

EX VIVO 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 artırılmış 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 tedavisinde 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 engraft olabilmemesi, büyük bir kısmının ise engraft 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 hücrenel taşıyıcıyla beraber enjeksiyon uygulanması, bu sayede terapötik hücrelerin sıçan vücuduna engraft olabılme oranlarının ve dolayısıyla hPTH üretim miktarlarının ykseltilebilmesi planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Hipoparatiroidizm, gen terapisi, ex vivo gen terapisi, lentiviral vektör, otolog primer hcre

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 therapeutic 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