (Ön çalışmalarda denenmiş, istenilen verim alınamamıştır) |
| Transfeksiyon kiti | Invitrogen Lipofectamine 3000 | HEK 293T hücrelerinin transfeksiyonu (Ön çalışmalarda denenmiş, istenilen verim alınamamıştır) |
| TransformAid Bacterial Transformation Kit | Thermo Fisher Scientific | E. coli One Shot® Mach1™-T1R hücrelerinin kompetan hale getirilmesi ve transformasyonunda kullanılmıştır |
| Eco RI restriksiyon enzimi | Thermo Fisher Scientific | PLPT, psPAX2 ve pMD.G plazmidlerinin restriksiyon kesiminde kullanılmıştır |
| Liberase TL | Roche | Deri dokusunun enzimatik parçalanması amacıyla kullanılmıştır |
| Tripsin/EDTA (%0,25) | Wisent Multicel | Hücrelerin pasajlanması amacıyla plaktan ayrıştırılabilmesi için kullanılmıştır |
| Xbal restriksiyon enzimi | Thermo Fisher Scientific | PLPT ve pEGFP-N1-hPTH plazmidlerinin restriksiyon kesiminde kullanılmıştır |
| GeneJET Gel Extraction Kit | Thermo Fisher Scientific | hPTH gen bölgesinin jelden ekstraksiyonu ve purifikasyonu amacıyla kullanılmıştır |
| GeneJET PCR Purification Kit | Thermo Fisher Scientific | Restriksiyon kesimi sonrasında PLPT plazmidinin purifikasyonu amacıyla kullanılmıştır |
| Rapid DNA Ligation Kit | Thermo Fisher Scientific | Transfer plazmidi (PLPT) ve terapötik genin (hPTH) ligasyonu amacıyla kullanılmıştır |
| Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix | Thermo Fisher Scientific | Ligasyon ve transformasyonun doğrulanması için koloni PCR yapımında kullanılmıştır |
| PTH ölçüm kiti | Architect Intact PTH | Besiyeri ve serumdan hPTH tayini |

### 3.1.4. Besiyerleri

Aşağıdaki besiyerlerinin hazırlığında kullanılan malzemelerin markası için bkz: "Kimyasallar / İlaçlar"

#### 3.1.4.1. Doku besiyeri

Bu besiyeri, sıçandan deri dokusu alındıktan sonra, dokunun laboratuvara götürülerek çalışmaya başlanan zamana kadar içinde muhafaza edildiği besiyeridir. Primer kültür besiyerine kıyasla Pen-Strep oranı daha yüksek olup, 37 °C'ye ısıtıldıktan sonra kullanılmaktadır. Aşağıdaki malzemeler, belirtilen oranlarda karıştırılarak toplamda 20 ml olacak şekilde hazırlanılır:

- %20 fötal sığır serumu (FBS)
- %4 Pen-Strep
- %0,2 Primocin
- DMEM/F-12 besiyeri

#### 3.1.4.2. Hazırlık besiyeri

Bu besiyeri, deri dokusunun yağlı hipodermis bölgesi kazınarak ayrıştırıldıktan sonra, dokunun enzimatik parçalanma aşamasına kadar içinde muhafaza edildiği, böylece hem dokuyu kurumaya karşı koruyan, hem de dokudaki FBS ve diğer maddeleri uzaklaştırmak için kullanılan bir besiyeridir. Aşağıdaki malzemeler, belirtilen oranlarda karıştırılarak toplamda 20 ml olacak şekilde hazırlanılır:

- %3 Pen-Strep
- %0,2 Primocin
- DMEM/F-12 besiyeri

#### 3.1.4.3. Enzimatik parçalama besiyeri

Sıçandan eksize edilen deri numunesinin enzimatik olarak parçalanması amacıyla hazırlanan besiyeridir. Diğer besiyerlerinden farklı olarak, kullanım amacı hücrelerin beslenmesinden ziyade, dokunun enzimatik olarak parçalanmasıdır. Hücreler ile küçük doku parçalarının birbirlerinden ve ortamdaki ekstraselüler matriks elemanlarından (kolajen, elastin, yağ vs...) ayrıştırılabilmesi için kullanılır. Bu besiyerinin temel bileşeni, içerisinde Tip I ve II kolajenaz türleri ile thermolizin barındıran "Liberase TL" enzimidir.

Liyofilize olarak temin edilen Liberase TL, 2 ml steril dd$H_2O$ içinde çözündürülür ve kullanıma hazır şekilde -20 °C'de muhafaza edilir. Enzimatik parçalama besiyeri,

primer doku kültürünün hemen öncesinde taze olarak hazırlanarak, hemen kullanılır. Aşağıdaki malzemeler, belirtilen oranlarda karıştırılarak toplamda 4 ml olacak şekilde hazırlanılır:

- DMEM/F12 (4 ml)
- Liberase TL (150 µL)
- %1 Pen-Strep
- %0,2 Primocin

### 3.1.4.4. Primer kültür besiyeri

Primer hücre kültürü amacıyla kullanılan besiyeri olup, başta fibroblastlar ve dermal kökenli kök hücrelerinin sağlıklı bir şekilde üretilmesi için kullanılır. Aşağıdaki malzemeler, belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlanır:

- %15 FBS
- %1 Pen-Strep
- %0,2 Primocin
- DMEM/F-12

### 3.1.4.5. LentiX besiyeri

LentiX hücre kültüründe kullanılan besiyeri olup, LentiX hücrelerinin sağlıklı bir şekilde üretilmesi için kullanılır. Aşağıdaki malzemeler, belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlanır:

- %10 FBS
- %1 Pen-Strep
- %0,1 Primocin
- DMEM/F-12

### 3.1.4.6. Kriyoprezervasyon besiyeri

Bu besiyeri, primer hücrelerin, LentiX hücre hattının ve HEK 293T hücre hattının -80 °C'de mümkün olduğunca soğuktan zarar görmeden muhafaza edilebilmesi için kullanılmaktadır. Besiyerinin içeriğindeki dimetil sülfoksit (DMSO), hücreleri ani ısı değişimleri şokundan korumakla beraber, normal kültür şartları altında hücreler için toksiktir ve kültürden uzaklaştırılmalıdır. Normal kültür şartlarında kullanılan antimikrobiyal ajanlar da, dondurma aşamasında hücrelere zarar verebileceğinden kullanımları tercih edilmez. Bu besiyeri için aşağıdaki malzemeler, belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlanır.

- %10 DMSO
- %20 FBS
- %70 DMEM/F-12

### 3.1.4.7. Transdüksiyon besiyeri

Bu besiyeri, diğerlerinden farklı olarak sadece hücreleri beslemek için değil, primer hücrelerin transdükte edilebilmesi amacıyla kullanılır. Viral vektör üretimi sonrası elde edilen viral sıvının primer hücrelerde kullanılacak optimum konsantrasyonunun belirlenebilmesi için, HEK293T hücrelerinde farklı "viral sıvı / besiyeri konsantrasyon" denemeleri yapıldıktan sonra aşağıdaki malzemeler, belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlanır:

- 2 ml viral sıvı (bkz: "lentiviral vektörlerin üretimi")
- Polybrene 10 µg/mL
- %10 FBS
- DMEM/F-12
- %1 Pen-Strep
- %0,1 Primocin

### 3.1.4.8. Dekontaminasyon besiyeri

Bu besiyeri, eğer primer hücre kültüründe düşük yoğunluklu bir bakteri kontaminasyonu tespit edilirse, iki günde bir kez değiştirilmek üzere 1 hafta kullanılarak hücre kültürlerini dekontamine etmek amacıyla kullanılır. Aşağıdaki malzemeler, belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlanır:

- %20 FBS
- %4 Pen-Strep
- %0,2 Primocin
- 100 µg/ml ampisilin
- 75 µg/ml kanamisin
- DMEM/F-12

### 3.1.4.9. Luria bertani sıvı besiyeri (LB broth)

Bu besiyeri hücre kültürü için değil, bakteri kültürü için kullanılan standart sıvı besiyeridir. Sigma-Aldrich markasından temin edilen toz besiyerinin içeriğinde 5 g/L maya, 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl bulunmaktadır.

200 ml LB sıvı besiyerinin hazırlanabilmesi için 4g. toz LB broth, steril bir erlendeki 200 ml $dH_2O$ içerisinde karıştırılarak çözündürülür. Erlenin ağız kısmı alüminyum bir

folyo ile kapatılarak besiyeri otoklavda 121 °C'de 1,5 Atm basınçta 20 dakika boyunca sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilir.

Bu besiyeri PLPT, psPAX2 ve pMD.G plazmidleri ile transforme olmuş bakterilerin (trBac-PLPT+hPTH, trBac-psPAX2, trBac-pMD.G) çoğaltılması için kullanılır. Söz konusu bakterileri seçici olarak çoğaltabilmek için trBac-PLPT+hPTH besiyerine 75 µg/mL kanamisin, trBac-psPAX2 ve trBac-pMD.G besiyerlerine ise 100 µg/mL ampisinin katıldıktan sonra bakteri inokülasyonu gerçekleştirilir.

#### 3.1.4.10. Luria bertani katı besiyeri (LB agar)

Bu besiyeri hücre kültürü için değil, bakteri kültürü için kullanılan standart katı besiyeridir. Sigma-Aldrich markasından temin edilen toz besiyerinin içeriğinde 5 g/L maya, 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 15g/L agar bulunmaktadır.

200 ml LB sıvı besiyerinin hazırlanabilmesi için 6,4 g. toz LB agar, steril bir erlendeki 200 ml $dH_2O$ içerisinde karıştırılarak çözündürülür. Erlenin ağız kısmı alüminyum bir folyo ile kapatılarak besiyeri otoklavda 121 °C'de 1,5 Atm basınçta 20 dakika boyunca sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilir.

Bu besiyeri PLPT+hPTH ile transforme olmuş E.coli suşunun (trBac-PLPT+hPTH) transformasyondan hemen sonra seçici olarak çoğaltılması için kullanılır. Söz konusu bakterileri seçici olarak çoğaltabilmek için hazırlanan besiyerinin sıcaklığı ortalama 50-55 °C'ye düştüğünde bu besiyerine 75 µg/mL kanamisin katıldıktan sonra steril petrilere eşit şekilde bölüştürülecek şekilde dökülür ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılır. Petriler içerisinde katılaştırılan besiyerine trBac-PLPT+hPTH ekimi yapılarak 37 °C'de inkübe edilir. Geri kalan katı besiyerleri sonraki kullanımlar için +4 °C'de muhafaza edilebilir.

### 3.1.5. Solüsyon ve Tamponlar

Aşağıdaki solüsyon ve tamponların hazırlığında kullanılan malzemelerin markası için bkz: "Kimyasallar / İlaçlar"

#### 3.1.5.1 TAE Tamponu

TAE tamponu elektrolitler açısından zengin bir solüsyon olup, elektroforez tankının içerisine doldurularak iletkenliği arttırmak için ve agaroz jel hazırlama aşamalarında kullanılır. TAE tamponu hazırlık aşamasında 50x olarak hazırlanılır. 1 litre TAE (50x) hazırlamak için aşağıdaki malzemeler, belirtilen oranlarda karıştırılır:

- 242 g Tris bazı
- 57,1 ml glasial asetik asit
- 100 ml EDTA (50 mM) (pH:8)
- $dH_2O$

Öncelikle Tris, bir miktar $dH_2O$ içerisinde tümüyle çözündürüldükten sonra üzerine glasial asetik asit ve EDTA solüsyonları eklenilir. Elde edilen karışımın final hacmi 1 lt olana kadar $dH_2O$ ilave edilir ve tüm malzemelerin karışması sağlanılır.

Elde edilen TAE (50x) kullanım öncesi, dH2O ile 1/50 oranında seyreltilerek TAE (1x) hazırlanılır ve hem agaroz jel hazırlığında hem de elektroforez tankında bu konsantrasyonda kullanılır.

### 3.1.5.2 Agaroz Jel

Elde edilen PLPT, PAX ve PMD plazmidlerinin doğrulanması amacıyla, restriksiyon enzim kesimi yapıldıktan sonra, %0,8'lik agaroz jel hazırlanılır. Aşağıdaki malzemeler, belirtilen oranlarda karıştırılarak toplamda 100 ml olacak şekilde hazırlanılır:

- 0,8 gr. agaroz
- 100 ml TAE (1x)
- 0,5 µg/mL etidyum bromür (EtBr)

0,8 gr. agarozu 100 ml TAE (1x) içerisinde çözündürebilmek için malzemeler bir behere dökülerek, mikrodalga fırına atılır ve ara ara karıştırarak kaynayana kadar beklenilir. Kaynama sıcaklığında agaroz tümüyle erimiş olur.

Erimiş agaroz solüsyonu ortalama 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine EtBr eklenilerek hafifçe karıştırılır ve katılaşmaya başlamadan önce, içerisine tarak yerleştirilmiş olan agaroz jel tepsisine dökülür. Jel, katılaştıktan sonra kullanıma hazır hale gelir.

pEGFP-N1-hPTH plazmidinin restriksiyon kesimi sonrası hPTH gen bölgesinin pEGFP-N1 plazmidinden ayrıştırılabilmesi için uygulanan agaroz jel elektroforezi için ise %1'lik agaroz jel hazırlanır. 0,8 gr agaroz yerine 1 gr. agaroz kullanılarak hazırlanılır.

### 3.1.6. Ökaryot hücreler ve mikroorganizmalar

#### 3.1.6.1. Ökaryot hücreler

- **Otolog primer hücreler:** Eksize edilen sıçan deri numunesinin laboratuvar koşulları altında mekanik ve enzimatik parçalanması sonrası kültüre edilmesiyle oluşturulmış olan, her deney sıçanı için ayrı olarak kültüre edilip üretilen hücrelerdir. *Ex vivo* ortamda her sıçana özel olarak kültüre edilen otolog primer hücrelere terapötik gen nakli (hPTH) gerçekleştirildikten sonra, söz konusu hücreler sıçana geri enjekte edilirler. Otolog primer hücre kültürü heterojen bir kültür olup, kültürün büyük bir kısmını primer fibroblastlar ve çok daha az bir kısmını da dermal kökenli kök hücreler oluşturmaktadır.
- **LentiX hücre hattı:** Transforme edilmiş insan embriyonik böbrek hücre hattının (HEK 293T) bir alt suşu olup, yüksek oranda transfekte olabilen ve LV vektör üretebilen bir hücre hattıdır. LV vektörlerin üretimi için kullanılan bir hücre hattı olup, Takara firmasından satın temin edilmiştir.
- **HEK293T hücre hattı:** Transforme edilmiş insan embriyonik böbrek hücre hattıdır. Primer hücrelerin transdüksiyonu öncesi, elde edilen viral sıvıdaki ortalama lentiviral vektör yükünün ve optimum transdüksiyon oranının tayini amacıyla kullanılır. Daha önce çalışılan başka bir proje esnasında üniversite tarafından satın alınarak laboratuvarımızda -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.1.6.2 Mikroorganizmalar

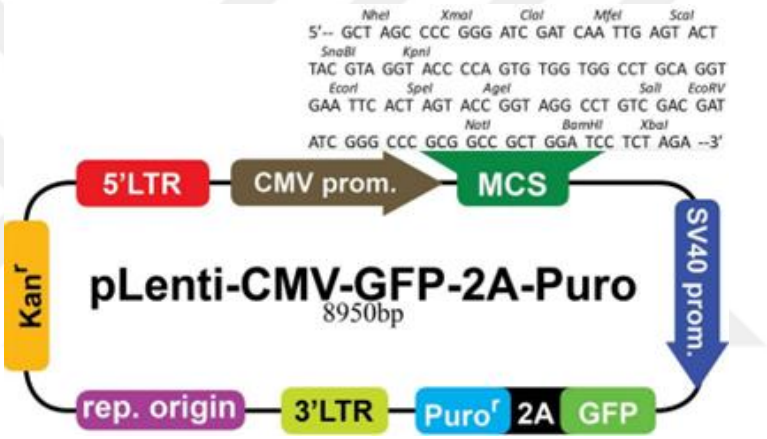
- **E. coli One Shot® Mach1™-T1R:** LV vektör üretiminde kullanılan rekombinant transfer plazmidinin (PLPT+hPTH) çoğaltılabilmesi için konakçı mikroorganizma (m.o) olarak kullanılmıştır. E. coli One Shot® Mach1™-T1R hücreleri önce kompetan hale getirilip, sonra PLPT+hPTH plazmidi ile transforme edilmiştir.

### 3.1.7. Plazmidler

Lentiviral vektörlerin üretilebilmesi için üç adet plazmid kullanılmıştır: Rekombinant transfer plazmidi (PLPT+hPTH), paketleme plazmidi (psPAX2) ve zarf proteinleri plazmidi (pMD.G).

### 3.1.7.1. Transfer plazmidi: “pLenti-CMV-GFP-2A-Puro” (PLPT)

Üçüncü jenerasyon SIN özellikli lentiviral transfer plazmidi olan PLPT, terapötik gen bölgesini taşımak (hPTH) ve hedef hücrelerin genomuna başarılı şekilde entegre edebilmek için kullanılır. “abm” tedarikçisinden boş plazmid olarak temin edilmiştir. Daha sonra bu plazmide terapötik gen olan hPTH geni entegre edilerek rekombinant bir transfer plazmidi oluşturulmuştur (PLPT+hPTH). Üretilen rekombinant transfer plazmidi, “E. coli One Shot® Mach1™-T1R” hücrelerine transforme edildikten sonra, çoğaltılarak kullanım zamanına kadar -80 °C’de stoklanmıştır. PLPT plazmidi kanamisin ve puromisin direnç genleri, CMV promotor bölgesi ve GFP raportör gen bölgesi taşımaktadır. 8950 bp uzunluğundadır. Aşağıdaki şekilde söz konusu plazmide ait vektör haritası yer almaktadır.




**Şekil 3.1:** pLenti-CMV-GFP-2A-Puro (PLPT) plazmidinin vektör haritası

### 3.1.7.2. Paketleme plazmidi: psPAX2

İkinci nesil lentiviral paketleme plazmididir. İkinci veya üçüncü nesil transfer plazmidleriyle beraber kullanımı uygundur. Lentiviral vektöre ait olan yapısal viral proteinleri kodlar (gag ve pol genleri). “Addgene” tedarikçisinden E.coli hücrelerine transforme edilmiş şekilde temin edilmiştir, çoğaltılarak kullanım zamanına kadar -80 °C’de stoklanmıştır. Ampisilin direnç genine sahiptir. 10703 bp uzunluğundadır.

### 3.1.7.3. Zarf proteinlerini kodlayan plazmid: pMD.G

VSV-G gen bölgesini içeren, vesicular stomatitis virüse ait viral zarf glikoproteinlerini kodlayan plazmiddir. Pek çok memeli hücre türüne tropizm gösterdiği ve vektörlerin hem saflaştırılması hem de stoklanması aşamasında dayanıklılığı arttırdığı için tercih edilmektedir. “Addgene” tedarikçisinden E.coli hücrelerine transforme edilmiş şekilde

temin edilmiştir, çoğaltılarak kullanım zamanına kadar -80 °C'de stoklanmıştır. Ampisilin direnç genine sahiptir. 6010 bp uzunluğundadır.

### 3.1.8. Sarf Malzemeleri

**Tablo 3.4:** Tez deneylerinde kullanılan sarf malzemeleri ve kullanım amaçları

| **Malzeme adı** | **Marka** | **Kullanım yeri / amacı** |
|---|---|---|
| Tek kullanımlık otomatik pipet uçları | Isolab | Tüm moleküler ve hücre kültürü çalışmaları |
| Tek kullanımlık steril pipetler(5ml, 10 ml, 20 ml) | CAPP | Hücre kültürü çalışmalarında besiyeri değişimi |
| 6 kuyulu hücre kültürü plağı | Nest | Hücrelerin kültüre edilmesi |
| T-75 hücre kültürü flaskı | Nest | Hücrelerin kültüre edilmesi |
| Tek kullanımlık steril petri kabı | Nest | Deri dokusunun mekanik parçalanması aşaması ve bakteri kültürü için katı besiyerinin muhafazası |
| Steril gazlı bez | Sanus | Sıçan derisinin operasyon öncesi ve sonrası sterilizasyon ve pansumanı |
| Bistüri ucu no:21 | Braun | Deri dokusunun mekanik parçalanması |
| Makas ve penset | YS Medikal | Deri dokusunun eksize edilmesi ve manipülasyonları |
| Cerrahi dikiş iğnesi ve ipliği | Ethicon | Deri eksizyonu sonrası opere bölgenin cerrahi dikimi |
| Jelli vacutainer | BD Belliver | Kan alındıktan sonra serumun ayrıştırılması |
| Enjektör (2 ml) | Berika | Kan alımı |
| Enjektör (5ml) | Berika | Hücre süspansiyonunun enjeksiyonu |
| Enjektör (10 ml) | Berika | Viral vektör içerikli besiyerinin filtre edilmesi |
| 0,45 nm şırınga filtresi | Isolab | Viral vektör içerikli besiyerinin filtre edilmesi |
| Tek kullanımlık steril hücre kazıyıcı | Isolab | Tripsinizasyon sonrası plaktan ayrılmayan hücrelerin ayrıştırılması |
| Tek kullanımlık steril hücre süzgeci | Falcon (Corning) | Doku kültürü sonrası çoğalan hücrelerin, eski doku kalıntılarından arındırılabilmesi |
| Beher, erlen | Isolab | Çeşitli solüsyon, tampon ve bazı besiyerlerinin hazırlığı |
| Mezür | Isolab | Çeşitli solüsyon, tampon ve bazı besiyerlerinin hazırlığı |
| Ependorf tüp (1,5ml ve 2 ml) | Nest | Plazmid izolasyonu, muhafazası ve restriksiyon kesimi vs… |
| Falkon tüp 50 ml | Nest | Steril besiyerlerinin muhafazası, plazmid izolasyonu, santrifüj işlemleri vs… |
| Falkon tüp 15 ml | Nest | Bazı malzemelerin muhafazası ve santrifüj işlemleri |
| Kriyo tüp (2 ml) | Nest | Hücrelerin -80 C de muhafazası |
| Kriyo tüp kutusu | Isolab | Hücrelerin -80 C de muhafazası |
| Thoma lamı ve lamel | Isotherm | Hücre sayımı |
| Tek kullanımlık steril eldivenler | Has-Pet | Tüm laboratuvar çalışmaları |
| Otoklav bandı | LP Italiana | Sterilizasyon kontrolü |
| Parafilm | Bemis | Besiyerlerinin steril şekilde muhafazası |
| PCR tüpü | Nest | Restriksiyon kesimi ve PCR |

### 3.1.9. Deney hayvanları

Tez çalışmasında kullanılan tüm deney hayvanları "Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu"nun 2017/211 sayılı kararlarıyla onaylanmıştır. Tez çalışmasında ön çalışma için 6, tez deneyleri için 5 adet olmak üzere toplam 11 adet Wistar albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Tüm sıçanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olmak üzere standart aydınlatma, nem ve sıcaklık koşulları altında tutulmuş olup, *ad libitum* olarak beslenilmiştir.

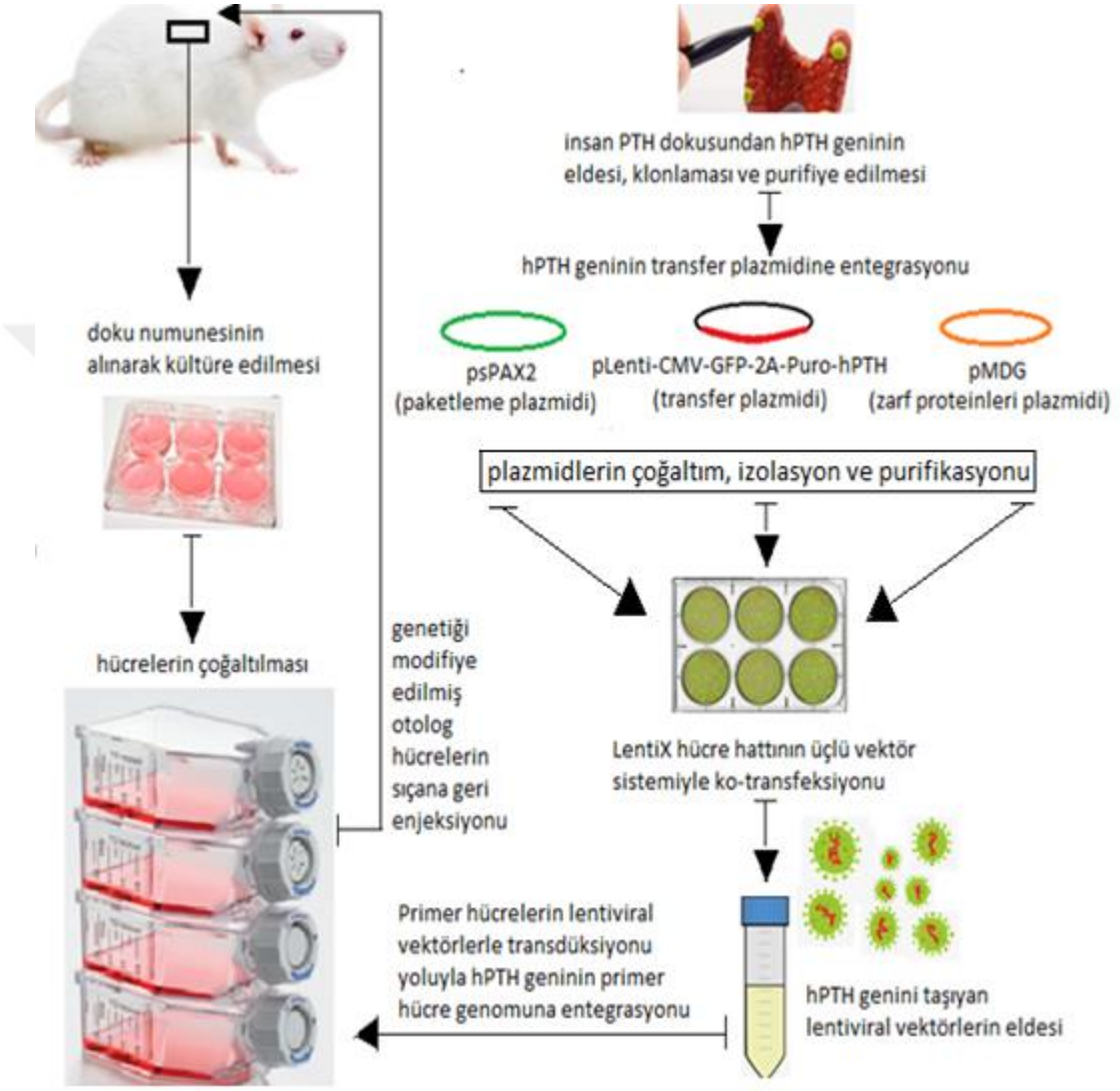
Tez çalışmamızda, laboratuvarımızda daha önce hiç denenmemiş olan "otolog primer hücre kültürü oluşturma", "transfeksiyon" ve "transdüksiyon" gibi metodlar ilk kez çalışılmıştır. Bu nedenle söz konusu metodların başarılı şekilde gerçekleştirilebilmesi, verim oranlarının arttırılarak optimize edilebilmesi için bir ön çalışmaya ve ön çalışmada kullanılacak hayvanlara ihtiyaç duyulmuştur. Ön çalışmada kullanılan 6 adet sıçanın bir kısmında sadece primer hücre kültürü oluşturma denemeleri yapılmış olup, diğer kısmında ise tez çalışmasına ait tüm deneysel aşamalar gerçekleştirildikten sonra *ex vivo* gen terapisi uygulamaları yapılmış ve sıçan vücudunda başarılı şekilde hPTH üretimi doğrulanmıştır.

Ön çalışmalar tamamlandıktan sonra, 5 deney sıçanı üzerinde tez çalışmalarına başlanılmış, her sıçandan ayrı ayrı tam kat deri numuneleri alınarak her sıçana özel otolog primer hücre kültürleri oluşturulmuş, üretilen hücrelere terapötik gen olan hPTH nakli gerçekleştirildikten sonra söz konusu hücreler sıçan vücuduna geri enjekte edilmiştir.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Giriş: Tez yöntemin genel özeti

Tez çalışmasında yapılanlar aşağıdaki şekilde oldukça genel olarak özetlenmektedir:




**Şekil 3.2:** Tez çalışma yönteminin genel özeti

#### 3.2.1.1 Ex-vivo gen terapisi için otolog primer hücre kültürünün oluşturulması

*In vivo* gen terapisine kıyasla daha güvenli ve uygulamanın daha kontrollü olması açısından *ex vivo* terapi modeli tercih edilmiştir. Bu modelde olası bir immun red reaksiyonu yaşanmaması amacıyla standart sıçan fibroblast hücre hattı değil, otolog primer hücrelerin kullanımı tercih edilmiş ve her bir sıçandan alınan deri numunesi kültüre edilerek otolog primer hücre kültürü oluşturulmuştur. Her bir çalışma sıçanı

için özel hazırlanan otolog primer hücreler, kültür ortamında çoğaltılarak gen terapisi için hazır hale getirilmiştir.

#### 3.2.1.2. İnsan paratiroid dokusundan hPTH geninin eldesi, klonlanması ve purifikasyonu

Paratireidektomi esnasında gönüllü hastalardan eksize edilen hiperplazik paratiroid dokusundan, total RNA izolasyonu ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. hPTH gen bölgesine özgü primerler ticari olarak satın alınarak, elde edilen cDNA bölgelerinden PCR ile hPTH gen bölgesi amplifiye edilmiş ve ardından purifiye edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

#### 3.2.1.3. hPTH geninin transfer plazmidine entegrasyonu

Sırasıyla gerçekleştirilen, hPTH genini taşıyan plazmidin (pEGFPN1+hPTH) ve transfer plazmidi olan "pLenti-CMV-GFP-2A-Puro"nun (PLPT) aynı restriksiyon enzimiyle kesimi ve ardından gerçekleştirilen ligasyon sonunda terapötik genin transfer plazmidine entegrasyonu sağlanarak, rekombinant bir transfer plazmidi olan "pLenti-CMV-GFP-2A-Puro+hPTH" (PLPT+hPTH) üretimi gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.1.4. Lentiviral vektör üretiminde kullanılan plazmidlerin çoğaltımı ve purifikasyonu

Lentiviral vektör üretimi için üç farklı plazmid gerekmektedir:

1) Terapötik geni taşıyan rekombinant transfer plazmidi:
   "pLenti-CMV-GFP-2A-Puro+hPTH" (PLPT+hPTH)
2) Paketleme plazmidi: "psPAX2"
3) Zarf proteinleri plazmidi: "pMD.G"

Her üç plazmidin de çoğaltılabilmesi için öncelikle bir konakçı bakteriye transformasyon yoluyla entegre olmaları gerekmektedir. PLPT+hPTH transfer plazmidi, laboratuvarımızda kompetan hale getirilen "E.coli One Shot" hücrelerine transforme edilerek, stoklanmaya ve çoğaltıma hazır hale getirilmiştir. psPAX2 ve pMD.G plazmidleri ise Addgene tedarikçisinden E.coli hücrelerine transforme edilmiş şekilde hazır olarak temin edilmiştir. Tüm plazmidler bakteri kültürü yoluyla çoğaltıldıktan sonra izolasyon ve purifikasyon aşamalarını takiben kullanıma hazır hale getirilmişlerdir.

#### 3.2.1.5. Lentiviral vektörlerin üretimi

Lentiviral vektör üretimi için konakçı olarak LentiX hücre hattı kullanılmıştır. LentiX hücrelerinin her üç plazmidle aynı anda ko-transfekte edilmesiyle terapötik gen olan "hPTH"ı taşıyan lentiviral vektör partikülleri üretilmiş ve besiyerine salınmıştır. Besiyerinin toplanıp saflaştırılmasıyla üretilen "lentiviral sıvı" için kullanım öncesi konsantrasyon analizleri yapılmıştır.

#### 3.2.1.6. Otolog primer hücrelerin transdüksiyonu

Kültür ortamında üretilerek çoğaltılan otolog primer hücreler, lentiviral sıvı ile transdükte edilerek terapötik gen olan "hPTH"ın genomlarına entegre olması ve hücrelerin hPTH üreterek salgılaması sağlanmıştır. Floresan mikroskop görüntüleri ve biyokimyasal testlerle biyolojik aktif hPTH üretimi ve salınımı doğrulanmıştır.

#### 3.2.1.7. Terapötik geni taşıyan otolog primer hücrelerin sıçana geri enjeksiyonu

Kültür ortamında hPTH nakli yapılan otolog hücreler, daha önce deri dokusu alınarak iyileşen sırt bölgesine subkutan olarak enjekte edilir. Kullanılan hücrelerin otolog olması bir yana, doku numunesinin alındığı ve geri enjeksiyonun yapıldığı bölgenin aynı olması, hücrelerin ortama daha rahat uyum sağlayarak engrafte olabilmesi içindir. Hücrelerin enjeksiyonu sonrasında belirli aralıklarla sıçandan alınan kan numunelerinde hPTH varlığının gösterilmesi "*ex vivo* gen terapisiyle hipoparatiroidi tedavisi modeli"nin geliştirilebileceğini göstermektedir.

### 3.2.2. Otolog Primer Hücre Kültürünün Oluşturulması ve Hücrelerin Çoğaltılması

#### 3.2.2.1. Doku numunesinin alınması

- I.m Rompun – Ketamin enjeksiyonuyla genel anesteziye sokulan sıçanın tüm sırt bölgesi povidin iyot katkılı yıkama köpüğü ile yıkanarak genel bir arındırma işlemi gerçekleştirilir.
- Sırttan doku alınacak bölge, povidin iyot katkılı yıkama köpüğü kullanılarak traşa hazır hale getirilir ve steril bir bistüri yardımıyla tıraş edilerek tümüyle kıllardan arındırılır.

