

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**AĞIR HEMOFİLİ A HASTALARINDA EKLEM
BULGULARI İLE SERUM ANJİOGENİK VE
İNFLAMATUVAR FAKTÖR DÜZEYLERİNİN
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Dr. Tuba Hilkey KARAPINAR

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

İZMİR- 2013

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**AĞIR HEMOFİLİ A HASTALARINDA EKLEM
BULGULARI İLE SERUM ANJİOGENİK VE
İNFLAMATUVAR FAKTÖR DÜZEYLERİNİN
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uzm. Dr. Tuba Hilkey KARAPINAR

Danışman öğretim üyesi: Prof. Dr. Hale ÖREN

TEŞEKKÜR

Eğitim sürem boyunca yetişmemde emeği geçen, her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen ve beraber çalışma fırsatı bulduğum için kendimi şanslı hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Gülarsu İrken, Prof Dr. Hale Ören ve Doç. Dr. Şebnem Yılmaz'a, tezimin yürütülmesinde emeği geçen İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Hematolojisi Kliniği, İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Kliniği ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı öğretim üyeleri ve yan dal uzman doktorlarına, Tıbbi Biolog Faize Yüksel'e, beraber çalışmaktan çok zevk aldığım ve desteklerini hep yanımda hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarım uzman Dr. Özlem Tüfekçi, Dr. Salih Gözmen, Dr. Fatma Demir Yenigülbüz ve Dr. Eda Büke'ye ve eğitim sürecimin her döneminde bana güç ve destek veren sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Uzm Dr. Tuba Hilkey **KARAPINAR**

İzmir 2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
KISALTMALAR.....	VI
ÖZET	VIII
SUMMARY	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Hemofili A	3
2.1.1 Hemofili A Epidemiyolojisi, İnsidansı ve Genetik Geçiş.....	3
2.1.2 Hemofili A Klinik Bulguları	4
2.1.3 Hemofili A Laboratuvar Bulguları	9
2.1.4 Hemofili A Tedavisi	9
2.1.5 Hemofili A Prognozu ve Komplikasyonları	12
2.2 F VIII	13
2.2.1 F VIII'in Yapısı	13
2.2.2 Koagülasyon Kaskadında F VIII'in Rolü	14
2.3 Yara İyileşmesi.....	15
2.3.1 Normal Yara İyileşmesi	15
2.3.2 Hemofili Hastalarındaki Yetersiz Yara İyileşmesi.....	17
2.3.3 Yara İyileşmesinde Anjiogenez	18

2.3.4 Anjiogenik Sitokinler Arasındaki ilişki	19
2.4 Hemofilik Artropati	21
2.4.1 Eklem Yapısı	21
2.4.2 Hemofilik Artropati Patogenezi ve Klinik Bulguları	22
2.4.3 Hemofilik Artropati Radyolojik Bulguları ve Evrelemesi	26
2.4.4 Hemofilik Artropati Tedavisi	30
3. HASTALAR VE YÖNTEM	32
3.1 Etik Kurul Kararı ve Aile Onamı	32
3.2 Hasta grubu Seçimi ve Kontrol Grubu	32
3.3 Laboratuvar Testleri	37
3.4 ELISA Testleri	34
3.5 Eklem Değerlendirmesi	41
3.6 İstatiksel Değerlendirme	42
4. BULGULAR	43
5. TARTIşMA	49
6. KAYNAKLAR	55
7. SONUÇLAR	65
8. EKLER	68

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>NO</u>	<u>BASLIK</u>	<u>SAYFA NO</u>
1	Hemofili A’da faktör düzeyi ile klinik bulguların şiddeti arasındaki ilişki.....	5
2	Hemofilik hastalarda kanama yerleri ve sıklığı	6
3	Hemofili A’da eklemlerde hemartroz görülme sıklığı	7
4	Hemofili tiplerinin ve klinik bulgularının insidansı.....	8
5	Kanama yerine göre verilmesi gereken faktör miktarı ve süresi	10
6	Petterson radyolojik skorlaması	27
7	Hemofilik artropatide Arnold-Hilgartner sınıflaması.....	28
8	Hemofilik artropatide Denver manyetik rezonans görüntüleme skalası	30
9	Akut hemartrozda tedaviye yanıt kriterleri.....	31
10	Tüm hastaların laboratuvar değerleri.....	44
11	Tüm hastaların ELİSA değerleri	45
12	Akut eklem kanaması sırasında ve bir ay sonrasında laboratuvar değerleri.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>NO</u>	<u>BAŞLIK</u>	<u>SAYFA NO</u>
1	Farklı yaş ve klinik durumlarda uygulanabilecek faktör replasman stratejisi	12
2	F VIII'in protein yapısı.....	13
3	Normal yara iyileşmesinin fazları	17
4	Normal sinovyal eklem yapısı	22
5	Eklem içine kanama ile oluşan eklem hasarı	25

KISALTMALAR

bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü
CRP	: C- reaktif protein
ES	: Endostatin
F VII	: Faktör VII
F VIII	: Faktör VIII
F VIIIa	: Aktive Faktör F VIII
F IX	: Faktör IX
F IXa	: Aktive Faktör IX
F X	: Faktör X
F Xa	: Aktive F X
F XIII	: Faktör XIII
GRE	: Gradient eko
HJHS	: Hemofilik eklem sağlığı skoru
ICAM -1	: İntersellüler adezyon molekülü 1
IFN-γ	: İnterferon -gama
IL-1β	: İnterlökin -1 beta
IL-2	: İnterlökin -2
IL-6	: İnterlökin -6
IL -8	: İnterlökin-8
IPSG	: Uluslararası çalışma grubu
LFA 1	: Lenfosit fonksiyon ilişkili antijen 1

MIF : Makrofaj migrasyon inhibitör faktör
MR : Manyetik rezonans
TAFI : Trombinle aktive olabilen fibrinoliz inhibitörü
TM : Trombomodulin
TNF - α : Tümör nekrotizan faktör -alfa
VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR : Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
VWF : von Willebrand faktör

ÖZET

AĞIR HEMOFİLİ A HASTALARINDA EKLEM BULGULARI İLE SERUM ANJİOGENİK VE İNFLAMATUVAR FAKTÖR DÜZEYLERİNİN İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ağır hemofili A hastalarında erken yaşta başlanan profilaktik Faktör VIII konsantresi replasmanına rağmen eklem içi kanamalar tam olarak önlenememekte, kalıcı eklem hasarları oluşmaya devam etmektedir. Kalıcı eklem hasarlarının azaltılması için kanamanın erken teşhis ve tedavisi önemlidir. Günümüzde, klinik bulgular ve mevcut laboratuvar ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile eklem içi kanamayı ilk başladığında saptamak henüz mümkün değildir. Son dönemde yapılan çalışmalarda hemofili hastalarında tekrarlayan eklem içi kanamalar sonrası sinovit gelişiminde neoanjiyogenezisin önemli rol oynadığı, hemofilik artropatide sinovya da saptanan histolojik anormalliklerin ve neoanjiyogenezisin diğer eklem hastalıklarındakilerle benzer olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ağır hemofili A hastalarında eklem bulguları ile plazma anjiogenik ve inflamatuvar faktör düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya hemofili takibi yapılan dört merkezden inhibitörü negatif olan, ağır hemofili A'lı olgular alındı. Akut eklem içine kanama ile gelen ve eklem hasarı olan 10 ağır Hemofili A hastası, akut eklem kanaması olmayan (mevcut eklem hasarı olan veya olmayan) 25 ağır hemofili A hastası ve kontrol grubu olarak da 22 sağlıklı erkek çocuk alındı. Hastalar eklem hasarı olanlar ve ileri eklem hasarı olanlar olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı. Tüm hastalardan ve kontrol grubundan periferik kandan tam kan sayımı, C-reaktif protein (CRP), serum ferritin, laktik asit ve ELISA yöntemiyle vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF),

intersellüler adezyon molekülü, trombomodulin (TM), makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) ve endostatin bakıldı. Hemofili hastalarının eklem bulguları klinik olarak Hemofilik eklem sağlığı skoru, radyolojik olarak Petterson radyolojik skorlaması ve Denver manyetik rezonans görüntüleme skorlaması ile değerlendirildi.

Hemofili hastalarında serum ferritin, CRP ve laktik asit düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu, eklem hasarı olan hemofili hastalarında ise CRP'nin eklem hasarı olmayanlara göre daha yüksek olduğu bulundu. Sadece akut eklem kanaması sırasında CRP ve MIF düzeylerinin belirgin arttığı saptandı. Serum TM ile VEGF ve MIF değerleri arasında pozitif korelasyon saptandı. Çalışmamız sonuçlarına göre serum CRP ve MIF düzeylerinin akut kanama sırasında yüksek olarak bulunması eklem hasarının derecesine bağlı olmadan kanama varlığını desteklemektedir. Mevcut bulgular, bu anjiyogenik faktörlerin düzeylerinin daha fazla sayıda akut eklem kanamalı ağır Hemofili A hastasında incelenmesinin erken eklem hasarı konusunda bilgi verebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Anjiyogenezis, hemartroz, hemofili

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN JOINT FINDINGS AND SERUM ANGIOGENIC AND INFLAMMATORY FACTOR LEVELS IN SEVERE HEMOPHILIA A PATIENTS

Despite the use of early prophylactic Factor VIII replacement in severe hemophilia A patients, bleeding into joints cannot be prevented completely and permanent joint damage remains to occur as a result. Early diagnosis and treatment of the joint bleedings are important for prevention of permanent joint damage. Today, the early detection of the joint bleeding at the beginning of the episode is not possible with clinical signs and current laboratory and radiologic imaging methods. Recent studies have shown that neoangiogenesis plays important role in development of synovitis after recurrent joint bleedings and the histological abnormalities and findings of neoangiogenesis in hemophilic arthropathy are similar to those in other joint diseases. This study aimed to investigate the relationship between joint findings and levels of plasma angiogenic and inflammatory factors in severe hemophilia A patients.

Severe, inhibitor negative, hemophilia A patients from four hemophilia centers were included into the study. The patient groups consisted of 10 severe hemophilia A patients with acute joint bleeding and joint damage and 25 severe hemophilia A patients with no acute joint bleeding (with joint damage or not). The control group consisted of 22 healthy male children. Each group of patients were further subdivided into two groups with respect to degree of joint damage as presence of joint damage and presence of severe joint damage. Complete blood count analysis, C-reactive protein (CRP), serum ferritin, lactic acid and ELISA based detection of vascular endothelial growth factor (VEGF), intercellular adhesion molecule-1,

thrombomodulin (TM), macrophage inhibitory factor (MIF), and endostatin were performed from peripheral blood of patient and the control groups. The joint findings of hemophilia A patients were evaluated clinically by hemophilia joint health score and radiologically by Petterson scoring and Denver magnetic resonance imaging scoring methods.

Serum ferritin, CRP and lactic acid levels were found to be increased in hemophilia A patients compared to the control group. CRP was significantly increased in hemophilia patients with joint damage compared to hemophiliacs with no joint damage. The increase in levels of CRP and MIF were detected significantly higher in patients with acute joint bleeding. There was a positive correlation between serum TM and VEGF and MIF levels.

The finding of increased levels of CRP and MIF in acute bleeding supports the presence of bleeding regardless of the degree of the joint damage. The present findings show that investigation of the levels of these angiogenic factors in large number of severe hemophilia A patients with acute bleeding episodes may give further information about early joint damage.

Key words: Angiogenesis, hemarthrosis, hemophilia

1. GİRİŞ VE AMAC

Ağır hemofili A hastalarının % 90'ında en sık diz, dirsek ve ayak bileği eklemlerinde olmak üzere spontan eklem içi kanamaları olmaktadır (1). Tekrarlayan kanama epizodları sonucunda bu eklemlerde kalıcı eklem hasarı oluşarak sakatlıklara yol açmaktadır. Hemofilik artropati olarak isimlendirilen bu tablo hastanın fiziksel aktivitesini kısıtlayarak yaşam kalitesini düşürmektedir. Erken yaşta başlanan düzenli Faktör VIII (F VIII) konsantresi replasmanlarına rağmen eklem içi kanamalar (özellikle subklinik kanamalar) hala daha önlenmemiştir ve kalıcı eklem hasarları oluşmaya devam etmektedir (2-4). Eklem hasarının erken evrede saptanması için klinik izlemin yanı sıra radyolojik görüntüleme yöntemleri de kullanılmaktadır. Konvansiyonel radyorafiler ile ancak ileri evre hemofilik artropatinin bulguları saptanabilirken manyetik rezonans (MR) görüntüleme yöntemleri ile daha erken evrede hemartroz bulguları izlenebilmektedir (5-8). Klinik, laboratuvar ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile eklem içi kanamayı ilk başladığında saptamak henüz mümkün değildir.