- İlgili bölge, musluk suyuyla yıkama köpüğünden arındırıldıktan sonra, povidin iyot solüsyonu (%10) ile silinir ve 1 dakika beklenildikten sonra, önce musluk suyuyla, sonra steril izotonikle yıkanarak arındırılır.
- İkinci dezenfeksiyon için sırt bölgesi %70'lik etanol ile ıslatılarak 30 saniye beklenilir ve son olarak steril izotonikle iyice yıkanarak arındırılır.
- Genel anestezi altında sırt bölgesinden yaklaşık 2x3 cm'lik tam kat doku kesiti alınır alınmaz, daha önceden doku muhafazası için hazırlanmış ve 37 °C'ye ısıtılmış, antimikrobiyal maddeler açısından zengin doku besiyerine aktarılır (bkz: Besiyerleri).
- Dokunun alındığı bölge, cerrahi dikiş ipliği ile dikilerek kapatılır, üzeri povidin iyot solüsyonu (%10) ile dezenfekte edilerek pansuman yapılır.
- Olası bir enfeksiyon riskine karşı opere sıçana i.m antibiyotik ve ağrı kesici enjeksiyonu yapılarak (bkz: Kimyasallar / İlaçlar), iyileşme süresi için istirahate bırakılır.

#### 3.2.2.2. Doku numunesinin dezenfeksiyonu ve hazırlanması

- Doku numunesi, 50 ml'lik falkon tüp içerisindeki 20 ml'lik doku besiyerine alınır alınmaz, hızlı bir şekilde hücre kültürü laboratuvarına getirilir. Doku alma işlemi ve nakil süreci esnasında, içinde doku besiyerinin bulunduğu falkon tüp, önceden 37'ye ısıtılmış su dolu bir beher içerisine yerleştirilmiş olduğundan, sıcaklığını koruması sağlanır.
- İçerisinde dokunun bulunduğu falkon tüp, %70'lik alkol ile dezenfekte edildikten sonra steril laminar hava akışlı kabininin içerisine alınarak, bundan sonraki tüm dezenfeksiyon, hazırlık işlemleri ve mekanik parçalama steril kabin içerisinde gerçekleştirilir.
- Doku besiyerinden çıkarılan doku numunesi, 15-20 saniye boyunca %70'lik alkol solüsyonunda bekletildikten sonra, steril d-PBS(1x) içerisinde hızlıca yıkanarak arındırılır.
- Hızlı bir şekilde steril petri kabının içerisinde, iki bistüri yardımıyla dokunun yağlı hipodermis bölgesi kazınarak atılır ve epidermis+dermis bölgesi kullanıma hazır hale getirilir. Bunun sebebi enzimatik parçalama için kullanılan enzimin, yüksek yağ konsantrasyonu sebebiyle inaktive olmasını engellemektir.

- Doku, 15 ml'lik falkon tüp içerisindeki hazırlık besiyerine (bkz: Besiyerleri) alınarak birkaç kez çalkalanır. Bu besiyerinde özellikle FBS bulunmaz, doku içindeki FBS ile diğer istenmeyen kalıntıların yıkanarak uzaklaştırılması ve ayrıca dokunun kurumasını önlemek için kullanılır.
- Hazırlık besiyerindeki ilk yıkama sonrası doku, taze bir hazırlık besiyerine alınarak eski besiyeri atılır.

#### 3.2.2.3. Doku numunesinin mekanik ve enzimatik parçalanması

- Doku numunesi önce mekanik daha sonra ise enzimatik olarak parçalanarak kültüre hazır hale getirilir. Mekanik parçalama aşaması oldukça kritik olup, bu esnada hem dokunun mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılarak kıyma kıvamına getirilmesi, hem de kurumaması gerekmektedir.
- Mekanik parçalama işlemi, iki adet steril bistüri yardımıyla, steril bir petri kabının içerisinde, laminar hava akışlı kabinin içerisinde gerçekleştirilir. Doku parçası, kıyma kıvamına gelene kadar bistüriler sayesinde iyice parçalanır ve ardından, önceden hazırlanmış olan 4 ml'lik enzimatik parçalama besiyerinin içerisine atılarak çalkalanır (bkz: Besiyerleri). Sonuçta ortalama 4,5 ml'lik bulanık bir doku-enzim süspansiyonu elde edilir.
- Söz konusu doku-enzim süspansiyonu 15 ml'lik falkon tübün içerisinde, yatay pozisyonda, 90 dakika boyunca, çalkalamalı inkübatörde 250 Rpm'de 37 °C'de enzimatik parçalanmaya bırakılır.
- Enzimatik parçalama sonunda enzim inaktivasyonu için süspansiyonun üzerine 8 ml primer kültür besiyeri ilave edilerek hafifçe karıştırılır (bkz: Besiyerleri).
- Elde edilen süspansiyon iki ayrı 15 ml'lik falkon tüpe eşit şekilde bölüştürülerek oda sıcaklığında 350 G'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre ve doku parçalarının dibe çökmesi sağlanılır. Parçalanmış ekstraselüler matriks elemanlarıyla istenmeyen kalıntıları içeren supernatant dökülerek uzaklaştırılır.

#### 3.2.2.4. Parçalanmış dokudan primer doku kültürü oluşturulması

- Santrifüj sonrası çöktürülerek elde edilen iki ayrı 15 ml'lik falkon tüpün dibindeki hücre ve doku pelletinin üzerine 4,8 ml primer hücre kültürü besiyeri eklenilerek (bkz: Besiyerleri), doku parçalarının besiyerinde iyice süspanse olması için hafifçe karıştırılır.

- Oluşturulacak ilk kültür için iki adet 6 kuyuluk hücre kültürü plağı kullanılır. Plağın her bir kuyusuna 800 µL hücre-doku süspansiyonu eklenilerek, süspansiyonun kuyunun tüm tabanına dağılması sağlanır. Primer kültürün ilk oluşturulmasında kullanılan besiyeri miktarının, normal hücre kültüründe kullanılan besiyeri miktarına kıyasla daha düşük tutulmasının sebebi, doku parçalarının ve hücrelerin plağın dibine daha kolay yapışabilmesidir. Bu sayede kültür verimi önemli ölçüde arttırılır. İlk doku kültürünün oluşturulduğu gün, kültürün 0. günü olarak kabul edilir.
- Hazırlanan doku kültürü, %5'lik $CO_2$'li memeli hücre kültürü inkübatöründe 37 °C'de 18-20 saat süreyle inkübasyona bırakılır.
- Kültürün kurumaması için 18-20 saat sonrasında (kültürün 1. günü) kültür plağının her kuyucuğun üzerine çok yavaş bir şekilde (plağın dibine yapışan dokuların tekrar ayrışmaması için) 200 µL daha taze besiyeri ilave edilir. Kültür, tekrar inkübasyona bırakılır.
- Kültürün 2. gününde her bir kuyuya 500 µL daha taze besiyeri ilave edilerek tekrar inkübasyona bırakılır.
- Kültürün 3. gününde kültür plağı invert bir mikroskop altında incelendiğinde küçük doku parçalarının plağın dibine yapıştığı ve bu parçaların kenarlarından yeni kök hücreler ve fibroblastların çoğalmaya ve yayılmaya başladıkları gözlemlenir.
- Kültürün üçüncü gününde, eski besiyeri uzaklaştırılarak, 6 kuyulu plağın her bir kuyusuna yavaş bir şekilde 1,5 ml taze besiyeri ilave edilerek tekrar $CO_2$'li inkübatörde 37 °C'de inkübasyona bırakılır. Bu esnada plağa yapışan doku parçalarının ayrışmaması için yavaş pipetaj yapılmalıdır, yine bu sebeple üçüncü günde d-PBS(x1) ile yıkama yapılmaz.
- Kültürün 5. gününde yeni oluşan hücrelerin daha da hızlı şekilde bölünerek üremeye devam ettikleri gözlemlenir. 5. günde plağın dibine yapışıp hücre üretimi yapmayan doku kalıntılarını uzaklaştırmak ve besiyerini tazelemek için eski besiyeri atıldıktan sonra, kültür plağının her kuyusuna yavaşça 1 ml steril d-PBS(1x) ilave edilerek ortalama 1-2 dakika beklenilir ve bir pipetle çekilerek uzaklaştırılır. Söz konusu d-PBS(1x) ile yıkama işlemi 2 kez tekrarlanarak kültür ortamı arındırılır.

- Kültür plağının her bir kuyusuna 1,5 ml taze primer kültür besiyeri eklenilerek tekrar inkübasyona bırakılır. Hücreler günler içerisinde bölünerek çoğalmaya devam eder.
- Kültürün 7. gününde d-PBS(x1) ile yıkama ve besiyeri değişimi tekrarlanılır.
- Her sıçandan primer kültür oluşturulurken aynı protokoller uygulanmasına rağmen, farklı sıçanlardan oluşturulan primer kültürlerde, hücrelerinin genel bölünme ve çoğalma hızları birbirinden ufak farklılıklar gösterebilir. Bu durumda hayvanın yaşı, genel sağlık durumu, dokunun ne oranda yağdan arındırılabildiği ve parçalanabildiği, mekanik parçalanma esnasında geçen süre ve besiyerinde kullanılan FBS'in lot numarasının değişmesi gibi ufak farklılıklar bile önemli rol oynayabilir.
- Genellikle kültürün 8-9. günleri arasında hücreler çoğalarak, kültür plağını konfliye etmeye başlarlar. Bu günlerde ilk pasajlama işlemi yapılarak 2 adet 6 kuyuluk kültür plağından, 2 adet T-75 kültür flaskına pasajlama gerçekleştirilir.

#### 3.2.2.5. Kültürün tüm doku parçalarından arındırılması ve pasajlanması

- Ortalama 8-9. günler arasında 6 kuyulu kültür plakları ortalama %70 konfliye hale geldiğinde, pasajlama ve arındırma işlemleri yapılır.
- Plak kuyularındaki eski besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, kuyulara 1 ml d-PBS(1x) ilave edilerek ilk yıkama yapılır. İkinci yıkamada hücreler 12-15 dakika boyunca boyunca d-PBS(1x) içerisinde bekletilerek tüm FBS kalıntılarından arındırılır ve d-PBS(1x) uzaklaştırılır.
- Her bir kuyuya 37 °C'ye ısıtılmış %0,2'lik Tripsin/EDTA solüsyonundan 1 ml eklenilir, plak 37 C'lik inkübatöre kaldırılarak ortalama 10-12 dakika inkübe edilir ve hücrelerin plağın dibinden ayrışması sağlanılır.
- İnkübasyon sonunda kültür plağının her kuyusuna 1 ml primer hücre kültürü besiyeri eklenilerek, Tripsin/EDTA solüsyonu nötralize edilir.
- Plağın dibinde ayrışmamış hücrelerin olması ihtimaline karşın plak tekrar invert mikroskop altında kontrol edilir. Fibroblastlar, diğer hücre türleriyle kıyaslandığında tutunma özellikleri çok güçlü hücreler olup, her zaman tripsinizasyonla kolayca plağın dibinden ayrıştırılamayabilirler. Bu sebeple az miktarda da olsa plağın dibinden ayrışmamış hücre kümeleri varsa, tek

kullanımlık steril bir hücre kazıyıcı yardımıyla plağın dibi nazikçe kazınarak hücreler ayrıştırılır.

- Sonuç olarak tek bir plak kuyusundan 2 ml hacimde, toplamda iki adet 6 kuyuluk plaktan 24 ml hacimde, içinde sağlıklı hücrelerin, doku artıklarının ve tripsin/EDTA'nın da bulunduğu, saf olmayan bir hücre süspansiyonu elde edilir.
- Süspansiyonun doku kalıntılarından uzaklaştırılabilmesi için 50 ml'lik bir falkon tüpün ağız kısmına 70 µm çapında porlu yapıya sahip, tek kullanımlık, steril bir hücre süzgeci yerleştirilir. Hücre süspansiyonu bu süzgeçten geçirilerek, atık doku parçaları süzgecin üzerinde birikirken, içinde sağlıklı hücrelerin bulunduğu süspansiyon süzülerek steril falkon tübün içinde toplanılır.
- Doku artıklarından arındırılmış süspansiyon, eşit miktarda iki ayrı 15 ml'lik falkon tüpe bölüştürülerek 350 G'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir ve hücrelerin dibe çökmesi sağlanılır.
- Tripsin/EDTA içeren supernatant dökülerek uzaklaştırıldıktan sonra, iki ayrı 15 ml'lik falkon tübün dibinde kalan sağlıklı hücre pelletinin üzerine, her tüpe 12'şer ml olacak şekilde taze primer hücre kültürü besiyeri eklenilir. Tüpler nazik şekilde ters yüz edilerek karıştırılır ve hücrelerin besiyeri içerisinde süspanse olmaları sağlanılır.
- Elde edilen iki adet süspanse kültür, iki ayrı T-75'lik flaska yayılarak 37 C'lik $CO_2$'li inkübatöre kaldırılır ve günler bazında hücrelerin gelişim ve çoğalma süreçleri incelenir.
- Pasajlama işlemini takiben kültürler sürekli takip edilerek 2-3 günde bir olmak üzere hücrelerin besiyerleri tazelenir.

Rekombinant teknolojiyle üretilmiş ve teorik olarak sınırsız kez bölünebilen çeşitli hücre hatlarına ait hücreler, nispeten sabit bir hızda bölünerek çoğaldıkları için ne kadar süre içerisinde çoğalarak kültür plağını konfliye edebileceklerini ve pasajlanma sürelerini öngörebilmek kolaydır. Ancak sıçan derisinden üretilerek elde edilen primer sıçan hücreleri, senesense girmeden önce teorik olarak en fazla 15-20 kez bölünebilirler [124]. Bu süreç esnasında primer hücreler, içerisinde bulundukları hücre siklusuna, bölünme sayısına ve ortam koşullarına göre kültür şartlarında hızlı veya yavaş şekilde bölünerek çoğalmaya devam edebilirler, daha sonra senesense girerek

bölünmelerini durdurabilirler veya apoptoza gidebilirler. Kültür ortamı, çevre koşulları ya da deney tasarımından kaynaklanan stresörler sebebiyle (beklenmeyen bir kontaminasyon, besiyerinde yüksek doz antimikrobiyal kullanımının zorunlu olduğu durumlar, transdüksiyon esnasında kullanılan viral sıvı, birden çok transdüksiyon uygulanması, Polybrene uygulaması, puromisin uygulaması vs…) hücrelerin strese girerek bölünmelerini durdurmaları ya da apoptoza girmelerine sebep olabilir. Tüm bu koşullar göz önüne alındığında hücrelerin morfolojileri, bölünme hızları ve sağlık durumları hemen her gün mikroskop altında takip edilmeli, pasajlama zamanına, uygulanabilecek transdüksiyon sayısına ve transdüksiyon sonrası puromisin uygulamasının yapılıp yapılmayacağına, hücre morfolojileri ve bölünme hızları göz önüne alınarak karar verilmelidir.

Özetlemek gerekirse, öngörülmesi zor biyolojik ve çevresel değişkenlere rağmen, 6'lık plaklardaki ilk primer kültürün oluşturulmasını takiben ortalama 8-9. günler arasında hücreler ortalama %70 konfliye olarak pasajlanmaya hazır hale gelirler ve iki adet T-75 kültür plağına pasajlanırlar.

#### 3.2.2.6. Olası bir kontaminasyon durumunda hücre kültürünün kurtarılması

Primer doku kültürü oluşturulduğunda olası bir kontaminasyon riskine karşı hücrelerin her gün mikroskop altında kontrol edilmesi önemlidir. Bunun sebebi tüm çalışma koşullarının sterilize edilebilmesine rağmen, kültürün başlangıç materyalinin oldukça yüksek mikroorganizma yüküyle kontamine bir materyal olan sıçan derisi olmasıdır.

Dikkatli çalışılmasına rağmen, nadir olmakla beraber, kültür besiyerinde bakteri kontaminasyonu tespit edilebilir. Eğer bakteri yükü fazla ise ve besiyerinde bulanıklık veya renk değişimi mevcutsa, tüm kültürlerin acilen sodyum hipoklorit ile inaktive edilmesi ve tıbbi atığa atılmasından başka çözüm yoktur. Fakat hücre kültürü besiyerinde bulanıklık veya kontaminasyona bağlı bir renk değişimi gözlenmemesine rağmen, invert mikroskopla 40X büyütmede bakterilerin gözlenmesi durumunda (sadece bakteri yükünün çok düşük olduğu durumlarda) kültür kurtarma uygulamaları yapılabilir.

Böyle bir durumda oldukça hızlı davranılması gerekmekle birlikte, acilen kontamine besiyeri eski bir falkon tüpün içine dökülür, üzerine eşit miktarda sodyum hipoklorit eklenerek inaktive edilir ve tıbbi atıkla uzaklaştırılır. Bunun ardından şu prosedürler uygulanır:

- Kültür plağı ard arda 2 kez steril d-PBS(x1) ile yıkanılır ve d-PBS(x1) uzaklaştırılır. Son yıkamada hücreler %10 Pen-Strep içeren d-PBS(x1) içerisinde 12-15 dakika bekletilerek arındırılmaya çalışılır.
- Yıkamadan sonra kullanılacak primer hücre kültürü besiyerindeki antimikotik ve antibakteriyel ajanların miktarı arttırılarak, dekontaminasyon besiyeri hazırlanılır (bkz: Besiyerleri). %20 FBS içeren DMEM/F-12 besiyerine %4 oranında Pen/Strep, %0,2 oranında Primocin, 100 µg/ml ampisilin ve 75 µg/ml kanamisin ilave edilerek hazırlanan dekontaminasyon besiyeri, iki günde bir değiştirilerek 1 hafta boyunca kullanılmaya devam edilir.
- 1 hafta sonunda kültürün bakterilerden arındığı gözlemlenir. Sonrasında her zaman kullanılan primer hücre kültürü besiyeri ile kültüre devam edilir.
- Kontaminasyon olayı nadir görülmekle beraber, oldukça kritiktir ve erken müdahale edildiğinde kültürün kontaminasyondan kurtarılma ihtimali yüksektir. Bununla beraber bakterilerin hücre yapısına zarar verme olasılığının haricinde, yüksek oranda antimikrobiyal kullanımı da hücreleri strese sokarak bazı hücrelerin erken senesense, hatta apoptoza girmesine zemin hazırlayabilir.

### 3.2.3. hPTH geninin izolasyonu, PCR ile çoğaltılması ve saflaştırılması

Tez çalışmamızda terapötik gen olarak kullandığımız hPTH geninin izolasyonu, PCR ile çoğaltılması ve saflaştırılması aşamaları Zekiye Dişçi'nin "Rekombinant Yöntemlerle Sentetik Parathormon Üretimi" adlı yüksek lisans tez çalışmasında gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle gönüllü hastalardan paratireidektomi esnasında alınan hiperplazik paratiroid dokusundan "Zymo research direkt-zol kiti" ile total RNA izolasyonu yapılmış, ardından "Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti" ile cDNA transkripsiyonu gerçekleştirilmiştir. hPTH gen bölgesine özgü primerler ticari olarak satın alınarak, hPTH geni PCR ile çoğaltılmış ve ardından purifiye edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Daha sonra elde edilen hPTH gen bölgesi pEGFP-N1 plazmidine entegre edilerek, rekombinant pEGFPN1+hPTH plazmidi oluşturulmuş ve -80 °C'de saklanmıştır. Detaylı bilgi için Zekiye Dişçi'nin "Rekombinant Yöntemlerle Sentetik Parathormon Üretimi" adlı yüksek lisans tezine bakabilirsiniz [125].

### 3.2.4. hPTH terapötik geninin PLPT transfer plazmidine entegrasyonu

#### 3.2.4.1. PLPT ve pEGFP-N1-hPTH plazmidlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi

Önceden oluşturulup -80 °C'de muhafaza edilen pEGFPN1+hPTH plazmidinin içerisinde bulunan hPTH gen bölgesinin kesilerek çıkarılabilmesi amacıyla, Thermo Fisher Scientific marka XbaI restriksiyon enzimi kullanılarak kesim gerçekleştirilir. Aynı enzimle transfer plazmidi olan PLPT de kesilerek, hem PLPT vektörünün hem de hPTH gen bölgesinin ucunda komplementer yapışkan uçlar oluşması sağlanır ve ligasyon için hazır hale getirilir. Her iki plazmidin restriksiyon kesimi için kullanılan malzemeler aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

**Tablo 3.5:** PLPT ve pEGFPN1+hPTH plazmidlerinin restriksiyon kesimi için kullanılan malzemeler

| | pLenti-CMV-GFP-2A-Puro (PLPT) | pEGFPN1+ hPTH |
|---|---|---|
| Plazmid | 4 µL (toplam 2 µg) | 10 µL (toplam 2 µg) |
| XbaI enzimi | 4 µL | 4 µL |
| 10x buffer | 5 µL | 5 µL |
| $ddH_2O$ | 37 µL | 31 µL |
| Toplam | 50 µL | 50 µL |

Her iki plazmidin kesimi için gerekli malzemeler iki ayrı PCR tüpü içerisinde karıştırılarak hazırlanılır ve tüpler, PCR cihazında 15 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilerek kesim gerçekleştirilir. Son olarak tüpler 80 °C'de 5 dakika inkübe edilerek sıcaklığa bağımlı inaktivasyon gerçekleştirilir ve reaksiyon tamamlanır.

Kesim işlemini takiben vektörlerin kendi üzerine kapanmaması için 5' uçlarındaki fosfor gruplarının defosforilasyonu amacıyla, vektörlerin bulunduğu PCR tüplerine 5 µl alkalin fosfataz (Thermo Fisher Scientific) ilave edilerek, PCR cihazında 37 °C'de 10 dk inkübe edilir.

#### 3.2.4.2. hPTH gen bölgesinin jelden ekstraksiyonu ve purifikasyonu

Rekombinant pEGFPN1+hPTH plazmidinin içerisinde bulunan hPTH gen bölgesinin kesilerek çıkarılabilmesi amacıyla, restriksiyon enzim kesimi gerçekleştirildikten sonra, hPTH gen bölgesinin saf olarak elde edilebilmesi için öncelikle agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilir. Restriksiyon kesimi sonrası içerisinde lineer pEGFPN1

vektörü ve hPTH gen bölgesinin bulunduğu karışım, %1'lik agaroz jele yüklenerek 120 mA, 110 V'de 45 dk yürütülür ve daha sonra jel görüntüleme sisteminde görüntülenir. Kesilerek birbirinden ayrılmış olan lineer pEGFPN1 vektörü ve hPTH gen bölgesinin boyutları birbirinden farklı olduğu için, jel elektroforezi sayesinde birbirinden ayrıştırılırlar. Elde edilen ürünlerin boyutları, kullanılan DNA markörü ile kıyaslandıktan sonra hPTH bandının (367 bp) bulunduğu jel bölgesi, UV ışık altında steril bir bisturiyle kesilerek 2 ml'lik ependorf tüpe aktarılır. Ardından tartımı yapılarak purifikasyon için hazır hale getirilir. hPTH gen bölgesinin jelden purifiye edilebilmesi amacıyla "GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific)" kullanılarak aşağıdaki prosedürler takip edilir:

- 2 ml'lik Ependorf tüpün içerisine alınarak tartımı yapılan jelin üzerine 1:1 oranında "binding buffer" ilave edilir.
- Hazırlanan karışım, önceden 60 °C'ye ısıtılan ısı bloğu üzerinde ortalama 10 dk bekletilerek jelin iyice erimesi sağlanılır ve ardından vortexle 5-10 sn karıştırılır. Karışımın renginin sarı olması, pH'ın ideal olduğunu gösterir.
- Karışım "Genejet purification column" kolonuna yüklenerek 1 dakika santrifüj edilir ve karışımdaki hPTH DNA'sının kolonun filtresine bağlanması sağlanılır. Süzülmüş olan sıvı atılarak uzaklaştırılır.
- Kolona 700 µl "wash buffer" ilave edilerek tekrar 1 dk santrifüj edilir ve böylece kolona bağlanmış hPTH DNA'sı yıkanarak arındırılır. Tüpün altında biriken sıvı atılarak uzaklaştırılır.
- Boş olan kolon 1 dk daha santrifüj edilerek içerisindeki tüm sıvı uzaklaştırılır.
- "Genejet purification column" kolonu boş ve steril bir 1,5 ml'lik ependorf tüpün içerisine yerleştirilerek, içerisine 50 µl "elution buffer" eklenilir. Bu sayede kolonun filtresine tutunmuş olan hPTH DNA'sı filtreden ayrışarak çözünür hale gelir.
- Son olarak 1 dk santrifüj edilerek, purifiye edilmiş olan hPTH DNA'sı Ependorf tüpün içerisinde toplanılır.
- Elde edilen hPTH DNA'sının saflığı ve miktarı spektrofotometrede ölçülür.

### 3.2.4.3. PLPT plazmidinin purifikasyonu

Restriksiyon kesimi sonrasında PLPT plazmidinin saf olarak elde edilebilmesi için ortamdaki restriksiyon enzimleri, alkalin fosfataz ve diğer kimyasalların

uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için "GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)" kullanılarak aşağıdaki protokole uygun şekilde purifikasyon gerçekleştirilir:

- Restriksiyon kesiminden sonra elde edilen karışımın üzerine 1:1 oranında "binding buffer" ilave edilerek pipetajla karıştırılır.
- Karışım, ucunda DNA'yı bağlayan bir filtre bulunan "GeneJET Purification Column" kolonuna aktarılarak 1 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüj edilerek, DNA filtreye bağlanır ve toplama tüpünde biriken sıvı atılarak uzaklaştırılır.
- Kolona 700 µL "wash buffer" eklenerek 1 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüj edilerek toplama tüpünde biriken sıvı atılır. Bu işlem 2 kez ardışık olarak tekrar edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilir ve DNA'nın arındırılması sağlanılır.
- Yıkama sonrası "wash buffer"ın tümüyle elimine edilebilmesi için boş tüp, 2 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüj edilerek toplama tüpünde biriken ilave sıvı atılır.
- Kolon, steril bir 2 ml'lik ependorf tüpün içerisine oturtularak işleme devam edilir.
- Isıtıcı blokta 60 °C'ye ısıtılan 50 µL "elution buffer" kolonun içindeki filtrenin üzerine eklenerek 3 dakika boyunca filtreye tutunmuş olan plazmid DNA'sının filtreden ayrışması beklenilir.
- 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj sonrası, plazmid DNA'sı tutunduğu filtreden ayrışarak saf şekilde ependorf tüpün içerisinde toplanılır.
- Elde edilen PLPT plazmidinin saflığı ve miktarı spektrofotometrede ölçülür.

#### 3.2.4.4. Transfer plazmidi (PLPT) ve terapötik gen bölgesinin (hPTH) ligasyonu ve rekombinant transfer plazmidi (PLPT+hPTH) eldesi

Restriksiyon kesiminin ardından purifiye edilen PLPT plazmidi ve hPTH gen bölgesinin birbirine bağlanarak hPTH terapötik genini taşıyan rekombinant transfer plazmidlerinin (PLPT+hPTH) oluşturulabilmesi için ligasyon gerçekleştirilir. Ligasyon işlemi için biri "ligasyon solüsyonu", diğeri ise "negatif kontrol solüsyonu" olacak şekilde iki ayrı PCR tüpünde reaksiyon gerçekleştirilir. Negatif kontrol solüsyonu, olası bir "self-ligation" ihtimaline karşı kontrol amaçlı hazırlanılır.

hPTH gen bölgesi 367 bp; PLPT plazmidi ise 8950 bp uzunluğunda olduğundan, ligasyon solüsyonu için "hPTH / PLPT oranı" 1/3 olacak şekilde hazırlanır. Ligasyon için "Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific)" kullanılarak aşağıdaki malzemeler belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlanır:

**Tablo 3.6:** PLPT plazmidi ve hPTH terapötik geninin ligasyonu için kullanılan malzemeler

| | Ligasyon grubu | Negatif kontrol |
|---|---|---|
| PLPT | 60 ng | 60 ng |
| hPTH | 20 ng | - |
| T4 DNA ligaz | 1 µl | 1 µl |
| Buffer (5X) | 4 µl | 4 µl |
| $ddH_2O$ | 5 µl | 7 µl |
| Toplam | 20 µl | 20 µl |

PCR tüpleri içerisinde hazırlanan karışımlar vortex ile karıştırıldıktan sonra PCR cihazında 30 dakika süreyle 22 °C'de inkübe edilerek ligasyon tamamlanır.

### 3.2.4.5. E. coli hücrelerinin rekombinant transfer plazmidi ile (PLPT+hPTH) transforme edilmesi

Pozitif ligasyon grubunda, transfer plazmidi olan PLPT, terapötik gen olan hPTH genini de genomuna dahil ederek sirküler yapıda rekombinant bir transfer plazmidi olan PLPT+hPTH üretilir. Söz konusu plazmidin çoğaltılabilmesi için klonlama konakçısı olarak "E. coli One Shot® Mach1™-T1R" hücreleri kullanılır. Plazmidlerin "E. coli One Shot® Mach1™-T1R hücreleri"ne aktarılabilmesi için öncelikle bakterilerin kompetan hale getirilmesi gerekmektedir. Daha sonra hem ligasyon karışımı, hem de negatif kontrol solüsyonları ayrı ayrı kullanılarak, kompetan hale getirilmiş bakteriler transforme edilir.

E. coli One Shot® hücrelerini kompetan hale getirmek ve transforme edebilmek için "TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific)" kullanılır. Hem ligasyon solüsyonu için hem de negatif kontrol solüsyonu için aşağıdaki aynı protokol takip edilerek transformasyon gerçekleştirilir:

- Transformasyon gününden önceki gün, 2 ml LB broth besiyeri içerisine 5µL "E. coli One Shot® Mach1™-T1R" hücre süspansiyonu steril koşullar altında inoküle edilir. 1 gece boyunca çalkalayıcı inkübatörde 250 rpm ve 37 °C'de inkübe edilir.

- Transformasyon günü, sıvı kültürden 150 µL alınarak 2 ml'lik ependorf tüpe nakledilir ve üzerine 1,5 ml "C-medium" eklenir. Oluşturulan yeni kültür, ortalama 3 saat boyunca çalkalayıcı inkübatörde 250 rpm ve 37 °C'de inkübe edilir.
- Transformasyon aşamalarına başlamadan önce kitin içeriğindeki "T-solution (A)" ve "T-solution (B)"nin her ikisinden de 250 µl'lik eş hacimler karıştırılarak 500 µl "T-solution" elde edilir. Kullanıma kadar buz üstünde inkübasyona bırakılır.
- "C-medium"da kültüre edilen hücreler, 5 dk buz üzerinde bekletildikten sonra 14000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüj edilerek supernatant dökülür ve bakterilerin pelet şeklinde çökmesi sağlanılır.
- Pelletin üzerine 300µl "T-solution" eklenerek süspanse edilir ve 5 dk boyunca buz üzerinde bekletilir. Tekrar 14000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edilerek supernatant dökülür.
- Geride kalan bakteri pelletinin üzerine tekrar 120µl "T-solution" eklenerek süspanse edilir ve 5 dk daha buzun üzerinde bekletilir.
- Transformasyonda kullanılacak olan ve daha önceden hazırlanmış olan ligasyon solüsyonundan 5 µL alınarak steril bir ependorf tüpe aktarılır ve kullanım öncesinde 2 dk buz üzerinde bekletilerek soğutulur.
- Soğutulan ligasyon solüsyonunun üzerine 50µl bakteri süspansiyonu eklenerek karıştırılır ve 5 dk boyunca buz üzerinde inkübe edilerek transformasyon tamamlanır.
- Transfer plazmidi olan PLPT'de kanamisin direnç geni bulunmaktadır. Transforme olmuş bakteriler, kanamisin içeren besiyerinde seçici olarak üretilebilirken, diğer bakteriler üreyemezler. Bu nedenle transformasyon aşamalarından hemen önce kanamisinli LB agar hazırlanarak katılaştırılmış ve kullanıma kadar 37 C'lik etüvde muhafaza edilmiştir.
- Son olarak hem ligasyon solüsyonuyla hem de negatif kontrol solüsyonuyla transforme edilerek hazırlanan "E. coli One Shot® Mach1™-T1R" hücreleri, iki ayrı kanamisinli LB agar üzerine steril bir öze ile yayılarak, 1 gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılır. 24 saat sonrasında, sadece transforme olan bakteriler agar üzerinde üreyerek koloni oluşturabilirler. Negatif kontrol solüsyonu ile transforme edilerek ekimi yapılan plakta koloni oluşmaması,

tüm işlemlerin başarılı şekilde yapıldığını ve plazmidlerde "self ligation" olmadığını gösterir.

### 3.2.4.6. Ligasyon ve transformasyonun doğrulanması

Ligasyon solüsyonuyla transforme edilerek hazırlanan ve agar üzerinde üreyen E.coli kolonilerinin gerçekten de PLPT+hPTH plazmidiyle başarılı şekilde transforme olmuş bakteriler olup olmadığının doğrulanması amacıyla koloni PCR yapılır.

Kanamisinli LB agar üzerinde üreyen bakteri kolonilerinden 6 adet seçilerek, bu kolonilerin her biri ayrı ayrı 5 ml'lik kanamisinli LB broth'lara inoküle edilirler. Yaklaşık 6 saat boyunca 37 °C'de, 250 rpm'de inkübe edilerek bakterilerin çoğalması ve sıvı bakteri kültürü elde edilmesi sağlanılır.

Seçilerek LB broth'ta çoğaltılan kolonilerin PLPT+hPTH plazmidiyle transforme olup olmadıklarının kontrolü amacıyla, LB sıvı besiyerlerinde çoğaltılan her koloni için PCR ve ardından agaroz jel elektroforezi uygulanır. Koloni PCR için "Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)" kiti ve hPTH'a özgü forward ve reverse primerler kullanılarak, aşağıdaki tabloda belirtilen oranlarda karıştırılarak hazırlanır. Daha sonra diğer tabloda belirtilen koşullarda PCR gerçekleştirilir.

**Tablo 3.7:** Koloni PCR için kullanılan malzemeler ve miktarları

| Malzeme | Miktar |
|---|---|
| Primer (F+R) | 1 µl |
| Master mix | 10 µl |
| Bakteri süspansiyonu | 1 µl |
| $ddH_2O$ | 8 µl |
| Toplam | 20 µl |

**Tablo 3.8:** Koloni PCR döngü ve süreleri

| PCR evreleri | Sıcaklık | Zaman | Döngü sayısı |
|---|---|---|---|
| İlk denatürasyon | 98 | 1 dk | |
| Denatürasyon | 98 | 5 sn | 30 döngü |
| Bağlanma | 62 | 10 sn | |
| Uzama | 72 | 20 sn | |
| Final uzama | 72 | 1 dk | |

6 koloni için yapılan PCR sonrasında, PCR ürünleri agaroz jele yüklenerek 45 dk boyunca 110 V, 120 mA şiddetinde elektroforez uygulanır ve ardından jel görüntüleme sisteminde görüntülenir. Görüntüleme sisteminde 367 bp'lik hPTH bandının görüntülendiği koloniler, başarılı bir ligasyon sonucu oluşan PLPT+hPTH rekombinant plazmidiyle transforme olan kolonilerdir. Bu sebeple söz konusu kolonilerden biri (veya birkaçı) seçilerek, PLPT+hPTH plazmidinin çoğaltılması ve stoklanması amacıyla kullanılır.

### 3.2.5. Lentiviral vektör üretiminde kullanılan plazmidlerin stoklanması, çoğaltımı, izolasyon ve purifikasyonu

Bir önceki alt başlıkta "E. coli One Shot® Mach1™-T1R hücreleri"nin kompetan hale getirildikten sonra PLPT+hPTH rekombinant transfer plazmidi ile transforme edilmesinden ve ardından ligasyon+transformasyonun doğrulanmasından bahsedilmiştir. Söz konusu transforme E.coli hücreleri, bundan sonra -80 °C'de muhafaza edilerek PLPT+hPTH rekombinant transfer plazmidinin stoklanması ve istenildiğinde çoğaltılabilmesi için kullanılır.

Lentiviral vektör üretimi için rekombinant transfer plazmidi haricinde paketleme plazmidi (psPAX2) ve zarf proteinlerini kodlayan plazmide de (pMD.G) ihtiyaç vardır. Bu plazmidlerin de stoklanabilmesi ve çoğaltılabilmesi için bir bakteri içerisine transforme edilmiş olmaları gerekmektedir. Söz konusu psPAX2 ve pMD.G plazmidleri "Addgene" tedarikçisinden E.coli hücrelerinin içerisine transforme edilmiş olarak satın alındığından, stoklanma ve çoğaltım işlemleri için hazır halde temin edilmişlerdir.

Anlatımda kolaylık sağlaması açısından, her üç plazmid ile transforme bakteri suşları, şu şekilde adlandırılacaktır:

- trBac-PLPT+hPTH: PLPT+hPTH ile transforme E. coli hücreleri
- trBac-psPAX2: psPAX2 ile transforme E. coli hücreleri
- trBac-pMD.G: pMD.G ile transforme E. coli hücreleri

Söz konusu transforme bakteri suşları, kullanım zamanına kadar -80 °C'de muhafaza edilir. Bunun için 2 ml'lik kriyotüplere 1 ml sıvı bakteri kültürü ve üzerine 1 ml %50'lik gliserol eklenerek karıştırılır. Kriyoprezervasyon için hazırlanan bakteri kültürleri, -80 °C'de yıllarca muhafaza edilebilir.

### 3.2.5.1. Transforme bakterilerin çoğaltılması

-80 °C'de stoklanan "trBac-PLPT+hPTH", "trBac-psPAX2" ve "trBac-pMD.G" bakterilerinin çoğaltılması amacıyla her biri için farklı erlenler içerisinde hazırlanıp, ağız kısımları alüminyum folyo ile sarılan ve otoklavda sterilize edilen 150 ml'lik LB broth'lar kullanılır.

Kullanım öncesi LB broth'lar oda sıcaklığına getirilerek trBac-PLPT+hPTH bakterisinin ekimi için kullanılacak LB broth'a 75 µg/ml kanamisin; trBac-psPAX2 ve trBac-pMD.G bakterileri için kullanılacak LB broth'lara ise 100 µg/ml ampisilin eklenilir. Hazırlanan her üç besiyerine de -80 °C'de muhafaza edilen ilgili bakteri stoğundan 50 µL olacak şekilde inoküle edilir.

Hazırlanan sıvı bakteri kültürleri çalkalayıcılı inkübatörde 250 rpm'de 37 °C'de 18 saat boyunca inkübe edilerek, transforme bakteriler ve dolayısıyla plazmidler çoğaltılır.

### 3.2.5.2. Plazmid izolasyonu ve purifikasyonu

trBac-PLPT+hPTH, trBac-psPAX2 ve trBac-pMD.G bakterileri LB broth'larda çoğaltıldıktan sonra, "ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kiti" kullanılarak, ilgili bakterilerden, PLPT+hPTH, psPAX2 ve pMD.G plazmidlerinin izolasyon ve purifikasyon aşamaları gerçekleştirilir. Her üç plazmid için uygulanan izolasyon ve purifikasyon prosedürleri bire bir aynı olduğundan, aşağıda tek bir plazmide ait izolasyon ve purifikasyon protokolü yer almaktadır:

- Elde edilen 150 ml sıvı bakteri kültüründeki tüm bakterilerin, tek bir 50 ml'lik falkon tüpün dibine çöktürülebilmesi için, aynı falkon tüpün içinde ardışık santrifüjler gerçekleştirilir. Her santrifüj için sıvı kültürün 50 ml'lik kısmı, 50 ml'lik aynı falkon tüpün içerisine aktarılarak 4000 rpm'de, 10 dakika boyunca santrifüj edilir, bakteriler çöktürülür ve supernatant atılır. Çöktürülen bakterilerin üzerine 50 ml daha sıvı bakteri kültürü eklenerek, aynı şekilde 3 ardışık santrifüj gerçekleştirilir. Santrifüjler sonrasında kültürdeki tüm bakteriler 50 ml'lik falkon tüpün dibinde çöktürülerek plazmid izolasyonuna hazır hale gelir. Tüm işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilir.
- Bakteri pelletinin üzerine 8 ml ZymoPURE™ P1 solüsyonu eklenilerek, bir vorteks yardımıyla bakteri pelletinin solüsyon içerisinde homojen bir şekilde süspanse olması sağlanır. P1 solüsyonu, süspansiyona ideal pH ve tuz içeriğini

sağlamasının yanı sıra, içerdiği RNAz enzimiyle süspansiyondaki RNA içeriğinin parçalanmasını da sağlar

- Süspansiyona 8 ml ZymoPURE™ P2 solüsyonu eklenerek, falkon tüp yavaşça 6-7 kez ters yüz edilir. Bu aşamada asla vorteks kullanılmaz ya da çalkalama işlemi yapılmaz. P2 solüsyonu, lizis solüsyonu olarak da bilinir ve bakteri duvarı ile membranını kısmi olarak hasarlayarak delikler açılmasını sağlar. Elde edilmek istenen plazmidler, zarar gören bakteri membranından çıkış yaparak süspansiyon içeriğine karışırlar. Lizis aşaması 3 dakikayı geçmemelidir. Aksi takdirde tüm bakteri membranı hasar görerek bakteriye ait genomik DNA da süspansiyon içeriğine karışarak genomik DNA kontaminasyonu oluşturabilir. Ayrıca uzun süren lizis, plazmid DNA'sının da denatüre olmasına sebep olabilir.
- 3 dakikanın sonunda solüsyonun üzerine 8 ml ZymoPURE™ P3 solüsyonu eklenilerek falkon tüp yavaşça bir kaç kez ters yüz edilir. ZymoPURE™ P3 solüsyonu nötralizasyon solüsyonu olarak da bilinir ve önceki basamakta kullanılan lizis solüsyonunu nötralize etmek için kullanılır. Solüsyonun rengi pembeden açık sarıya döndüğünde nötralizasyon işleminin tamamlandığı anlaşılır. Sonuç olarak süspansiyonun içerisindeki parçalanan bakteri kalıntıları yoğun kıvamlı mukusumsu bir faz oluşturarak, içerisinde plazmidlerin bulunduğu berrak kıvamlı açık sarı fazdan ayrışır.
- Elde edilen çift fazlı karışım ZymoPURE™ şırınga filtresine aktarılarak, mukusumsu tabakanın daha iyi ayrışabilmesi için 5-8 dakika beklenilir. Bu süre sonunda, şırınga pistonuyla uygulanan basınç sayesinde filtrasyon işlemi gerçekleştirilir. Plazmid içeren berrak sıvı 50 ml'lik steril bir falkonda toplanırken, istenmeyen bakteri kalıntıları ve atıklar şırınga filtresinde tutularak uzaklaştırılır. İlk aşama olan plazmid izolasyonu sonucunda ortalama 20 ml plazmid içerikli berrak solüsyon elde edilmiş olur. İzolasyon aşamasından sonra istenmeyen protein, tuz ve diğer kontaminantların uzaklaştırılması için plazmid purifikasyonu aşamasına geçilir.
- Elde edilen plazmid içerikli berrak solüsyonun içerisine 8 ml "ZymoPURE™ binding buffer" (bağlama tamponu) ilave edilir. Bağlama tamponunun kullanım amacı, plazmid DNA'sının purifikasyon amacıyla kullanılacak olan filtreye bağlanarak tutulabilmesi, ancak istenmeyen diğer kontaminantların

yıkama süreçleri sayesinde uzaklaştırılabilmesidir. Yıkama süreçleri için vakum manifoldu kullanılır.

- Bağlama tamponu ilave edilen solüsyon, ağız kısmında DNA'yı tutabilmesi için küçük bir filtre barındıran 50 ml'lik "Zymo-Spin™ III-P Column Assembly" rezervuarına aktarılır ve rezervuar, vakum manifolduna bağlanılır. Vakum manifoldu çalıştırılarak sıvının süzülerek uzaklaştırılması sağlanırken, plazmid DNA'sı rezervuarın alt kısmındaki filtreye bağlanmış olur.
- Yıkama süreçleri için önce 2 ml "ZymoPURE™ Wash 1" ilave edilerek ilk yıkama gerçekleştirilir
- Sonrasında 2 ml "ZymoPURE™ Wash 2" ilave edilerek ikinci solüsyonla yıkama gerçekleştirilir. Bu aşama 2 kez tekrar edilerek plazmid DNA'sının tüm kalıntılardan uzaklaştırılması sağlanılır. Yıkama işlemleri sonrası vakum manifoldu 1-2 dakika daha çalıştırılarak tüm yıkama solüsyonları da tamamen uzaklaştırılır.
- Arındırılmış plazmid DNA'sını bağlayan "Zymo-Spin™ III-P Column Assembly" filtresi, rezervuar kısmından ayrıştırılarak çıkarılır ve 2 ml'lik steril bir ependorf tübün içerisine yerleştirilir.
- Plazmid DNA'sını filtreden ayrıştırıp saf olarak toplayabilmek için gerekli "Elution buffer" çözeltisinden 200 µL, filtrenin üzerine eklenilerek 3 dakika beklenilir. "Elution buffer" kullanılmadan önce daha etkin çalışabilmesi için 60 °C'ye ısıtılır. Son olarak oda sıcaklığında 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj gerçekleştirilerek, saflaştırılan plazmid DNA'sı ependorf tübün içerisine toplanılır.
- Elde edilen plazmidlerin saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrede ölçülür.

#### 3.2.5.3. Plazmid konsantrasyonlarının ve saflığının spektrofotometrik analizi

Elde edilen PLPT+hPTH, psPAX2 ve pMD.G plazmidlerinin saflık oranları spektrofotometrede 260/280 nm dalga boyunda ölçülür. Ölçüm sonunda elde edilen 260/280 oranı 1,80 değerine ne kadar yakınsa elde edilen DNA'nın o oranda saf olduğu anlaşılır. Söz konusu spektrofotometrede ölçülen saflık, DNA'nın istenmeyen protein ve kimyasallardan ne oranda ayrıştırılabilmiş olduğunu göstermesine rağmen, eğer varsa RNA veya genomik DNA kontaminasyonu spektrofotometrede tespit edilemez.

Ortamda RNA veya genomik DNA kontaminasyonu mevcut değilse, spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda okunan değere göre, saflaştırılmış olan plazmidlerin konsantrasyonları belirlenilir.

### 3.2.5.4. Plazmidlerin restriksiyon kesimi ile doğrulanması ve genomik saflık analizi

Elde edilen plazmidlerin doğrulanması ve olası bir RNA ve/veya genomik DNA kontaminasyonu varsa bunların belirlenilebilmesi için EcoRI restriksiyon enzimiyle plazmidlerin kesimi yapılarak, elde edilen DNA fragmanları agaroz jel elektroforezinde yürütülür.

Elimizdeki plazmidlere ait genom haritaları mevcut olduğundan, EcoRI restriksiyon enziminin plazmid genomlarını hangi bölgelerden keseceği ve oluşacak DNA fragmanlarının uzunlukları bellidir. Buna göre restriksiyon kesimi sonucu elde edilen DNA fragmanlarının uzunlukları değerlendirilerek elde edilen plazmidlerin doğrulaması yapılır.

Jel görüntüsünde plazmidlere ait DNA fragmanları haricinde olası bir genomik kontaminasyon ve/veya RNA kontaminasyonu mevcutsa, jelde smear görünümü veya beklenmeyen boyutlardaki DNA ve/veya RNA bantları tesbit edilir. Bu durumda plazmid izolasyon ve purifikasyon işlemlerinin başarılı olmadığı ve yeniden tekrarlanması gerektiği anlaşılır.

EcoRI enzimiyle restriksiyon kesimi yapıldıktan sonra elde edilecek DNA fragmanlarının boyutları ve agaroz jelde görüntülenecek bant sayıları şöyledir:

- PLPT+hPTH (8950 bp + 367 bp): tek bölgeden kesilerek 9317 bp boyutunda tek bant,
- psPAX2 (10703 bp): çift bölgeden kesilerek 4374 bp ve 6309 bp boyutlarında iki bant,
- pMD.G (6010 bp): üç bölgeden kesilerek 780 bp, 1600 bp ve 3630 bp boyutlarında üç bant görüntülenecektir.

Restriksiyon kesimi için “FastDigest® EcoRI (Thermo Fisher Scientific)” restriksiyon enzim kiti kullanılır. Kesim öncesinde yapılan spektrofotometrik plazmid konsantrasyonu ölçümünde PLPT+hPTH ve psPAX2 plazmidlerinin çok yüksek konsantrasyonda, pMD.G plazmidinin ise daha düşük konsantrasyonda elde edildiği

tespit edildiği için PLPT ve PAX plazmidlerinden 0,5 µL; pMD.G plazmidinden ise 5 µL kullanılarak kesim yapılmıştır. Restriksiyon kesimi için kullanılan malzemeler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

**Tablo 3.9:** Lentiviral vektör üretiminde kullanılan tüm plazmidlerin restriksiyon kesimi amacıyla kullanılan malzemeler

| | PLPT+hPTH | psPAX2 | pMD.G |
|---|---|---|---|
| Plazmid DNA | 0,5 µL | 0,5 µL | 5 µL |
| Fast Digest EcoRI | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| Fast Digest buffer | 2 µL | 2 µL | 2 µL |
| ddH2O | 16,5µL | 16,5µL | 12 µL |
| Toplam hacim | 20 µL | 20 µL | 20 µL |

Restriksiyon kesimi için uygulanan protokol şöyledir:

Tablodaki malzemeler, her plazmid için farklı PCR tüplerinde karıştırılarak hazırlanılır. Tüpler PCR cihazında 15 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilerek restriksiyon kesimi gerçekleştirildikten sonra, 80 °C'de 5 dakika inkübe edilerek sıcaklığa bağımlı inaktivasyon gerçekleştirilerek reaksiyon tamamlanılır.

Restriksiyon kesimi tamamlandıktan sonra PCR tüplerinde 3 µL "Thermo Scientific™ DNA Gel Loading Dye (6X)" yükleme boyası eklenerek DNA fragmanlarının jelde görüntülenebilmeleri sağlanılır. Elektroforez için hazırlanan 0,8'lik agaroz jel ve elektroforez tankı ile jel yapımında kullanılan TAE (1x) tamponunun içeriği için bkz: "Solüsyonlar ve Tamponlar"

Restriksiyon kesimi sonrası elde edilen DNA fragmanlarının boyutlarının kıyaslanması için "Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder SM 1333" DNA markörü kullanılır. Agaroz jeldeki kuyulara sırasıyla DNA markörü ve kesimi tamamlanan PLPT+hPTH, psPAX2, pMD.G plazmidleri yüklenilerek 90 dk boyunca 110 V, 120 mA şiddetinde elektroforez uygulandıktan sonra DNA fragmanları, jel görüntüleme sisteminde görüntülenir. Bu sayede hem izolasyon ve purifikasyonu gerçekleştirilen plazmidlerin doğrulanması hem de genomik DNA ve / veya RNA kontaminasyonunun olmadığının doğrulaması yapılır.

### 3.2.6. Lentiviral vektörlerin üretimi

#### 3.2.6.1. Transfeksiyon için kullanılacak yöntem ve hücre hattının seçimi

Elde edilmesi amaçlanan lentiviral vektör konsantrasyonu ve kalitesi açısından transfeksiyonda kullanılacak yöntem ve vektörün üretileceği hücre hattının türü ile sağlık durumu oldukça kritiktir. Tez döneminde 2,5 yıla yakın bir süreç ve önemli bir bütçe, transfeksiyon metodunun optimize edilerek başarılı şekilde lentiviral vektör üretilebilmesi amacıyla farklı metodların denenilmesi için kullanılmıştır.

Yüksek titrede ve kalitede lentiviral vektör üretimi için başarı oranı pek çok koşuldan etkilenmektedir. Bunlardan bazıları:

- Kullanılan plazmidlerin saflığı (Çeşitli kimyasal, protein, DNA veya RNA kontaminasyonları transfeksiyon oranını ciddi şekilde düşürebilir veya inhibe edebilir, plazmid izolasyon ve purifikasyon aşamaları kritiktir.),
- Kullanılan plazmidlerin boyutlarına göre kullanım miktarlarının orantılı olarak hesaplanılmış olması,
- Üretimde kullanılan konakçı hücre hattının türü,
- Üretimde kullanılan konakçı hücre hattının pasaj sayısı ve genel sağlık durumu,
- Tercih edilen transfeksiyon yöntemi,
- Transfeksiyon öncesi kültür plağının hücrelerle konfliye olma oranı (ideal %50-70),
- Uygulanan transfeksiyon yöntemi ile besiyeri özelliklerinin, içeriğinin ve pH'ının uyumlu olması,
- Transfeksiyon süresi (hücrelerin strese girmeyeceği kadar kısa, optimum verimin alınabilmesi için yeteri kadar uzun),
- Transfer vektörünün boyutu ve tasarımı,
- Paketleme plazmidinin jenerasyonu,
- Hatta işlemler esnasındaki pipetaj hızı vs… bile transfeksiyon başarısı ve lentiviral vektör üretim miktarını etkilemektedir.

Lentiviral vektörlerin üretimi komplike süreçleri içermektedir. Önceki başlıklarda da bahsedildiği üzere, vektör üretimini yapacak olan konakçı hücrelerin transfeksiyon sürecinde kullanılan her üç plazmidle birden ko-transfekte edilmeleri gerekmektedir.

Tek bir plazmid ile transfeksiyon oranları nispeten yüksek olmasına rağmen, üç plazmidle aynı anda ko-transfeksiyon oranları çok daha düşük olmaktadır. Söz konusu ko-transfeksiyon, tüm hücreler için başarılabilse bile, üretilen lentiviral vektör partiküllerinden sadece çok azı terapötik geni taşımakta, geri kalanları boş virion kılıfları olarak paketlenmektedir. Yapılan araştırmalar, üretilen her 1000 lentiviral vektörden sadece 1 tanesinin terapötik geni taşıdığını, diğerlerinin boş olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, terapötik geni taşıyan oldukça az sayıdaki lentiviral vektörün, transdüksiyon esnasında boş vektörlerle rekabet etmesi sebebiyle, terapötik genin hedef hücrelerin genomuna entegrasyon oranları daha da düşebilmektedir [95].

Ko-transfeksiyon oranlarının hızlı tayini için, işlemden bir sonraki gün, konakçı hücrelerin floresan mikroskop altında yaydığı GFP sinyali değerlendirilir. GFP proteinine ait gen dizisi sadece transfer plazmidinde bulunup, diğer iki plazmidde bulunmamaktadır. Bu sebeple transfeksiyonun ertesi günü hücreler floresan mikroskop altında değerlendirildiğinde, sadece transfer plazmidinin transfeksiyon yüzdesi değerlendirilebilir, diğer plazmidler için yorum yapılamaz. Ancak, tek bir plazmidle transfeksiyon oranı ne kadar yüksekse, üçlü ko-transfeksiyon oranının da o denli yüksek olduğu tahmininde bulunulabilir.

Tezimizin ön çalışma safhasında aşağıda bahsedilen farklı transfeksiyon metodları ve hücre hatları denenilerek en yüksek verimin alındığı yöntem tercih edilmiştir.

Ön çalışma aşamasında, transfeksiyon için ilk kullandığımız hücre hattı HEK 293T olup, lentiviral vektör üretimi için en çok tercih edilen hücre hattıdır. Birkaç yıl öncesinden temin edilip -80 °C'de stoklan bu hücre hattının pasajlama sayısı yüksek olduğu için bu durumun lentiviral vektör üretim oranlarını düşürdüğü tahmin edilmektedir.

İlk denenilen transfeksiyon kiti "Thermo Fisher TurboFect" olup, yapılan pek çok denemeye rağmen transfeksiyon verimi %10-20'nin üzerine çıkarılamamıştır. İkinci olarak denenilen metod, kalsiyum fosfat presipitasyonu protokolüne dayalı olmakla beraber, her denemede oldukça değişken sonuçlar elde edilmiştir (verim %10-80 arası değişkenlik göstermiştir). Bu metodun optimizasyonundaki güçlük sebebiyle yeni metodlar denenmiştir. Deneme yaptığımız diğer bir transfeksiyon kiti "Lipofectamine 2000" olmasına rağmen bu kitle de transfeksiyon oranları %40-50'lerin üzerine

çıkarılamamıştır. Bundan sonra "Lipofectamine 3000" denenmiş ve yine beklenilen başarı oranları elde edilememiştir.

Son olarak Takara markasına ait bir transfeksiyon kiti olan "X-fect Transfection Kit" ve bu kitle uyumlu olan "LentiX hücre hattı" temin edilerek, ortalama %95 oranında transfeksiyon başarısı elde edilebilmiştir. Bu sayede nispeten yüksek titrede LV vektör üretimi gerçekleştirilebilmiştir.

#### 3.2.6.2. LentiX hücre hattının temini ve çoğaltılarak stoklanması

LentiX hücre hattı, HEK 293T hücre hattının bir alt suşu olup, Takara markasına ait X-fect transfeksiyon kitiyle uyumlu çalışmakta ve lentiviral vektör üretiminde yüksek verim alınmasına yardımcı olmaktadır.

Soğuk zincirle temin edilen LentiX hücrelerinin (1 ml = 2.0 x $10^6$ hücre/tüp) kullanılabilmeleri için kültüre edilerek çoğaltılmaları, sonrasında -80 °C'de muhafaza edilmeleri gerekmektedir. Bunun için uygulanan aşamalar şöyledir:

- 1 ml'lik kriyo tüp içerisinde temin edilen hücreler, 15 ml'lik falkon tüpe aktarılarak üzerine bir miktar LentiX besiyeri eklenir (bkz: Besiyerleri) ve 300 G'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürülür, supernatant atılır.
- Pelet şeklinde çöktürülen hücrelerin üzerine 9 ml taze LentiX besiyeri eklendikten sonra tüp birkaç kez ters yüz edilerek hücreler süspanse edilir.
- Hücre süspansiyonu, her kuyuya 1,5 ml olacak şekilde 6 kuyuluk kültür plağına yayılır.
- 3-4 gün sonra sadece sağlıklı hücreler plağa tutunup çoğalarak diğer hücreler ölecektir. 3 günün sonunda 6 kuyuluk kültür plağından 1 adet T-75 flaska pasaj yapılarak hücreler çoğaltılmaya devam edilir.
- Hücreler istenildiği kadar pasajlanarak çoğaltılabilir.
- Çoğaltılan hücrelerin muhafazası öncesinde hücreler tripsinizasyonla plaktan ayrıştırılarak daha sonra santrifüjle pellet halinde çöktürülür, supernatant dökülür.
- Pellet şeklinde çöktürülen hücrelerin üzerine kriyoprezervasyon besiyeri eklenerek (bkz: Besiyerleri) Thoma lamında yapılan sayım ile hücre yoğunluğu 1x$10^6$ hücre/ml olacak şekilde ayarlandıktan sonra, hücre süspansiyonu 2 ml'lik kriyo tüplere bölüştürülür.

- Kriyo tüpler 1 saat boyunca -20 °C'de bekletildikten sonra, transfeksiyon için kültüre edilecekleri döneme kadar -80 °C'de muhafaza edilirler.

### 3.2.6.3. Transfeksiyon öncesi LentiX hücre hattının ve kültür plağının hazırlanması

Transfeksiyon, 6 kuyulu hücre kültür plağında gerçekleştirilir. LentiX hücreleri, tutunma özellikleri oldukça zayıf hücreler olduğundan, kullanılacak kültür plağının dibinin kolajen ile kaplanması, hücrelerin plağa daha güçlü tutunarak daha yüksek titrede lentiviral üretim yapmalarına yardımcı olur.

- 6 kuyulu kültür plağının her kuyusuna 1 ml kolajen solüsyonu eklenilerek plak 37 °C'de ortalama 6 saat inkübe edilir.
- İnkübasyon sonunda kuyulardaki sıvı uzaklaştırılarak, plak steril laminar hava akışlı kabinin içerisinde, dibi tamamen kuruyana kadar ağzı açık şekilde kurumaya bırakılır.
- Son olarak kuyular 1 kez dPBS (1x) ile yıkanılarak tekrar kurumaya bırakılır.
- Plağın içi tümüyle kuruduktan sonra ağzı kapatılarak, kullanım zamanına kadar 1 hafta süreyle +4 °C'de muhafaza edilebilir veya hemen kullanılabilir.

Her transfeksiyon öncesi -80 °C'de muhafaza edilen 1 adet kriyotüp (ort 2 x $10^6$ hücre / kriyo tüp) su banyosunda hızlıca çözündürüldükten sonra santrifüjleme sayesinde kriyoprezervasyon besiyerinin içeriğindeki DMSO'dan arındırılır. Pellet şeklinde çöktürülen hücrelerin üzerlerine 9 ml LentiX besiyeri eklenilip süspanse edildikten sonra, dibi kolajenle kaplanmış 6 kuyuluk kültür plağının her kuyusunda 1,5 ml hücre süspansiyonu olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilir. Kültür plağı $CO_2$'li inkübatörde 37 °C'de inkübasyona bırakılır. Ortalama 3 gün sonra hücreler %50-70 oranında konfliye olarak transfeksiyona hazır hale gelirler.

### 3.2.6.4. Transfeksiyon ve lentiviral vektörlerin eldesi

Başarılı bir transfeksiyon için, LentiX hücrelerinin sağlıklı bir şekilde kültür plağında çoğaltılarak %50-70 konfliye duruma gelmesi gereklidir. Söz konusu oran oldukça önemlidir. Hücreler %50'den daha az oranda konfliye olduğunda, transfeksiyon oranı düşecektir. %70'den daha yüksek oranda konfliye olduklarında ise bu kez de ko-transfeksiyon oranı daha yüksek olmasına rağmen, transfeksiyon sonrası hücreler çok

hızlı bölünerek kültür plağını dolduracak ve zamanından önce ölmeye başlayacaklardır.

Lentiviral vektör üretimi için kullanılacak plazmidler izole edilerek saflaştırıldıktan sonra, spektrofotometrede yapılan ölçüme göre konsantrasyonları aşağıda belirtilmiştir.

- transfer plazmidi (PLPT+hPTH): 1200 ng/µL
- paketleme plazmidi (psPAX2): 1080 ng/µL
- zarf proteinleri plazmidi (pMD.G): 190 ng/µL

Transfeksiyon için "X-fect transfeksiyon kiti" protokolü takip edilir. Protokole göre 6 kuyulu kültür plağının her kuyusuna 7,5 µg'a kadar plazmid DNA'sı yüklenilebilmektedir.

Ko-transfeksiyon için tek seferde 3 farklı plazmid kullanılacağından, kullanım miktarlarının plazmid boyutlarıyla doğru orantılı olarak hesaplanması gerekmektedir. Buna göre plazmidlerin ortalama boyutları ve kullanım miktarları şu şekilde hesaplanmıştır:

(6 kuyuluk kültür plağının tek bir kuyusu için)

- PLPT+hPTH: 9317 bp. için 3 µg
- psPAX2: 10703 bp. için 3 µg
- pMD.G: 6010 bp. için 1,5 µg

Protokole göre kullanılan her 1 µg plazmid DNA'sı için 0,3 µL X-fect polimeri kullanılması gerekmektedir. Buna göre tek kuyu için toplamda 7,5 µg plazmid DNA'sı kullanıldığından; 7,5 x 0,3 = 2,25 µL X-fect polimeri kullanılmalıdır. Aşağıdaki tabloda 6 kuyulu plağın her bir kuyusu için kullanılan plazmid miktar ve hacimleri gösterilmektedir.

**Tablo 3.10:** Ko-transfeksiyonda kullanılan plazmid miktar ve hacimleri (6 kuyuluk plağın tek bir kuyusu için)

| | **PLPT+hPTH** | **psPAX2** | **pMD.G** |
|---|---|---|---|
| Saflaştırma sonrası plazmid konsantrasyonu | 1200 ng/ml | 1080 ng/ml | 190 ng/ml |
| 1 kuyu için kullanılacak plazmid miktarı | 3 µg (3000 ng) | 3 µg (3000 ng) | 1,5µg (1500 ng) |
| 1 kuyu için kullanılacak plazmid hacmi | 3000/1200 = 2,5 µL | 3000/1080 = 2,8 µL | 1500/190 = 7,9 µL |

Kullanılacak plazmid ve polimer hacimleri hesaplandıktan sonra, kullanılacak X-fect reaksiyon tamponunun hacmi de buna göre belirlenilir. Her bir kuyu için hazırlanan toplam hacim 100 µL olmalı ve bu hacmin en az %50'sini X-fect reaksiyon tamponu oluşturmalıdır. Buna göre hazırlanan transfeksiyon solüsyonunda kullanılan plazmid, reaksiyon tamponu ve polimer miktarları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

**Tablo 3.11:** Ko-transfeksiyonda kullanılan plazmid, reaksiyon tamponu ve polimer miktarları

| | 6 kuyulu plağın her bir kuyusu için | 6 kuyulu plağın tümü için |
|---|---|---|
| Kullanılan toplam plazmid miktarı | 7,5µg | 7,5 x 6 = 45 µg |
| Kullanılan toplam plazmid hacmi | 2,5 + 2,8 + 7,9 = 13,2 µL | 13,2 x 6 = 79,2 µL |
| X-fect reaksiyon tamponu | 100 – (13,2 + 2,25) = 84,5µL | 84,5 x 6 = 507 µL |
| X-fect polimeri | 7,5 x 0,3 = 2,25 µL | 2,25 x 6 = 13,5 µL |
| Toplam hacim | 100 µL | 600 µL |

Transfeksiyon uygulamasının basamakları şöyledir:

- Transfeksiyon uygulamasından 30-60 dk önce LentiX hücrelerinin besiyeri tazelenmelidir. 6 kuyulu plağın her kuyusuna 900 ml LentiX besiyeri eklenilir (bkz: Besiyerleri)
- Protokole uygun olarak hazırlanan transfeksiyon solüsyonu, 6 kuyuluk plağın her bir kuyusuna 100 µL olacak şekilde damla damla ilave edilir.
- Hücreler 1 gece boyunca (ortalama 16 saat) transfeksiyon solüsyonuyla beraber 37 °C'de $CO_2$'li inkübatörde inkübasyona bırakılır.

- İnkübasyon süresi sonunda eski besiyeri ve transfeksiyon solüsyonu tümüyle uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 1 ml d-PBS(1x) ilave edilerek ortalama 1 dakika beklenilir ve uzaklaştırılır.
- Kültür plağının her bir kuyusuna 2 ml taze LentiX besiyeri eklenilerek, plak tekrar 37 C'lik $CO_2$'li inkübatörde inkübasyona bırakılır.
- Lentiviral vektör üretim miktarı, transfeksiyonu takiben ortalama 48. saat civarında en yüksek seviyede olmaktayken, daha sonra hücre ölümlerinin başlamasıyla yavaş yavaş azalmaya başlar. Transfeksiyonu takiben ortalama 5. günün sonunda hücrelerin çoğu ölmüş olur.
- Transfeksiyon sonrası besiyeri tazeleme işlemini takiben LentiX hücrelerinin ortalama 3 gün boyunca (72 saat) yüksek oranda lentiviral vektör üretimi yaparak besiyerine salgılamaları beklenilir. Bu süre boyunca besiyeri değişimi yapılmaz.
- Üçüncü günün sonunda lentiviral vektör yükü içeren besiyeri toplanılır. Viral vektörlerle beraber ölü hücre kalıntılarını da içeren besiyeri, oda sıcaklığında 500 G'de 5 dakika santrifüj edilerek ölü hücreler pellet şeklinde çöktürülerek ayrıştırılır. Sadece LV vektör yükü içeren supernatant toplanılır.
- LV vektör yükü içeren supernatant, 0,45 nm çapında porlu selüloz yapılı bir şırınga filtresiyle filtre edilerek tüm hücresel atıklardan arındırılır.
- Filtre edilerek arındırılan ve LV vektörlerle yüklü olan besiyeri, daha sonraki işlemler için 2 ml'lik kriyo tüplere bölüştürülerek -80 °C'de muhafaza edilir. Bundan sonraki bölümlerde, anlatım kolaylığı sağlaması açısından, arındırılma işlemleri tamamlanmış LV vektörlerle yüklü bu besiyerinden "lentiviral sıvı" olarak bahsedilecektir.
- Ölü hücrelerle beraber LV vektör kontaminasyonu barındıran eski hücre plağındaki kuyulara çamaşır suyu ilave edilerek viral yük inaktive edilir ve tıbbi atıkla uzaklaştırılır.