Hemofili hastalarında tekrarlayan eklem içi kanamalara sekonder sinovit gelişiminde neoangiogenezinin major rol oynadığını son çalışmalar göstermiştir (9-12). Hemofilik artropatide, sinovya da saptanan histolojik anormalliklerin ve neoangiogenezinin diğer eklem hastalıklarındakilerle benzer olduğu gösterilmiştir (4).

Bu çalışmada, ağır hemofili A hastalarında eklem bulguları ile plazma anjiogenik ve inflamatuvar faktör düzeylerinin rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu araştırma sonucunda hastalarda eklem bulguları ile plazma inflamatuvar ve anjiogeneziste rol oynayan faktör

düzeylerinin ilişkisinin belirlenerek uygun profilaktik ve tedavi yaklaşımının yapılmasına olanak sağlanması ve buna bağlı morbitidenin azaltılması beklenmektedir. İlgili konuda literatürde çok az veri bulunmakta, benzer bir çalışma yer almamaktadır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 HEMOFİLİ A

2.1.1 Hemofili A epidemiyolojisi, insidansı ve genetik geçişi

Hemofili A, F VIII eksikliği ile ortaya çıkan ve X kromozomuna bağlı çekinik kalıtımı olan ciddi bir kanama bozukluğudur. F VIII geni X kromozomun uzun kolunda yerleşiktir. X'e bağlı kalıtımla geçtiği için hastaların tamamına yakını erkektir (13-15). Hemofili hastası olan erkekler hastalık taşıyan X kromozomunu bütün kız çocuklarına geçirir ve kız çocukları taşıyıcı olur. Ancak erkek çocuklar babadan X kromozomu almadıkları için hasta veya taşıyıcı olmazlar. Hemofilinin kadınlarda görülmesi X-inaktivasyonuna veya nadiren hem anneden hem babadan iki hastalık taşıyan X allelin kalıtılmasına bağlıdır. Taşıyıcı kadınlar yani babadan defektif X kromozomunu alanlar hastalığı %50 olasılıkla erkek çocuklarına geçirirler. Bu sebeple genetik tanıda ilk aşamada taşıyıcılığın belirlenmesi önemlidir. Hastalarının yaklaşık 1/3'ünde aile öyküsü olmadan spontan de novo mutasyonlar ile hemofili oluşmaktadır. Bu durumda mutasyon annenin gametlerinden birinde oluşmuştur. Ailede bir tek hasta birey vardır ve anne taşıyıcı değildir. Ailesel geçişli hemofilide ise hastalık ailede birden çok bireyde görülür ve hastanın annesi taşıyıcı durumdadır. Erkeklerde X kromozomu tek olduğu için eğer bu kromozom üzerindeki F VIII geninde mutasyon varsa hastalık görülür, mutasyon yoksa birey sağlamdır (13,14,16). İnsidansı 5000-10000 erkek doğumda bir olarak bildirilen bu hastalık dünyada tüm etnik gruplarda ve coğrafik bölgelerde hemen hemen benzer sıklıkta görülmektedir (13-17).

Hemofili A genetik

186 kilobaz büyüklüğünde olan ve 26 değişik ekzondan oluşan F VIII geni X kromozomu üzerinde (Xq28) bulunmaktadır. Bu 186 kb'lik genomik bölge toplam 2332 amino asiti kodlamaktadır. Genom içerisindeki lokalizasyonunun yapıldığı dönemde tanınan en büyük gen F VIII genidir (18). F VIII genindeki mutasyonların bir kısmı F VIII yapımını, salınımını veya dolaşımdaki stabilitesini etkilerken bir kısmı da dolaşımda disfonksiyonel proteinlerin oluşmasına neden olmaktadır (15). Son 15 yıl içinde hafif/orta hemofili A'ya yol açan 200'den fazla mutasyon saptanmıştır (15). Hastaların %40'ında intron 22 içerisindeki inversiyona rastlanırken %30-35'inde nükleotid değişimlerinden oluşan noktasal mutasyonlara rastlanmaktadır. Hastaların %5-10' unda küçük delesyonlar ve insersiyonlar tanımlanırken, %5'inde büyük delesyonlar tanımlanmaktadır (19). Spermiogenezis sırasında oluşan intron 22 inversiyonu F VIII'in fonksiyon eksikliğine yol açmaktadır. İnsanlarda bu inversiyon genellikle annenin babasında spermiogenezis sırasında oluşmaktadır. Ağır hemofili A hastalarında intron 22 inversiyon insidansının yüksek olmasından dolayı taşıyıcı ve prenatal tanı testlerinde ilk basamak intron 22 inversiyonunun aranmasıdır (13,20).

2.1.2 Hemofili A klinik bulguları

Erken çocukluk döneminde kolay ekimoz oluşumu, özellikle spontan eklem içi ve kas içi kanamaların olması, travma veya cerrahi girişim sonrası beklenenden uzun süren kanama öyküsünün olması hemofiliyi akla getirmektedir.

Kanama bulgularının ağırlığı ile faktör VIII düzeyi arasında yakın ilişki olduğundan serum F VIII düzeyine göre hemofili A 3 grupta sınıflandırılmaktadır (13,21).

- Ağır hemofili: Faktör düzeyi normalin %1'nin altında
- Orta hemofili: Faktör düzeyi normalin %1 -5'i arasında
- Hafif hemofili: Faktör düzeyi normalin %5-40'ı arasında

Tablo 1’de faktör düzeyleri ile hemofilinin klinik şiddeti arasındaki ilişki gösterilmektedir (14).

Tablo 1: Hemofili A’da faktör düzeyi ile klinik bulguların şiddeti arasındaki ilişki

Hemofili klinik tipi	F VIII yüzdesi	Kanama Tipi
Ağır	< % 1	Spontan kanamalar; hemartroz ve hematomlar
Orta	< % 1-5	Hafif travma ile kanama; bazen hemartroz; nadiren spontan kanamalar
Hafif	>% 5	Şiddetli travma veya cerrahi ile kanamalar
Yüksek riskli taşıyıcı kadınlar	Değişken	Yaygın jinekolojik ve obsteterek kanamalar

Aile öyküsünden dolayı ağır hemofili A hastalarına tanı genellikle kolay konulmaktadır. Ağır hemofilili çocuklar genellikle 12-18 aylıkken ilk kanama ataklarını geçirirken hafif hemofilili çocuklarda ilk kanama atağı 2-5 yaşlarındadır. Ağır hemofilililerde sıklıkla kolay morarma olurken, hafif ve orta hemofililerde travma, sünnet veya diş çekimi sonrası kanamalar vardır (13,22,23). Hemofililerde kanama yerleri ve bu bölgelerde hangi sıklıkta kanama görüldüğü Tablo 2’de gösterilmiştir (14).

Tablo 2: Hemofililerde kanama yerleri ve sıklığı

Ciddi kanama- Sıklık		Hayatı tehdit eden kanama - Sıklık
Hemartroz	% 70-80	Santral Sinir Sistemi Kanaması < %5
Diz	%45	
Dirsek	%30	
Ayak bileği	%15	
Omuz	%3	
El bileği	%3	
Kalça	%2	
Diğer	%2	
Kas / Yumuşak Doku	%10-20	Sindirim sistemi Boyun- Boğaz
Ağız-Dişeti- Burun Hematüri Diğer kanamalar	%5-10	Ciddi travma

Hemofili hastalarında klinikte görülebilecek başlıca kanama bölgeleri:

-Eklem içi kanamalar (hemartroz): Ağır hemofili A hastalarında en sık görülen kanama yeridir (14). Hemartrozların sıklığı ve şiddeti F VIII eksikliğinin derecesine bağlıdır. Genellikle tekrarlayan kanamalar ‘hedef eklem’ olarak adlandırılan tek bir eklemde (13,14). Hemofilili çocukların yaklaşık % 5 kadarında ilk kanama atağı eklem içine olmaktadır (24). Orta ve ağır hemofili tanılı çocuklarda, ilk eklem içi kanamalar çocukların emekleme ve yürümeye başladığı yaşlarda oluşabilmektedir (13,24). Tüm eklem içi kanamaların % 45’i dizde, %30’u dirsekte, %15’i ayak bileğinde olmaktadır (14). Hemofili A’da eklemlerde hemartroz görülme sıklığı Tablo 3’de gösterilmektedir. Bilateral eklem içi kanama olabilse de sık değildir (13,14). İlk 3 sırayı menteşe tipi eklemlerin almasının nedeni küresel eklemlere (kalça, omuz) oranla daha fazla sinoviyal doku içermeleri ile açıklanmaktadır (25). Hemofilili hastalarda vücudun diğer bölgelerine oranla daha fazla eklem kanaması görülmesinin nedeni halen daha tam olarak açıklanabilmiş değildir (26).

Tablo 3: Hemofili A’da eklemlerde hemartroz görülme sıklığı

Hemartroz oluşan eklem	Sıklık
Diz	% 45
Dirsek	% 30
Ayak bileği	% 15
Omuz	% 3
Kalça	% 2
Diğer	% 2

-Yumuşak doku/ kas içi hematomları: Yumuşak doku kanamaları doku boyunca yayılabilmekte ve yaşamı tehdit edecek kadar şiddetli kanamalara yol açabilmektedirler. Travmaya bağlı olarak gelişebileceği gibi spontan da oluşabilmektedirler. Orta ve ağır hemofilik hastalarda hematomların her yöne doğru büyümeye ve dağılmaya eğilimi olduğundan yakın takip edilmeleri gerekmektedir (13,14). En sık kas içi kanamanın görüldüğü bölgeler kuadriseps, gastrokinemius, bacağın anterior kompartanı, iliopsoas ve ön kolun volar kompartmanı olarak sıralanmaktadır. Kas içine kanamalar, kompartman sendromu ve komşu sinirlere bası sonucu nörolojik bozukluklara yol açabileceğinden yakın takip edilmelidirler (13,14).

-Psödotümörler: Kanama periost veya kemiği içeriyorsa psödotümörler oluşabilmektedir. Hemofilinin nadir fakat tehlikeli bir komplikasyonudur (27). Çocuklarda en sık dirsek distalinde veya dizlerinde meydana gelmektedirler. Eğer büyürlerse komşu kas, sinir ve kemiklerde basıya neden olabilmektedirler (13).

-Kafa içi kanamaları: İntrakranial kanamalar hemofili hastalarında halen daha kanamaya bağlı ölümün en sık nedenidir. Spontan olarak oluşabilir ancak genellikle bir travmayı takip ederek oluşmaktadır (13).

-Dental ve cerrahi kanamalar: Hemofili hastalarında, zayıf pıhtı oluşumuna bağlı zayıf yara iyileşmesi mevcuttur. Diş çekimi hemofili hastalarına en sık uygulanan cerrahi işlemdir. Ağır hemofili hastaları kolay tanı aldıkları için cerrahi öncesi ve sonrası kanamayı önlemek için tedavilerini almaktadırlar. Bazen hafif hemofilili hastalar tanı konmadan cerrahiye gidebilmekte ve operasyon sırasında şiddetli kanama olabilmektedir (13).

-Diğer kanamalar: Hematüri, müköz membran ve gastrointestinal sistem kanamaları görülebilmektedir (13).

Ağır olgularda spontan kanama (özellikle hemartroz) görülürken orta ve hafif olgularda daha çok travma ilişkili kanama bulguları ortaya çıkmaktadır. Hemofili tiplerinin ve klinik bulgularının insidansı Tablo 4’de gösterilmektedir (14).

Tablo 4: Hemofili tiplerinin ve klinik bulgularının insidansı

	Ağır	Orta	Hafif
İnsidans			
Hemofili A	% 70	%15	%15
Hemofili B	% 50	% 30	% 20
Kanama bulguları başlama yaşı	≤ 1 yaş	1-2 yaş	2 yaş- yetişkin
Neonatal kanamalar			
Sünnet sonrası	Sık	Sık	Yok
İntrakraniyal kanama	Olabilir	Nadir	Nadir
Kas/eklem kanaması	Spontan	Hafif travma sonrası	Major travma sonrası
SSS kanaması	Yüksek risk	Orta risk	Nadir
Cerrahi sonrası kanama	Sık	Sık	Nadir
Ağız içi kanaması	Sık	Sık	Nadir

2.1.3 Hemofili A laboratuvar bulguları

F VIII aktivitesi ünite olarak tayin edilmektedir. Bir ünite faktör, 1 ml plazma havuzunun aktivitesine eşdeğer aktivite gösteren faktör miktarıdır. Bu faktörün konsantrasyonu % olarak ifade edilmektedir. Normal F VIII düzeyi % 50-150 arasındadır (13,14). F VIII koagülasyon kaskadının intrensek yolunda yer aldığından, hemofili A hastalarında karakteristik olarak koagülasyon tarama testlerinden aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) uzamış olarak bulunur. Protrombin zamanı (PT) ve kanama zamanı normaldir (13,14).

2.1.4 Hemofili A tedavisi

Hemofili tedavisi hematolog, ortopedist, fizyoterapist, psikiyatrist ve diş hekiminin de içinde bulunduğu multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir. Öncelikle hasta antiagregan ilaç kullanımından ve intramusküler enjeksiyondan kaçınılmalıdır. Hemofili A hastalarında tedavi seçenekleri:

-Faktör replasmanı: F VIII konsantreleri ile yapılmaktadır. Son yıllarda evde F VIII uygulaması ile yapılan ev tedavisi yaygınlaşmıştır. Hemartroz ve hematomlara ev tedavisiyle hızlı müdahale edilebildiğinden morbitide ve mortalitede belirgin bir düzelme sağlamıştır. Dolayısıyla hemofili A hastalarının yaşam kaliteleri de artmıştır (28). Verilecek F VIII dozu “Vücut ağırlığı X (İstenilen faktör düzeyi- hastanın faktör düzeyi) X 0.5” şeklinde hesaplanmaktadır (13,14). Kanamanın yerine göre verilecek faktör dozu ve tedavi süresi değişmektedir. Kanama yerine göre verilmesi gerekli F VIII doz ve süreleri Tablo 5’de gösterilmektedir (14).

Tablo 5: Kanama yerine göre verilmesi gereken faktör miktarı ve süresi

Kanama yeri	Hedef F VIII düzeyi	Süre
Hemartroz	% 40-60	1-2 gün
İliopsoas kanaması		
Başlangıç	% 80-100	2-3 gün
İdame	%30-60	7-10 gün
Diğer kas içi kanamalar	% 40-60	2-3 gün
SSS/ kafa içi kanamalar		
Başlangıç	%80-100	1-7 gün
İdame	%50	8-21 gün
Boyun kanamaları		
Başlangıç	%80-100	1-7 gün
İdame	%50	8-14 gün
Gastrointestinal sistem		
Başlangıç	%80-100	1-6 gün
İdame	%50	7-14 gün
Üriner sistem	%50	3-5 gün
Derin cilt kesisi	%50	5-7 gün
Majör cerrahi öncesi		
Başlangıç	%80-100	1-3 gün
İdame	%30-80	4-14 gün

-Taze donmuş plazma: Ancak acil durumlarda ve F VIII konsantresi bulunamayan durumlarda kullanılması önerilmektedir (14).

- Profilaktik tedavi: Kanama ve kanamaya bağlı komplikasyonların gelişmesini önleyecek şekilde 2 yaşından önce ve/veya ilk eklem içi kanamasını takiben başlanan ve en az bir yıl

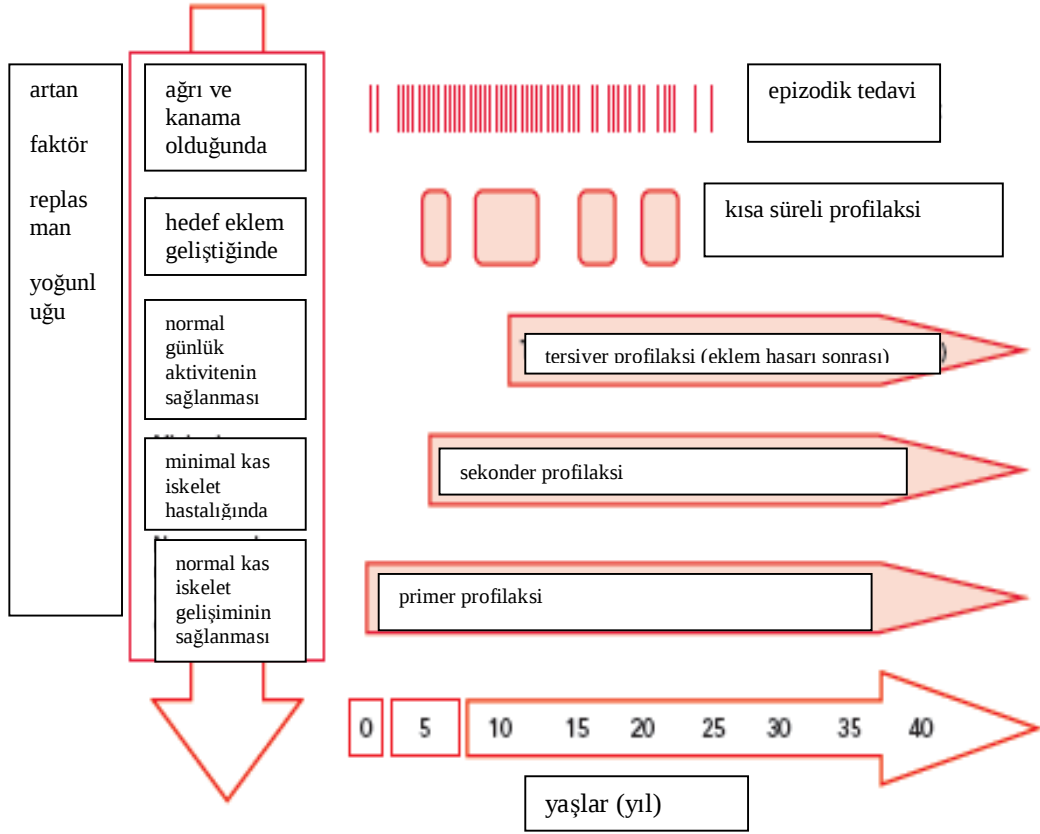
sürdürülen (yılda en az 45 hafta) düzenli faktör replasmanı tedavisine primer profilaksi denilmektedir. Hemartrozu önlemede primer profilaksinin faydası pek çok çalışmada gösterilmiştir (28-30). Birden fazla eklemde veya aynı eklemde birden fazla kanaması olanlarda veya hayatı tehdit eden kanama atağı geçiren hastalarda başlanan ve uzun süreli uygulanan faktör replasmanı tedavisine sekonder profilaksi denilmektedir (14). Farklı yaş ve klinik durumlarda kullanılabilecek faktör replasman tedavileri Şekil 1’de gösterilmektedir (14).

-Desmopressin: 1970’li yıllarda orta veya hafif hemofili vakalarında faktör VIII seviyesinde geçici bir yükselmeye neden olduğu bulunmuştur. Ağır hemofili hastalarında etkisizdir (13,14).

-Antifibrinolitik ajanlar: Hemofili A hastalarında fibrin stabilitesini artırmak amacıyla özellikle müköz membran kanamasında, dental girişimlerde ve menorrajide transeksamik asit kullanılmaktadır (13,14).

-Yardımcı tedaviler: İstirahat, buz, kompresyon ve buz uygulamalarını içermektedir.

-Gen tedavisi: Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler gen tedavisini olası kılmıştır. İnsan üzerindeki çalışmalar başlamış fakat kesin sonuçlar henüz alınamamıştır (13).



Şekil 1: Farklı yaş ve klinik durumlarda uygulanabilecek faktör replasman stratejileri

2.1.5 Hemofili A prognozu ve komplikasyonları

1960'lı yıllarda F VIII konsantrelerinin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte morbitide ve mortalitede belirgin bir azalma olmuştur ancak replasman tedavisinin bir takım komplikasyonları ortaya çıkmıştır (13,14). Hemofili hastalarında görülebilecek komplikasyonlar:

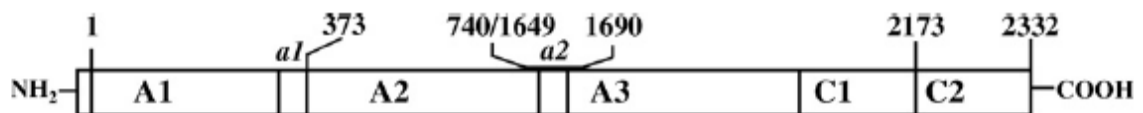
- Kronik sinovit ve eklem kontraktürleri
- Psödotümör oluşumu
- Osteoporoz gelişimi ve buna bağlı kemik kırıkları
- F VIII'e karşı antikor oluşumu (inhibitör): En sık karşılaşılan komplikasyondur. Ağır hemofilik hastalarda siktir ve tedaviye cevap alınamayan durumlarda akla getirilmelidir.

-Faktör replasmanına bağlı infeksiyonlar: Özellikle Hepatit B ve C virusları ile HIV infeksiyonları geçmiş yıllarda sık görülmekte iken son yirmi yılda geliştirilen rekombinant ürünlerin kullanımının artmasıyla belirgin olarak görülme sıklıkları azalmıştır.

2.2 F VIII

2.2.1 F VIII'in yapısı

Kompleks bir glikoprotein yapısında olan F VIII, 2351 aminoasitten oluşan bir plazma glikoproteinidir. Dolaşımda inaktif prekürsör olarak von Willebrand faktör (vWF) ile birlikte bulunur ve dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 12 saattir. F VIII'in sentez yeri halen daha tam olarak bilinmemekle birlikte endotelial hücrelerden sentezlendiği düşünülmektedir. Molekülün A1-a1-A2-a2-B domainleri ağır zinciri oluştururken a3-A3-C1-C2 domainleri hafif zinciri oluşturmaktadır (13,15,24). F VIII'in molekül yapısı Şekil 2'de gösterilmektedir (15). F VIII molekülü trombin tarafından aktive edildiğinde vWF'den ayrılmakta böylece aktive faktör IX (F IXa) ve aktive faktör X (F Xa) için bağlanma bölgeleri aktiflenmektedir. A1 domaini kalsiyum iyonları için, A2 ve A3 domainleri F IXa için, C2 domaini vWF için, A2 ve C2 domainleri F Xa için bağlanma bölgeleridir. Trombin ise hem ağır hem de hafif zincir bölgelerine bağlanmaktadır. Molekülün B domaininin fonksiyonu tam açıklanamamıştır ancak koagülasyon için gerekli olmadığı düşünülmektedir (15,16,31).



Şekil 2: F VIII'in protein yapısı

2.2.2 Koagölasyon kaskadında F VIII'in rolü

Faktör VIII, koagölasyon sisteminin anahtar faktörlerinden biridir. Aktif formu olan F VIIIa koagölasyon kaskadında protrombinaz ve tenaz komplekslerinin kofaktörü olarak görev yapmaktadır (13,15).

Yaralanmayı takiben açığa çıkan doku faktörü, faktör VII (F VII)'yi aktive ederek koagölasyon kaskadını başlatmaktadır. Doku faktörü-FVIIa kompleksi FX ve IX'u aktive etmektedir. F Xa; F Xa-Va (protrombinaz kompleksi) oluşturarak az miktarda protrombinin trombine dönüşümünü sağlamaktadır. Koagölasyonun buraya kadar ki süreci başlangıç fazı olarak adlandırılmaktadır. Trombinin bu başlangıç miktarı trombositleri uyararak daha fazla F VIII, F V, F XI, F IX salınımına yol açmaktadır. Koagölasyonun bu fazı amplifikasyon (güçlendirme) fazı olarak bilinmektedir. Son faz olan propagasyon (çoğalma) fazında F Xa ile F VIIIa tenaz kompleksi oluşturarak büyük miktarda protrombinaz kompleksinin aktivasyonu ile çok miktarda trombin generasyonuna (trombin patlaması) yol açmakta ve pıhtı oluşturmak üzere fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlamaktadırlar. Hemofili A'da F VIII eksikliğinden dolayı tenase kompleksi yeterince oluşamadığı için trombin patlaması olmamakta ve sonuçta pıhtı oluşumu tamamlanamadığı için geç kanamalar olmaktadır (16,32,33).

2.3 YARA İYİLEŞMESİ

2.3.1 Normal yara iyileşmesi

Yara iyileşmesi yara yerine trombositlerin gelip subendotele yapışması ile başlamaktadır.