#### 3.2.6.5. Lentiviral vektörlerin etkinliğinin ve transdüksiyon konsantrasyonunun tesbiti

Üretilen lentiviral vektörlerin etkinliğinin tayini ve primer hücrelere uygulanacak transdüksüyon işlemi için kullanılacak lentiviral sıvının optimum konsantrasyonunun belirlenilebilmesi amacıyla, HEK 293T hücre hattına, farklı konsantrasyonlarda deneme amaçlı transdüksiyonlar gerçekleştirilecektir.

HEK 293T hücre hattı, kolayca transdükte olabilen bir hat olduğundan, lentiviral vektör konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan transdüksiyon denemelerinde en sık tercih edilen hücre hatlarından biridir.

Konsantrasyon tayini amacıyla kullanılan HEK 293T hücre hattı, tez projemizden önceki proje bütçeleriyle temin edilerek uzun süre -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

- Kültür aşaması için 1 adet HEK 293T kriyo tüpü ($2x10^6$ hücre/tüp) -80 °C'den çıkarıldıktan sonra önceki protokollerde anlatıldığı şekilde 6 kuyuluk kültür plağına yayılır ve birkaç gün kültüre edilerek çoğalmaları beklenilir.
- 3 günlük kültür sonrası hücrelerin çoğunun ölü olduğu ve bir kısmının da morfolojilerinin bozuk olduğu tespit edildiğinden, sadece sağlıklı hücre klonlarının gözlemlendiği 2 kuyudaki hücreler yeni bir 6 kuyuluk kültür plağına pasajlanarak, tümüyle sağlıklı hücrelerden oluşan yeni bir subkültür elde edilir.
- Hücrelerin 6 kuyuluk plağı ortalama %50-70 oranında konfliye etmeleri için ortalama 2 gün beklenilir.
- 6 kuyuluk kültür plağındaki her bir kuyu için 1/2 konsantrasyondan başlayıp 2'nin katlarıyla orantılı şekilde azalan dilüsyonlarda "lentiviral sıvı / LentiX besiyeri karışımı" hazırlanılır. Söz konusu karışıma transdüksiyon oranını arttırması için 10 µg/mL Polybrene eklenilir.
- Hek 293T kültür plağının her 6 kuyusu için azalan dilüsyonlarda hazırlanan "lentiviral sıvı / toplam besiyeri" oranları sırasıyla şöyledir: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32 ve 1/64.
- Kuyularda farklı konsantrasyonlarda lentiviral sıvı uygulanmasına rağmen, her kuyuya eşit şekilde 1 ml transdüksiyon besiyeri (lentiviral sıvı + LentiX besiyeri) eklenilir.
- Kültür plağı ortalama 18 saat boyunca 37C'lik $CO_2$'li inkübatörde inkübe edilerek transdüksiyon işlemi tamamlanır.
- Kuyulardaki transdüksiyon besiyeri atılarak 1 kez dPBS(1x) ile yıkama yapılarak uzaklaştırılır.
- Her kuyuya 1,5 ml taze LentiX besiyeri karışımı eklenerek tekrar 37 C'lik $CO_2$'li inkübatörde inkübasyona bırakılır.
- Transdüksiyonu takiben, lentiviral vektörlerin taşıdığı terapötik gen olan hPTH, raportör gen olan GFP ve seçici çoğaltım için gerekli puromisin direnç

genlerinin LentiX genomuna entegre olabilmesi için transdüksiyon sonrası ortalama 2-4 gün geçmesi gerekmektedir.

- 3 gün sonunda, hücrelerdeki GFP üretimi sebebiyle, hücreler floresan mikroskop altında yeşil renkte görünür. Bu sayede transdüksiyon yüzdesi ortalama olarak belirlenilebilir.
- Bazen yüksek konsantrasyonlarda viral sıvı ve Polybrene uygulaması hücreleri strese sokarak ölmelerine sebep olabilir. Transdüksiyon sonrasında hücre viabilitesinin korunması da en az transdüksiyon verimi kadar önemlidir. Bu sebeple primer hücrelere uygulanacak lentiviral sıvı konsantrasyonunun belirlenmesinde bu iki faktör beraberce değerlendirilerek primer hücrelere uygulanacak konsantrasyona karar verilir.
- Yapılan konsantrasyon denemelerinde "lentiviral sıvı / kültür besiyeri"nin 1/2 ve 1/4 oranlarda kullanıldığı kültür plağı kuyularında maksimum transdüksiyon verimi alındığı gözlenmiştir. Hücre viabilitesinin ise kültür plağının tüm kuyularda hemen hemen aynı olduğu ve transdüksiyon sonrası hücre morfolojilerinde belirgin bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Bununla beraber viabilitenin, 1/4 oranında uygulama yapılan kuyuda, 1/2 oranında uygulama yapılan kuyuya kıyasla bir miktar daha yüksek olduğu gözlenmiştir.
- Söz konusu veriler değerlendirildiğinde, primer hücrelere transdüksiyon aşamasında uygulanacak "optimum lentiviral sıvı / kültür besiyeri" oranının 1/4 olması gerektiğine karar verilmiştir.

### 3.2.7. Primer hücrelerin transdüksiyonu ve transdükte hücrelerin çoğaltılması

Transdüksiyon amacıyla kullanılan transdüksiyon besiyerinin hazırlığında 3 temel bileşen kullanılır: lentiviral sıvı, besiyeri ve Polybrene.

Lentiviral sıvının üretimi aşamalarından önceki bölümlerde detaylı olarak bahsedilmektedir. Transdüksiyonda kullanılan katyonik bir polimer olan Polybrene'in transdüksiyon verimini ciddi oranda arttırdığı tespit edilmiştir. Polybrene'in, viral vektör zarfı ve transdükte edilecek hedef hücre membanı arasındaki elektrostatik repulsiyonu nötralize ederek, viral vektörlerin hedef hücre membranına afinitesini arttırdığı ve bu yolla transdüksiyon verimliliğini 10 kata kadar arttırabildiği rapor edilmiştir [126]. Bu sebeple transdüksiyon besiyerine 10 µg/ml Polybrene ilave edilir.

Primer doku kültürünün başlangıcında 2 adet 6 kuyuluk plakta kültüre edilen primer doku parçalarından üretilen hücreler, kültürün ortalama 8. gününde %60-70 konfliye hale gelerek iki adet T-75 flaska pasajlanırlar. (bkz: Primer hücre kültürünün oluşturulması ve hücrelerin üretimi) Pasajlanan hücreler hızla bölünerek, kültürün ortalama 10. gününde 2 adet T-75 flaskı %50-70 oranında konfliye ederler.

İlk pasajlama sonrasında T-75 flasklar ortalama %50-70 oranında konfliye olduğunda ilk transdüksiyon için hazır hale gelmiş olurlar. Her iki flaska birden transdüksiyon yapılmakla beraber, aşağıda anlatılan prosedürler tek bir T-75 flask içindir.

Kullanılan transdüksiyon besiyerinin içeriği şöyledir:

- 2 ml lentiviral sıvı (bkz: "Lentiviral vektörlerin üretimi")
- Polybrene 10 µg/mL
- Besiyeri (%10 FBS, %1 Pen-Strep, %0,1 Primocin, DMEM/F-12)

Transdüksiyon aşamaları şöyledir:

- Eski besiyeri dökülerek uzaklaştırılır ve 2 kez d-PBS(1x) ile yıkama işlemi yapılarak hücreler arındırılır.
- 6 ml transdüksiyon besiyeri, T-75 flaskın dibindeki tüm hücreleri örtecek şekilde ilave edilir. Standart olarak T-75 flask için 12 ml besiyeri kullanılmasına karşın, transdüksiyon besiyerinin miktarının daha az olması önemlidir. Transdüksiyon besiyeri, tüm flaskın dibindeki hücreleri örtmeye yetecek miktarda, ancak viral vektörlerin besiyeri yüzeyinde yüzerek hedef hücrelerle temasının azalmaması için mümkün olduğunca düşük miktarda tutulmalıdır. Bu sebeple yaptığımız denemelerde 6 ml transdüksiyon besiyeri kullanımının ideal olduğu tespit edilmiştir.
- Transdüksiyon besiyeri ilavesi sonrasında T-75 flask $CO_2$'li inkübatörde 37 °C'de 18-20 saat inkübe edilerek transdüksiyon gerçekleştirilir.
- İnkübasyon sonrasında transdüksiyon besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 1 kez d-PBS(1x) ile yıkanarak arındırılır
- Uzaklaştırılmak istenen eski transdüksiyon besiyeri ve yıkamada kullanılan d-PBS(x1), halen bir miktar viral yük taşıyabileceği için, imha edilmeden önce 50 ml'lik bir falkon tübe aktarıldıktan sonra, üzerine eşit hacimde sodyum hipoklorit solüsyonu eklenerek 15 dk beklenilir ve viral vektörlerin tümüyle inaktive olması sağlanır. Daha sonra tıbbi atıkla atılır.

- Yıkama işleminin ardından T-75 flaska 12 ml primer hücre kültürü besiyeri eklenilerek, hücreler $CO_2$'li inkübatörde 37 °C'de ortalama 3 gün inkübe edilir.
- Transdüksiyon sonrası her 2-3 günde bir besiyeri değişimi yapılması, hücrelerin sağlığı ve olası bir kontaminasyonun önlenmesi açısından önemlidir.
- Transdüksiyonu takiben viral vektörlerin hedef hücrelere penetre olarak, terapötik genin nukleus zarından nukleus içerisine taşınması ve genoma entegre olma aşamaları için ortalama 2-4 gün geçmesi gerekmektedir. Bu süre içerisinde terapötik gen olan hPTH, raportör gen olan GFP ve puromisin direnç geni (*pac)* hedef hücre genomuna entegre olarak ekspresyona başlarlar. PTH ile beraber eksprese olan GFP sayesinde, hücreler floresan mikroskop altında incelendiğinde transdükte olan hücreler yeşil renkte görünürler.
- Transdüksiyonu takiben 3. günde floresan mikroskop altında yapılan gözlemsel değerlendirmeye göre transdükte olan ve olmayan hücreler birbirinden ayırt edilerek, ortalama transdüksiyon oranı belirlenilir. Genellikle tek transdüksiyon sonrası istenilen verim elde edilemeyebilir.
- İlk transdüksiyondan sonra GFP sinyali veren hücre oranı düşükse, ikinci hatta üçüncü kez yukarıda anlatılan transdüksiyon aşamaları tekrar edilir. İki transdüksiyon arasında 3 gün ara bırakmak yeterlidir.
- En son transdüksiyonu takiben 3-4 gün sonra, hücre morfolojilerinde belirgin bir değişim ve yüksek oranda senesense girmiş hücreler yoksa, sadece transdükte hücrelerin yaşamına devam edip, diğer hücrelerin apoptoza gitmesi için "puromisin" uygulaması gerçekleştirilir.

Puromisin, aminoglikozid türevi bir antibiyotik olup, hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde güçlü bir translasyonel inhibitör olarak iş görerek, protein sentezini engeller ve bu sayede hücre ölümüne sebep olur [127]. Ancak transfer plazmidinde selektif amaçlı olarak puromisin direnç geni *(pac)* de bulunmakta ve transdüksiyon sonrası terapötik gen (hPTH) ve raportör gen (GFP) ile birlikte transdükte olan hücrelerin genomuna entegre olmaktadır. Bu sayede kültür ortamına ilave edilen 1,5 µg/mL puromisin, 3-5 gün içerisinde neredeyse tüm transdükte olmayan hücreleri öldürürken, sadece transdükte hücrelerin yaşamını sürdürdüğü saf bir kültür elde edilmesini sağlamaktadır. Bununla beraber, transdükte hücreler eğer senesense girmeye başlamışlarsa, "*pac"* geni taşımalarına rağmen, antibiyotiğin

hücrede yaratmış olduğu strese dayanamayarak apoptoza girebilirler. Bu sebeple puromisin uygulaması öncesi hücrelerin morfolojileri ve bölünme hızları dikkatlice değerlendirildikten sonra, senesense giren hücre oranı göz önünde bulundurularak, puromisin uygulamasının yapılıp yapılmamasına karar verilir.

Ardışık transdüksiyon uygulamaları sonucu hücrelerin büyük çoğunluğunun morfolojilerinde senesense girmeye başladıklarını işaret eden değişimler gözlenmeye başlanılmışsa, daha fazla zaman kaybedilmeden kültür aşaması sonlandırılarak hücrelerin bir an önce sıçana geri enjeksiyonu gerçekleştirilir.

Ancak ardışık transdüksiyonlar (max 3 kez) sonrasında hücrelerin büyük çoğunluğu halen genç hücrelerden oluşmaktaysa, puromisin uygulaması yapılarak sadece transdükte hücrelerden oluşan saf bir kültür elde edilir, transdükte olmayan hücrelerin tümünün apoptoza girmesi sağlanılır. Puromisin uygulamasından sonra, transdükte olmuş hücrelerin, transdükte olmadığı için ölen hücrelerin yerlerini dolduracak şekilde bölünerek çoğalmaları ve içinde bulundukları T-75 kültür plaklarını tam olarak konfliye edebilmeleri için ortalama 7-9 gün beklenilir. Bu sürenin sonunda *ex vivo* gen terapisi gerçekleştirilen hücreler, sıçan vücuduna geri enjekte edilir.

### 3.2.8. Transdükte otolog hücrelerin sıçana geri enjeksiyonu, enjekte edilen hücre sayısının tespiti ve biyokimyasal testler

#### 3.2.8.1. Transdükte otolog hücrelerin sıçana geri enjeksiyonu

Otolog primer hücrelerin kültüre edilmeleri ve transdüksiyon aşamaları tamamlandıktan sonra, transdükte olan hücrelerin eş zamanlı olarak hPTH ve GFP üretimi yaptıkları ve bu sebeple floresan mikroskopta yeşil renkte görüntülendiklerinden bahsedilmiştir. Bunun yanı sıra hücrelerin hPTH üretimi ve salgılaması yapabildiğinin de doğrulanması amacıyla, 2 günlük kültür besiyerinden alınan 1 ml numune, Bezmialem Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda analiz edilerek hPTH miktarı tespit edilir.

hPTH üretimi yaptığı doğrulanan hücrelerin kültür flasklarından ayrıştırılarak, sıçan vücuduna enjeksiyon aşamaları şöyledir:

- Kültür flasklarından besiyerleri döküldükten sonra, hücreler ardışık olarak 2 kez d-PBS(1x) ile yıkanarak arındırılır. Son yıkamada flaskların üzerine 10'ar ml d-PBS(1x) ilave edilerek 10 dakika $CO_2$'li inkübatörde inkübasyon

gerçekleştirilir ve d-PBS(x1) dökülerek uzaklaştırılır. Bu sayede hücrelerin besiyeri ve FBS kalıntılarından tümüyle arındırılması sağlanılır.

- Her bir T-75 flasktaki hücreler, önceki bölümlerde anlatılan pasajlama protokolünde bahsedildiği şekilde tripsinizasyonla süspanse edilir ve ardından tripsin nötralize edilir.
- Tripsinizasyon sonrası ayrışmayan hücreler için steril bir hücre kazıyıcısı kullanılarak, tüm hücrelerin nazikçe flaskların dibinden ayrıştırılması ve süspanse hale gelmeleri sağlanılır.
- Her bir T-75 flasktan elde edilen hücre süspansiyonu, 50 ml'lik falkon tübe aktarılarak oda sıcaklığında, 300 G de 5 dakika santrifüj edilerek pellet şeklinde çöktürülür ve supernatant tümüyle dökülerek uzaklaştırılır.
- Dibinde hücre pelletleri bulunan falkon tüplere 10'ar ml steril izotonik eklenilir ve falkon tüpler hafifçe karıştırılarak hücrelerin izotonik içerisinde homojen şekilde süspanse olmaları sağlanılır.
- Tüm falkon tüplerdeki hücre süspansiyonları tek bir falkon tüp içerisinde birleştirilerek oda sıcaklığında 300 G'de 5 dakika santrifüj edilerek tüm hücreler çöktürülür. Supernatantın dökülmesiyle hücreler, tüm besiyeri ve enzim kalıntılarından arındırılırlar. Bu işlem sayesinde ortamdaki tüm tripsin ve FBS kalıntılarının uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Aksi takdirde enjeksiyon bölgesinde olası bir enflamasyon oluşabilir.
- Arındırılarak çöktürülen hücre pelletinin üzerine 1 ml steril izotonik eklenilerek, hücreler süspanse edilir ve enjeksiyona hazır hale gelirler.
- Enjeksiyon öncesi sıçana uygulanan Isofluran inhalasyonu ile sedasyon gerçekleştirilir.
- 1 ml'lik hücre süspansiyonu için 2,5 ml'lik enjektör ve 21 Gauge iğne kullanılarak enjeksiyon gerçekleştirilir. Hücrelerin hasar görmemesi için enjeksiyonun oldukça yavaş yapılması çok önemlidir.
- Enjeksiyon, daha önce deri numunesi alınıp iyileşen sırt bölgesine subkutan olarak gerçekleştirilir.

#### 3.2.8.2. Enjekte edilen canlı hücre sayısının tespiti

Enjekte edilen hücre süspansiyonundan, hücre sayımı ve viabilite analizi için 30µL numune ayrılarak aşağıdaki şekilde canlı hücre sayımı yapılır:

- 30 µL hücre süspansiyonu 30 µL %0,4'lük tripan mavisi ile karıştırılarak 5 dakika beklenilir. Bu süre içerisinde canlı hücreler boyanmazken, ölü hücreler maviye boyanırlar.
- 10 µL hücre süspansiyonu + tripan mavisi karışımı Neubauer lamında incelenerek sadece canlı hücrelerin sayımı yapılır.
- Neubauer lamının 4 büyük boy karesindeki toplam canlı hücreler sayıldıktan sonra 4'e bölünerek tek bir büyük karedeki ortalama canlı hücre sayısı bulunur. Şu formüle göre 1 ml hücre solüsyonundaki canlı hücre sayısı tespit edilir: CHS x 2 x $10^4$ (CHS: tek büyük karedeki ortalama canlı hücre sayısı; x2: tripan mavisi kullanımı nedeniyle seyreltme oranı; $10^4$: 1ml'deki hücre sayısını bulmak için kullanılan sabit değer)

#### 3.2.8.3. Biyokimyasal testlerle sıçan vücudundaki hPTH'ın tespiti

Ex-vivo gen terapisiyle hPTH ekspresyonu yapan otolog hücrelerin sıçan vücuduna geri enjeksiyonunu takiben, 45 günlük süreçte (15 günlük aralıklarla) deney sıçanlarından kan numuneleri alınarak Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya laboratuvarına götürülür ve hPTH analizleri yaptırılır. Bunun sonucunda sıçan vücudunda hPTH üretimi teyit edilmiş olur.

hPTH'ın biyokimyasal analizi için Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya laboratuvarında bulunan "Architect ci 16200" adlı cihaz ve "Architect Intact PTH" adlı ölçüm kiti kullanılır. Kullanılan "Architect Intact PTH" kiti sadece intakt insan PTH'ının ölçümünü yapmaktadır [hPTH(1-84)]. Kemilüminesan mikropartikül immunolojik tetkikidir (CMIA). Söz konusu kitin kalibrasyon aralığı 0,0-3000,0 pg/mL'dir. Architect Intact PTH tetkikinin analitik hassasiyeti %95 güven düzeyinde 0,23 pg/mL olarak hesaplanmıştır. Architect Intact PTH tetkiki sadece hPTH (1-84) için spesifik olup, yapısal olarak benzer diğer PTH fragmanlarıyla çapraz reaktivite gösterme oranı ≤ % 0,01 olacak şekilde tasarlanmıştır.

# 4. BULGULAR

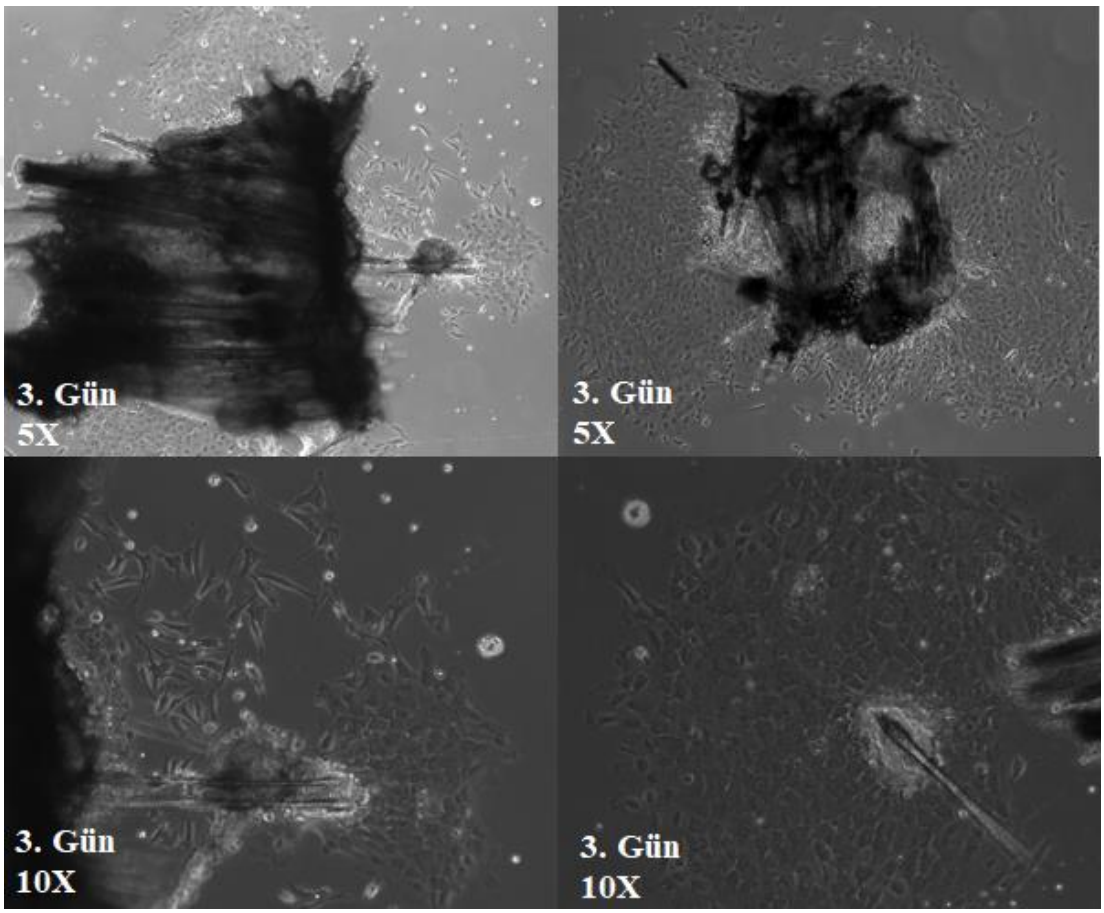
## 4.1. Sıçandan Deri Numunesinin Alınması

Sıçandan deri numunesinin alınma aşamaları "Doku numunesinin alınması" bölümünde detaylı olarak anlatılmıştır. Genel anestezi altında sırt bölgesinden yaklaşık 2x3 cm'lik tam kat doku kesiti alındıktan sonra, dokunun alındığı bölge, cerrahi dikiş ipliği ile dikilerek kapatılır ve pansuman yapılır. Olası bir enfeksiyon riskine karşı opere sıçana i.m antibiyotik ve ağrı kesici enjeksiyonu yapılarak, iyileşme süresi için istirahate bırakılır. Opere bölgenin cerrahi işlemi takiben 7-10 gün içerisinde kapandığı, 15-20 gün içerisinde ise traş edilen bölgede tüylerin çıkmasıyla beraber dokunun eski haline döndüğü gözlemlenir. Deri eksizyonu ve iyileşme aşaması aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

**Şekil 4.1:** Deri eksizyonu ve iyileşme aşaması
A)Deri eksizyonu / B)Post-opere / C)Post-opere 20. Gün

### 4.2. Otolog Primer Hücrelerin Çoğaltılması

Sıçandan eksize edilen doku parçasının kültüre edilmesi ve otolog primer hücrelerin çoğaltılmasına ait tüm basamaklar "Otolog primer hücre kültürünün oluşturulması ve hücrelerin çoğaltılması" adlı başlıkta detaylı olarak anlatılmıştır. Aşağıdaki görsellerde doku kültürünü takiben, kültürün 3., 7., 12. günlerinde çekilmiş olan ışık mikroskobu görüntüleri yer almaktadır.

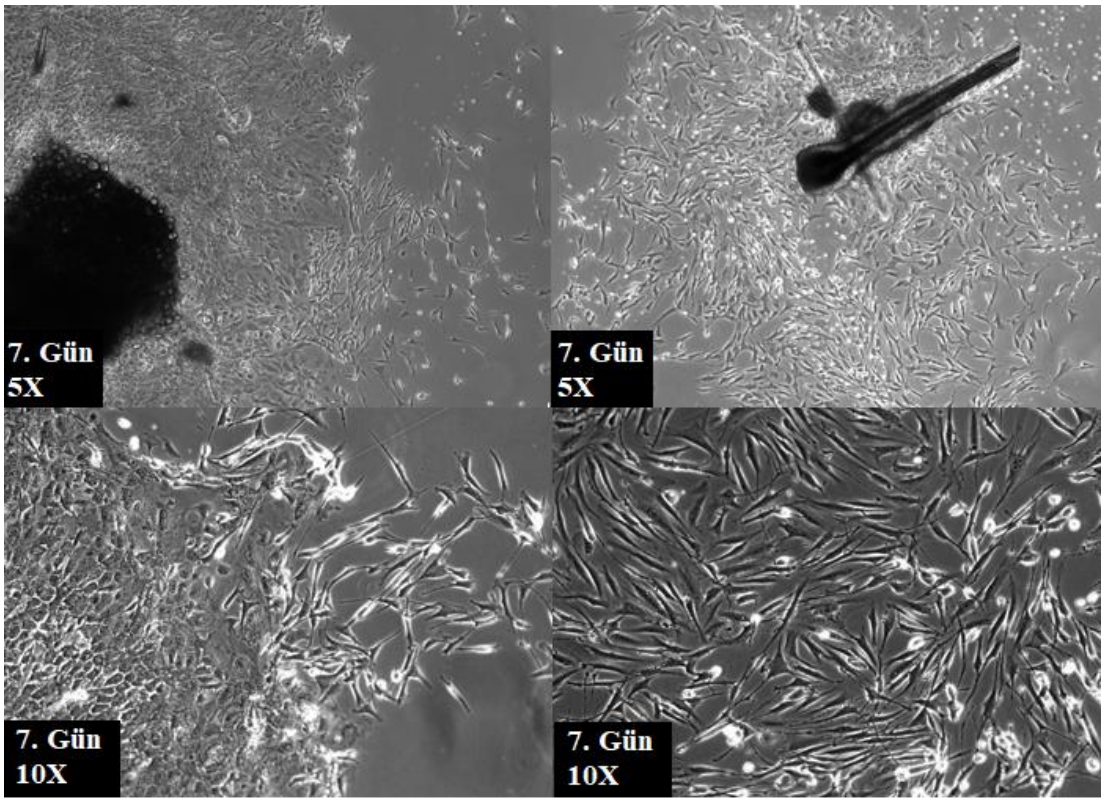



**Şekil 4.2:** Primer doku kültürünün 3. günü ışık mikroskobu görüntüleri (5X ve 10X objektiflerde)

Yukarıdaki görselde kültürün 3. gününe ait, 5X ve 10X objektiflerle görüntülenmiş, farklı kültür bölgelerinin ışık mikroskobu görüntüleri yer almaktadır. Başarılı bir kültür neticesinde, küçük doku parçalarının kültür plağının dibine yapıştığı, kültürün 3. gününde dahi söz konusu küçük doku parçalarının çevresinde yeni hücrelerin bölünerek çoğalmaya başladığı gözlemlenir. Özellikle kıl folikülleri, kök hücre rezervi

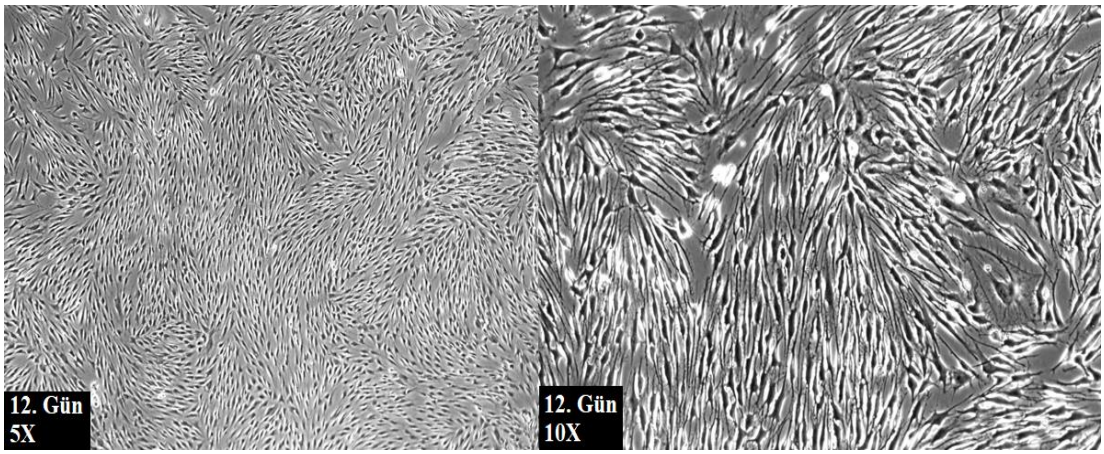
açısından zengin bir kaynak olduğundan, foliküllerin çevrelerinde yoğun bir hücre bölünmesi ve çoğalması gözlemlenilir.

Aşağıdaki görselde kültürün 7. gününe ait, 5X ve 10X objektiflerle görüntülenmiş, farklı kültür bölgelerinin ışık mikroskobu görüntüleri yer almaktadır. Kültürün ilk haftasında hücreler çok hızlı bölünüp çoğalarak kültür plağını kaplamaya başlarlar. Hızlı bölünme döngülerinden dolayı, dokuların çevresinde üreyen yeni hücrelerin, sonraki pasajlamalarla elde edilen kültürlerdeki hücrelere kıyasla daha küçük morfolojiye sahip oldukları gözlemlenilir. Doku kültürünün ortalama 8. - 9. günlerinde hücreler çoğalarak plağın %70'ini konfliye ederler ve pasajlanmaya hazır hale gelirler.




**Şekil 4.3:** Primer doku kültürünün 7. günü ışık mikroskobu görüntüleri
(5X ve 10X objektiflerde)

Aşağıdaki görselde hücre kültürünün 12. gününe ait, 5X ve 10X objektiflerle görüntülenmiş bir kültür bölgesinin ışık mikroskobu görüntüleri yer almaktadır. İlk doku kültürünün oluşturulmasını takiben ortalama 8. günde, doku kalıntılarından ayrıştırılarak 2 adet T-75 flaska pasajlanan hücreler, hızlı şekilde bölünerek çoğalmaya devam ederler. Kültürün başlangıcından sonra ortalama 12-14. günlerde flasklar %90 konfliye hale gelir.




**Şekil 4.4:** İlk pasajlamayla doku kalıntılarından arındırılan hücrelerin 12. günü ışık mikroskobu görüntüleri (5X ve 10X objektiflerde)

## 4.3. Transfeksiyon Plazmidlerininin Kimyasal Saflığının Değerlendirilmesi ve Konsantrasyonlarının Ölçümü

Lentiviral vektör üretiminde kullanılacak plazmidler "Transfeksiyon ve lentiviral vektörlerin eldesi" adlı bölümde anlatıldığı şekilde çoğaltılmalarının ardından, izolasyon ve purifikasyon aşamalarından geçirildikten sonra saf şekilde elde edilirler. Spektrofotometre ile protein ve kimyasallardan ne oranda arındırılabildikleri (saflıkları) ve konsantrasyonları ölçülür. Her üç plazmidin konsantrasyonu şu şekilde ölçülmüştür:

- transfer plazmidi (PLPT+hPTH): 1200 ng/µL
- paketleme plazmidi (psPAX2): 1080 ng/µL
- zarf proteinleri plazmidi (pMD.G): 190 ng/µL

Her üç plazmidin saflığı 260/280 nm dalga boyunda şu şekilde ölçülmüştür:

- transfer plazmidi (PLPT+hPTH): 1,81
- paketleme plazmidi (psPAX2): 1,80
- zarf proteinleri plazmidi (pMD.G): 1,81

DNA saflığının spektrofotometrik tayini için 260/280 nm dalga boyunda okunan değer 1,80 oranına ne kadar yakınsa, numunenin o oranda saf olduğu anlaşılır. Buna göre değerlendirildiğinde, her üç plazmidin de yüksek saflıkta elde edilmiş olduğu görülmektedir. Yüksek saflıkta üretilemeyen plazmidler için tekrar çoğaltım, izolasyon ve purifikasyon aşamaları tekrar edilir.