Normal yara iyileşmesi iç içe geçmiş 4 fazdan oluşmaktadır:

- 1) Hemostaz fazı
- 2) İnflamasyon fazı
- 3) Proliferasyon fazı
- 4) Remodeling/ rezolusyon fazı

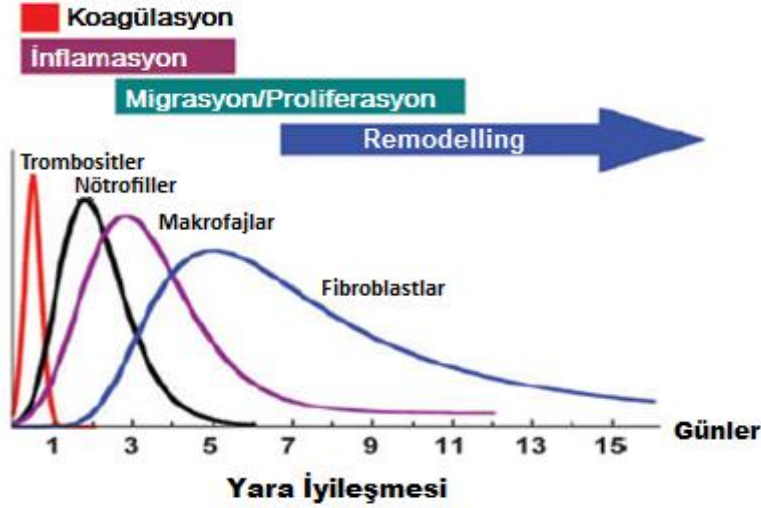
Hemostaz fazı: Yara oluştuğunda etrafındaki damarlar hasarlanmaktadır. Trombositler ekstrasellüler matrikse yapışarak degranüle olmakta ve koagülasyon kaskadını başlatacak büyüme faktörleri salmakta, sonuçta trombin ve fibrin sistemleri aktive olmaktadır. Trombin bir yandan fibrinojeni fibrine dönüştürerek pıhtılaşmayı sağlarken, bir yandan faktör XIII (F XIII) ve trombinle aktive olabilen fibrinoliz inhibitörü (TAFI) aktive ederek pıhtı stabilizasyonunu arttırmakta, bir yandan da salgıladığı büyüme faktörü benzeri sitokinlerin yol açtığı kemotaksis sonucunda monosit, makrofaj, keratonsit, fibroblast ve endotel hücrelerinin proliferasyonuna yol açmaktadır (10,32,34).

İnflamasyon fazı: Yaralanmadan sonraki dakikalar içinde nötrofillerin akını başlamaktadır. Nötrofillerin bakteriyel invazyona karşı defansta rol oynadığı, nötrofil eksikliğinde yara iyileşmesinde bir defekt olmadığı bilinmektedir (10,34). Yaralanmanın birinci günündeki nötrofil akınını monosit akını izlemektedir. Monositler dokuya geçtikten sonra hızla makrofajlara dönüşmekte ve ölene kadar ya da lokal lenf noduna gidene kadar, 30-

90 gün süreyle dokuda kalmaktadırlar (35). Makrofajlar aktive olduklarında sitokinler, kompleman komponentleri, reaktif oksijen ürünleri, proteazlar, inhibitörler ve büyüme faktörlerini salmaktadırlar (36). Yaralanmanın 2. gününde yara yerinde baskın düzeyde bulunan hücre makrofajlardır. Bu hücreler endotel hücreleri, lenfositler ve fibroblastlara etki etmekte, böylece sitokin üretimine yol açarak iyileşmeyi ve immün cevabı koordine etmektedirler (35,37,38). Yara yerine hücrelerin akını ve kalma süreleri Şekil 3'de gösterilmektedir (10).

Proliferasyon fazı: Epitelial hücreler ve fibroblastlar prolifer olmakta, anjigenezis başlamakta, yara yerinde granülasyon dokusu oluşmaktadır. Bu doku çok sayıda yeni damar ve az sayıda stabilize bağ dokusu içerdiğinden çabuk kanamaktadır. Granülasyon dokusunun oluşumu sırasında bitişik damarlardan kapillerler yara pıhtısına doğru filiz sürmekte, aynı zamanda, granülasyon dokusu içinde fibroblastlar prolifer olmakta, altta kollojen ve diğer bağ doku komponentleri uzanmaya başlamaktadır (10,34).

Remodeling/ rezolusyon fazı: Bu faz haftalarca, aylarca sürebilmektedir. İnflamatuvar infiltrat çözülmeye başlamakta, filizlenen çoğu damar regrese olmakta, kollojen yeniden yapılanmaktadır. Bu faz sonunda yara bölgesi ya normale dönmekte ya da asellüler bağ dokusu ile doldurularak skar dokusu oluşmaktadır (10,34).



Şekil 3: Normal yara iyileşmesinin fazları

2.3.2 Hemofili hastalarındaki yetersiz yara iyileşmesi

Stabil bir fibrin çatı varlığının doku yapısının normal onarımı için gerekli olduğu bilinmektedir (10,34). İntakt bir trombin generasyon sisteminin yara kapanmasında sürekliliği sağladığı ancak fibrin pıhtı yapısının doku onarımında direkt rol oynadığı hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (39). Farelerle yapılan deneysel çalışmalarda hemofilik farelerde yara bölgesine makrofaj akınının gecikmesinin nedeninin yeterli trombin generasyonunun olmamasından kaynaklandığı gösterilmiştir (9,40). Hemofilik fareler ile sağlıklı farelerin yara yerleri incelendiğinde angiogenesis hızı açısından benzer olduğu ancak hemofilik farelerde yeni oluşan damar sayısının daha fazla olduğu bulunmuştur (10). Hemofilik farelerde kutanöz yara iyileşmesinde gecikme ile ilgili histolojik anormallikler şunlardır:

- 1) Yara yerinin yanında subkutanöz hematoma formasyonu,
- 2) Gecikmiş makrofaj akını,
- 3) Gecikmiş reepitelizasyon,
- 4) Yara yerinde angiogenezde artma (9).

2.3.3 Yara iyileşmesinde anjiogenezis

Anjiogenezis; vasküler endotel hücrelerinin migrasyonu, proliferasyonu ve diferansiasyonu sonucu tubul oluşumunu içermektedir. Embriyogenezis, yara iyileşmesi ve kadın üreme siklusunda fizyolojik bir süreç olan anjiogenezis ateroskleroz, iskemik hastalıklar, artrit ve kanserde tümör büyümesi gibi pek çok hastalığın patogenezinde de rol oynamaktadır (35,41,42). Anjiogenezisde; endotel hücrelerinin apoptozu, bazal membranın sekresyonu, aksesuar hücrelerin yeniden oluşumu ve ekstrasellüler matriksin birikimi ile damar maturasyonu tamamlanmaktadır. Bunların hepsi birlikte yeni oluşan damarların morfolojik ve fenotipik stabilizasyonunu sağlamaktadır. Anjiogenezisin primer fonksiyonu doku iskemi ve hipoksisini düzeltmek için kan akımını sağlamaktır. Anjiogenezisin başlangıç aşamasında; matür damarlarda vazodilatasyon ve plazma proteinlerinin permeabilitesinde artış oluşmakta, destek hücrelerinin ayrılması ve komşu ekstrasvasküler matriksin kaybı ile yeni damar filizlenmesi için zemin hazırlanmaktadır (34,43). Endotelial filizler gelişen granülasyon dokusuna doğru göç etmekte ve fonksiyonel kapiller uçlara doğru lümenler oluşmaktadır. Yara yerinde mevcut damarların stabil olmaması, oluşan yeni damarların narin olması ve granülasyon dokusu içindeki proteolitik enzimlerin aktivitesinden dolayı anjiogenezis sırasında kanama eğilimi artmaktadır (44). Hayvan deneylerinde anjiogenezisin tekrarlayan kanamalar için predispozan faktör olduğu gösterilmiştir (10).

Yara yerindeki hücrelerin hipoksiye maruz kalması anjiogenezisin başlaması için temeldir. Dokularda vasküler perfüzyonun azalması ile hem lokal hipoksi hem de glikoz azalması olduğu, bundan dolayı hücrelerin anaerobik metabolik yola geçtiği, böylece laktat yapımının arttığı ve ekstrasellüler PH'nın azaldığı, oluşan bu yeni ortamın makrofajlardan proanjiogenik sitokin/enzim salınımına yol açtığı gösterilmiştir (35,45,46). Makrofajlardan salınan bu moleküllerden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), tümör nekrotizan

faktör alfa (TNF- α), interlökin 8 (IL-8) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'ün proanjiojenik özellikte olup yara iyileşmesi ve malign tümörlerde anjiogeneziste rol oynadıkları bilinmektedir (35,47,48).

2.3.4 Anjiogenik sitokinler arasındaki ilişki

İmmün ve hematolojik hastalıkların patogeneğinde hücre adezyon moleküllerinin önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Yara oluştuğunda kan akımı ile gelen monositlerin yüzeylerindeki lenfosit fonksiyon ilişkili antijen-1 (LFA-1) ve endotelial hücre yüzeyindeki intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) sitokinleri aracılığıyla monositler dolaşımdan dokuya geçmektedirler (35). Ayrıca ICAM-1'in inflamatuvar yolda da önemli rol oynadığı , osteoartrit ve romatoid artritın erken evrelerinde de serum ICAM-1 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (49-51).

Makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) inflamatuvar ve immün cevabın düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir sitokindir. Vücut stres altındayken salgılanan otokrin ve parakrin sekresyonlarla dolaşıma karışmaktadır (52). İnflamatuvar cevaba yol açan TNF- α , interferon gama (IFN- γ), interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin 2 (IL-2), interlökin 6 (IL-6), IL-8, makrofaj inflamatuvar protein-2, nitrik oksit ve COX-2'nin salınımını uyarmaktadır (53-55). Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanamalı ateş, septik şok, romatoid artrit, otoimmün hastalıklar, ateroskleroz gibi pek çok hastalıkta MIF'in rol oynadığı gösterilmiştir (53,54,56). MIF'in hem ICAM-1 hem de trombomodulin salınımını arttırdığı çok yeni olarak gösterilmiştir(54).

Trombomodulin (TM) endotelial hücre yüzeyinde yer alan ve trombin reseptörü olarak görev yapan bir hücre membran glikoproteinidir. İnsanlarda monosit ve diğer hücrelerde de tespit edilmesine rağmen esas olarak vasküler endotelial hücrelerde bulunmaktadır (57). Endotel hasarı olduğunda, trombin ile kompleks oluşturarak hemostaz kaskadına girmekte ve protein C'nin proteolitik aktivasyonunu katalize etmektedir. Beş domainden oluşan TM molekülünün D2 domaini trombin ile etkileşmekte ve TM'nin antikoagulan aktivitesini oluşturmaktadır (58). Ekstrasellüler TM domainlerinden kaynaklanan solubl TM formları plazma ve idrarda saptanmış ve bunların endotel hücre hasarının bir göstergesi olduğu anlaşılmıştır (59). TM'in in vitro olarak fosfatidil inositol 3 kinaz-act yolunun aktivasyonu ile erken endotelial prokürsör hücrelerin anjiogenik potansiyelini arttırdığı çok yeni olarak gösterilmiştir (60).

Anjiogenezis sürecinde proanjiogenik ajanlar ile antianjiogenik ajanlar arasında bir denge vardır. Anjiostatin, trombospondin, endostatin (ES) ve fibrinojen E fragmanı başlıca antianjiogenik ajanlardır (35,61). Antiangiogenik bir ajan olan ES, kollojen XVIII'ün bir fragmanıdır. Ekstrasellüler matriksin değişimi ile ES'in salınımı artmaktadır (61). Anjiogenezisi inhibe ederek tümör büyümesini ve metastaz gelişimini önlediği bilinmektedir. ES'in hücre yüzeyindeki heparin sulfat bağlayıcı proteine tutunmak için bFGF ile yarışmaya girerek mitojenik büyüme faktörü sinyal ileti yolunu bloke ederek endotelial hücre migrasyon ve proliferasyonunu azalttığı düşünülmektedir (62). Tümör dokularında neoangiogenezisin arttığı ve aynı zamanda endostatin salınımının da arttığı gösterilmiştir (61-63).

Hipoksinin etkisi ile salınan proanjiogenik moleküllerden biri olan VEGF anjiogenezis için temel sinyal molekülüdür (11,47,64). Romatoid artrit ve osteoartrit gibi diğer eklem hastalıklarında ve tümörlerde serum VEGF düzeyi ile hastalık aktivitesi arasındaki ilişki

gösterilmiştir (11,65). VEGF ilk başlarda endotelial hücreye spesifik potent bir mitojenik ajan olarak tanımlanmıştır (66). Oysa bugün VEGF hem vaskülogenezis hem de anjiogenezis sürecinde yeni damar oluşumunda temel molekül olarak kabul edilmektedir (67,68). Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR 1 ve VEGFR 2) ile etkisini göstermektedir (69). Hipoksi ve asidozda VEGF salınımının artarak endotelial hücrelerin apoptoza gitmelerini önlediği gösterilmiştir (70).