### 4.4. Transfeksiyon Plazmidlerinin Doğrulanması ve Genomik Saflığının Değerlendirilmesi

Spektrofotometre ile protein ve kimyasallardan ne oranda arındırılabildikleri (saflıkları) ve konsantrasyonları ölçülen plazmidlerin doğrulanmalarının yapılabilmesi ve bakteriye ait genomik DNA ile RNA kontaminasyonundan da arındırılabildiğinin gösterilebilmesi için, genomik haritası bilinen her üç plazmid de EcoRI enzimiyle kesilerek agaroz jel elektroforezi uygulanır. Elektroforez sonrası ayrıştırılan DNA fragmanları, jel görüntüleme cihazında görüntülenir ve DNA fragmanlarının boyları, kullanılan DNA markörüyle kıyaslanarak ölçülür.

Her üç plazmidin uzunluğu, kesim sonucu oluşan bant sayıları ve uzunlukları şöyledir:

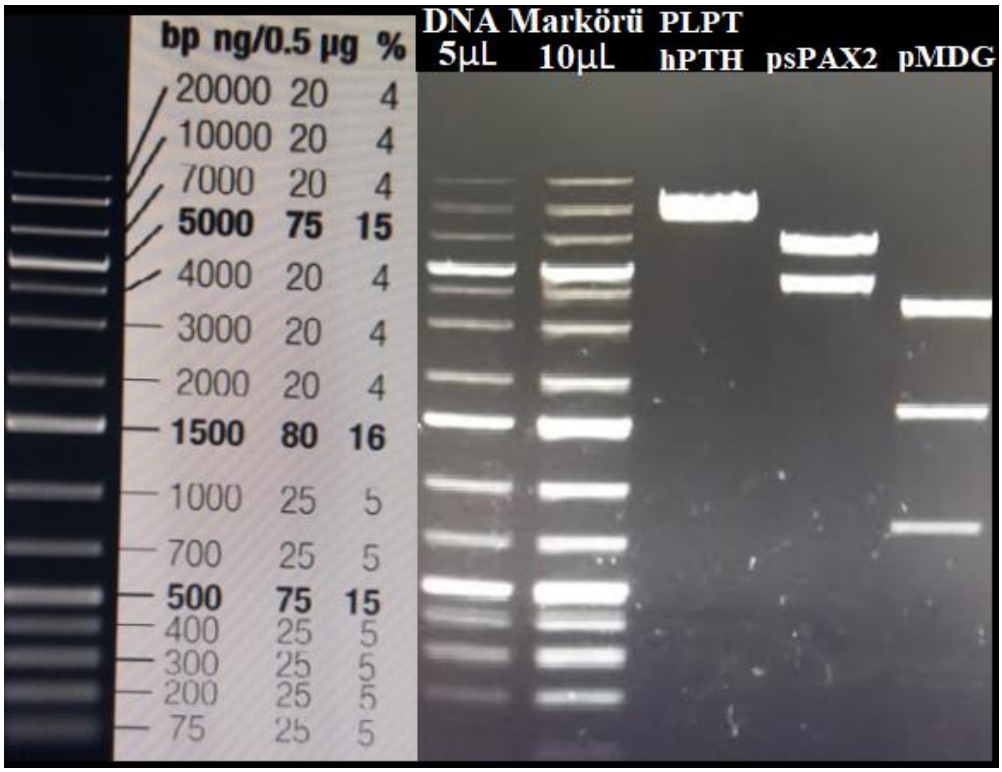
- PLPT+hPTH plazmidi:
  - Uzunluğu: 8950 + 367
  - Kesilen bölge sayısı: Tek
  - Kesim sonucu oluşan DNA fragman sayısı (bant) ve uzunluğu: 9317 bp uzunluğunda tek bant

- psPAX2 plazmidi:
  - Uzunluğu: 10703 bp
  - Kesilen bölge sayısı: Çift
  - Kesim sonucu oluşan DNA fragman sayısı (bant) ve uzunluğu: 4374 bp ve 6309 bp uzunluğunda iki bant

- pMD.G plazmidi:
  - Uzunluğu: 6010
  - Kesilen bölge sayısı: Üç
  - Kesim sonucu oluşan DNA fragman sayısı (bant) ve uzunluğu: 780 bp, 1600 bp ve 3630 bp uzunluğunda üç bant

Aşağıdaki görsele ait en sol sütunda, kullanılmış olan DNA markörüne ait DNA fragmanları ve uzunlukları gösterilmektedir. Jel görüntüsünün ilk iki sütununda ise farklı miktarlarda kullanılan DNA markörleri, sonra sırasıyla restriksiyon kesimi gerçekleşmiş PLPT+hPTH, psPAX2 ve pMD.G plazmideri yer almaktadır. Elde edilen DNA fragmanlarının uzunlukları, uzunluğu bilinen markör fragmanlarıyla kıyaslanarak tespit edilir.

Jel görüntüsünde smear, smoke veya beklenmeyen DNA bantları mevcut değildir. Bu durum, elde edilmiş olan plazmidlerde olası bir genomik DNA veya RNA kontaminasyonu olmadığını göstermektedir.



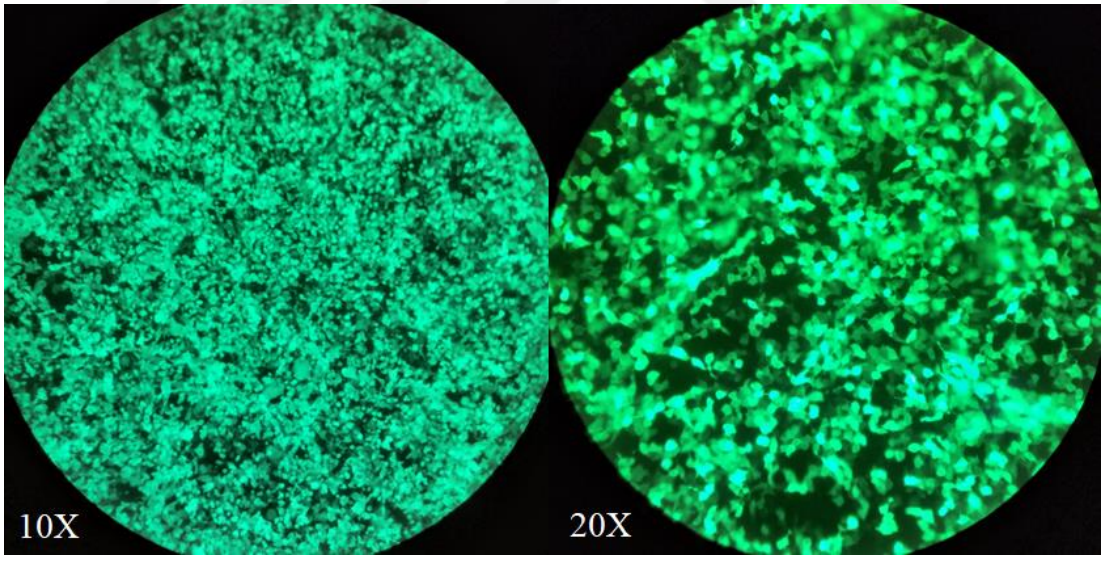

**Şekil 4.5:** PLPT+hPTH, psPAX2 ve pMD.G plazmiderinin EcoRI ile kesimi sonrası agaroz jel elektroforez görüntüleri

### 4.5. LentiX Hücre Hattının Transfeksiyon Bulguları

hPTH terapötik genini taşıyan LV vektörlerin üretimi için konakçı hücre olarak LentiX hücre hattının kullanıldığından ve söz konusu hücre hattının PLPT+hPTH, psPAX2 ve pMD.G plazmidleriyle aynı zamanda ko-transfekte edildiğinden "Transfeksiyon ve lentiviral vektörlerin eldesi" adlı başlıkta detaylı olarak bahsedilmektedir.

Ortalama transfeksiyon başarısı, transfeksiyonun ertesi günü, LentiX hücreleri floresan mikroskop altında incelendiğinde, “GFP üretimi yapan hücre sayısı / toplam hücre sayısı” oranı gözlemsel olarak değerlendirilerek tayin edilir. GFP proteini, sadece transfer plazmidi olan PLPT+hPTH plazmidinde mevcuttur, diğer plazmidlerde bulunmamaktadır. Dolayısıyla tespit edilen GFP sinyali, direk olarak hangi hücrelerde lentiviral üretim yapıldığını göstermez, sadece PLPT+hPTH plazmidiyle transfekte olan hücreleri gösterir. Lentiviral üretimin gerçekleşebilmesi için, söz konusu hücrelerin her üç plazmidle aynı anda ko-transfekte olması gerekmektedir. Bununla birlikte, PLPT+hPTH plazmidiyle transfekte olan hücre oranının yüksek olması, diğer plazmidlerle gerçekleşen transfeksiyon oranlarının da aynı şekilde yüksek olduğunu, dolayısıyla lentiviral üretim titresinin de yüksek olduğunu işaret eder.

Transfeksiyon sonrası floresan mikroskopta gözlemlenen “GFP üretimi yapan hücre sayısı / toplam hücre sayısı” oranı %90-98 olup son derece yüksektir. Bu da yüksek titrede lentiviral vektör üretimi yapıldığını işaret etmektedir. Aşağıdaki görselde transfeksiyondan 1 gün sonra LentiX hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüleri yer almaktadır.




**Şekil 4.6:** Transfeksiyondan 1 gün sonra LentiX hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri (10X ve 20X objektiflerle)

Lentiviral vektör üretimi yapan tahmini hücre oranını hesaplamak için, psPAX2 ve pMD.G vektörleriyle transfekte olan hücre oranlarının, PLPT+hPTH plazmidiyle transfekte olan hücre oranıyla hemen hemen aynı olduğu varsayılarak şu formül kullanılır:

[GFP üretimi yapan hücrelerin toplam hücrelere oranı]$^3$

Dolayısıyla GFP sinyali veren hücrelerin (PLPT+hPTH plazmidiyle transfekte olan hücrelerin), tüm hücrelere oranları hesaplanarak ortalama olarak [90/100] oranı bulunduğunda; [90/100]$^3$ formülü kullanılarak, her üç plazmidle de aynı anda ko-transfekte olup, lentiviral üretim yapan hücrelerin, tüm hücrelere oranı yaklaşık olarak [73/100] olarak tespit edilebilir.

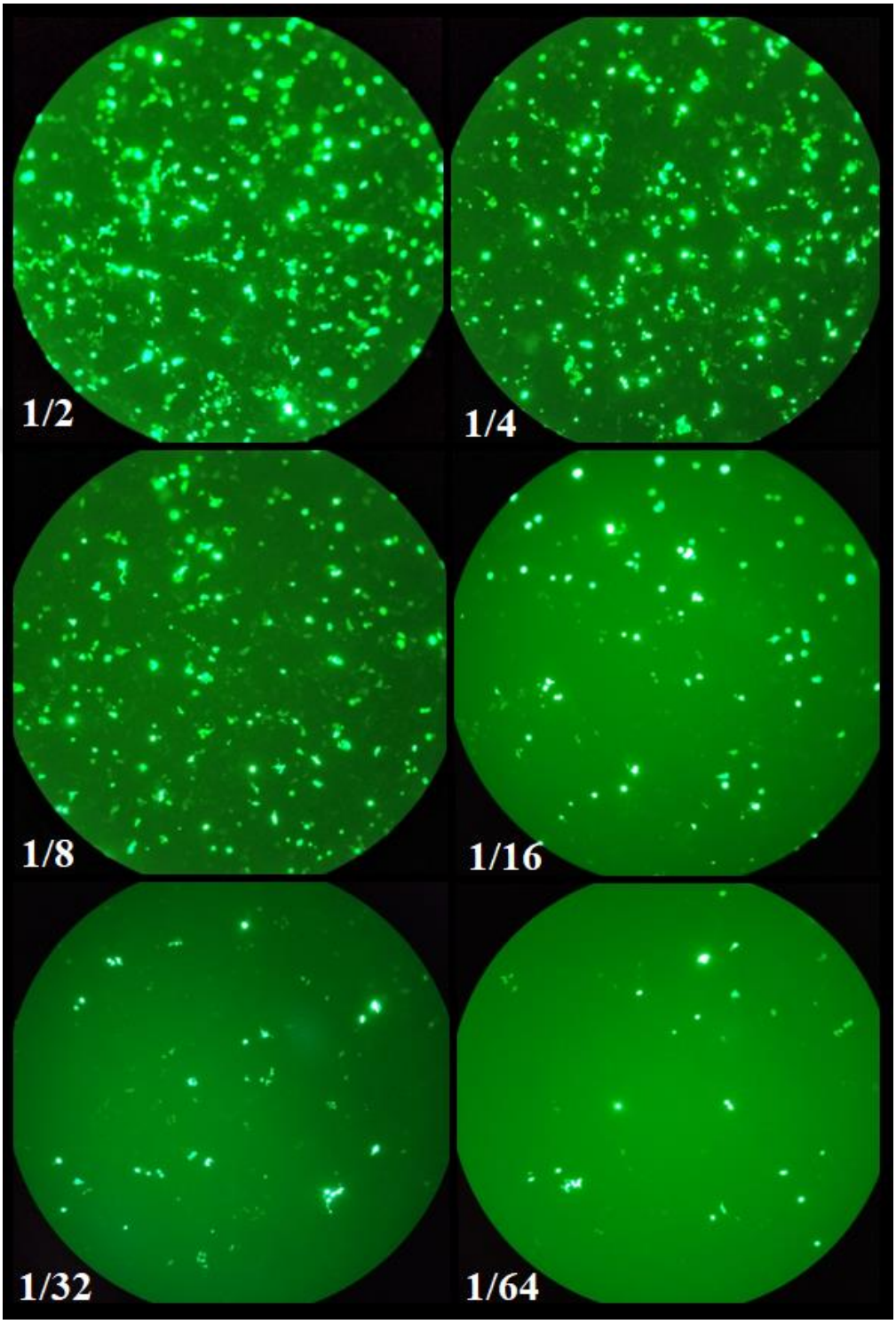
### 4.6. Lentiviral Vektörlerin Etkinliğinin ve Otolog Primer Hücrelere Uygulanacak Transdüksiyon Konsantrasyonunun Tesbiti

Üretilen lentiviral vektörlerin etkinliğinin tayini ve primer hücrelere uygulanacak transdüksüyon işlemi için, kullanılacak lentiviral sıvının optimum konsantrasyonunun belirlenilebilmesi amacıyla HEK 293T hücre hattı tercih edilmiştir. HEK 293T hücre hattı, kolayca transdükte olabilen bir hat olduğundan, lentiviral vektör konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan transdüksiyon denemelerinde en sık tercih edilen hücre hatlarından biridir.

6 kuyuluk kültür plağındaki her bir kuyu için 1/2 konsantrasyondan başlayıp 2'nin katlarıyla orantılı şekilde azalan dilüsyonlarda "lentiviral sıvı / toplam besiyeri karışımı" hazırlanılır. Kültür plağının her 6 kuyusu için azalan dilüsyonlarda hazırlanan "lentiviral sıvı / toplam besiyeri" oranları sırasıyla şöyledir: 1/2; 1/4; 1/8; 1/16; 1/32 ve 1/64.

Transdüksiyonu takiben 3. günde, hücreler floresan mikroskop altında incelendiğinde, "lentiviral sıvı / toplam besiyeri" oranlarının 1/2 ve 1/4 olduğu plak kuyularında, maksimum transdüksiyon verimi alındığı gözlenmiştir. Hücre viabilitesinin ise kültür plağının tüm kuyularında hemen hemen aynı olduğu ve transdüksiyon sonrası hücre morfolojilerinde belirgin bir değişim olmadığı tespit edilmiştir. Bununla beraber viabilite oranlarının, "1/4 oranında uygulama yapılan kuyuda", "1/2 oranında uygulama yapılan kuyuya" kıyasla bir miktar daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Söz konusu veriler değerlendirildiğinde, primer hücrelere transdüksiyon aşamasında uygulanacak "optimum lentiviral sıvı / kültür besiyeri" oranının 1/4 olması gerektiğine karar verilmiştir.

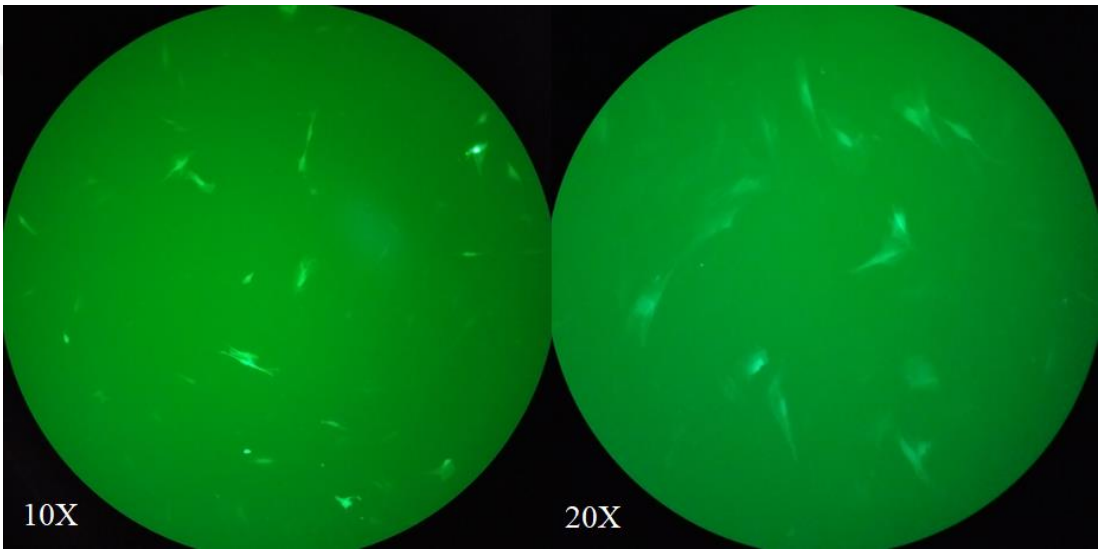
Aşağıdaki görselde farklı konsantrasyonlarda transdüksiyon yapılan HEK 293T hücrelerinin transdüksiyonu takiben 3. güne ait floresan mikroskop görüntüleri görülmektedir.




**Şekil 4.7:** HEK 293T hücre hattında farklı viral sıvı konsantrasyonlarda transdüksiyon denemeleri (10X objektifte; sırasıyla 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 konsantrasyonlar)

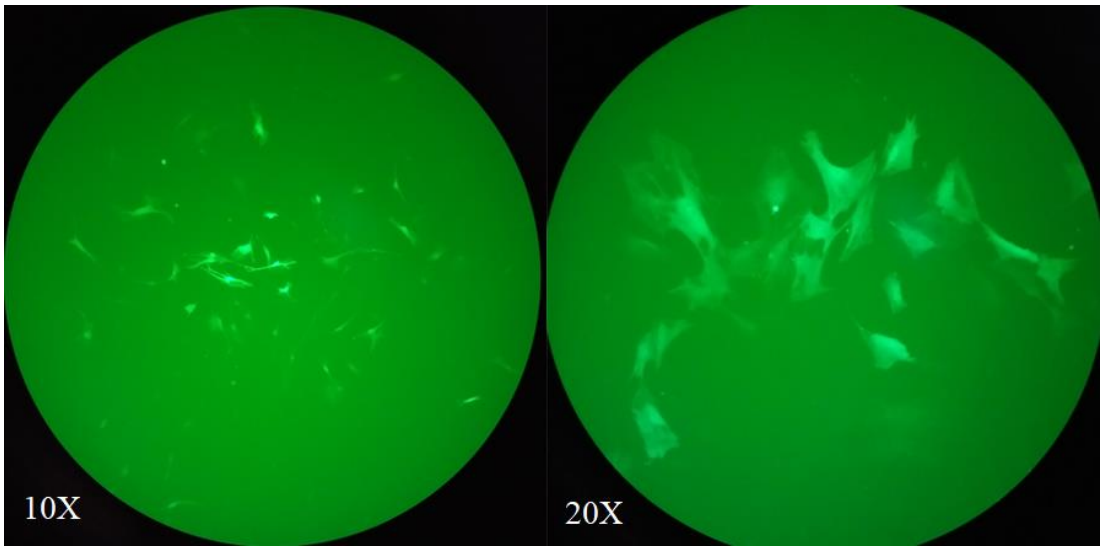
### 4.7. Transdüksiyon Bulguları

HEK 293T hücrelerinde yapılan transdüksiyon konsantrasyon denemeleri sonucunda optimum transdüksiyon konsantrasyonu (lentiviral sıvı / toplam besiyeri) 1/4 olarak belirlendikten sonra; T-75 flasklarda çoğaltılmış olan otolog primer hücrelere 1/4 oranında ilk transdüksiyon işlemi uygulanır. Transdüksiyon oranını arttırması için besiyerine 10 µg/ml Polybrene eklenilir. İlk transdüksiyonu takiben 3 gün sonra hücreler floresan mikroskop altında değerlendirildiğinde ortalama %10-20 transdüksiyon verimi gözlemlenir (Şekil 4.7).




**Şekil 4.8:** İlk transdüksiyonu takiben 3 gün sonra hücrelerin floresan mikroskoptaki görünümü (10X ve 20X objektiflerde)

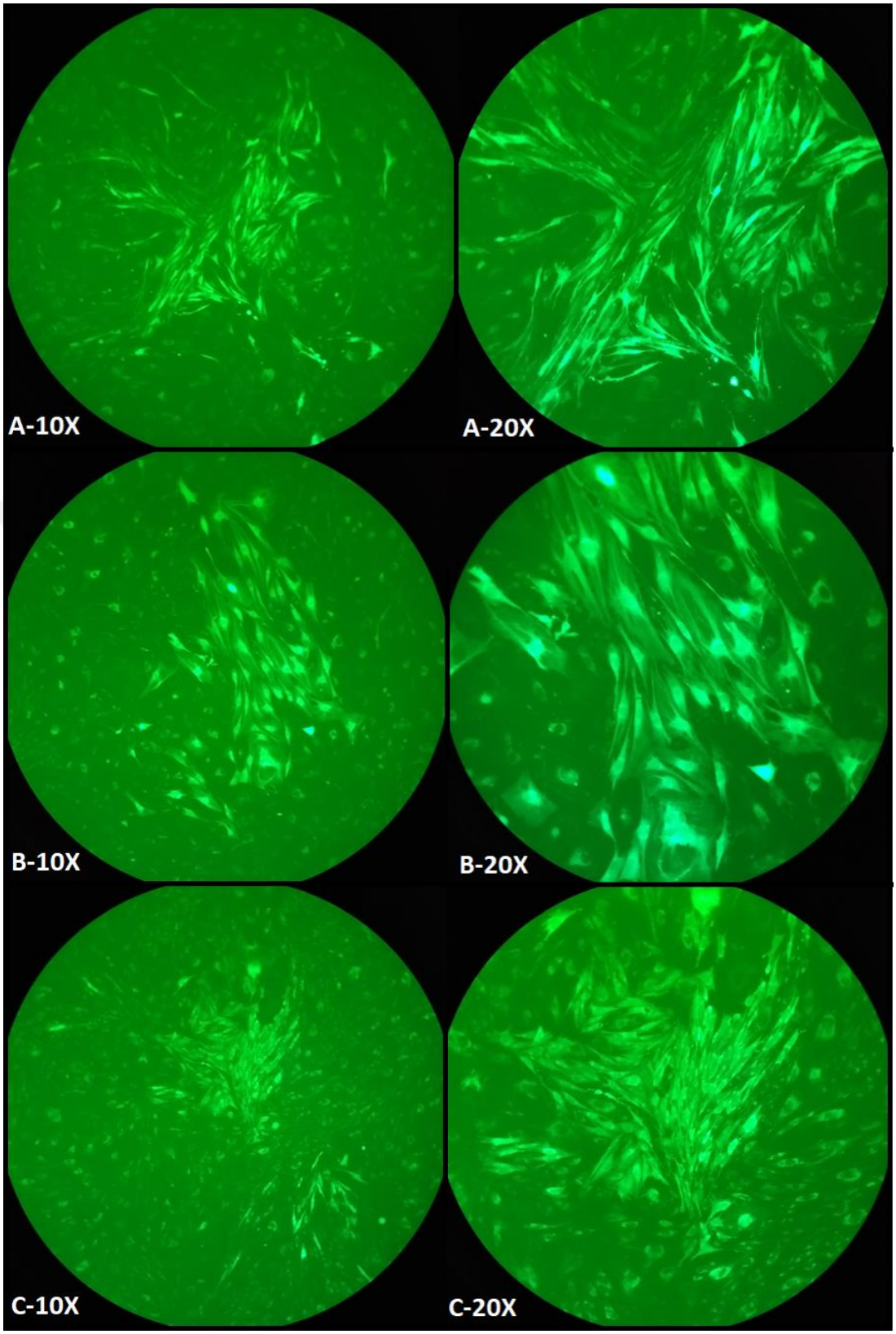
Yeterli verim elde edilemediği için ilk transdüksiyonu takiben 3. gün, hücrelere ikinci kez transdüksiyon işlemi uygulanır. İkinci transdüksiyonu takiben 3 gün sonra, hücreler ikinci kez floresan mikroskopta görüntülendiğinde transdüksiyon veriminin %20-30'a çıktığı gözlemlenir (Şekil 4.8).




**Şekil 4.9:** İkinci transdüksiyonu takiben 3 gün sonra hücrelerin floresan mikroskoptaki görünümü (10X ve 20X objektiflerde)

Yeterli verim elde edilemediği için ikinci transdüksiyonu takiben 3. gün, hücrelere üçüncü ve son kez transdüksiyon işlemi uygulanır. Son transdüksiyonu takiben 3. gün hücreler floresan mikroskopta görüntülendiğinde transdüksiyon veriminin ortalama %50'lere çıktığı gözlemlenir.

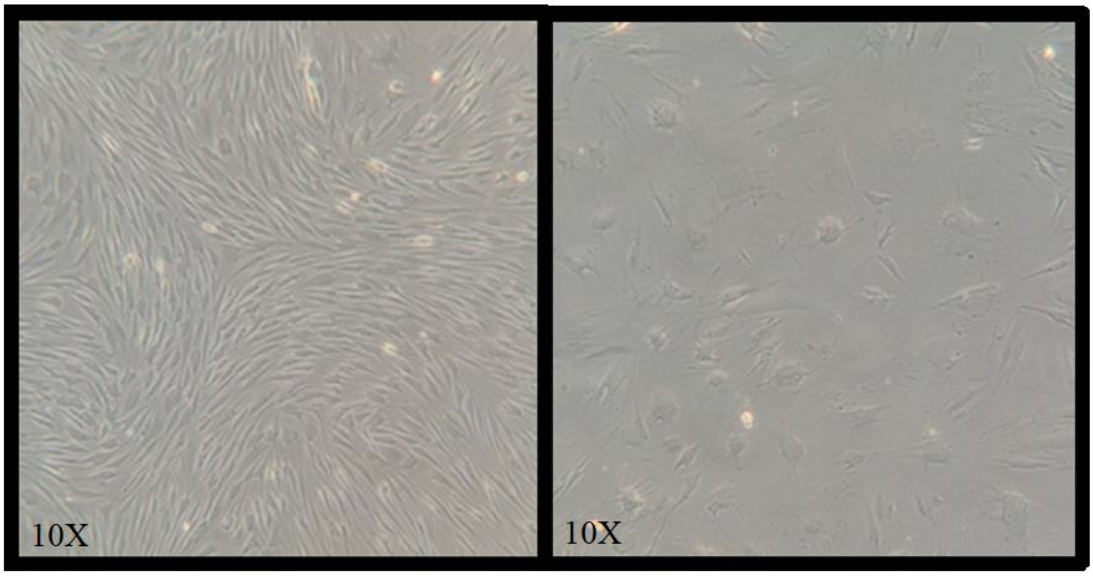
Ardışık transdüksiyon işlemleri sonrası en az %50 transdüksiyon verimi elde edildiğinde, transdükte olmamış hücrelerin ölmesi ve sadece transdükte olmuş hücrelerin bölünerek çoğalmaya devam etmeleri için her iki T-75 kültür flask ortamına 1,5 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde "puromisin" uygulaması yapılır. 3-5 gün içerisinde transdükte olmayan neredeyse tüm hücrelerin öldüğü ve sadece transdükte hücrelerin yaşamaya devam ettiği gözlemlenir. Bu sayede sadece hPTH geniyle transdükte olmuş primer hücrelerden oluşan saf hücre kültürleri elde edilir. Puromisin uygulamasını takiben canlı kalan hücrelerin, ölmüş olan hücrelerin yerlerini doldurmak için çoğalarak, içinde bulundukları flaskları konfliye etmeleri için ortalama 7-8 gün beklenilir. Bu süre sonunda hücreler çoğalarak, 2 adet T-75 flaskı da ortalama %95 oranında konfliye etmiş olurlar. Söz konusu hücreler sıçana enjeksiyon için hazır hale gelmiş olurlar (Şekil: 4.9).




**Şekil 4.10:** Kültür plağını %90-95 oranında konfliye etmiş olan, %98-100 oranında transdükte primer hücreler (Şekilde sırasıyla A, B ve C olarak gösterilen üç farklı bölgeden çekimi yapılan görsellerin 10X ve 20X objektiflerde gösterimi)

### 4.8. Enjeksiyon Öncesi Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi ve Hücre Sayımı

Deneyin tüm aşamalarında hücre morfolojilerinin sürekli ve dikkatli takibi şarttır. Özellikle ardışık transdüksiyon uygulamaları, Polybrene / puromisin gibi kimyasalların uygulanması ve hücrelerin uzun süre kültüre edilmesi vs… gibi durumlar, hücrelerin erken senesense girmelerine sebep olabilir. Eğer işlemler esnasında, hücrelerin yarısından fazlası senesense girmeye başlamışsa, strese sebebiyet verebilecek ekstra bir uygulama daha yapılmaz. Örneğin ardışık transdüksiyonları takiben hücrelerin önemli bir kısmı senesense girmeye başlamışsa, puromisin uygulaması yapılmaz. Az miktarda transdükte hücre elde edilmişse bile hücrelerin daha yüksek oranda senesense girmelerini önlemek amacıyla, söz konusu hücrelerin kültürü sonlandırılarak, acilen sıçana enjeksiyon gerçekleştirilir. Aşağıdaki ışık mikroskobu görüntüsünde genç ve senesense girmeye başlayan hücrelerin morfolojileri görülmektedir.




**Şekil 4.11:** Genç ve senesens dönemi hücrelerinin ışık mikroskobunda morfolojik olarak kıyaslanması (10X objektif)

Yukarıdaki her iki görselde de hücreler kültür plağını %98-100 oranında konfliye etmektedir. Buna rağmen soldaki hücreler genç hücreler olup, mekik şeklinde, düzenli yapılanma gösteren ve çok daha küçük boyuttaki hücrelerdir. Oysa senesense girmeye başlayan hücreler, kültür plağında bir çarşaf gibi açılıp yayılarak, çok daha büyük boyutta ve şekilsiz görünmektedirler.

Her deney sıçanı için ayrı ayrı kültüre edilip, ex-vivo gen terapisi uygulanmış hücreler, enjeksiyon öncesinde bir ışık mikroskobu altında gözlemsel olarak incelenerek morfolojik olarak değerlendirilir ve "genç / senesens dönemi hücrelerin ortalama oranı" tayin edilir. Daha sonra "Enjekte edilen hücre sayısının tespiti" adlı bölümde anlatıldığı şekilde neubauer lamında sayımı yapılan hücreler, dokunun alındığı sıçana geri enjekte edilir. Aşağıdaki tabloda sıçanlara enjekte edilen hücrelerin durumları (genç / senesens) ve sayıları belirtilmektedir.

**Tablo 4.1:** Farklı deney sıçanları için otolog olarak hazırlanıp, ex-vivo gen terapisi uygulanan primer hücrelerin, enjeksiyon öncesi durumları (genç / senesens) ve sayıları belirtilmektedir

| | ön çalışma sıçan | 1. sıçan | 2.sıçan | 3. sıçan | 4. sıçan | 5. sıçan |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Hücre durumu (genç / senesens) | >%95 Genç | >%70 Genç | >50 Senesens | >50 Senesens | >%95 Genç | >%95 Genç |
| Puromisin kullanımı | Kullanıldı | Kullanıldı | - | - | Kullanıldı | Kullanıldı |
| Transdüksiyon sayısı | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| Ortalama transdüksiyon verimi | 98-100% | %98-100 | %10-20 | %40-50 | %98-100 | %98-100 |
| Enjekte edilen toplam hücre sayısı | 900.000 | 900.000 | 2.000.000 | 6.000.000 | 2.800.000 | 3.000.000 |
| Enjekte edilen toplam pozitif hücre sayısı | 900.000 | 900.000 | 300.000 | 3.000.000 | 2.800.000 | 3.000.000 |
| Besiyeri hPTH ölçüm (2 günlük) | | >3000 pg/ml | 560 pg/ml | >3000 pg/ml | >3000 pg/ml | >3000 pg/ml |

## 4.9. Biyokimyasal Analizler

Ex-vivo gen terapisi uygulanmış otolog primer hücreler, üretildikleri deney sıçanlarına geri enjekte edildikten sonra, sıçanlardan düzenli aralıklarla 0,9 ml kan alınarak serum ayrıştırılır ve ardından hPTH tayini için biyokimyasal analiz gerçekleştirilir.

Aşağıdaki ilk tabloda, enjeksiyon sonrası farklı günlerde yapılan ölçümlerde elde edilen hPTH değerleri görülmektedir. İkinci tabloda ise gen terapisi uygulanmamış 4 adet kontrol sıçanından ölçülen hPTH değerleri yer almaktadır. Daha önceden de belirtilmiş olduğu üzere, biyokimyasal değer ölçümü yapan cihaz, sadece hPTH ölçümü yapıp, sıçan PTH ölçümü yapmamaktadır. Bu sebeple tüm kontrol grubu sıçanlarında 0,0 pg/ml hPTH değeri ölçülmüştür.

**Tablo 4.2:** Gen terapisini takiben hücre enjeksiyonu sonrası deney sıçanlarında ölçülen hPTH değerleri

| | ön çalışma sıçan | 1. sıçan | 2.sıçan | 3. sıçan | 4. sıçan | 5. sıçan |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Hücre durumu (genç / senesens) | >%95 Genç | >%70 Genç | >50 Senesens | >50 Senesens | >%95 Genç | >%95 Genç |
| Enjekte edilen toplam pozitif hücre sayısı | 900.000 | 900.000 | 300.000 | 3.000.000 | 2.800.000 | 3.000.000 |
| Besiyeri hPTH ölçüm (2 günlük) | | >3000 | 560 | >3000 | >3000 | >3000 |
| 1. ölçüm (ort 3 gün) | 5,4 | 7,8 | 0,9 | 0,1 | 0,5 | 0,0 |
| 2. ölçüm (ort 15 gün) | 23,6 | 1,1 | 0,1 | 0,6 | 3,7 | 3,6 |
| 3. ölçüm (ort 30 gün) | | 2,6 | 0,2 | 1,2 | 10,9 | 6,9 |
| 4. ölçüm (ort 45 gün) | | 1,0 | 0,0 | 2,3 | 4,5 | 8,5 |

**Tablo 4.3:** Kontrol grubu sıçanlarında ölçülen hPTH değerleri

| Kontrol grubu sıçanlar | 1. sıçan | 2.sıçan | 3. sıçan | 4. sıçan |
|---|---|---|---|---|
| Terapi uygulanmamış sıçanlardan ölçülen hPTH değerleri (pg/ml) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

# 5. TARTIŞMA

Günümüzde hipo-PT'nin tedavisi için izlenecek strateji, hastalığın hangi hızda ortaya çıktığına, serum PTH seviyelerine ve hastalığın semptomlarının şiddetine göre belirlenmektedir. Kronik hipo-PT, uzun yıllar boyunca oral Ca ve D vitamini takviyeleri ve bazı durumlarda ilave olarak tiazid diüretikleriyle tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Özellikle şiddetli seyreden hipo-PT tedavisi için bazen oldukça yüksek dozlarda kullanılan oral Ca ve D vitamini takviyeleri, tedavide tek başına yeterli olamamaktadır ve uzun süreli kullanımda oldukça ciddi yan etkilere sebep olabilmektedir [69]. Konvansiyonel tedavi, semptomatik olup küratif değildir. Söz konusu Ca ve D vitamini takviyeleriyle serum Ca seviyeleri normal fizyolojik referans aralığına çekilebilmesine rağmen, hastalık sebebiyle PTH'ın kemikler, böbrekler ve merkezi sinir sistemi üzerindeki düzenleyici etkilerinin ortadan kalkmasına yönelik tedaviye yardımcı bir etki sağlayamamaktadırlar [128]. 2015 yılında konvansiyonel tedaviye ilave olarak kullanılmak üzere FDA tarafından onay alarak piyasaya sürülen rekombinant hPTH analoğu olan Natpara® [hPTH(1-84)], oldukça yeni bir tedavi yöntemi olup, başta osteosarkom riski olmak üzere pek çok yan etkiye karşı dikkatli kullanılması gereken bir terapötiktir. Bununla beraber söz konusu tedavinin oldukça kısa olan yarılanma ömrü ve günlük enjeksiyonlarla uygulanmasının zorunluluğu, tedavinin olumsuz yönleri arasında gösterilebilir [76-78]. Bahsedilen sebeplerle hipo-PT tedavisi için, yeni terapi yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu açık şekilde görülmektedir.

Gen terapisi, özellikle küratif tedavisi bulunmayan hastalıklar için, konvansiyonel tedaviyle kıyaslandığında çok açık bir avantaj sunmaktadır. Bunun sebebi hastalıkların semptomlarını baskılamak yerine, genetik seviyeye inerek, hastalığın sebebini direk olarak ortadan kaldırabilmesi veya düzeltebilmesidir [84]. Son yıllarda yapılan klinik araştırmalar, özellikle tasarımları yıllar içerisinde yenilenerek güncelleştirilen yeni nesil vektörler sayesinde, gen tedavisinin pek çok hastalığın tedavisinde hem etkili hem de güvenli olduğunu göstermektedir [82]. 2019 yılında yayınlanan bir yayına göre, söz konusu tarihe kadar gen terapisiyle ilgili 2500'den fazla klinik araştırma

yürütülmüş [83], 2020 yılında yayınlanan bir diğer yayına göre ise dünyanın farklı ülkelerinde toplam 22 gen terapisi ilacı onay alarak piyasaya sürülmüştür [79]. Söz konusu sebeplerle, hipo-PT tedavisi için gen terapisinin etkin, güvenli ve uzun süreli bir tedavi yöntemi olabileceği düşünülmektedir.

Gen terapisi, kullanılan gen aktarım metoduna göre viral ve non-viral olmak üzere iki sınıfa ayrılmakla beraber, viral vektörlerin kullanıldığı metod, terapötik genin hedef hücrelere ulaştırılabilmesi açısından non-viral vektörlerin kullanıldığı metodlara kıyasla çok daha etkindir [88, 89]. Günümüzde gen terapisinin kullanıldığı klinik araştırmalarda, gen aktarım metodu olarak açık ara farkla viral vektörler daha fazla kullanılmaktadır [85].

Gen terapisinde kullanılan viral vektörler arasından sadece gama RV vektörler ve LV vektörler, hedef hücre genomuna entegre olabilme avantajına sahiptir [129]. Genoma entegre olabilen viral vektörler, terapötik genin tüm hücre yaşamı boyunca eksprese olabilmesine olanak verdikleri için, terapötik etkinliğin uzun süreler boyunca devam edebilmesini sağlayabilmektedirler. Gama RV vektörler sadece bölünebilen hücreleri transdükte edebilme yeteneğine sahipken, LV vektörlerin hem bölünebilen hem de bölünmeyen hücreleri transdükte edebilme özellikleri, tercih edilmeleri bakımından oldukça önemli bir avantaj sağlamaktadır. Bunun haricinde, genoma entegre olabilme özelliği gösteren viral vektörlerin tümü, insersiyonel mutagenez kaynaklı onkogeneze sebep olabilme riski taşımasına rağmen, bu risk gama RV vektörlerde daha yüksek olup, LV vektörler ise çok daha güvenlidir. Gama RV vektörler, genomdaki promotor ve enhancer bölgelere entegre olma eğilimindeyken, LV vektörlerin entegrasyon profilleri daha farklıdır. Bu sebeple pek çok yayında LV vektörlerin, RV vektörlere kıyasla çok daha güvenli olduğundan bahsedilmektedir [91, 92, 114, 116, 117]. Ancak negatif yönüyle değerlendirildiğinde, LV vektörlerin GMP koşullarına uygun ve stabil olarak üretimleri, gama RV vektörlere kıyasla daha zahmetlidir [81].

Son zamanlarda LV vektörlerin tercih edildiği pek çok klinik araştırma yürütülmektedir. Bu sayede başta primer immün yetmezlikler, hemoglobinopatiler, nörometabolik bozukluklar ve kök hücre kaynaklı bazı anomaliler gibi hastalıklar olmak üzere, pek çok hastalıkta LV vektörlerin kullanımının güvenli ve etkili olduğu görülmüştür. Bu araştırmaların sonucunda, LV vektörlerin kullanıldığı çeşitli gen terapileri dünya sağlık otoriteleri tarafından onay almıştır. Beta talasemi tedavisinde kullanılması için onaylanan “Zynteglo®”, metakromatik lökodistropide kullanılmak

için onaylanan “Libmeldi®” ve akut lenfoblastik lösemide kullanılmak için onaylanan Kymriah® piyasaya sürülmüştür [115, 121, 122]. LV vektörlerin kullanıdığı pek çok klinik araştırmanın olması ve onay almış tedaviler, söz konusu LV vektörlerin güvenilirliğini ve tedavideki etkinliklerini göstermektedir. Tüm bu sebeplerle tez çalışmamızda son jenerasyon ve SIN özellikli LV vektörlerin kullanımı tercih edilmiştir.

Terapötik genin vücuda verilişine göre gen terapisi, “*in vivo*” ve “*ex vivo*” olmak üzere ikiye ayrılmakadır. *In vivo* yöntemde terapötik gen direk olarak vücuda enjekte edilirken, *ex vivo* yöntemde ise terapötik gen, kültür ortamındaki hücrelere nakledilerek genetik yapıları değiştirildikten sonra, söz konusu hücreler canlı vücuduna enjekte edilmektedir [83]. Tez çalışmamızda, daha komplike ve uygulaması daha zahmetli bir yöntem olmasına rağmen, daha güvenli ve kontrollü bir uygulama sağladığı için *ex vivo* yöntem tercih edilmiştir. Ayrıca *ex vivo* yöntemde LV vektörler, canlı vücuduna direk olarak uygulanmadığı için vücutta vektöre karşı olası bir immünolojik reaksiyon da meydana gelmemektedir.

Otolog hücreler, allojenik kaynaklı hücrelerin aksine vücuda enjekte edildikten sonra canlıda immun reaksiyon geliştirmemektedirler. Terapide kullanılan hücrelerin vücuda kalıcı olarak engrafte olması isteniliyorsa, özellikle otolog hücrelerin tercih edilmesi avantaj sağlamaktadır [130]. Bununla beraber otolog hücrelerin kullanımının bir takım dezavantajları ve zorlukları da bulunmaktadır. Otolog dermal kökenli hücrelerin üretimi için her hastadan deri numunesi alınarak hücrelerin çoğaltılabilmesi ve ex vivo ortamda gen naklinin yapılabilmesi için ortalama 1 ay gibi bir süre geçmektedir. Söz konusu işlem zaman alıcı, zahmetli, masraflı ve yüksek kontaminasyon riski taşıdığından dolayı, son derece dikkatli çalışılması gereken bir işlemdir. Buna rağmen yetişkin somatik hücre ve kök hücrelerin bölünme ve çoğalma yeteneklerinin sınırlı oluşu nedeniyle (Hayflick limit) her zaman istenilen miktarda hücre üretimi gerçekleştirilemeyebilmektedir [131]. Tez çalışmamızda olası bir immun red yaşanmaması ve terapötik geni taşıyan hücrelerin sıçan vücuduna engrafte olabilmesi için dermal kökenli otolog primer hücreler tercih edilmiştir. Ancak söz konusu otolog primer hücrelerin zaten sınırlı olan bölünme sayıları ve çoğalma yetenekleri göz önüne alındığında, gerçekleştirilen ardışık transdüksiyon uygulamaları, puromisin ve Polybrene kullanımı, hücrelerin erken senesense girmelerini teşvik edebilmesinden dolayı, kültüre edilen hücrelerin bir kısmı senesense

girmeye başladığında kültür sonlandırılmış ve eldeki hücreler sıçana geri enjekte edilerek terapi tamamlanmıştır.

Sıçan derisinden kültüre edilen otolog primer hücreler karma bir hücre topluluğu olup, çok büyük kısmı primer fibroblastlardan, geri kalan kısmı ise dermal kökenli kök hücrelerden oluşmaktadır. Bunun sebebi hücre kültürü için kullanılan primer kültür besiyerinin (%15 FBS, %1 Pen-Strep, %0,2 Primocin, DMEM/F-12) temel olarak primer fibroblastların kültüre edilmesine uygun olmasına rağmen, aynı besiyerinde dermal kökenli kök hücrelerin de büyüyüp çoğalabilmesidir [132]. Özellikle söz konusu besiyerinde çoğaltılan dermal kökenli kök hücrelerin morfolojilerinin, fibroblastlarla bire bir aynı olmasından dolayı, iki hücre tipi mikroskop altında incelendiğinde morfolojik olarak birbirinden ayırt edilememektedir [133]. Hem primer fibroblastlar hem de dermal kökenli kök hücrelerin her ikisi de *ex vivo* gen terapisinde kullanılmaya elverişli hücre türleridir. Ancak kök hücre popülasyonları, fibroblastlar gibi terminal diferansiye hücrelere kıyasla çok daha fazla kez bölünebilme yeteneğine sahip olduğundan, kök hücre kökenli kültürlerden çok daha fazla sayıda hücre çoğaltabilmek mümkündür [134].

Tez çalışmamızın amacı *ex vivo* gen terapisiyle hipo-PT tedavisinin mümkün olabileceğini göstermek olduğundan ve bunun için otolog primer hücrelerin kullanımları tercih edildiğinden, öncelikle sıçan derisinden primer hücre kültürü sayesinde otolog hücrelerin çoğaltımı gerçekleştirilmiştir. Terapötik gen olarak klonlanarak amplifiye edilen ve saflaştırılan hPTH geni kullanılmakla beraber, hPTH geninin primer hücre genomuna kalıcı olarak entegre olabilmesi için LV vektörler tercih edilmiştir. LV vektörlerin üretimi, LentiX hücre hattına üç adet plazmidin aynı anda ko-transfeksiyonuyla gerçekleştirilerek, yüksek transfeksiyon verimi elde edilmiş ve hücrelerin floresan mikroskop altında değerlendirilesiyle transfeksiyon başarısı doğrulanmıştır. Transfeksiyon sonrası LV vektör üretiminin doğrulanması ve elde edilen lentiviral sıvının kullanım konsantrasyonunun belirlenebilmesi için, HEK293T hücre hattına farklı viral sıvı konsantrasyonlarında transdüksiyon denemeleri yapılmıştır. Bunun sonucunda transdüksiyon özelliği bulunan, hPTH terapötik genini taşıyan LV vektörlerin üretildiği doğrulanmış olup, primer hücrelerde kullanılacak konsantrasyon belirlenmiştir. Daha sonra LV vektörlerle kültüre edilmiş olan otolog primer hücrelere ardışık transdüksiyon işlemleri uygulanmış ve ardından puromisin uygulamasıyla transdükte olmayan hücrelerin apoptoza girmesi, sadece

hPTH ile transdükte edilmiş hücrelerin yaşamına devam ederek çoğalması sağlanmıştır. Bu sayede %98-100 oranında transdükte hücrelerden oluşan bir primer hücre kültürü elde edilmiştir. Otolog primer hücrelerin hedef gen olan hPTH genini genomlarına entegre ederek transdükte olmuş oldukları iki yolla doğrulanmıştır. hPTH geninin hemen yanına yerleştirilen GFP geni, GFP proteini eksprese ederek, transdükte hücrelerin floresan mikroskop altında incelendiğinde yeşil renkte görüntülenmesini sağlayan bir raportör gendir. Bu sayede floresan mikroskop altında yapılan incelemede neredeyse tüm hücrelerin yeşil renkte göründüğü ve transdükte olduğu doğrulanmıştır. İkinci olarak kültür besiyerinden alınan 2 günlük kültür sıvısı biyokimyasal olarak test edildiğinde oldukça yüksek seviyede ve biyolojik aktif hPTH değerleri tespit edilmiştir. hPTH ölçümünde kullanılan biyokimya cihazının limitleri 0,0 - 3000 pg/ml arasında olup, sadece intakt insan PTH'ı [hPTH(1-84)] değerlerini ölçmektedir. Toplamda 5 adet deney sıçanıyla çalışılmış olup, bu sıçanlardan dördüne ait 2 günlük kültür besiyerlerinden ölçülen aktif hPTH değerleri 3000 pg/ml'den yüksek olarak tespit edilmiştir. Floresan mikroskop görüntüleri ve biyokimyasal ölçüm sonuçları neticesinde, *ex vivo* ortamda otolog primer hücrelere başarılı şekilde hPTH gen transferi yapılabildiği ve hücrelerin beklenildiği şekilde yüksek miktarda biyolojik aktif hPTH üretimi ve salgılaması yapabildiği gösterilmiştir.

*Ex vivo* gen nakli gerçekleştirilen hücreler, sıçan vücuduna sırt bölgesinden subkutan olarak enjekte edilmiş ve bunu takiben ortalama 3., 15., 30., 45. günlerde kan numuneleri alınarak hPTH ölçümü yapılmıştır. Tüm deney sıçanlarında 45 günlük deney süresi boyunca hPTH üretimi gösterilmiştir. Bu durum *ex vivo* gen terapisiyle hipo-PT tedavisi modeli geliştirilebileceğini göstermektedir.

Erişkin sıçanlardaki fizyolojik PTH ölçüm referans aralığı 10-15 pg/ml arasındadır [60]. Tüm deney sıçanlarında hPTH üretimi gösterilebilmesine karşın, ölçülen değerler sıçanlardaki fizyolojik PTH referans aralığının altında kalmaktadır. Şimdiye kadar tüm deney sıçanlarından ölçülen en yüksek hormon değeri ise 10,9 pg/ml'dir. Bu durumun en temel sebebinin, *ex vivo* gen terapisiyle başarılı şekilde transdükte edilerek hormon üretimi yapan hücrelerin, sıçan vücuduna enjekte edilmesinden sonra, sadece çok az bir miktarının sıçan vücuduna engrafte olmasına karşılık, hücrelerin çok büyük bir kısmının engrafte olamaması ve bu sebeple apoptoza girerek ölmesi olduğu düşünülmektedir. Söz konusu durumun terapötik etkinliğin çok ciddi oranda düşmesine sebep olduğu görülmektedir.

Ex vivo gen terapisi, tedavisi bulunmayan pek çok hastalığın küratif tedavisi için umut vadeden bir yöntem olmasına karşın, terapötik etkinlik genel olarak başlıca üç faktörden dolayı sınırlandırılmaktadır: düşük gen transferi oranları, gen ekspresyon seviyelerinin düşük olması ve terapötik hücrelerin canlı vücudundaki düşük engrafman oranları [135]. Tez çalışmamızda otolog primer hücrelerin yüksek transdüksiyon oranları sayesinde etkin bir gen transferi sağlanabilmiştir. Transdüksiyon sonrası kültür besiyerinde yüksek miktarda biyolojik aktif hPTH ölçümü sayesinde, aktif hPTH gen ekspresyonu, hormon üretimi ve salınımı da doğrulanmıştır. Buna karşın, terapötik hücrelerin enjeksiyonu sonrası düşük engrafman oranları sebebiyle, sıçan vücudunda hormon üretiminin gösterilebilmesine rağmen, ölçülen hPTH değerleri fizyolojik referans aralığının altında kalmaktadır. Özellikle düşük engrafman oranlarına, uzun vadede terapötik genin epigenetik mekanizmalar sebebiyle sessizleştirilmesi de ilave olabileceğinden, terapötik etkinliğin zamanla daha da düşmesi riski söz konusu olabilir [136].

Onlarca makalede, tüm hücresel temelli tedavilerdeki aşılması gereken en önemli zorluğun ve terapinin etkisinin uzun süre devam edememesinin altında yatan primer sebep olarak düşük hücre engrafmanı oranları olduğundan bahsedilmektedir [137-141]. Hücresel temelli terapilerde kullanılan hücrelerin canlı vücuduna engrafte olabilme oranlarını araştıran bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin ratlardaki omurilik hasarı için kullanılan mezenkimal kök hücrelerin i.v olarak uygulandığı bir çalışmada erken dönem engrafman oranlarının %15 olduğu [142], başka bir çalışmada ise intrakoroner olarak uygulanan mezenkimal kök hücrelerin, uygulamayı takiben ikinci haftada sadece %2'lik bir oranının vücuda engrafte olabildiği gösterilmiştir [143]. Diğer bir çalışmada ise özellikle uzun dönemdeki hücre engrafman oranlarının oldukça düşük olduğu, hatta uygulanan hücrelerin %1'inin bile altına düştüğü vurgulanmaktadır [137]. Enjekte edilen hücrelerin canlı vücuduna engrafte olamamasının pek çok farklı, komplike sebepleri olmakla beraber, bunlardan biri farklı hücre siklusundaki hücrelerin farklı engrafman özelliği göstermelerinden kaynaklanmaktadır. G0 ve G1 fazlarındaki hücreler enjeksiyon sonrası engrafte olabilme özelliğine sahip olmasına rağmen; S, G2 ve M fazlarındaki hücreler vücuda engrafte olamamakta ve bu sebeple zamanla apoptoza girerek ve vücuttan uzaklaştırılmaktadır [144, 145].

Hücresel temelli tedavilerde en önemli kısıtlılığın engrafman oranlarının çok düşük olmasına ilave olarak, yapılan bazı çalışmalar özellikle *ex vivo* gen terapisinde transdükte edilerek genetiği manipüle edilen hücrelerin, genetiği manipüle edilmeyen hücrelere kıyasla, engrafman oranlarının daha da düşük olduğunu göstermektedir [146, 147]. Bu durum *ex vivo* gen terapisi sonrası hücrelerin engrafman oranlarını, dolayısıyla terapötik etkinliği daha da düşürmektedir. Bazı araştırmacılar bu durumun üstesinden gelinebilmesi için mega dozlarda hücre enjekte edilebileceğini vurgularken [147], pek çok araştırmacı ise hücrelerin uygun bir taşıyıcı veya matrix ile beraber uygulanmasının engrafman oranlarını arttıracağından ve hatta terapötik etkinliğin arttırılması için bunun zorunlu olduğundan bahsetmektedirler [137]. Günümüzde kolajen, çitosan, hyaluronik asit, alginat, jelatin, matrijel vs... gibi doğal biyomateryaller hücresel taşıyıcılar (matrix) olarak kullanılmakta, terapötik hücreler için uygun bir mikroçevre oluşturarak hücrelerin canlılığını, engrafman oranlarını ve büyümelerini teşvik ederek, terapötik etkinliği önemli ölçüde arttırabilmektedirler [137, 148, 149].

Vücutta kemik oluşumunu tetiklemek için tasarlanan bir *ex vivo* gen terapisi çalışmasında, BMP-7 ile transdükte edilen insan fibroblastları kullanılmış olup, bir matrijel taşıyıcıyla beraber enjekte edilen sadece 1000 adet fibroblastın bile küçük kemikçiklerin oluşumunu tetikleyebilmesine karşın, herhangi bir taşıyıcı kullanılmadan direk subkutan olarak enjekte edilen 2 milyonun altındaki transdükte fibroblastın bile, hiçbir şekilde kemik dokusu oluşumunu tetikleyemediği gözlenmiştir [150]. Söz konusu çalışma, az miktarda hücre uygulaması yapılsa bile, hücrelerin uygun bir taşıyıcıyla beraber uygulanmasının terapötik etkinliği çok ciddi oranda arttırdığını göstermektedir.

Tez çalışmamızda hücreleri PBS içerisinde süspanse ederek ve herhangi bir hücresel taşıyıcı kullanmadan direk olarak subkutan enjeksiyonla uyguladığımız için, hücrelerin çok düşük oranlarda engrafte olduğunu ve bu yüzden tüm hayvanlarda hPTH üretimi doğrulansa da, hormon seviyelerinin fizyolojik limitin altında olduğunu gözlemledik. Bu sebeple, başarılı şekilde *ex vivo* gen terapisi gerçekleştirilen terapötik hücreleri, uygun bir hücresel taşıyıcıyla birlikte enjekte ettiğimizde, canlı vücuduna çok daha yüksek oranda engrafte olabileceklerini ve böylece çok daha yüksek seviyelerde hormon üretimi gerçekleştirebileceklerini düşünmekteyiz.

Herhangi bir terapi modeli geliştirme aşamasında, uygulama metodu ve dozajı oldukça önemlidir. Söz konusu dozaj belirleme işlemi klasik farmakolojik ajanlar için nispeten kolay ve standardize edilebilir olmasına karşın, hücresel tabanlı terapiler gibi kompleks biyolojik terapiler için optimal dozajın belirlenebilmesi oldukça zordur. Örneğin kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde hücresel temelli terapi yöntemleri 10 yıldan uzun bir süredir hastalar üzerinde uygulanmasına rağmen, uygulama için optimal bir dozaj ve metod halen belirlenememiştir. Pek çok pre-klinik ve klinik araştırma, hücresel temelli terapilerin uygulama dozajı ve metodu konusunda birbiriyle çelişkili sonuçlar ortaya koymaktadır [151].

Tez çalışmamız, *ex vivo* gen terapisiyle hipoparatiroidi tedavisi modeli oluşturmaya yönelik ilk çalışma olduğundan, hipo-PT tedavisinde kullanılan hücre dozajını belirleyebilmek amacıyla kıyaslama yapabileceğimiz herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Uygulanacak hücre dozaj aralığının kabaca tespit edilebilmesi açısından, "*ex vivo* gen terapisi" yönteminin kullanıldığı diğer hastalıklara yönelik terapi çalışmaları incelendiğinde, optimal bir dozaj aralığının olmadığı ve çok değişken dozajlar kullanıldığı görülmüştür. Rodentler üzerinde yapılan bazı *ex vivo* gen terapisi çalışmalarında 18 milyon ve 50 milyon hücre gibi çok yüksek dozlar kullanılmasına karşılık [152], diğer bazı çalışmalarda uygun bir hücresel taşıyıcıyla beraber uygulanan 300 bin [153] ve 600 bin hücre [154], ya da taşıyıcı kullanılmadan direk enjekte edilen 750 bin hücre [155] gibi nispeten daha düşük dozların kullanıldığı ve bu düşük dozların bile amaçlanan terapötik etkinliğin elde edilebilmesini sağladığı rapor edilmiştir.

Uygulanan hücre dozajlarının kıyaslamasını yapabilmek için terapi metodu ve model canlı türü kadar, uygulama yolunun da benzer olması gerekmektedir [151]. Bu sebeple deney modelimizle benzerlik göstermesi açısından literatürdeki "rodentler üzerinde ex vivo gen terapisi uygulanan ve uygulamanın subkutan yolla yapıldığı" diğer çalışmalar incelenmiştir. Bu çalışmaların neredeyse tümünde kullanılan terapötik hücrelerin, uygun bir hücresel taşıyıcıyla (matrix) beraber uygulandığı veya hücrelerin bir doku iskelesine emdirilerek uygulandığı görülmüştür. Bahsedilen çalışmalardan ikisinde 1 milyon terapötik hücre kullanılmış olup; bunlardan birinde hücreler alginata enkapsüle edilerek [156], diğerinde ise tip 1 kolajenle karıştırılarak [157] uygulama yapılmıştır. Söz konusu çalışmalardan üçünde 2 milyon hücre kullanılmış, bunlardan birinde hücreler kolajenle [158], diğerinde matrijelle karıştırılarak [159], öbüründe ise bir

doku iskelesine emdirilerek [160] uygulanmıştır. 2 milyon üzerinde hücrenin kullanıldığı çalışmalar da olup, bunlardan birinde kolajen süngere emdirilmiş 2-4 milyon hücre [161], diğerinde ise bir doku iskelesine emdirilmiş 8 milyon hücre [162], subkutan olarak uygulanmıştır. Söz konusu bahsedilen tüm çalışmalarda, farklı hücre dozajları uygulanmasına rağmen, beklenen terapötik etkinliğin gözlendiği rapor edilmiştir.

"Rodentler üzerinde gerçekleştirilen ve subkutan uygulama yapılan ex vivo gen terapisi" çalışmalarında optimal bir hücre dozajı olmadığından, hem farklı dozajları denemek için, hem de uygulama metodunun optimize edilebilmesi için kullanılan 5 adet deney sıçanına, 300 bin ile 3 milyon aralığında olacak şekilde, değişken dozajlarda transdükte hücre, subkutan olarak enjekte edilmiştir. Bunun sonucunda terapötik etkinliğin artan hücre dozajıyla beraber genelde doğru orantılı olarak arttığı gözlenmesine rağmen, tam manasıyla bir lineer doğru orantı gözlenmemiştir. Bunun sebebinin terapötik etkinliği etkileyen tek faktörün uygulanan hücre dozajları olmayıp, ayrıca hücrelerin genç veya senesens döneminde olmaları, canlı vücuduna engrafte olabilme oranları, bölünme sayıları, yaşam siklusundaki dönemleri (G0, G1, S, G2, M), hücrelerin sağlık durumları ve engrafte olan hücre türlerindeki farklılık (dermal kök hücre veya dermal fibroblast) gibi pek çok değişkenin de terapötik etkinliği belirgin şekilde etkilemesi kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

*Ex vivo* gen terapisinde uygulanan hücre dozajlarının ve terapötik etkinliğin arasındaki bağlantıyı araştıran bazı çalışmalarda, bizim çalışmamızda da olduğu gibi, artan hücre dozlarıyla birlikte terapötik etkinliğin de doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir [150]. Daga A. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada EPO ile transdükte edilen insan kemik iliği kök hücrelerinin optimal terapötik dozajının belirlenebilmesi için, farklı dozlardaki transdükte hücreler (500 bin, 1,5 milyon, 5 milyon ve 10 milyon) farelere subkutan olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada 500 bin hücrenin bile farelerde terapötik bir etki meydana getirebileceğini ve terapötik etkinin artan hücre dozlarıyla beraber doğru orantılı olarak arttığını göstermiştir. Bununla beraber, aynı çalışmada 5 milyon ile 10 milyon hücre uygulamasının arasında bariz bir terapötik fark olmadığını da rapor etmiştir. Bu bulgular ışığında bir değerlendirme yapıldığında, terapötik etkinliğin artan hücre dozlarıyla doğru orantılı olarak arttığı ancak belli bir sınır değerin üzerine çıkıldığında, doğru orantının geçerli olmadığı görülmektedir. Yine aynı çalışmada, terapötik hücrelerin bir hücresel taşıyıcı kullanılmadan enjekte edilme yöntemi ile,

hücrelerin bir taşıyıcıyla beraber subkutan olarak uygulanması arasındaki fark da araştırmış olup, taşıyıcı kullanımının hem terapötik etkiyi hem de etki süresini bariz şekilde arttırdığı gösterilmiştir [163]. Tez çalışmamızdan elde edilen veriler, literatürdeki diğer çalışmalarla kıyaslanarak değerlendirildiğinde, enjekte etmiş olduğumuz hücre dozajlarının yeterli olmasına rağmen, söz konusu hücrelerin uygun bir hücresel taşıyıcıyla beraber enjekte edilmediği için, sadece çok küçük bir oranının vücuda engrafte olabildiği ve bu yüzden sıçan vücudundan ölçülen hPTH değerlerinin de fizyolojik değerlerin altında kaldığı düşünülmektedir.

*Ex vivo* gen terapisinde karşılaşılan zorluklardan bir diğeri de, genoma entegre olabilen vektörlerle transdükte edilen hücrelerdeki terapötik genin, bir süre sonra ekspresyonunun tam veya kısmi olarak, hücresel mekanizmalar tarafından sessizleştirilebilmesidir [164]. Şimdiye kadar yapılmış pek çok çalışmada, *ex vivo* gen terapisi sayesinde transdükte edilen hücreler, canlı vücuduna enjekte edildikten sonra başarılı şekilde engrafte olabilse bile, bir süre sonra terapötik genin ekspresyon seviyelerinin düştüğü gösterilmiştir. Bu durumun primer sebeplerinden birinin transgenin (terapötik gen) metilasyonu, diğerinin ise histon deasetilasyonu olduğu düşünülmekle beraber, söz konusu durumun ardında henüz aydınlatılamamış başka mekanizmaların olduğu da tahmin edilmektedir [165]. Ancak, LV vektörlerin tercih edildiği diğer bazı *ex vivo* gen terapisi çalışmalarında da, terapötik genin sessizleştirilmediğinden ve ekspesyonuna devam ederek uzun süreler boyunca terapötik etkinlik gösterdiğinden bahsedilmektedir [166]. Dolayısıyla söz konusu durum için birbiriyle çelişkili sonuçlar iddia eden çalışmalar mevcuttur.

Yaptığımız bir ön çalışmada, primer hücreler başarılı şekilde transdükte edildikten sonra, hücrelerin bulunduğu kültür plağındaki 2 günlük besiyerinden yapılan ölçümde 3000 pg/ml'den daha yüksek oranda hPTH tespit edilmesine rağmen, bundan yaklaşık 10 gün sonra yapılan ölçümde hormon seviyesinin 1980 pg/ml'ye düştüğü ölçümlenmiştir. Bu durum, terapötik genin zaman içerisinde hücresel epigenetik mekanizmalar tarafından kısmen sessizleştirilebildiğini düşündürmektedir. Söz konusu durumun, kullanmış olduğumuz promotor dizinin, sitomegalovirüse ait ve oldukça agresif bir promotor olan CMV promotoru olması nedeniyle tetiklenmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Literatürde, CMV promotorunun kullanıldığı pek çok *ex vivo* gen terapisi çalışmasında da, zaman içerisinde söz konusu promotorun etkisinde olan terapötik genin belli oranlarda sessizleştirildiğine ilişkin raporlar mevcuttur [165,

167, 168]. Bununla beraber kullanılan CMV promotorunun, dokuya spesifik bir promotor ile yer değiştirmesi durumunda, terapötik genin çok daha uzun süreler boyunca, sessizleştirilmeden eksprese olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur [168]. Ayrıca terapötik genin "insulator" dizilerle çevrelenmesi ve/veya ilave "enhancer" diziler eklenmesi de terapötik genin (transgen) uzun süreler boyunca sessizleştirilmeden eksprese olabilmesini sağlayabilmektedir [169, 170]. *Ex vivo* gen terapisinde transgenin sessizleştirilmesini önlemek için kullanılabilecek diğer bir strateji de, terapötik genin sessizleştirilmesinde görevli epigenetik mekanizmaları, hücre kültürü aşamasında kimyasal ajanlarla bloke ettikten sonra, hücrelerin canlı vücuduna enjekte edilmesidir. Bu amaçla gerçekleştirilen bir çalışmada, transdükte edilen hücreler DNA metilasyonunu önlemek için kullanılan bir ajana (azadeoxycytidine) maruz bırakıldıklarında, terapötik geni tam 11 kat; histon deasetilasyonunu önlemek için kullanılan başka bir ajana (trichostatin A) maruz bırakıldıklarında ise tam 9 kat daha fazla eksprese ettikleri gözlenmiştir [164]. Dolayısıyla LV vektör ile beraber CMV promotoru kullandığımız bu çalışmamızda, terapötik genin zaman içerisinde bir miktar sessizleştirilebilme olasılığına rağmen, yukarıda bahsedilen stratejilerden birinin kullanılarak bu durumun önüne geçilebilmesi mümkündür.