2.4 HEMOFİLİK ARTROPATİ

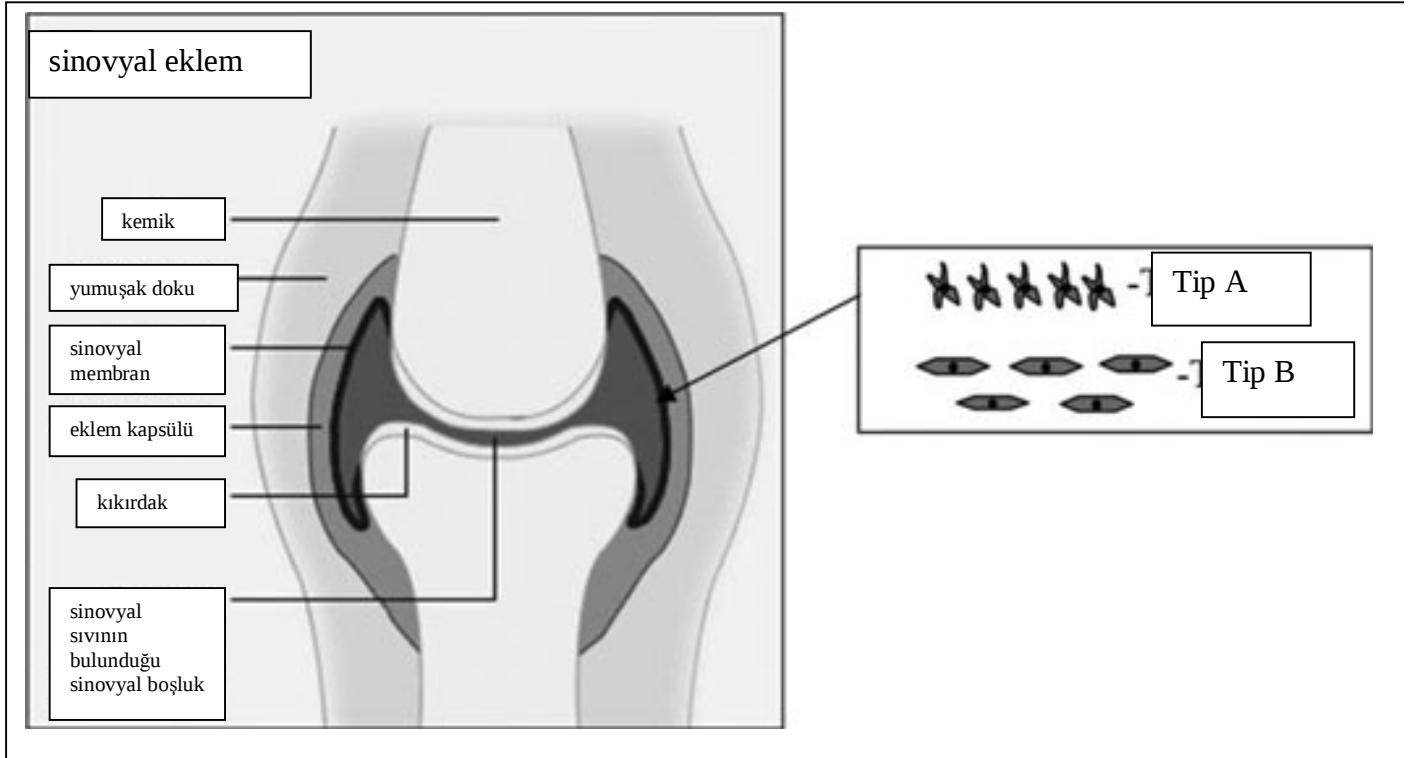
2.4.1 Eklem yapısı

İki kemik, aralarındaki eklem kapsülü, bağlar ve sinovya eklem yapısını oluşturan komponentlerdir. Sinovyal bir eklem normal yapısı Şekil 4’de gösterilmektedir (30). Eklem boşluğunu örten ve sinovyal sıvıyı içeren eklem kapsülü biri dış diğeri içte olmak üzere başlıca 2 tabakadan oluşur:

- Fibröz tabaka: Yoğun bağ dokusundan yapılmıştır. Eklem çevresindeki bağlar ve kemik içersine giren bazı tendonlar bu tabaka ile sarılmış durumdadır.
- Sinovyal membran: Hücreleri mezenkimden kaynaklanır. Sinovya, kıkırdak hariç olmak üzere tüm eklem yüzeyini kaplayan, damardan zengin bir dokudur. Sinovyal hücreler 2 tiptir. A hücreleri fagositik özellikte olup makrofajlara benzer, B hücreleri ise fibroblastlara benzemektedir. Eklem kıkırdağını kayganlaştırmak, kıkırdağın beslenmesini sağlamak ve yıkım ürünlerinin temizlenmesini sağlamak sinovyanın görevleridir (71).

Eklem kıkırdağı ekstrasellüler bir matriks içine gömülmüş olan kondrositlerden oluşmaktadır. Bu kondrositler kıkırdak metabolizması için gerekli olan kollojen,

proteoglikanlar ve enzimleri üretmektedirler. Ekstrasellüler matriksin yapısı kollojen lifleri ve matriks proteinlerinin oluşturduğu bir ağ şeklindedir. Proteoglikanların üretimi ile ekstrasellüler matriksde bu proteoglikanların çözülmesi arasındaki denge kıkırdak sağlığının temelini oluşturmaktadır (71).



Şekil 4: Normal sinovyal eklemin yapısı

2.4.2 Hemofilik artropati patogenezi ve klinik bulguları

F VIII eksikliğinin en önemli morbitidesi tekrarlayan eklem içi kanamalar sonucu oluşan eklemlerdeki ilerleyici hasarlanmaya bağlı lokomotor sistemdeki sakatlıklardır. Akut eklem kanaması olduğunda kısa süre içinde ağrı, şişlik, ısı artışı ve kas spazmı olur. Bunlar kanamanın kısa dönemdeki etkileridir. Uzun dönemdeki etkileri ise daha önemlidir. Tekrarlayan kanamalar sonucunda sinovya ve kıkırdakta spesifik değişiklikler gelişir. Hemofilik

sinovit sinovyanın proliferatif bir bozukluğudur, çok miktarda damarsal yapı içeren bir sinovyal membran, infiltrasyon ve proliferen olmuş sinovyal fibroblastlarla karakterizedir (72). Bu sürecin sonunda hemofilik artropati olarak adlandırılan kalıcı eklem hasarı ortaya çıkar ve deformiteler oluşmaktadır (26). İleri evre hemofilik artropatide sinovyal doku villöz özellikteki yapısını kaybetmekte ve yaygın fibrozis gelişmektedir. Bu evrede, sinovyal katlantılar kaybolmaya başladığından sinovyal doku eklem hareketleriyle uyumlu olarak genişleyemediğinden eklemde hareket kısıtlılığı başlamaktadır (1,72). Hemofilililerde eklem kanamaları klinik olarak 3 grupta değerlendirilmektedir:

-Akut hemartroz: Travma ile gelişebileceği gibi ağır hemofililerde spontan da olabilmektedir. Kanın eklem aralığına geçişinden sonraki saatler içinde eklem kapsülü gerilmesini takiben polinomorf nüveli lökositler ve ardından monositlerin gelmesi ile başlamaktadır. Eklem kapsülünün mekanik olarak gerilmesi ve eklem aralığında basınç artışı kondrositlerin apoptozuna ve proteoglikan sentezinin inhibisyonuna yol açmaktadır. Eklem içindeki kandan açığa çıkan demir sinovyal hücreler ve makrofajlar tarafından uzaklaştırılmaktadır. Kanamanın başlangıcı en iyi hastanın kendi tarafından hissedilmekte ve eklem içinde bir ürperti olarak ifade edilmektedir. Bunu eklemde ağrı, kızarıklık ve şişlik izlemektedir. Eklem istirahat pozisyonunda tutulmakta (çoğunlukla fleksiyonda) ve hareketleri kısıtlanmaktadır. Sinovyal membranın akut kanamaya ait kan yıkım ürünlerini tam olarak absorbe etmesi yaklaşık iki hafta sürmektedir. Tedavi almaktayken ve tedavi kesildikten sonraki 72 saat içinde klinik gidişte kötüleşme olması tekrarlayan kanamayı göstermektedir. İki veya üçten fazla akut kanama epizodu varlığında sinovyal membranın absorpsiyon kapasitesi aşılmış olmaktadır. Aynı eklemde altı ay içinde en az üç kez kanama olduğunda artık o eklem hedef eklem olarak tanımlanmaktadır.

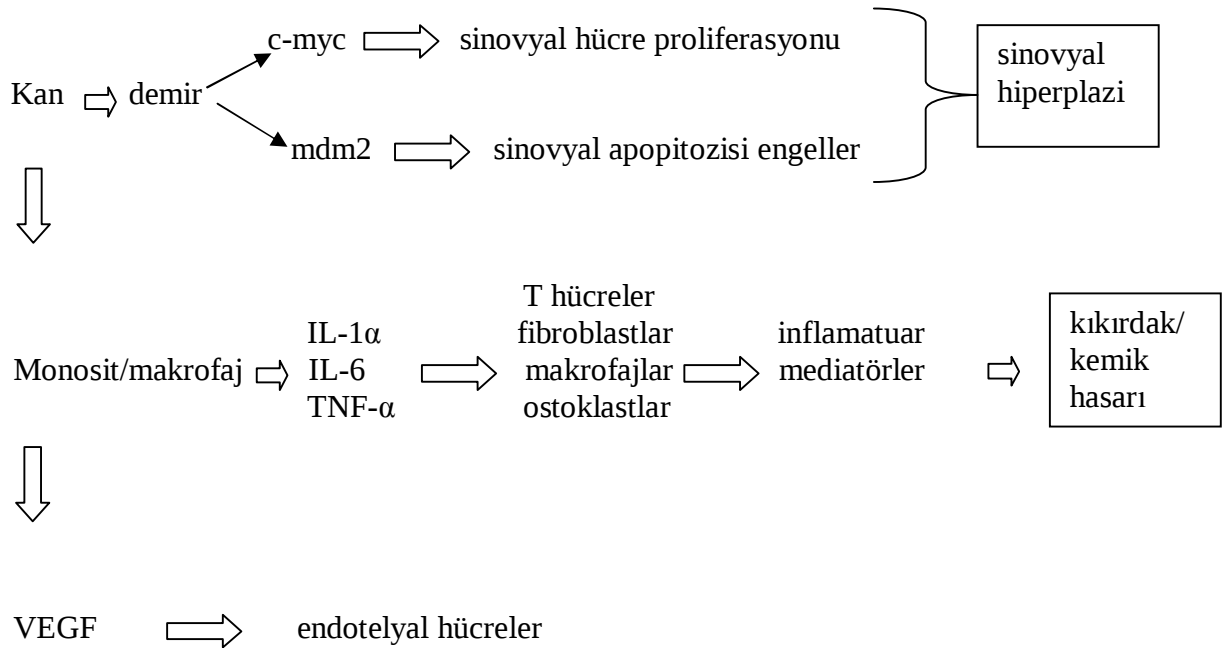
-Subakut hemartroz: Kanama olsun veya olmasın, hipertrofik sinovya olduğu zamandan sonraki tablo subakut artropati olarak tanımlanmaktadır. Eklem hareket aralığında 10-30 derece kadar bir kayıp vardır. Bu evrede sinovyal sıvıya aspirasyon yapıldığında %10-20 hematokrit düzeyinde bir kanama bulunmaktadır. Bu durum fragil olan hipertrofik sinovyumdan sızma şeklinde kanama olması ile açıklanmaktadır.

-Kronik artropati: Tekrarlayan kanamalar sonucu eklemde gelişen artritik değişikliklere bağlı ağrı olmaktadır. Bu evrede ağrı ve eklem deformiteleri ön plana çıkmaktadır. İleri evre hemofilik artropatide eklem kıkırdığı osteoartritteki gibidir. Zamanla eklem ankiloze hale gelir, valgus deformiteleri olur, eklem etrafındaki kaslarda atrofi gelişir (1,14,72-75).

Hemofilik artropati genellikle 15-25 yaş arasında başlamaktadır ve bu hastaların beklenen yaşam süreleri normal bireylerle aynıdır. Dolayısıyla, fizik performanstaki bu azalma sağlıklı bireylerle kıyaslandığında günlük aktiviteleri olumsuz etkilemektedir. Bindokuzyüzaltmışlarda başlayan evde faktör infüzyonu ve koruyucu faktör tedavisi uygulamaları ortopedik sorunlarda dramatik iyileşme yaratmışsa da hastaların okul hayatında, akademik gelişmelerinde, iş hayatlarında hala olumsuzluklar mevcuttur (13,26).