Insulator diziler, hem kromatindeki aktif transkripsiyonel ünitelerin arasına sınır koyarak birbirinden ayıran, hem de genomdaki heterokromatin bölgelere sınır koyarak, genom içerisinde sınırsızca yayılmasına engel olan DNA dizileridir [171]. Bu özellikleri sayesinde çevreledikleri geni, civar bölgelerdeki kromatinin gen ekspresyonunu modifiye edici etkisinden korudukları gibi, civardaki diğer genleri de kendi çevrelediği gene ait enhancer ve promotor bölgelerin etkisinden ayrıştırırlar [172]. Insulator dizilerin *ex vivo* gen terapisinde kullanımlarının pek çok avantajı bulunmaktadır. İlk avantajları, önceki paragrafta da bahsedildiği gibi terapötik geni, sonradan gerçekleşebilecek çevresel kromatin modifikasyonları nedeniyle sessizleştirilmeye karşı koruyarak uzun süre eksprese edilebilmesini sağlamaktır. İkinci avantajları, terapötik genin düzenlenmesi için kullanılan güçlü promotor ve enhancer dizilerin, civar bölgelerdeki diğer genlerle etkileşimlerini sınırlandırarak, olası bir insersiyonel onkogenezin önüne geçilebilmesini sağlamaktır. Önceden de bahsedildiği gibi SIN özellikli son jenerasyon LV vektörlerin kullanımı nedeniyle herhangi bir klinik araştırmaya katılan katılımcıda insersiyonel onkogenez gelişimi

gözlenmemesine ve kullanımlarının güvenli oluşuna rağmen [113], genoma entegre olabilen tüm vektörlerde teorik olarak da olsa insersiyonel mutagenez riski söz konusu olabilir. Ayrıca CMV gibi güçlü viral promotor bölgelerin insersiyonel mutageneze daha yüksek oranda yol açabilmeleri mümkündür. Tasarımı bizim çalışmamıza benzeyecek şekilde, güçlü bir viral promotorun ve aynı zamanda SIN özellikli lentiviral vektörlerin kullanıldığı bir çalışmada, terapötik genin insulator diziler ile çevrelenmesinin, terapötik açıdan daha da güvenli olabileceği belirtilmektedir [173]. Tüm bunların haricinde, transdüksiyon aşamasında terapötik gen, kromatin içerisinde ökromatin özellikli bir bölgeye entegre olabileceği gibi, heretokromatin özellikli bir bölgeye de entegre olabilir ve bu sebeple ekspresyonu baskılanabilir. Ancak insulator dizilerin kullanımıyla bu durumun da üstesinden gelinerek, heterokromatinin pozisyonel etkisi aşılabilir ve terapötik genin eksprese olması sağlanılabilir [174]. Insulator dizilerin söz konusu avantajları göz önüne alındığında, gelecek çalışmalarımızda mevcut vektör tasarımımıza uygun insulator dizilerin eklenilerek, çalışma tasarımının geliştirilmesi ve böylece terapötik genin hem daha yüksek miktarda hem de daha uzun süreler boyunca eksprese olabileceği, maksimal düzeyde güvenli bir vektör tasarlanılması planlanmaktadır.

*Ex vivo* gen terapisinde terapötik etkinliğin süresi; kullanılan vektör türüne - tasarımına (kullanılan promotor türü, enhancer veya insulator dizilerin kullanılıp kullanılmaması, kullanıldıysa türleri, terapötik genin boyutu vs…), terapötik hücre türüne (fibroblast, mezenkimal kök hücre vs…) - sayısına - sağlık durumlarına - yaşam döngülerine - kaynağına (otolog veya allojenik kaynaklı), hücrelerin belirli bir taşıyıcıyla birlikte uygulanıp uygulanmamasına, taşıyıcı kullanılmışsa bunun türüne, uygulama yapılan vücut bölgesine, uygulama yapılan canlının genel sağlık durumuna, her zaman öngörülemeyen epigenetik modifikasyonlara (DNA metilasyonu veya histon deasetilasyonu gibi) vs... göre pek çok farklı değişkenden etkilenmektedir. Bu sebeplerle pek çok *ex vivo* gen terapisi çalışmasında terapötik etkinlik süreleri birbirinden oldukça farklıdır. Bizim çalışma tasarımımıza benzerliği açısından model hayvan olarak rodentlerin, vektör olarak ise genoma entegre olabilen vektörlerin (LV veya RV vektörler) kullanıldığı farklı *ex vivo* gen terapisi çalışmaları incelendiğinde, farklı çalışmalarda terapötik etkinliğin sürelerinin birbirinden oldukça farklı olabildiği rapor edilmiştir. Bu çalışmalardan bazılarında terapötik etkinliğin 2 ay [175], bazılarında 4 ay [162], bazılarında 5 ay [159], bazılarında 7 ay [156] vs… boyunca

devam edebileceğinden bahsedilmekte olup, gözlemlenen sonuçlar birbirinden oldukça değişkendir. Hayvan deneyleri haricinde klinik araştırma fazına geçen ya da onay alıp piyasaya sürülen *ex vivo* gen terapileri de mevcuttur. Bu çalışmalardan bazıları incelenecek olursa, tek doz gen terapisi uygulaması sonrasında, söz konusu terapilerden bir kısmının 6 ay boyunca terapötik etkinlik gösterebildiği, bazılarının ise 38 ay gibi çok daha uzun bir süre etkinlik gösterebildiği rapor edilmiştir [176]. Görüldüğü gibi tek doz uygulama sonrasında bile, *ex vivo* gen terapilerinin terapötik etkinliği uzun süreler boyunca devam edebilmekle beraber, çalışmaların metodolojisine göre değişkenlik gösterebilmektedir.

Bizim çalışmamızda ise transdükte edilen hücreler, canlı vücuduna enjekte edildikten sonra en az 45 gün boyunca canlı vücudunda hormon üretimi gözlemlenilebilmiştir. Ancak canlı vücudundaki hormon seviyeleri, fizyolojik değerlerin altında kaldığından, çalışmaya daha uzun aylar boyunca devam edilmemiştir. Terapötik zaman aralığının belirlenilebilmesi için, öncelikle deney tasarımının düzenlenilerek, transdükte edilen hücrelerin uygun bir hücresel taşıyıcıyla beraber subkutan olarak enjekte edilmesi ve hPTH'ın fizyolojik referans değer aralığında üretiminin gerçekleştirilebilmesi gerekmektedir. Fizyolojik referans değerleri arasında hormon üretimi gerçekleştirilebildikten sonra ise ölçülen hormon değerlerin ne kadar süre boyunca kanda terapötik düzey aralığında stabil olarak kalabildiğinin tespiti sayesinde terapötik sürenin belirlenebilmesi mümkündür. Daga A. ve arkadaşları, yürütmüş oldukları ex vivo gen terapisi çalışmasında, herhangi bir hücresel taşıyıcı kullanılmadan subkutan olarak enjekte edilen hücrelerle gerçekleştirdikleri denemede, terapötik etkinliğin 5. haftadan sonra hızla düşüş göstermesine rağmen, aynı hücrelerin bir doku iskelesiyle beraber subkutan olarak uygulandığında, terapötik etkinliğin 14 hafta boyunca devam edebildiğini göstermişlerdir [163]. Bu sebeple ilerleyen zamanlarda uygun bir hücresel taşıyıcı kullanarak hem terapötik etkinliği arttırıp hem de terapötik süreyi uzatmayı planlamaktayız.

Literatürdeki bazı makaleler, ex vivo gen terapisi sonrasında canlı vücudunda terapötik gene ait protein seviyelerinin zamana bağlı düşüşünün temel sebebini, terapötik hücrelerin ortadan kalkmasına bağlarken [159], diğer bazı makaleler ise bu durumu büyük ölçüde terapötik genin epigenetik mekanizmalar tarafından sessizleştirilmesine bağlamaktadırlar [163]. Biz deney süremizi çok uzun bir döneme yaymayıp 45 gün ile sınırlı tuttuğumuz için çok belirgin bir hormon düşüşü gözlemlemedik. Ancak deneye

devam edildiği takdirde, zamana bağlı hormon düşüşlerinin gözlenmesi beklenen bir durumdur. Bu durumun ne şekilde aşılabileceğinden de önceki paragraflarda bahsedilmiştir.

Neeltje A. ve arkadaşları, tıpkı bizim çalışmamızın tasarımına benzer şekilde, vektör olarak LV vektörleri, terapötik gen olarak ise insana ait "faktör 8"i kullandıkları bir *ex vivo* gen terapisi çalışması gerçekleştirdiklerinde, yine bizim çalışmamıza benzer şekilde transdüksiyon sonrası hücre kültürü besiyerinde oldukça yüksek seviyelerde faktör 8 tespit etmiştirler. Yüksek oranlarda faktör 8 üreten bu terapötik hücrelerin sıçana enjeksiyonu sonrasında, sıçan serumundan yapılan biyokimyasal ölçümlerde ise oldukça düşük miktarlarda faktör 8 tespit edilebilmiştir (fizyolojik seviyenin %5'inin bile altında kalacak şekilde). Daha sonra yaptıkları araştırmalarda, çalışmada kullanılan sıçanların, transgenik olarak üretilen insan faktör 8'ine karşı yüksek miktarda antikor ürettiklerini, bu antikorların dolaşımdaki faktör 8'i nötralize ettiğini ve bu sebeple de yapılan biyokimyasal analizlerde düşük miktarda faktör 8 ölçümü alındığını tespit etmişlerdir. Üretilen söz konusu antikorların, faktör 8 üreten transgenik hücrelerin de zamanla ortadan kaldırılmasında görevli olabileceğini eklemişlerdir [177]. Çalışma tasarımımızla oldukça benzer olan bu araştırma, bizim çalışmamızda da canlı vücudunda hPTH'a karşı olası bir immun yanıtın meydana gelerek, anti-hPTH antikorlarının üretiminin olabileceğini işaret etmekte olabilir. Söz konusu durum, sıçan serumundan ölçülen transgenik hPTH ölçümlerimizdeki düşüklüğün ve zaman içerisinde meydana gelen hormon dalgalanmalarının da sebebi olabileceğini akla getirmektedir. Ancak bu durumdan emin olabilmek adına, sonraki çalışmalarda canlı vücudundan anti-hPTH antikoru ölçümü yapılması gerekmektedir.

Literatürdeki diğer kaynaklar incelendiğinde ve *ex vivo* gen terapisinin subkutan yolla uygulandığı diğer çalışmalar göz önüne alındığında, terapötik hücre enjeksiyonunu takiben maksimal terapötik etkinin ortaya çıkması için geçen süre, çoğu makalede farklılık göstermektedir. Terapötik hücre enjeksiyonunu takiben maksimal etkinliğin ortaya çıkması için geçen süre bazı makalelerde 1 hafta [162], bazılarında 2 hafta [163], bazılarında 3 hafta [156] ya da daha değişken olarak rapor edilmektedir. Bizim çalışmamızda ise genellikle hormon seviyelerinin, enjeksiyonu takiben, 3. ve 4. haftalarda genel bir yükseliş gösterdiği, bazı hayvanlarda zamana bağlı hormonal dalgalanmaların görüldüğü, fakat bununla beraber tüm deney süreci boyunca kandan hormon tespit edilebildiği görülmektedir. 15 günlük aralıklarla yapılan ölçümlerden

elde edilen hPTH değerlerinde, zamana bağlı olarak bazen dalgalı sonuçlar elde edilmesinin sebebinin, pek çok değişken faktörün biraraya gelmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Zamana bağlı hormon seviyelerindeki dalgalanmaların, terapide kullanılan hücrelerin bölünme sayılarının farklı olması, hücrelerin yaşam dönemlerindeki farklılık (genç - senesens), hücrelerin sikluslarındaki farklılık, hücrelerin canlı vücuduna engrafte olma yüzdeleri, engrafte olan hücrelerin türleri (primer fibroblastların mı yoksa dermal kökenli kök hücrelerin mi daha yüksek oranda engrafte olduğu), zamanla terapötik genin ne oranda sessizleştirildiği, zaman içerisinde sıçanlarda transgenik hPTH'a karşı antikor oluşup oluşmadığı, hayvan vücudunda hPTH'ı degrede eden enzimlerin zamana bağlı üretim miktarlarındaki değişkenlik ve hatta hayvanın genel sağlık durumu vs… gibi pek çok değişkene bağlı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Bu sebeplerin tümü hesaba katıldığında, ölçülen hPTH değerlerinde zaman içerisinde dalgalanmaların olması beklenilen bir durumdur.

Hem sıçan vücudunda üretilen hPTH seviyesini yükseltebilmek, hem terapötik süreyi uzatabilmek hem de söz konusu hormon dalgalanmalarını azaltabilmek için gelecek çalışmalarda başlıca üç strateji planlanmaktadır. Bunlardan ilki, daha önce de bahsedildiği gibi hücreleri uygun bir hücresel taşıyıcı ile beraber enjekte ederek, hücre engrafman oranlarını ve viabilitesini arttırabilmek, bu sayede terapötik hormon üretim miktarını fizyolojik aralığa yükseltebilmek ve terapötik süreyi belirgin şekilde arttırabilmektir. İkinci strateji, heterojen bir hücre topluluğu olan otolog primer hücreler yerine (primer fibroblastlar + dermal kökenli mezenkimal kök hücreler) homojen bir hücre topluluğu olan sıçan mezenkimal kök hücrelerini kullanmaktır. Daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi hem primer fibroblastlar hem de mezenkimal kök hücreler *ex vivo* gen terapisi için elverişli hücre türleri olup, her ikisi de söz konusu amaçlarla çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Ancak primer sıçan fibroblastlarının senesense girmeden önce bölünme kapasiteleri en iyi ihtimalle 15-20 iken [124], sıçan mezenkimal kök hücreleri senesense girmeden önce 90 kereden fazla kez bölünüp çoğalabilmektedirler [178]. Kullanmış olduğumuz LV vektörlerin hücre genomuna entegre olabilme avantajını ve mezenkimal kök hücrelerin çok daha fazla bölünebilme yeteneğini göz önünde bulundurursak, sonraki çalışmalarda hücre türü olarak mezenkimal kök hücrelerin kullanımının terapinin etkinliğini ve süresini arttırmak için bir avantaj olabileceği düşünülmektedir. Üçüncü strateji ise vektör

tasarımına insulator dizilerin eklenerek terapötik genin ekspresyon seviyesini ve terapötik süreyi daha da arttırabilmek olarak planlanmaktadır.

"Pubmed" ve "Google Akademik" veri tabanlarının taranması sonucu, hipo-PT tedavisi amacıyla günümüze kadar sadece 9 adet "gen terapisi" çalışmasının yürütüldüğü görülmekte olup, çalışmaların tümü hayvanlar üzerinde gerçekleştirilmiş ve klinik araştırma fazına geçilmemiştir [179-187]. Bu çalışmalardan 8'i genetik aktarım metodu olarak "*in vivo* yöntem"i kullanmış olup, bizim çalışmamızda olduğu gibi çok daha güvenli bir yöntem olan "*ex vivo* yöntem"i kullanan sadece 1 araştırma bulunmaktadır. Ancak söz konusu bu araştırmanın tasarımı da bizim çalışmamızdan farklı olup, otolog primer hücreler yerine, temini daha kolay olan allojenik kaynaklı hematopoietik kök hücreler kullanılmış, vektör olarak ise LV vektörler yerine gama RV vektörler tercih edilmiştir. [186].

Tez çalışmamız, hipo-PT tedavisi amacıyla otolog primer hücrelerin kullanıldığı ilk *ex vivo* gen terapisi çalışmasıdır. Ayrıca hipo-PT için gerçekleştirilen gen terapisi çalışmaları arasında vektör olarak LV vektörlerin kullanıldığı ilk çalışma olmaktadır. Hipo-PT tedavisi amacıyla yürütülen 9 adet gen terapisi çalışmasının 7'si vektör olarak plazmidleri tercih ederken, sadece iki çalışmada viral vektörler kullanılmış, bunlardan birinde gama RV vektörler [186], diğerinde ise AV vektörler [179] tercih edilmiştir. Tezin genel bilgiler bölümünde de bahsedilmiş olduğu gibi, AV vektörler üretimlerinin daha kolay ve transdüksiyon oranlarının daha yüksek olmasına karşın, genoma entegre olmayan vektörler olduğundan terapötik etki süreleri, genoma entegre olan vektörlere kıyasla daha kısa süreli olmaktadır. AV vektörler ve *in vivo* yöntemin kullanılmış olduğu bu çalışmada, hPTH geni taşıyan AV vektörler, sıçanların parotid bezlerine direk olarak enjekte edilmiş ve enjeksiyondan 48 saat sonra alınan serum numunesinde ortalama 43 pg/ml hormon tespit edilmiştir. Elde edilen hormon seviyesinin klinik olarak anlamlı olmasına rağmen, çalışma 2. günde sonlandırılmış olup, terapinin uzun vadedeki etkinliği araştırılmamıştır. Söz konusu çalışmada vektör olarak AV vektörlerin kullanılması sebebiyle, çalışma uzun vadede değerlendirilmiş olsaydı, terapötik etkinliğin genoma entegre olan vektörlerin kullanıldığı çalışmalara kıyasla daha hızlı düşmesinin söz konusu olabileceği düşünülmektedir [179]. Vektör olarak gama RV vektörlerin kullanıldığı diğer hipo-PT tedavisine yönelik gen terapisi çalışmasında ise terapötik etkinliğin 3 ay boyunca devam ettiği belirtilmiştir [186]. Bununla beraber, genel bilgiler bölümünde de bahsedildiği üzere, RV vektörlerin

genoma entegrasyon profilleri, LV vektörlere kıyasla daha farklı olup, insersiyonal onkogenez riskleri daha yüksektir. Söz konusu sebeplerle çalışmamızda, üretiminin daha zahmetli olmasına rağmen, kullanımları daha güvenli olan SIN özellikli ve transfer plazmidi üçüncü nesile ait olan LV vektörler tercih edilmiştir.

Literatürdeki hipo-PT tedavisine yönelik non-viral vektörlerin kullanıldığı diğer 7 adet *in vivo* gen terapisi çalışması incelendiğinde, bunların vektör olarak plazmidleri kullandıkları ve PTH genini taşıyan söz konusu plazmidlerin direk olarak vücuda enjekte edilerek uygulandığı görülmektedir (sadece 1 çalışmada oral uygulama yapılmış) [180-185, 187]. Plazmidlerin vücuda direk olarak enjekte edilmesinin, plazmidlerin yerleşebilecekleri organlar ve hücreler öngörülemeyeceği için, *ex vivo* terapiye kıyasla daha riskli olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca direk olarak vücuda enjeksiyonla uygulanan plazmidler, genoma entegre olmadığından, tedavinin terapötik süresi, genoma entegre olan viral vektörlerle yapılan uygulamalara kıyasla daha sınırlıdır. Söz konusu 7 adet *in vivo* gen terapisi çalışmasından 4'ü Çince dilinde yayımlanmış olduğu için, çalışmanın yöntem ve tasarımları hakkında detaylı bilgilere ulaşılamamaktadır [183-185, 187]. Geriye kalan 3 çalışmanın 2'sinde ise PTH geni taşıyan plazmidler direk enjeksiyon yoluyla vücuda uygulanmış olup, enjeksiyonu takiben 2 gün sonra serumdaki PTH seviyeleri oldukça yüksek değerlere ulaşmış olsa bile, her iki çalışmada da terapiyi takiben 1 ay sonra hormon seviyelerinin terapötik sınırların altına düştüğünden bahsedilmektedir [181, 182]. Dolayısıyla herhangi bir viral vektör kullanılmaksızın direk olarak plazmidlerin uygulandığı çalışmalarda, terapötik süre nispeten daha kısa olmaktadır. Söz konusu son çalışmada ise PTH(1-34) DNA'sı, polimerik bir misele enkapsüle edilerek oral yolla uygulanmış ve uygulamayı takiben 1 hafta sonunda çeşitli organlarda PTH DNA'sının tespit edildiği ve serum PTH değerlerinin yükseldiğinden bahsedilmiştir [180]. Bununla beraber söz konusu çalışmada PTH DNA'sının kontrolsüzce tüm vücuda dağılması ve terapötik sürenin de sınırlı olması istenmeyen bir durumdur.

Çalışmamız literatürdeki hipo-PT için gen terapisi yaklaşımını kullanan diğer 9 çalışma arasında hem "otolog primer hücrelerin kullanıldığı ilk ex vivo gen terapisi" hem de "LV vektörlerin" kullanıldığı ilk çalışmadır.

# 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız hipo-PT tedaviside hem "otolog primer hücrelerin kullanıldığı ilk ex vivo gen terapisi" çalışması olup, hem de söz konusu hastalığın tedavisinde vektör olarak "LV vektörler"in kullanılmış olduğu ilk çalışmadır.

Çalışmamızda olası bir immun red yaşanmaması amacıyla otolog primer hücreler kullanılmış olup, her deney sıçanından ayrı ayrı alınan deri numunelerinden, sadece söz konusu sıçana özgü otolog primer hücreler kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Diğer yandan LentiX konakçı hücre hattında, üçlü plazmid ko-transfeksiyon yöntemiyle, terapötik gen olan hPTH DNA'sını taşıyan lentiviral vektörler üretilmiştir. Üretilen vektörlerle otolog primer hücreler başarılı bir şekilde transdükte edildikten sonra, terapötik gen olan hPTH geninin hücrelerin genomuna entegre olarak, hücrelerin yüksek miktarda hPTH üretimi yaptıkları hem floresan mikroskop görüntüleriyle, hem de biyokimyasal testlerle doğrulanmıştır. Söz konusu terapötik hücreler, steril izotonik içerisinde süspanse edilerek sıçana sırt bölgesinden subkutan olarak enjekte edilmiş ve uygulama sonrasında 45 gün boyunca 15 günde bir alınan kan numunelerinden hPTH analizi yapılmıştır.

Biyokimyasal ölçümlerde, tüm deney sıçanlarında hPTH üretimi doğrulanmış olup, ex vivo gen terapisi ile hipo-PT tedavisinin mümkün olabileceği gösterilmiştir. Bununla beraber, transdükte hücrelerin kültür ortamında yüksek miktarlarda hPTH üretip salgılamalarına karşın, enjeksiyon sonrası sıçanlardan alınan kan numunelerinden ölçülen hPTH değerleri, fizyolojik referans değer aralığının altında kalmaktadır. Bunun en temel sebebinin enjekte edilmiş olan terapötik hücrelerin sadece çok az bir kısmının canlı vücuduna engrafte olabilmesi, geri kalan çok daha büyük bir kısmının ise engrafte olamadığı için vücuttan uzaklaştırılması olduğu düşünülmektedir.

Yapılan literatür incelemelerinde hücresel temelli terapilerin en büyük kısıtlılığının, uygulama sonrası çok düşük miktarlardaki hücre engrafman oranları olduğu görülmektedir. Bazı çalışmalarda ise genetiği modifiye edilmiş hücrelerin, modifiye edilmemiş hücrelere kıyasla engrafman oranlarının daha da düşük olduğundan

bahsedilmektedir. Bununla beraber yine pek çok çalışmada terapötik hücrelerin uygun bir hücresel taşıyıcı (matriks) ile beraber enjekte edildiğinde hücrelerin viabilite ve engrafman yüzdelerinin çok ciddi oranlarda arttığından, dolayısıyla hem terapötik etkinliğin hem de terapötik sürenin bariz şekilde arttığından bahsedilmektedir. Bu yüzden ileride yapılacak olan çalışmalarda, söz konusu terapötik hücrelerin engrafman oranlarının ve terapötik etkinin arttırılabilmesi için uygun bir matriksle beraber enjekte edilmesi planlanmaktadır.

Herhangi bir terapi modeli geliştirme aşamasında, uygulama metodu ve dozajı oldukça önemlidir. Söz konusu dozaj belirleme işlemi klasik farmakolojik ajanlar için nispeten kolay ve standardize edilebilir olmasına karşın, hücresel tabanlı terapiler gibi kompleks biyolojik terapiler için optimal dozajın belirlenebilmesi oldukça zordur. Bu sebeple söz konusu terapötik hücrelerin vücuda engrafman oranlarının arttırılmasına yönelik çalışmalar başarıyla tamamlanıp, canlıdaki hPTH üretim miktarları yükseltildikten sonra, terapi için uygun dozaj aralığının belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için farklı deney gruplarına farklı dozajlarda hücreler enjekte edilip denemeler yapılarak, hangi hücre dozaj aralığının fizyolojik PTH referans değer aralığına ulaşılabilmesi için gerekli olduğu tespit edilebilmelidir.

Çalışmamızda sıçan deri numunesinden kültüre edilen otolog primer hücreler kullanılmış olup, söz konusu hücreler çok büyük oranda dermal fibroblastlar ve daha az miktarda dermal kökenli kök hücrelerden oluşan heterojen bir hücre topluluğudur. Her iki hücre türü de *ex vivo* gen terapilerinde kullanılmak üzere tercih edilen hücre türleridir. Ancak söz konusu hücrelerin bölünme sayıları ve engrafman oranları birbirinden farklı olduğu için, terapi uygulaması sonrası sıçanlardan alınan hPTH ölçümlerindeki zamana bağlı dalgalanmaların en temel sebeplerinden birinin bahsedilen durumdan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bu sebeple özellikle ileride yapılması planlanan dozaj belirleme çalışmalarında, aynı tür hücrelerden oluşan homojen bir hücre kültürüyle çalışılmasının daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. Özellikle bölünme sayılarının ve engrafman oranlarının daha yüksek oluşu sebebiyle, sıçanlardan üretilebilecek olan otolog mezenkimal kök hücreler, gelecek çalışmalarda kullanılmak için ideal olabilir.

İleride yapılması planlanan çalışmalarla uygun terapötik hücre dozajı belirlendikten sonra, terapötik sürenin de uzatılabilmesi için bir takım stratejiler geliştirilebilir. Bunun için çalışmada kullanılan CMV promotorunun yerine, başka bir promotor

tercih edilebilir, hücre kültürüne epigenetik metilasyonu veya histon deasetilasyonunu inhibe edici ajanlar eklenilerek terapötik genin ekspresyon seviyesi ve süresi uzatılabilir, ya da vektör tasarımına ilave insulator diziler eklenilebilir. Söz konusu insulator diziler sayesinde hem terapötik genin, çevresel kromatinin ekspresyonu baskılayıcı etkilerinden izole edilebilmesi ve böylelikle daha uzun süreler boyunca eksprese olabilmesi sağlanılabilir, hem de vektör tasarımının güvenilirliği daha da arttırılabilir. Daha uzun vadede ise terapötik gen olan hPTH'ın kontrollü salınımını sağlayabilmek için, indüklenebilir bir promotor bölge tercih edilerek yeniden tasarlanan LV vektörler sayesinde, hPTH'ın sadece istenilen zamanlarda salgılanması için yeni çalışmalar planlanılabilir.

Sonuç olarak, sıçanlarda ex vivo gen terapisi ile hipo-PT tedavisinin gerçekleştirilebileceğini gösterebilmekle beraber, söz konusu uygulamanın insanlar üzerinde klinik araştırma fazına geçebilmesinden önce katedilmesi gereken oldukça uzun bir yol bulunmaktadır. Bunun için uygulama yönteminin optimize edilerek hPTH seviyelerinin fizyolojik değer aralığına çıkarılabilmesi, zaman içerisinde oluşan hormon dalgalanmalarının önüne geçilebilmesi, optimal hücre dozajının belirlenmesi için yapılması gereken çalışmalar ve terapötik etkinin mümkün olduğunca uzatılabilmesine yönelik yeni çalışmalar planlanılmalıdır.

Gerçekleştirmiş olduğumuz "*ex vivo* gen terapisi ile hipo-PT tedavisi modeli oluşturma" adlı çalışmamızın metodolojisi ileri düzeyde optimize edilebildiği takdirde, gen terapisi ile tedavi edilebilecek diğer hormon veya enzim eksikliklerine bağlı hastalıklar için de uyarlanarak, yeni tedavi modellerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

## KAYNAKLAR


**[1]** **Hall, J.E.** Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji (2017) Güneş Tıp Kitabevleri

**[2]** **Giddings, C.E., J. Rimmer, Weir, N.** (2009). History of parathyroid gland surgery: an historical case series. J Laryngol Otol, 123(10), 1075-81.

**[3]** **Toneto, M. G., Prill, S., Debon, L. M., Furlan, F. Z., Steffen, N.** (2016). The history of the parathyroid surgery. Rev Col Bras Cir, 43(3), 214-22.

**[4]** **Kafetzis, I. D., Diamantopoulos, A., Christakis, I., Leoutsakos, B.** (2011). The history of the parathyroid glands. Hormones (Athens), 10(1), 80-4.

**[5]** **Ellis, H.** (2007). Anatomy of the thyroid and parathyroid glands. Surgery (Oxford), 25(11), 467-468.

**[6]** **Taterra, D., Wong, L. M., Vikse, J., Sanna, B., Pękala, P., Walocha, J., Cirocchi, R., Tomaszewski, K., Henry, B. M.** (2019). The prevalence and anatomy of parathyroid glands: a meta-analysis with implications for parathyroid surgery. Langenbeck's archives of surgery, 404(1), 63-70.

**[7]** **Akerström, G., Malmaeus J., ve Bergström R.** (1984). Surgical anatomy of human parathyroid glands. Surgery, 95(1), 14-21.

**[8]** **Mohebati, A., Shaha, A**. (2012). Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. Clinical Anatomy, 25(1), 19-31.

**[9]** **Benli, Y.** (2015). Paratiroid Bezlerinin Anatomisi. In. Mediyasten Hastalıklar ve Cerrahisi (pp. 23-25). TÜSİAD Eğitim Kitapları Serisi, Türkiye.

**[10]** **Turan, B., Yazkan R.** (2019). Ektopik Paratiroid Bezlerine Klinik ve Cerrahi Yaklaşım. Medical Journal of Suleyman Demirel University, 26(2).

**[11]** **Noussios, G., Anagnostis, P., Natsis, K.** (2012). Ectopic parathyroid glands and their anatomical, clinical and surgical implications. Experimental and clinical endocrinology & diabetes, 120(10), 604-610.

**[12]** **Guilmette, J., Sadow, P. M.** (2019). Parathyroid Pathology. Surgical pathology clinics, 12(4), 1007-1019.

**[13]** **Naveh-Many, T., Volovelsky, O.** (2020). Parathyroid Cell Proliferation in Secondary Hyperparathyroidism of Chronic Kidney Disease. International journal of molecular sciences, 21(12), 4332.

**[14]** **Mense, M.G., Rosol, T.J.** (2018) Parathyroid Gland. In Boorman's Pathology of the Rat (pp. 687-693). Elsevier.

**[15]** **Scharpf, J., Kyriazidis, N., Kamani, D., Randolph, G.** (2016). Anatomy and embryology of the parathyroid gland. Operative Techniques in Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 27(3), 117-121.

**[16]** **Stewart, W. B., Rizzolo, L. J.** (2007). Embryology and surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands. In Surgery of the thyroid and parathyroid glands (pp. 13-20). Springer.

**[17]** **Uludağ, M., Aygün, N., İşgör, A.** (2019). Primer Hiperparatiroidizmin Cerrahi Tedavisinde Temel Cerrahi İlkeler ve Cerrahi. The Medical Bulletin of Şişli Etfal Hospital, 53(4), 337-352.

**[18]** **Arrangoiz, R., Cordera, F., Caba, D., Juarez, M. M., Moreno, E., Luque, E.** (2017) Parathyroid embryology, anatomy, and pathophysiology of primary hyperparathyroidism. International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery, 6(4), 39-58.

**[19]** **Peissig, K., Condie, B.G., Manley, N. R.** (2018). Embryology of the parathyroid glands. Endocrinology and metabolism clinics of North America, 47(4), 733.

**[20]** **Chen, H., Senda, T., Emura, S., Kubo, K.** (2013). An update on the structure of the parathyroid gland. The open anatomy Journal, 5(1).

**[21]** **Yazıcıoğlu, A., Karaoğlanoğlu, N.** (2015). Mediyastenin Paratiroid Tümörleri. In Mediyasten Hastalıklar ve Cerrahisi (pp.407-424). TÜSİAD Eğitim Kitapları Serisi, Türkiye.

**[22]** **Trier, J. S.** (1958). The fine structure of the parathyroid gland. The Journal of Cell Biology, 4(1), 13-22.

**[23]** **Cinti, S., Sbarbati, A.** (1995). Ultrastructure of human parathyroid cells in health and disease. Microscopy research and technique, 32(2), 164-179.

**[24]** **Roth, S.** (1970). The ultrastructure of primary water-clear cell hyperplasia of the parathyroid glands. The American journal of pathology, 61(2), 233.

**[25]** **Chen, H., Emura, S., Shoumura, S.** (2006). Ultrastructure of the water-clear cell in the parathyroid gland of SAMP6 mice. Tissue and Cell, 38(3), 187-192.

**[26]** **Cohn, D., Hamilton, J.** (1976). Newer aspects of parathyroid chemistry and physiology. The Cornell Veterinarian, 66(3), 271-300.

**[27]** **Khan, M., Jose, A., Sharma, S.** (2018). Physiology, parathyroid hormone (PTH). In StatPearls Publishing, Treasure Island.