Hemofilik artropati patogenezi henüz tam olarak bilinmemektedir (11). Hemofilik artropatide eklem içinde tekrarlayan kanamalar sinovya ve kıkırdak değişikliği için predispozan faktördür (76). Kan normalde eklem aralığında bulunmamaktadır. Eklem içine kanama olduğunda eritrositlerden açığa çıkan demiri sinovyal makrofajlar ve kondrositler absorbe etmektedirler. Eğer kanama atakları sıklaşırsa sinovya yenilenmekte yetersiz kalmakta ve demir birikmektedir. Eklem içinde biriken demir c-myc ve mdm2 genlerini etkileyerek sinovyal hipertrofiye yol açmaktadır (76-78). Demir birikimi nedeniyle lizozomal

enzimler ve proteoglikanlar salınarak sinoviosit ve kondrositlerin parçalanmasına ve sinovite yol açmaktadır. Sinovyal hipertrofi gelişmekte ve vaskülarizasyonda artma olmakta böylece sinovya kanamaya daha da duyarlı hale gelmektedir. Hemofilik eklem sıvısında ve sinovyasında bulunan asit fosfataz, katepsin D gibi hidrolitik enzimlerin etkisi ile sadece sinovyada değil eklem ve kemik dokuda da harabiyet gelişmektedir (3,74,76,79-82). Eklem aralığında azalma, subkondral kemik düzensizliği, erozyonlar ve subkondral kist gelişimi ile seyreden bu sürecin sonunda kemik ve eklem harabiyeti ile eklemde kalıcı fleksiyon kontraktürü ve kas atrofisi oluşmaktadır (26,72-74,79,83). Eklem içine kanamalar ile bir yandan demir birikimi bir yandan anjiogenezis sonucu oluşan eklem hasarının şematizasyonu Şekil 5’de görülmektedir (82).



Şekil 5: Eklem içine kanama ile oluşan eklem hasarı

Hemofilik artropatinin klinik izleminde standartizasyonu sağlamak için ilk olarak Dünya Hemofili Federasyonu 1985’de fiziksel muayene skalası oluşturmuştur. Diz, dirsek ve el bileğinde eklem şişliği, krepitasyonu, deformitesi ve hareketliliğini değerlendiren bu skala

daha sonra Uluslararası Profilaksi Çalışma Grubu (IPSG) tarafından geliştirilerek hemofilik eklem sağlık skoru (HJHS) oluşturulmuştur (84). Klinik izlemde halen en yaygın olarak kullanılan HJHS'dir.

2.4.3 Hemofilik artropati radyolojik bulguları ve evrelemesi

Hemofilik artropatinin değerlendirilmesinde ve evrelendirilmesinde uzun yıllardır radyolojik skorlama sistemleri kullanılmaktadır (75,85,86). Bu amaçla en yaygın kullanılan sistemler 1977'de geliştirilen Arnold-Hilgartner skalası ve 1980'de geliştirilen Petterson skorudur (1,21,85). Her iki sistemde de konvansiyonel radyografi temel alınmıştır. Tablo 6'da Petterson skorlaması, Tablo 7'de Arnold-Hilgartner sınıflaması gösterilmektedir. Arnold-Hilgartner skalası bulguların ilerlemesine göre evreleme yaparken Petterson skoru bulguların eklenmesine göre evreleme yapmaktadır. En yüksek skoru tek bir eklem için 13 olup bu değer tam eklem harabiyetini gösterir, bir hasta için altı eklem değerlendirildiğinde maksimum skor 78'dir (21,75,86,87). Günümüzde konvansiyonel radyografi ile yapılan hemofilik artropati değerlendirmelerinde daha çok Petterson skoru kullanılmaktadır (87).

Tablo 6: Petterson radyolojik skoru

Radyolojik değişiklikler	Grafide olup olmadığı	puanlama
Osteoporoz	Yok	0
	Var	1
Epifiz büyümesi	Yok	0
	Var	1
Subkondral yüzey düzensizliği	Yok	0
	Kısmi var	1
	tamamen	2
Eklem aralığı daralması	Yok	0
	Eklem aralığı > 1mm	1
	Eklem aralığı ≤ 1 mm	2
Subkondral kist oluşumu	Yok	0
	1 kist	1
	>1 kist	2
Eklem köşelerinde erozyonlar	Yok	0
	Var	1
Ekleme katılan kemik yüzeylerde önemli uyumsuzluk	Yok	0
	Hafif	1
	Belirgin	2
Eklem deformitesi	Yok	0
	Hafif	1
	Belirgin	2

Tablo 7: Hemofilik artropatide Arnold-Hilgartner sınıflaması

Evre 0	Normal eklem
Evre 1	Yumuşak doku şişliği mevcuttur
Evre 2	Osteopeni ve epifizyal aşırı büyüme vardır, eklem aralığında daralma yok
Evre 3	Eklem aralığında belirgin daralma yok, subkondral kist vardır, hareket açıklığı:120 ⁰
Evre 4	Kıkırdak tahribatı ve eklem aralığında daralma, hareket açıklığı:90 ⁰
Evre 5	Eklem tahribatı ve kemik değişiklikleri, hareket açıklığı:45 ⁰

Hemofilik eklem hasarının değerlendirilmesinde ultrasonografi kullanımı daha yenidir (88). Hemofilik artropatide eklem içi efüzyonu ve hemartrozunu, yumuşak doku değişikliklerini ve sinovyal kalınlaşmayı göstermesine rağmen eklem ve kemiğe ilişkin detaylı bir değerlendirme yapamaması ve tek bir eklem incelenmesi için geçen sürenin diğer radyografik tetkiklere göre daha uzun süre gerektirmesinden dolayı ultrasonografinin klinikte kullanımı kısıtlı kalmaktadır (1,89,90).

Konvansiyonel grafilerde osteoporoz, osteonekroz, kemik kistleri, eklem aralığında daralma, eklem yüzeyinde düzensizlikler ve kemik harabiyeti görülmesine karşın eklem hasarının erken değişiklikleri saptanamamaktadır. Oysa, günümüzde tedavi yaklaşımındaki ilerlemelerin minimal eklem değişikliklerinin saptanmasına ihtiyaç duyması ve manyetik rezonans (MR) ile görüntülemeye konvansiyonel radyografiye kıyasla yumuşak dokuya dair daha detaylı bilgi alınması, minimal efüzyon/ hemartrozun saptanabilmesi, sinovyal hipertrofi ve kartilaj harabiyeti ve subkondral kemik değişikliklerinin daha erken dönemde

görüntülenebilmesinden dolayı son yıllarda hemofilik artropati için MR skarlama sistemleri geliştirilmeye başlanmıştır (5-8,91). T2* gradient-echo (GRE) tekniği ile akut dönemdeki deoksihemoglobin ve kronik dönemdeki hemosiderin görüntülenebilmektedir (92). Bildirilen ilk MR görüntüleme sklası Nuss ve ark. tarafından geliştirilen Denver sklasıdır (85). Bu skala Arnold-Hilgartner sklasına benzer şekilde progressiftir. Tablo 8’de Denver MR görüntüleme sklası verilmektedir. En kötü puan 10 olup %50’den fazla kırıldak kaybı olduğunu göstermektedir (5). Lundin ve ark. tarafından European skoru olarak adlandırılan ve Petterson skorlamasına benzer şekilde bulguların eklenmesine göre evreleme yapan bir başka skarlama sistemi daha geliştirilmiştir (85,93,94). Denver skorlaması daha yaygın olarak kullanılmasına rağmen her iki skarlama sistemi de aynı oranda güvenilir ve kullanışlı bulunmuştur. MR görüntüleme ile yapılan skorlamalarda henüz daha standartizasyon sağlanmamıştır (21).

Tablo 8: Hemofilik artropatide Denver MR görüntüleme skalası

Skor	Bulgu
0	Normal eklem
Efüzyon/ hemartroz	
1	Az
2	Orta
3	Çok
Sinovyal hiperplazi/ hemosiderin	
4	Az
5	Orta
6	Çok
Kistler / erozyonlar	
7	1 kist ya da kısmi erozyon
8	>1kist ya da tüm yüzeyde erozyon
Kartilaj kaybı	
9	< %50 kartilaj kaybı
10	≥ %50 kartilaj kaybı

2.4.4 Hemofilik artropati tedavisi

Hemofilik artropati hastalardaki en önemli morbitide nedeni olup, eklem içi kanamaların önlenmesi hemofili tedavisinin primer amacını oluşturmaktadır. Akut hemartroz geliştiğinde tedavinin temel amacı mümkün olan en kısa sürede kanamayı durdurmaktır (14). Eklem içine kanama olduğunda hemen F VIII konsantresi verilmesi ile ağrı hızlı bir şekilde azalmasına rağmen inflamasyonun düzelmesi eklem içinde var olan kanın miktarına bağlı olarak daha uzun bir süre almaktadır (21,71). Soğuk uygulama, analjezik kullanımı ve kısa süreli eklem istirahati uygulanması faktör replasmanına destek tedavilerdir (13,21,88). Akut hemartrozda tedaviye yanıt kriterleri Tablo 9’da verilmektedir (14).

Tablo 9: Akut hemartrozda tedaviye yanıt kriterleri

Mükemmel yanıt	İlk enjeksiyondan sonra 8 saat içinde ağrının kaybolması ve/veya kanama bulgularının tamamen düzelmesi ve 72 saat içinde başka replasmana ihtiyaç duyulmaması
İyi yanıt	İlk enjeksiyondan sonra 8 saat içinde ağrının belirgin azalması ve/veya kanama bulgularının belirgin düzelmesi ancak tam düzelme için 72 saat içinde en az 1 doz daha enjeksiyona ihtiyaç duyması
Orta yanıt	İlk enjeksiyondan sonra 8 saat içinde ağrının azalması ve/veya kanama bulgularının düzelmesi, 72 saat içinde yapılan en az 1 enjeksiyona rağmen tam düzelme olmaması
Yanıtsız	İlk enjeksiyondan sonra 8 saat içinde minimal yanıt olması veya hiç yanıt olmaması veya durumun daha da kötüleşmesi

Yeni bir kanama epizodu önceki hemartroz tamamen çözülmeden başladığında subakut/kronik sinovit gelişmektedir. Hemofilik artropati oluştuğunda faktör profilaksisi eklem hasarını durduramayabileceğinden sinevektomi yapmak gerekebilmektedir. Ard-arda yineleyen kanama ataklarının döngüsünü kırmada fizyoterapi yardımcı olmaktadır.

Fizyoterapi ile ağrının azaltılması, hareket açıklığının korunması, kasların güçlendirilmesi ve sonuçta deformite/kontraktürün önlenmesi amaçlanmaktadır (13,21,88).

3.HASTALAR VE YÖNTEM

3.1 ETİK KURUL KARARI VE AİLE ONAMI

Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 01.12.2012 tarih ve 2012/03-24 sayılı etik kurul onayı alındı.

Olguların çalışmaya dahil edilmesinden önce bilgilendirilmiş gönüllü onam formu doldurularak ailesinden onam alındı.

3.2 HASTA GRUBU SEÇİMİ VE KONTROL GRUBU

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı, İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Hematolojisi Kliniği, İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Kliniği ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı tarafından tanı konan ve/veya izlenen, inhibitörü negatif olan, akut eklem içine kanama ile gelen ve eklem hasarı olan 10 ağır hemofili A hastası, akut eklem kanaması olmayan (mevcut eklem hasarı olan veya olmayan) 25 ağır hemofili A hastası ve kontrol grubu olarak da 22 sağlıklı erkek çocuk alındı. Akut eklem kanaması geçiren hastalar eklem hasarının ağırlığına göre erken eklem hasarı olanlar ve ileri eklem hasarı olanlar olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Akut eklem kanaması olmayan hastalar da mevcut eklem bulgularına göre erken eklem hasarı olanlar, ileri eklem hasarı olanlar ve eklem hasarı olmayanlar olmak üzere 3 gruba ayrıldı ve çalışma 6 grupta yapıldı:

- 1) İleri eklem hasarı olup akut eklem içi kanama ile gelen ağır hemofili A hastaları
- 2) Erken eklem hasarı olup akut eklem içi kanama ile gelen ağır hemofili A hastaları
- 3) İleri eklem hasarı olup akut eklem içi kanaması olmayan ağır hemofili A hastaları
- 4) Erken eklem hasarı olup akut eklem içi kanaması olmayan ağır hemofili A hastaları
- 5) Eklem hasarı gelişmemiş olan ağır hemofili A hastaları
- 6) Sağlıklı kontrol grubu

Hemofili hastalarında rutin tetkik için tam kan sayımı, F VIII düzeyi, inhibitör tayini, c-reaktif protein (CRP) düzeyi, serum ferritin düzeyi bakılmaktadır. Araştırmamızda ağır hemofili A hastalarında akut eklem kanaması gelişmesiyle başlayan inflamasyon ve neovaskülarizasyonun erken birer göstergesi olarak serumda laktik asit, VEGF, ICAM 1, TM, MIF ve ES artışının olup olmadığı bu çalışmada araştırıldı. Hastalardan bu çalışma için planlanan tetkikler periferik kandan çalışıldı. Eklem kanaması ile gelen hastalarda bu tetkikler kanamadan 1 ay sonra tekrar çalışıldı. Bu tetkikler de rutin alınacak tetkiklerle birlikte alındığından ek kan alınmasına gerek kalmadı.

Hemofili hastalarının eklem bulguları klinik olarak HJHS, radyolojik olarak Petterson radyolojik skorlaması ve Denver MR görüntüleme skorlaması ile değerlendirildi. Eklem hasarı olmayan, erken eklem hasarı olan ve ileri eklem hasarı olan hastalar bakılması planlanan plazma anjiogenik ve inflamatuvar faktör düzeyleri açısından incelendi.

Kontrol grubu, son bir ay içinde herhangi bir enfeksiyon öyküsü, kronik hastalığı ve buna bağlı sürekli ilaç kullanım hikayesi olmayan, fizik muayene bulguları normal olan, 1-18 yaş arası, yaş ve cinsiyet bakımından hasta grubu ile eşleşen basit cerrahi girişim (tonsillektomi, skolyoz, herni vb.) nedeniyle hastaneye başvurmuş ve cerrahi operasyon

öncesi rutin tetkikleri alınacak hastalardan seçildi. Kontrol grubunda tam kan sayımı, F VIII düzeyi, CRP düzeyi, serum ferritin, laktik asit, VEGF, ICAM 1, TM, MIF ve ES düzeyleri periferik kandan çalışıldı.

3.3 LABORATUVAR TESTLERİ

Tam kan sayımı empedans yöntemi ile K2 edta'lı tam kandan çalışıldı. Lökosit sayısı, monosit sayısı, trombosit sayısı ve hemoglobin düzeyleri yaşa göre normal değerler referans alınarak değerlendirildi (95).

Serum C-reaktif protein (CRP) ölçümü immünoturbidimetrik yöntemle serumdan çalışıldı (normal değerler: 0.1-8.2 mg/L).

Serum ferritin düzey ölçümü komilüminesan mikropartikül immün ölçüm yöntemi ile çalışıldı ve düzeyleri yaşa göre normal değerler referans alınarak değerlendirildi (96).

Serum laktik asit ölçümü enzimatik, fotometrik yöntemle sodyum florürlü tüplere alınan plazmadan çalışıldı (normal değerler: 0.5-2.2 mmol/L).

3.4 ELİSA TESTLERİ

MIF düzeyinin saptanması:

Kan örnekleri 1000 x g de 15 dk santrifüj edildikten sonra serumu ayrılarak çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı. MIF düzeyleri Cusabio sandviç ELİSA kiti (Katolog no:CSB-E08330h) kullanılarak saptandı.Bu amaçla anti-insan MIF antikorları ile kaplı 96 yuvalı

kaplar kullanıldı. ELISA kitinde bulunan reaktifler, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve örnekler çalışmaya başlamadan önce oda ısısına getirildi.

Standart ve örneklerin hazırlanması: Kitte hazır liyofilize halde bulunan 8000 pg/ml konsantrasyonundaki standart vial 8000 rpm de 30 sn santifüj edildikten sonra örnek dilüenti ile çözüldü. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar şeklinde 4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml ve 0 pg/ml konsantrasyonuna ayarlandı.

-80 °C de serumlar çözüldükten sonra ELİSA çalışmasına uygun hale getirildi.

Standartların ve örneklerin ELİSA kuyucuklarına konulması: 100 µl serum örnekleri, 100 µl standartlar MIF antikoruna ile kaplı 96 kuyucuklu ELİSA plağına eklendi. 37 °C de 120dk inkübe edildi. Daha sonra kuyucukların içeriği aspire edildi.

Biyotin konjuge anti-insan MIF antikor eklenmesi: Her bir kuyucuğa 100 µl Biyotin konjuge anti-insan MIF antikoruna ilave edildi. 37 °C de 60dk inkübe edildi.

Yıkama: İnkübasyon sonrası ELİSA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

HRP-Avidin kompleksinin eklenmesi: Her bir kuyucuğa 100 µl HRP-Avidin kompleksi ilave edildi. 37 °C de 60dk inkübasyona bırakıldı.

Yıkama: İnkübasyon sonrası ELİSA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

Substrat eklenmesi: Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 90 µl TMB(Tetramethylbenzidine) substrat ilave edilerek 37°C 15-30 dk karanlıkta inkübe edildi.

Reaksiyonun durdurulması: Tüm kuyucuklara 50 µl asit içeren stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

MIF düzeyinin ölçümü: 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japon) örneklerin absorbanları ölçüldü. Bilgisayarda Log-Log grafik kullanarak X eksenine MIF standart değerleri (pg/ml), Y eksenine de karşılık gelen absorban

değerleri işaretlenerek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan absorbans değerleri standart eğri üzerinde işaretlenerek karşılırlarına denk gelen MIF seviyeleri belirlendi.

TM düzeyinin saptanması:

Kan örnekleri 1000 x g de 15 dk santrifüj edildikten sonra serumu ayrılarak çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı. TM düzeyleri Cusabio sandviç ELİSA kiti(Katalog no: CSB-E007937h) kullanılarak saptandı. Bu amaçla anti-insan TM antikorları ile kaplı 96 yuvalı kaplar kullanıldı. ELISA kitinde bulunan reaktifler, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve örnekler çalışmaya başlamadan önce oda ısısına getirildi.

Standart ve örneklerin hazırlanması: Kitte hazır liyofilize halde bulunan 50 ng/ml konsantrasyonundaki standart vialı 8000 rpm de 30 sn santifüj edildikten sonra örnek dilüenti ile çözüldü. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar şeklinde 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,13 ng/ml, 1,57ng/ml, 0,78 ng/ml ve 0 pg/ml konsantrasyonuna ayarlandı. -80 °C de serumlar çözüldükten sonra ELİSA çalışmasına uygun hale getirildi.

Standartların ve örneklerin ELİSA kuyucuklarına konulması: 100 µl serum örnekleri, 100 µl standartlar TM antikoru ile kaplı 96 kuyucuklu ELİSA plağına eklendi. 37 °C de 120dk inkübe edildi. Daha sonra kuyucukların içeriğı aspire edildi.

Biyotin konjuge anti-insan TM antikoru eklenmesi: Her bir kuyucuğa 100 µl Biyotin konjuge anti-insan TM antikoru ilave edildi. 37 °C de 60dk inkübe edildi.

Yıkama: İnkübasyon sonrası ELİSA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

HRP-Avidin kompleksinin eklenmesi: Her bir kuyucuğa 100 µl HRP-Avidin kompleksi ilave edildi. 37 °C de 60dk inkübasyona bırakıldı.

Yıkama: İnkübasyon sonrası ELİSA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

Substrat eklenmesi: Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 90 µl TMB(Tetramethylbenzidine) substrat ilave edilerek 37°C 15-30 dk karanlıkta inkübe edildi.

Reaksiyonun durdurulması: Tüm kuyucuklara 50 µl asit içeren stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

TM düzeyinin ölçümü: 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japon) örneklerin absorbansları ölçüldü. Bilgisayarda Log-Log grafik kullanarak X eksenine TM standart değerleri (ng/ml), Y eksenine de karşılık gelen absorbans değerleri işaretlenerek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan absorbans değerleri standart eğri üzerinde işaretlenerek karşılıklarına denk gelen MIF seviyeleri belirlendi.

ES düzeyinin saptanması:

Kan örnekleri 1000 x g de 15 dk santrifüj edildikten sonra serumu ayrılarak çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı. ES düzeyleri Cusabio sandviç ELİSA kiti (Katolog no:CSB-E007973h) kullanılarak saptandı.Bu amaçla anti-insan ES antikoru ile kaplı 96 yuvalı kaplar kullanıldı. ELISA kitinde bulunan reaktifler, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve örnekler çalışmaya başlamadan önce oda ısısına getirildi.

Standart ve örneklerin hazırlanması: Kitte hazır liyofilize halde bulunan 500 ng/ml konsantrasyonundaki standart vial 8000 rpm de 30 sn santifüj edildikten sonra örnek dilüenti ile çözüldü. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar şeklinde 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,3 ng/ml, 15,7ng/ml, 7,8 ng/ml ve 0 pg/ml konsantrasyonuna ayarlandı. -80 °C de serumlar çözüldükten sonra ELİSA çalışmasına uygun hale getirildi.

Standartların ve örneklerin ELİSA kuyucuklarına konulması: 100 µl serum örnekleri, 100 µl standartlar ES antikoru ile kaplı 96 kuyucuklu ELİSA plağına eklendi. 37 °C de 120dk inkübe edildi. Daha sonra kuyucukların içeriği aspire edildi.

Biyotin konjuge anti-insan ES antikor eklenmesi: Her bir kuyucuğa 100 µl Biyotin konjuge anti-insan ES antikor ilave edildi. 37 °C de 60dk inkübe edildi.

Yıkama: İnkübasyon sonrası ELİSA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

HRP-Avidin kompleksinin eklenmesi: Her bir kuyucuğa 100 µl HRP-Avidin kompleksi ilave edildi. 37 °C de 60dk inkübasyona bırakıldı.

Yıkama: İnkübasyon sonrası ELİSA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

Substrat eklenmesi: Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 90 µl TMB(Tetramethyl-benzidine) substrat ilave edilerek 37°C 15-30 dk karanlıkta inkübe edildi.

Reaksiyonun durdurulması: Tüm kuyucuklara 50 µl asit içeren stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

ES düzeyinin ölçümü: 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japon) örneklerin absorbansları ölçüldü. Bilgisayarda Log-Log grafik kullanarak X eksenine ES standart değerleri (ng/ml),Y eksenine de karşılık gelen absorbans değerleri işaretlenerek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan absorbans değerleri standart eğri üzerinde işaretlenerek karşılıklarına denk gelen ES seviyeleri belirlendi.

ICAM-1 düzeyinin saptanması:

Kan örnekleri 1000 x g de 15 dk santrifüj edildikten sonra serumu ayrılarak çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı. ICAM-1 düzeyleri Boster sandviç ELİSA kiti (Katolog no:EK0370) kullanılarak saptandı. Bu amaçla anti-insan ICAM-1 antikorları ile kaplı 96 yuvalı kaplar kullanıldı. ELISA kitinde bulunan reaktifler,96 kuyucuklu ELISA plağı ve örnekler çalışmaya başlamadan önce oda ısısına getirildi.

Standart ve örneklerin hazırlanması: Kitte hazır liyofilize halde bulunan 10000 pg/ml konsantrasyonundaki standart örnek dilüenti ile çözüldü. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar şeklinde 5000 pg/ml, 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 313 pg/ml, 156 pg/ml ve 0 pg/ml konsantrasyonuna ayarlandı. -80 °C de saklanan serum örnekleri çözüldükten sonra ELİSA çalışmasına uygun hale getirildi.

Standartların ve örneklerin ELİSA kuyucuklarına konulması: 100 µl serum örnekleri, 100 µl standartlar ICAM-1 antikoruna ile kaplı 96 kuyucuklu ELİSA plağına eklendi. 37 °C de 90dk inkübe edildi. Daha sonra kuyucukların içeriği aspire edildi.

Biyotin konjuge anti-insan ICAM-1 antikor eklenmesi: Her bir kuyucuğa 100 µl Biyotin konjuge anti-insan ICAM-1 antikoruna ilave edildi. 37 °C de 60dk inkübe edildi.

Yıkama: İnkübasyon sonrası ELİSA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak PBS (phosphate buffered saline) ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleksinin eklenmesi: Her bir kuyucuğa 100 µl Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi ilave edildi. 37 °C de 30dk inkübasyona bırakıldı.

Yıkama: İnkübasyon sonrası ELİSA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak PBS (phosphate buffered saline) ile 5 kez yıkama işlemi yapıldı.

Substrat eklenmesi: Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 90 µl TMB(Tetramethylbenzidine) substrat ilave edilerek 20-25 dk 37°C karanlıkta inkübe edildi.

Reaksiyonun durdurulması: Tüm kuyucuklara 100 µl asit içeren stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

ICAM-1 düzeyinin ölçümü: 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japon) örneklerin absorbansları ölçüldü. Bilgisayarda Lineer-Lineer grafik kullanarak X eksenine ICAM-1 standart değerleri (pg/ml), Y eksenine de karşılık gelen absorbans değerleri işaretlenerek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan

absorbans değerleri standart eğri üzerinde işaretlenerek karşılarına denk gelen ICAM-1 seviyeleri belirlendi.