**[28]** **Silva, B.C., Bilezikian, J. P.** (2015). Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. Current opinion in pharmacology, 22, 41-50.

**[29]** **Lombardi, G., Ziemann, E., Banfi, G., Corbetta, S.** (2020). Physical activity-dependent regulation of parathyroid hormone and calcium-phosphorous metabolism. International Journal of Molecular Sciences, 21(15), 5388.

**[30]** **GenBank: Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p13 Primary Assembly.** Erişim: 27.01.2021, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000011.10?report=genbank&from=13492054&to=13496181&strand=true.

**[31]** **168450 Parathyroid Hormone; PTH.** Erişim: 27.01.2021, https://omim.org/entry/168450.

**[32]** **Cohn, D. V. ve Elting, J.** (1983). Biosynthesis, processing, and secretion of parathormone and secretory protein-I. In Proceedings of the 1982 Laurentian Hormone Conference (pp:181-209). Elsevier.

**[33]** **Potts, J. T.** (2005). Parathyroid hormone: past and present. Journal of Endocrinology, 187(3), 311-325.

**[34]** **Friedman, P. A., Goodman, W. G.** (2006). PTH (1–84) / PTH (7–84): a balance of power. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 290(5), 975-984.

**[35]** **Habener, J. F., Amherdt, M., Ravazzola, M., Orci, L.** (1979). Parathyroid hormone biosynthesis. Correlation of conversion of biosynthetic precursors with intracellular protein migration as determined by electron microscope autoradiography. The Journal of cell biology, 80(3), 715-731.

**[36]** **Öztekin Ü.** (2013). Paratiroid Adenomlarında Tc-99 Mibi ile Paratiroid Sintigrafisinin Histopatolojik Bulgularla Korelasyonu (Uzmanlık tezi, Cumhuriyet Üniversitesi).

**[37]** **d'Amour, P.** (2006). Circulating PTH molecular forms: what we know and what we don't. Kidney International, 70, 29-33.

**[38]** **Brown, E. M.** (2000). Calcium receptor and regulation of parathyroid hormone secretion. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 1(4), 307-315.

**[39]** **Berne, R. M., Levy, M. N., Bruce M., Coeppen, B. M., Stanton, B. A.** (2008) Fizyoloji. Güneş Tıp Kitabevleri.

**[40]** **Terris, D. J., Duke W. S.** (2016). Thyroid and Parathyroid Diseases (Medical and Surgical Management). Thieme

**[41]** **Kumar, R., Thompson, J. R**. (2011). The regulation of parathyroid hormone secretion and synthesis. Journal of the American Society of Nephrology, 22(2), 216-224.

**[42]** **Conigrave, A.D.** (2016). The calcium-sensing receptor and the parathyroid: past, present, future. Frontiers in physiology, 7, 563.

**[43]** **Brown, E. M., Chen, C. J.** (1989). Calcium, magnesium and the control of PTH secretion. Bone and mineral, 5(3), 249-257.

**[44]** **Vetter, T., Lohse, M. J.** (2002). Magnesium and the parathyroid. Current opinion in nephrology and hypertension, 11(4), 403-410.

**[45]** **Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., Brooks, H. L.** (2015). Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri.

**[46]** **Silver, J., Levi, R.** (2005). Regulation of PTH synthesis and secretion relevant to the management of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. Kidney International, 67, 8-12.

**[47]** **İnsal, B., Pişkin, İ.** (2017). Kemik Dokusunun Fizyolojisi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 28(1), 28-32.

**[48]** **Bellido, T., Plotkin, L. I., Bruzzaniti, A.** (2019). Bone cells. In Basic and applied bone biology (pp. 37-55). Elsevier.

**[49]** **O'Brien, C.A., Plotkin, L., Galli, C., Goelner, J. J., Gortazar, A. R., Allen, M. R., Robling, A. G., Bouxselin, M., Schipani, E., Turner, C. H.** (2008).

Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. PloS one, 3(8), 2942.

**[50]** **Wein, M. N., Kronenberg, H. M.** (2018). Regulation of bone remodeling by parathyroid hormone. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 8(8), a031237.

**[51]** **Qin, L., Raggatt, L. J., Partridge, N. C.** (2004). Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. Trends in Endocrinology & Metabolism, 15(2), 60-65.

**[52]** **Hodsman, A. B., Bauer, D. C., Dempster, D. W., Dian, L., Hanley, D. A., Harris, S. T., Kendler, D. L., McClung, M. R., Miller, P. D., Olszynski, W. P.** (2005). Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. Endocrine reviews, 26(5), 688-703.

**[53]** **Mihai, R., Farndon, J.** (2000). Parathyroid disease and calcium metabolism. British journal of anaesthesia, 85(1), 29-43.

**[54]** **Rodman, J., Heinemann, H.** (1975). Parathyroid hormone and the regulation of acid-base balance. The American journal of the medical sciences, 270(3), 481-489.

**[55]** **Fleet, J.C., Schoch, R. D.** (2010). Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. Critical reviews in clinical laboratory sciences, 47(4), 181-195.

**[56]** **Nemere, I., Larsson, D.** (2002). Does PTH have a direct effect on intestine? Journal of cellular biochemistry, 86(1), 29-34.

**[57]** **Kahraman, S.D.** (2017) Tiroid Cerrahisi Uygulanan Hastalarda Ameliyat Sonrası Erken Dönem Ölçülen Parathormon Seviyesinin Kalıcı Hipoparatiroidizm Tanısında Öngörü Değerinin Saptanması ve Hipoparatiroidi Gelişimini Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi (Uzmanlık tezi, Gülhane Tıp Fakültesi).

**[58]** **Goldstein, D. A.** (1990). Serum calcium. In Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. Butterworths, Boston.

**[59]** **Houtmeyers, A., Duchateau, L., Grünewald, B., Hermans, K.** (2016). Reference intervals for biochemical blood variables, packed cell volume, and body temperature in pet rats (Rattus norvegicus) using point-of-care testing. Veterinary clinical pathology, 45(4), 669-679.

**[60]** **Schultz, V. L., Garner, S. C., Lavigne, J. R., Toverud, S. U.** (1994). Determination of bioactive rat parathyroid hormone (PTH) concentrations in vivo and in vitro by a 2-site homologous immunoradiometric assay. Bone and mineral, 27(2), 121-132.

**[61]** **Torres, P.U.** (2006). The need for reliable serum parathyroid hormone measurements. Kidney international, 70(2), 240-243.

**[62]** **Şişman, P., Şişman, M., Ersoy, C**. (2014). Hipoparatiroidizmin tanı ve tedavisi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 40(2), 111-117.

**[63]** **Özata, M.** (2016) Endokrinoloji. İstanbul Tıp Kitabevleri.

**[64]** **Pamuk, N.** (2019). Hipoparatiroidili Hastalarda Kardiyovasküler Risk Göstergesi Olarak Kan Grubu ve Arteriyel Stiffness Parametrelerinin Değerlendirilmesi (Uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Keçiören Hastanesi)

**[65]** **Erdoğan, G.** (2005). Koloğlu Endokrinoloji Temel ve Klinik. Medical Network Nobel Kitabevi.

**[66]** **Bollerslev, J., Rejnmark, L., Marcocci, C., Shoback, D. M., Sitges-Serra, A., Van Biesen, W., Dekkers, O. M.** (2015). European Society of Endocrinology Clinical Guideline: Treatment of chronic hypoparathyroidism in adults. Eur J Endocrinol, 173(2), G1-20.

**[67]** **Çalış, H.** (2012). Total Tiroidektomi Sonrası Gelişebilecek Hipokalseminin Erken Tanısında Parathormon Ölçümü (Uzmanlık tezi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi)

**[68]** **Serin, M.** (2015). Total Tiroidektomi Sonrası Erken Dönem Kalsiyum İnfüzyonunun Kan Parathormon Seviyelerine Etkisi (Uzmanlık tezi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi).

**[69]** **Marcucci, G., Brandi, M. L.** (2019). Conventional treatment of hypoparathyroidism. Parathyroid Disorders, 51, 160-164.

**[70]** **Bilezikian, J. P., Brandi, M. L., Cusano, N. E., Mannstadt, M., Rejnmark, L., Rizzoli, R., Rubin, M. R., Winer, K. K., Liberman, U. A., Potts Jr, J. T.** (2016). Management of hypoparathyroidism: present and future. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 101(6), 2313-2324.

**[71]** **De Sanctis, V., Soliman, A., Fiscina, B.** (2012). Hypoparathyroidism: from diagnosis to treatment. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity, 19(6), 435-442.

**[72]** **Tecilazich, F., Formenti, A. M., Frara, S., Giubbini, R., Giustina, A.** (2018). Treatment of hypoparathyroidism. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 32(6), 955-964.

**[73]** **Marcucci, G., Brandi, M.L.** (2019). A new era for chronic management of hypoparathyroidism: Parathyroid hormone peptides. Parathyroid Disorders, 51, 165-171.

**[74]** **Ramakrishnan, Y., Cocks, H.** (2016). Impact of recombinant PTH on management of hypoparathyroidism: a systematic review. European Archives of Oto-rhino-laryngology, 273(4), 827-835.

**[75]** **Rejnmark, L., Sikjaer, T., Underbjerg, L., Mosekilde, L.** (2013). PTH replacement therapy of hypoparathyroidism. Osteoporosis International, 24(5), 1529-1536.

**[76]** **Rubin, M.R.** (2020). Recent advances in understanding and managing hypoparathyroidism. F1000Research, 9, 766.

**[77]** **Marcucci, G., Della Pepa, G., Brandi, M.L.** (2016). Natpara for the treatment of hypoparathyroidism. Expert opinion on biological therapy, 16(11), 1417-1424.

**[78]** **Brandi, M. L., Bilezikian, J. P., Shoback, D., Bouillon, R., Clarke, B. L., Thakker, R. V. Khan, A. A., Potts Jr, J. T.** (2016). Management of

hypoparathyroidism: summary statement and guidelines. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 101(6), 2273-2283.

**[79]** **Ma, C-C., Wang, Z-L., Xu, T., He, Z-Y., Wei, Y-Q.** (2020). The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019. Biotechnology advances, 40, 107502.

**[80]** **Wirth, T., Parker, N., Ylä-Herttuala, S.** (2013). History of gene therapy. Gene, 525(2), 162-169.

**[81]** **Milone, M. C., O'Doherty, U.** (2018). Clinical use of lentiviral vectors. Leukemia, 32(7), 1529-1541.

**[82]** **Naldini, L.** (2015). Gene therapy returns to centre stage. Nature, 526 (7573), 351-360.

**[83]** **Anguela, X. M., High, K. A.** (2019). Entering the modern era of gene therapy. Annual review of medicine, 70, 273-288.

**[84]** **Mohan, R. R., Sharma, A., Netto, M. V., Sinha S., Wilson S. E.** (2005). Gene therapy in the cornea. Progress in retinal and eye research, 24(5), 537-559.

**[85]** **Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein M., Abedi M. R.** (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. The journal of gene medicine, 20(5), e3015.

**[86]** **Ibraheem, D., Elaissari, A., Fessi, H.** (2014). Gene therapy and DNA delivery systems. International journal of pharmaceutics, 459(1-2), 70-83.

**[87]** **Rashnonejad, A., Durmaz, B., ve Özkınay, F.** (2014). Gen tedavisinin temel ilkeleri ve son gelişmeler. Ege Tıp Dergisi, 53(4), 231-240.

**[88]** **Verma, I. M., Weitzman, M. D.** (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. Annu. Rev. Biochem., 74, 711-738.

**[89]** **Li, S. D., Huang, L.** (2006). Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. Gene therapy, 13(18), 1313-1319.

**[90]** **Attar, A.** (2017). Gen terapisi yöntemleri: fiziksel ve kimyasal metotlar. Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology, 74(1).

**[91]** **Escors, D., Breckpot, K.** (2010). Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 58(2), 107-119.

**[92]** **Giacca, M., Zacchigna, S.** (2012). Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. Journal of controlled release, 161(2), 377-388.

**[93]** **Lundstrom, K.** (2018). Viral vectors in gene therapy. Diseases, 6(2), 42.

**[94]** **Kootstra, N.A., Verma, I. M.** (2003). Gene therapy with viral vectors. Annual review of pharmacology and toxicology, 43(1), 413-439.

**[95]** **Sheridan, C.** (2011). Gene therapy finds its niche. Nature biotechnology, 29(2), 121-128.

**[96]** **Gao, J., Zhang, W., Ehrhardt, A.** (2020). Expanding the spectrum of adenoviral vectors for cancer therapy. Cancers, 12(5), 1139.

**[97]** **Nadeau, I., Kamen, A.** (2003). Production of adenovirus vector for gene therapy. Biotechnology advances, 20(7-8), 475-489.

**[98]** **Lundstrom, K.** (2003). Latest development in viral vectors for gene therapy. Trends in biotechnology, 21(3), 117-122.

**[99]** **Daya, S., Berns, K. I.** (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. Clinical microbiology reviews, 21(4), 583-593.

**[100]** **Carter, P., Samulski, R.** (2000) Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. International journal of molecular medicine, 6(1), 17-44.

**[101]** **Li, C., Samulski, R. J** (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. Nature Reviews Genetics, 21(4), 255-272.

**[102]** **Wu, N., Ataai, M. M.** (2000). Production of viral vectors for gene therapy applications. Current opinion in biotechnology, 11(2), 205-208.

**[103]** **Robbins, P. D., Ghivizzani, S. C.** (1998). Viral vectors for gene therapy. Pharmacology & therapeutics, 80(1), 35-47.

**[104]** **Ingusci, S., Verlengia, G., Soukupova, M., Zucchini S., Simonato M.** (2019). Gene therapy tools for brain diseases. Frontiers in pharmacology, 10, 724.

**[105]** **Ryu, W. S.** (2016). Molecular virology of human pathogenic viruses (pp. 227-246). Academic Press.

**[106]** **Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli L., Pistello M.** (2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. New Microbiol, 36(1), 1-22.

**[107]** **Vargas, J. E., Chicaybam, L., Stein, R. T., Tanuri, A., Delgado-Cañedo A., Bonamino, M. H.** (2016). Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. Journal of translational medicine, 14(1), 1-15.

**[108]** **Elsner, C., Bohne, J.** (2017). The retroviral vector family: something for everyone. Virus Genes, 53(5), 714-722.

**[109]** **Park, F.** (2007). Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? Physiological genomics, 31(2), 159-173.

**[110]** **Giry-Laterrière, M., Verhoeyen, E., Salmon, P.** (2011). Lentiviral vectors. In Viral Vectors for Gene Therapy (pp. 183-209). Springer.

**[111]** **Quinonez, R., Sutton, R. E.** (2002). Lentiviral vectors for gene delivery into cells. DNA and cell biology, 21(12), 937-951.

**[112]** **Picanco-Castro, V., Maria de Sousa Russo-Carbolante, E., Tadeu Covas, D.** (2012). Advances in lentiviral vectors: a patent review. Recent Patents on DNA & Gene Sequences (Discontinued), 6(2), 82-90.

**[113]** **Follenzi, A., Naldini, L.** (2002). HIV-based vectors. In Gene Therapy Protocols (pp. 259-274). Springer.

**[114]** **Sakuma, T., Barry, M. A., Ikeda, Y.** (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. Biochemical Journal, 443(3), 603-618.

**[115]** **Poletti, V., Mavilio, F.** (2021). Designing Lentiviral Vectors for Gene Therapy of Genetic Diseases. Viruses, 13(8), 1526.

**[116]** **Yi, Y., Jong Noh, M., Hee Lee, K.** (2011). Current advances in retroviral gene therapy. Current gene therapy, 11(3), 218-228.

**[117]** **Kaufmann, K. B., Büning, H., Galy, A., Schambach, A., Grez M.** (2013). Gene therapy on the move. EMBO molecular medicine, 5(11), 1642-1661.

**[118]** **Follenzi, A., Santambrogio, L., Annoni, A.** (2007). Immune responses to lentiviral vectors. Current gene therapy, 7(5), 306-315.

**[119]** **Breckpot, K., Aerts, J., Thielemans, K.** (2007). Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. Gene therapy, 14(11), 847-862.

**[120]** **Goswami, R., Subramanian, G., Silayeva, L., Newkirk, I., Doctor, D., Chawla, K., Chattopadhyay, S., Chandra, D., Chilukuri, N., Betapudi, V.** (2019). Gene therapy leaves a vicious cycle. Frontiers in oncology, 9, 297.

**[121]** **Alhakamy, N. A., Curiel, D. T., Berkland, C. J.** (2021). The era of gene therapy: from preclinical development to clinical application. Drug Discovery Today, 26(7), 1602-1619.

**[122]** **Shahryari, A., Saghaeian Jazi, M., Mohammadi, S., Razavi Nikoo, H., Nazari, Z., Hosseini, E. S., Burtscher, I., Mowla, S. J., Lickert, H.** (2019). Development and clinical translation of approved gene therapy products for genetic disorders. Frontiers in genetics, 10, 868.

**[123]** **Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. WL., Gao, G.** (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. Signal Transduction and Targeted Therapy, 6(1), 1-24.

**[124]** **Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Ou, C-N., Finegold, M., Grompe, M.** (1997). Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. The American journal of pathology, 151(5), 1273.

**[125]** **Dişçi, Z.** (2017). Rekombinant Yöntemlerle Sentetik Parathormon Üretimi (Yüksek lisans tezi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi).

**[126]** **Davis, H. E., Morgan, J. R., Yarmush, M. L.** (2002). Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. Biophysical chemistry, 97(2-3), 159-172.

**[127]** **Iwamoto, M., Mori, C., Hiraoka, Y., Haraguchi, T.** (2014). Puromycin resistance gene as an effective selection marker for ciliate Tetrahymena. Gene, 534(2), 249-255.

**[128]** **Babey, M., Brandi, M. L., ve Shoback, D. (2018).** Conventional treatment of hypoparathyroidism. Endocrinology and Metabolism Clinics, 47(4), 889-900.

**[129]** **Flotte, T. R.** (2007). Gene therapy: The first two decades and the current state of the art. Journal of cellular physiology, 213(2), 301-305.

**[130]** **Wong, T., McGrath, J., Navsaria, H.** (2007). The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. British Journal of Dermatology, 156(6), 1149-1155.

**[131]** **Shams, F., Rahimpour, A., Vahidnezhad, H., Hosseinzadeh, S., Moravvej, H., Kazemi, B., Rajabibazl, M., Abdollahimajd, F., Uitto, J.** (2021). The Utility of Dermal Fibroblasts in Treatment of Skin Disorders: A Paradigm of

Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. Dermatologic Therapy, 34(4), e15028.

**[132]** **Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieks, I., Muceniece, R., Ancans, J.** (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. Stem Cell Reviews and Reports, 5(4), 378-386.

**[133]** **Riekstina, U., Muceniece, R., Cakstina, I., Muiznieks, I., Ancans, J.** (2008). Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. Cytotechnology, 58(3), 153-162.

**[134]** **Petersen, T., Niklason, L.** (2007). Cellular lifespan and regenerative medicine. Biomaterials, 28(26), 3751-3756.

**[135]** **Emery, D. W., Nishino, T., Murata, K., Fragkos, M., Stamatoyannopoulos, G.** (2002). Hematopoietic stem cell gene therapy. International journal of hematology, 75(3), 228-236.

**[136]** **Mukherjee, S., Thrasher, A. J.** (2014). Gene correction of induced pluripotent stem cells derived from a murine model of X-linked chronic granulomatous disorder. In Gene Correction (pp. 427-440). Springer.

**[137]** **Cheng, A. Y., García, A. J.** (2013). Engineering the matrix microenvironment for cell delivery and engraftment for tissue repair. Current opinion in biotechnology, 24(5), 864-871.

**[138]** **Ezquer, F. E., Ezquer, M. E., Vicencio, J. M., Calligaris, S. D.** (2017). Two complementary strategies to improve cell engraftment in mesenchymal stem cell-based therapy: Increasing transplanted cell resistance and increasing tissue receptivity. Cell adhesion & migration, 11(1), 110-119.

**[139]** **Weber, A., Groyer-Picard, M-T., Dagher, I.** (2009). Hepatocyte transplantation techniques: large animal models. In Hepatocyte Transplantation (pp. 83-96). Springer.

**[140]** **Jeong, G-J., Song, S. Y., Kang, M., Go, S., Sohn, H. S., Kim, B-S.** (2018). An injectable decellularized matrix that improves mesenchymal stem cell engraftment for therapeutic angiogenesis. ACS Biomaterials Science & Engineering, 4(7), 2571-2581.

**[141]** **Im, G-B., Kim, Y. H., Kim, Y-J., Kim, S-W., Jung, E., Jeong, G-J., Wang, K., Kim, J., Kim, D-I., Kim, T-H.** (2019). Enhancing the wound healing effect of conditioned medium collected from mesenchymal stem cells with high passage number using bioreducible nanoparticles. International journal of molecular sciences, 20(19), 4835.

**[142]** **Kim, J-W., Ha, K-Y., Molon, J. N., Kim, Y-H.** (2013). Bone marrow–derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats: comparative study between intralesional and intravenous transplantation. Spine, 38(17), E1065-E1074.

**[143]** **Leiker, M., Suzuki, G., Iyer, V. S., John M Jr, C., Lee, T.** (2008). Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells. Cell transplantation, 17(8), 911-922.

**[144]** **Hossle, J. P., Seger, R. A., Steinhoff, D.** (2002). Gene therapy of hematopoietic stem cells: strategies for improvement. Physiology, 17(3), 87-92.

**[145]** **Dao, M. A., Hashino, K., Kato, I. Nolta, J. A.** (1998). Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during ex vivo culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 92(12), 4612-4621.

**[146]** **Hall, K. M., Horvath, T. L., Abonour, R., Cornetta, K., Srour, E. F.** (2006). Decreased homing of retrovirally transduced human bone marrow CD34+ cells in the NOD/SCID mouse model. Experimental hematology, 34(4), 433-442.

**[147]** **Psatha, N., Karponi, G., ve Yannaki, E.** (2016). Optimizing autologous cell grafts to improve stem cell gene therapy. Experimental hematology, 44(7), 528-539.

**[148]** **Nakajima, K., Fujita, J., Matsui, M., Tohyama, S., Tamura, N., Kanazawa, H., Seki, T., Kishino, Y., Hirano, A., Okada, M.** (2015). Gelatin hydrogel enhances the engraftment of transplanted cardiomyocytes and angiogenesis to ameliorate cardiac function after myocardial infarction. PloS one, 10(7), e0133308.

**[149]** **Xu, B., Yuan, F-Z., Lin, L., Ye, J., Fan, B-S., Zhang, J-Y., Yang, M., Jiang, D., Jiang, W-B., Wang, X.** (2020). The higher inherent therapeutic potential of biomaterial-based hDPSCs and hEnSCs for pancreas diseases. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 636.

**[150]** **Rutherford, R. B., Moalli, M., Franceschi, R. T., Wang, D., Gu, K., Krebsbach, P. H.** (2002). Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo. Tissue engineering, 8(3), 441-452.

**[151]** **Golpanian, S., Schulman, I. H., Ebert, R. F., Heldman, A. W., DiFede, D. L., Yang, P. C., Wu, J. C., Bolli, R., Perin, E. C., Moyé, L.** (2016). Concise review: review and perspective of cell dosage and routes of administration from preclinical and clinical studies of stem cell therapy for heart disease. Stem cells translational medicine, 5(2), 186-191.

**[152]** **Bougioukli, S., Alluri, R., Pannell, W., Sugiyama, O., Vega, A., Tang, A., Skorka, T., Park, S. H., Oakes, D., Lieberman, J. R.** (2019). Ex vivo gene therapy using human bone marrow cells overexpressing BMP-2: "Next-day" gene therapy versus standard "two-step" approach. Bone, 128, 115032.

**[153]** **Pajenda, G., Hercher, D., Márton, G., Pajer, K., Feichtinger, G. A., Maléth, J., Redl, H., Nógrádi, A.** (2014). Spatiotemporally limited BDNF and GDNF overexpression rescues motoneurons destined to die and induces elongative axon growth. Experimental neurology, 261, 367-376.

**[154]** **Nanobashvili, A., Melin, E., Emerich, D., Tornøe, J., Simonato, M., Wahlberg, L., Kokaia, M.** (2019). Unilateral ex vivo gene therapy by GDNF in epileptic rats. Gene therapy, 26(3), 65-74.

**[155]** **Adriaansen, J., Vervoordeldonk, M. J., Vanderbyl, S., de Jong, G., Tak, P. P.** (2006). A novel approach for gene therapy: engraftment of fibroblasts containing the artificial chromosome expression system at the site of

inflammation. The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications, 8(1), 63-71.

**[156] Orive, G., De Castro, M., Ponce, S., Hernandez, R. M., Gascon, A. R., Bosch, M., Alberch, J., ve Pedraz, J. L.** (2005). Long-term expression of erythropoietin from myoblasts immobilized in biocompatible and neovascularized microcapsules. Molecular therapy, 12(2), 283-289.

**[157] Yang, M., Ma, Q. J., Dang, G. T., Ma, K. T., Chen, P., Zhou, C. Y.** (2005). In vitro and in vivo induction of bone formation based on ex vivo gene therapy using rat adipose-derived adult stem cells expressing BMP-7. Cytotherapy, 7(3), 273-281.

**[158] Neumeyer, J., Lin, R-Z., Wang, K., Hong, X., Hua, T., Croteau, S. E., Neufeld, E. J., Melero-Martin, J. M.** (2019). Bioengineering hemophilia A–specific microvascular grafts for delivery of full-length factor VIII into the bloodstream. Blood advances, 3(24), 4166-4176.

**[159] Matsui, H., Shibata, M., Brown, B., Labelle, A., Hegadorn, C., Andrews, C., Hebbel, R. P., Galipeau, J., Hough, C., Lillicrap, D.** (2007). Ex vivo gene therapy for hemophilia A that enhances safe delivery and sustained in vivo factor VIII expression from lentivirally engineered endothelial progenitors. Stem cells, 25(10), 2660-2669.

**[160] Lin, C-Y., Schek, R. M., Mistry, A. S., Shi, X., Mikos, A. G., Krebsbach, P. H., Hollister, S. J.** (2005). Functional bone engineering using ex vivo gene therapy and topology-optimized, biodegradable polymer composite scaffolds. Tissue engineering, 11(9-10), 1589-1598.

**[161] Krebsbach, P. H., Gu, K., Franceschi, R. T., Rutherford, R. B.** (2000). Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone in vivo. Human gene therapy, 11(8), 1201-1210.

**[162] Krebsbach, P. H., Zhang, K., Malik, A. K., Kurachi, K.** (2003). Bone marrow stromal cells as a genetic platformfor systemic delivery of therapeutic proteins in vivo: human Factor IX model. The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications, 5(1), 11-17.

**[163] Daga, A., Muraglia, A., Quarto, R., Cancedda, R., Corte, G.** (2002). Enhanced engraftment of EPO-transduced human bone marrow stromal cells transplanted in a 3D matrix in non-conditioned NOD/SCID mice. Gene therapy, 9(14), 915-921.

**[164] Rosenqvist, N., Jakobsson, J., ve Lundberg, C.** (2005). Inhibition of chromatin condensation prevents transgene silencing in a neural progenitor cell line transplanted to the rat brain. Cell transplantation, 14(2-3), 129-138.

**[165] Jakobsson, J., Rosenqvist, N., Thompson, L., Barraud, P., Lundberg, C.** (2004). Dynamics of transgene expression in a neural stem cell line transduced with lentiviral vectors incorporating the cHS4 insulator. Experimental cell research, 298(2), 611-623.

**[166] Kohn, D. B., Booth, C., Kang, E. M., Pai, S-Y., Shaw, K. L., Santilli, G., Armant, M., Buckland, K. F., Choi, U., De Ravin, S. S.** (2020). Lentiviral

gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease. Nature medicine, 26(2), 200-206.

**[167]** **Ngai, S. C., Rosli, R., Al Abbar, A., Abdullah, S.** (2015). DNA methylation and histone modifications are the molecular lock in lentivirally transduced hematopoietic progenitor cells. Hindawi publishing corporation BioMed research international, 2015.

**[168]** **Oertel, M., Rosencrantz, R., Chen, Y-Q., Thota, P. N., Sandhu, J. S., Dabeva, M. D., Pacchia, A. L., Adelson, M. E., Dougherty, J. P., Shafritz, D. A.** (2003). Repopulation of rat liver by fetal hepatoblasts and adult hepatocytes transduced ex vivo with lentiviral vectors. Hepatology, 37(5), 994-1005.

**[169]** **Ramezani, A., Hawley, R. G.** (2010). Strategies to insulate lentiviral vector-expressed transgenes. In Lentivirus Gene Engineering Protocols (pp. 77-100) Springer.

**[170]** **Romero, Z., Campo-Fernandez, B., Wherley, J., Kaufman, M. L., Urbinati, F., Cooper, A. R., Hoban, M. D., Baldwin, K. M., Lumaquin, D., Wang, X.** (2015). The human ankyrin 1 promoter insulator sustains gene expression in a β-globin lentiviral vector in hematopoietic stem cells. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 2, 15012.

**[171]** **Arumugam, P. I., Urbinati, F., Velu, C. S., Higashimoto, T., Grimes, H. L., Malik, P.** (2009). The 3′ region of the chicken hypersensitive site-4 insulator has properties similar to its core and is required for full insulator activity. PloS one, 4(9), e6995.

**[172]** **Recillas-Targa, F., Valadez-Graham, V., Farrell, C. M.** (2004). Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. Bioessays, 26(7), 796-807.

**[173]** **Singh, S., Khan, I., Khim, S., Seymour, B., Sommer, K., Wielgosz, M., Norgaard, Z., Kiem, H-P., Adair, J., Liggitt, D.** (2017). Safe and effective gene therapy for murine Wiskott-Aldrich syndrome using an insulated lentiviral vector. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 4, 1-16.

**[174]** **Shotkoski, F., Stamatoyannopoulos, G., Neff, T.** (1997). Stem cell gene therapy, position effects and chromatin insulators. Stem cells, 15(S2), 265-271.

**[175]** **Englund, U., Ericson, C., Rosenblad, C., Mandel, R. J., Trono, D., Wictorin, K., Lundberg, C.** (2000). The use of a recombinant lentiviral vector for ex vivo gene transfer into the rat CNS. Neuroreport, 11(18), 3973-3977.

**[176]** **Kunz, J. B., Kulozik, A. E.** (2020). Gene therapy of the hemoglobinopathies. HemaSphere, 4(5), e479.

**[177]** **Kootstra, N.A., Matsumura, R., Verma, I. M.** (2003). Efficient production of human FVIII in hemophilic mice using lentiviral vectors. Molecular Therapy, 7(5), 623-631.

**[178]** **Seruya, M., Shah, A., Pedrotty, D., Du Laney, T., Melgiri, R., McKee, J. A., Young, H. E., Niklason, L. E.** (2004). Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. Cell transplantation, 13(2), 93-101.

**[179]** **Adriaansen, J., Perez, P., Zheng, C., Collins, M. T., Baum, B. J.** (2011). Human parathyroid hormone is secreted primarily into the bloodstream after rat parotid gland gene transfer. Human gene therapy, 22(1), 84-92.

**[180]** **Chou, F-F., Huang, S-C., Chang, S-F., Liaw, J., Hung, P-H.** (2009). Oral gene therapy for hypoparathyroidism: a rat model. Human gene therapy, 20(11), 1344-1350.

**[181]** **Lee, S., Hong, S. W., Choi, H. S., Lee, L. Y., Nam, C., Rhee, Y., Chung, U., Lim, S-K.** (2008). Experimental parathyroid hormone gene therapy using øC31 integrase. Endocrine journal, 55(6), 1033–1041.

**[182]** **Liu, D., Zhu, Y., Yang, C., Long, J., Yao, C., Li, J., Wang, S.** (2012). Potential treatment of hypoparathyroidism with recombinant plasmids encoding preproparathyroid hormone. Journal of endocrinological investigation, 35(5), 479-484.

**[183]** **Wang, S., Zhu, Y., ve Wang, J.** (2004). pCKM-mPTH recombinant plasmid therapy for hypoparathyroidism: an in vivo experimental research with rats. Zhonghua yi xue za zhi, 84(24), 2107-2109.

**[184]** **Wen, J. M., Zhong, Y. H., Sun, Y., Huang, Z., Zhang, L. W., Wu, Q. L. Zeng, D. C.** (2006). pcDPG parathyroid hormone gene therapy of hypoparathyroidism: An experimental study. Zhonghua yi xue za zhi, 86(4), 260-265.

**[185]** **Zhang, W., Song, C., ve Wen, J.** (2002). pcDNA3. 1 parathyroid hormone gene therapy of hypoparathyroidism: an experimental study. Zhonghua yi xue za zhi, 82(16), 1133-1135.

**[186]** **Zhou, Y., Lü, B-J., Xu, P., Song, C-F.** (2005). Optimising gene therapy of hypoparathyroidism with hematopoietic stem cells. Chinese medical journal, 118(3), 204-209.

**[187]** **Zhu, Y., Ye, J. ve Wang, S.** (2006). pCKM-mPTH recombinant plasmid therapy for hypoparathyroidism by polycationic liposome-mediated transfection. Zhonghua yi xue za zhi, 86(12), 837-840.

**EKLER**

**EK A:** Etik kurul onayı

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** **:Öykü Zeybek**
**Doğum Tarihi ve Yeri** **:**
**E-posta** **:**

## ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** **:**2007, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji
- **Yükseklisans** **:**2014, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Ens, Farmakoloji

## MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2017-2020 Araştırma Görevlisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi

## DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

**Zeybek Ö., Akbaş F. (2021).** Ex-Vivo Gen Terapisiyle Hipoparatiroidizm Tedavisi Modeli Oluşturma. XVII. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 28-31 Ekim, İstanbul, Türkiye.