VEGF düzeyinin saptanması:

Kan rnekleri 1000 x g de 15 dk santrifüj edildikten sonra serumu ayrılarak çalışma gününe kadar -80 C' de saklandı. VEGF düzeyleri Boster sandviç ELİSA kiti (Katolog no: EK0539) kullanılarak saptandı. Bu amaçla anti-insan VEGF antikorları ile kaplı 96 yuvalı kaplar kullanıldı. ELISA kitinde bulunan reaktifler, 96 kuyucuklu ELISA plağı ve örnekler çalışmaya başlamadan önce oda ısısına getirildi.

Standart ve örneklerin hazırlanması: Kitte hazır liyofilize halde bulunan 10000 pg/ml konsantrasyonundaki standart örnek dilüenti ile çözüldü. Dilüsyon sonrası standartlar seri dilüsyonlar şeklinde 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml ve 0 pg/ml konsantrasyonuna ayarlandı. -80 C de saklanan hücre kültür örnekleri çözüldükten sonra ELİSA çalışmasına uygun hale getirildi.

Standartların ve örneklerin ELİSA kuyucuklarına konulması: 100 l serum örnekleri, 100 l standartlar VEGF antikoru ile kaplı 96 kuyucuklu ELİSA plağına eklendi. 37 C de 90dk inkübe edildi. Daha sonra kuyucukların içeriği aspire edildi.

Biyotin konjuge anti-insan VEGF antikoru eklenmesi: Her bir kuyucuğa 100 l Biyotin konjuge anti-insan VEGF antikoru ilave edildi. 37 C de 60dk inkübe edildi.

Yıkama: İnkübasyon sonrası ELİSA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak PBS (phosphate buffered saline) ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleksinin eklenmesi: Her bir kuyucuğa 100 l Avidin-Biotin-Peroksidaz kompleksi ilave edildi. 37 C de 30dk inkübasyona bırakıldı.

Yıkama: İnkübasyon sonrası ELİSA yıkayıcısı (BioRAD 1575) kullanılarak PBS (phosphate buffered saline) ile 5 kez yıkama işlemi yapıldı.

Substrat eklenmesi: Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 90 µl TMB(Tetramethylbenzidine) substrat ilave edilerek 20-25 dk 37°C karanlıkta inkübe edildi.

Reaksiyonun durdurulması: Tüm kuyucuklara 100 µl asit içeren stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

VEGF düzeyinin ölçümü: 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında (BioRad Novapath microplate reader, Japon) örneklerin absorbensları ölçüldü. Bilgisayarda Lineer-Lineer grafik kullanarak X eksenine VEGF standart değerleri (pg/ml),Y eksenine de karşılık gelen absorbens değerleri işaretlenerek bir standart eğri oluşturuldu. Çalışma örnekleri için bulunan absorbens değerleri standart eğri üzerinde işaretlenerek karşılıklarına denk gelen VEGF seviyeleri belirlendi.

3.5 EKLEM HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm hemofili hastalarının eklemlerinin mevcut durumu fizik muayenede HJHS skorlaması (84) ile değerlendirildi. Eklemlerin konvansiyonel radyografi ile yapılan hemofilik artropati değerlendirmelerinde Petterson skoru (86), MR görüntüleme değerlendirmelerinde Denver skorlaması (85) kullanılarak hastalardaki eklem hasarı ileri eklem hasarı ve erken eklem hasarı olarak sınıflandırıldı. Eklem MR ile görüntülenmesinde sinovit bulguları olan ancak direkt grafi ile görüntülenmesinde artropati bulguları olmayan hastalar erken eklem hasarı olarak tanımlandı (11). Eklem MR ve direkt grafi ile görüntülenmesinde eklem hasarı bulgularının olması ileri eklem hasarı olarak tanımlandı. Hemofili hastaları eklem bulgularına göre 5 gruba ayrıldı:

- 1- İleri eklem hasarı olup akut eklem içi kanama ile gelen ağır hemofili A hastaları
- 2- Erken eklem hasarı olup akut eklem içi kanama ile gelen ağır hemofili A hastaları
- 3- İleri eklem hasarı olup akut eklem içi kanaması olmayan ağır hemofili A hastaları
- 4- Erken eklem hasarı olup akut eklem içi kanaması olmayan ağır hemofili A hastaları
- 5- Eklem hasarı gelişmemiş olan ağır hemofili A hastaları

3.6 İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirme için veriler SPSS 15.0 programına yüklenerek çözümlmeler bu program üzerinden yapıldı.

Sonuçlar uygulamaya göre ortalama, standart sapma, ortanca değerler, mutlak sayı veya persentiller olarak verildi. Ortalamaların veya ortancaların karşılaştırılması bağımsız gruplarda Mann Whitney U testi, bağımlı gruplarda Wilcoxon testi ile yapıldı. Ölçümsel veri için korelasyon analiz testi uygulandı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Çalışmaya 01.03.2012 ile 01.03.2013 tarihleri arasında akut eklem içi kanaması ile gelen 10 ağır hemofili A hastası ile akut eklem içi kanaması olmayan 25 ağır hemofili A hastası dahil edildi. Sağlıklı kontrol grubu olarak 22 sağlıklı erkek çocuğu alındı. Hemofili hastalarının yaş ortalaması 11.75 ± 4.46 (3-18 yaş), sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması 12.09 ± 2.82 (5-18 yaş) idi ($p=0.5$).

Ağır hemofilisi olan çocuklarla kontrol grubu hemoglobin, trombosit, lökosit ve monosit sayıları açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (sırasıyla $p=0.07$, $p=0.47$, $p= 0.40$, $p=0.18$). Tüm hastaların laboratuvar değerleri Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10: Tüm hastaların laboratuvar değerleri

Belirteç	<u>Akut Kanamalı Hemofili</u>		<u>Kanama olmayan hemofili</u>			<u>Sağlıklı</u>
	İleri eklem hasarı (n=7)	Erken eklem hasarı (n=3)	İleri eklem hasarı (n=6)	Erken eklem hasarı (n=3)	Hasarsız (n=16)	(n=22)
Lökosit (/ μ L)	8577	6233	8516	7500	7753	6572
Monosit (/ μ L)	505	500	451	500	599	500
Hemoglobin (gr/dL)	13.4	12.1	13.9	11.9	12.7	13.1
Trombosit(/ μ L)	240000	266000	239000	304000	253000	267000
CRP (mg/dL)	16.9	6.2	4	4.9	4.1	1.1
Ferritin (ng/mL)	48.54	47.73	86.85	92.35	51.67	26.95
Laktik asit (mmol/L)	1.11	1.27	1.33	1.16	1.59	1.07

CRP: C-reaktif protein

Akut eklem kanaması olan hastalardan 3'ünde erken eklem hasarı, 7'sinde ileri eklem hasarı mevcuttu. Akut eklem kanaması olmayan hastaların 3'ünde erken eklem hasarı, 6'sında ileri eklem hasarı saptandı. On altı hastada eklem hasarı mevcut değildi. Akut eklem kanaması olan 10 hemofili hastasından 2 tanesi kanamadan sonra 1. ayda kontrole gelmediği için bu 2 hastanın 1. ay kontrol değerleri alınamadı. Kalan 8 hastanın akut kanama sırasındaki ve kanamadan sonraki 1. ay laboratuvar tetkikleri karşılaştırıldı.

Akut eklem kanaması olan ve olmayan tüm hemofili hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Tablo 10) CRP, serum ferritin ve laktik asit düzeyleri hemofili

hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p < 0.05$). Serum ferritin ile laktik asit düzeyleri istatistiksel olarak yüksek bulunduysa da bu değerler normal sınırlar içindeydi. Akut kanamalı hemofilik hastalarda CRP normal değerlerin üst sınırından 2 kat daha yüksekti. Serum VEGF, MIF, TM, ES ve ICAM-1 düzeyleri karşılaştırıldığında (Tablo 11) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.95$, $p=0.28$, $p=0.89$, $p=0.83$ ve $p=0.83$).

Tablo 11: Tüm hastaların ELISA test değerleri

Belirteç	<u>Akut Kanamalı Hemofili</u>		<u>Kanamaya olmayan hemofili</u>			<u>Sağlıklı</u>
	İleri eklem hasarı (n=7)	Erken eklem hasarı (n=3)	İleri eklem hasarı (n=6)	Erken eklem hasarı (n=3)	Hasarsız (n=16)	(n=22)
VEGF (pg/mL)	113.208	114.681	70.615	71.024	148.089	111.436
TM (ng/mL)	0.42	1.18	0.45	0.8	0.97	0.72
MIF (pg/ml)	75952	34204	40542	27104	19471	17491
ICAM-1(pg/mL)	366.125	360.228	352.061	380.809	377.01	374.289
ES (ng/mL)	27.791	26.215	29.811	24.683	25.049	27.332

VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü TM: trombomodulin MIF: makrofaj migrasyon inhibitör faktör
ICAM-1: intersellüler adezyon molekülü 1 ES: endostatin

Akut eklem kanaması olan hemofili hastaları ile akut eklem kanaması olmayan hemofili hastaları karşılaştırıldığında sadece CRP düzeyleri akut kanaması olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0.05$). Akut kanamalı hemofilik hastalarda CRP normal değerlerin üst sınırından 2 kat daha yüksekti. Akut eklem kanaması olan hemofili hastaları ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında ise CRP ve serum ferritin düzeyleri akut

eklem kanaması olan hastalarda anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Akut eklem kanaması olmayan hemofili hastaları ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında serum ferritin ve laktik asit düzeyleri kanaması olmayan hemofili hastalarında anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Bu değerler normal sınırlardaydı.

Akut eklem kanaması olan 8 hastanın akut kanama sırasındaki ve kanamadan sonraki 1. ay laboratuvar tetkikleri karşılaştırıldığında CRP ve MIF düzeylerinin akut kanama sırasında anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$). ICAM 1 düzeylerinde azalma bulundu. Lökosit sayısı, hemoglobin düzeyleri, serum ferritin ve laktik asit düzeyleri, serum VEGF, TM ve ES düzeyleri arasında ise anlamlı olarak fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.49$, $p=0.67$, $p=0.69$, $p=0.35$, $p=0.48$, $p=0.93$, $p=0.88$) (Tablo 12).

Tablo12: Akut eklem kanaması sırasında ve bir ay sonrasında laboratuvar değerleri

	Kanama sırasında		1 ay sonra		P değeri
	Ortalama	Median	Ortalama	Median	
Lökosit sayısı (/ μ L)	7937	6300	6850	6900	0.49
Hemoglobin (gr/dL)	13.1	12.9	13.2	13.6	0.64
CRP (mg/dL)	16.3	7.3	3.1	1.9	0.02
Ferritin (ng/mL)	50.33	39.94	39.11	38.01	0.06
Laktik asit (mmol/L)	1.13	1.11	1.18	1.16	0.35
VEGF (pg/mL)	115.689	111.883	144.542	139.127	0.48
TM (ng/mL)	0.91	0.68	0.57	0.46	0.09
MIF (pg/ml)	74801	36336	23692	12967	0.02
ICAM-1(pg/mL)	359.496	362.242	399.759	404.929	0.01
ES (ng/mL)	28.076	25.471	26.874	27.255	0.88

CRP: C-reaktif protein VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü TM: trombomodulin
MIF: makrofaj migrasyon inhibitör faktör ICAM-1: intersellüler adezyon molekülü 1 ES: endostatin

Akut eklem kanaması olan hastalar içinde erken eklem hasarı olanlar (n=3) ile ileri eklem hasarı olanlar (n=7) arasında laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. Akut eklem kanaması olmayan ileri eklem hasarı olanlar (n=6) ile erken eklem hasarı olanların (n=3) laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak karşılaştırılan bu gruplardaki olgu sayısının çok az olması nedeniyle bu sonuçları değerlendirme dışı bıraktık.

Akut eklem kanaması olan ve olmayan tüm hemofili hastaları içinden erken eklem hasarı olanlar (n=6) ile ileri eklem hasarı olanların (n= 13) laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında hemoglobin düzeyi ileri eklem hasarı olanlarda anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$), lökosit sayısı, serum ferritin ve laktik asit düzeyleri, serum VEGF, MIF, TM ve ES düzeyleri arasında ise anlamlı olarak fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.32$, $p=0.63$, $p=0.96$, $p=0.89$, $p=0.52$, $p=0.10$ ve $p=0.57$).

Tüm hemofili hastaları içinde eklem hasarı olanlar (n= 19) ile eklem hasarı olmayanların (n= 16) laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında eklem hasarı olanlarda CRP anlamlı olarak yüksek ($p<0.05$) , eklem hasarı olmayanlarda serum laktik asit düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$).

Erken eklem hasarı olan hastalarda serum TM düzeyi VEGF ve ICAM-1 ve laktik asit düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulundu, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla $p=0.77$, $p=0.77$, $p=0.77$). Serum VEGF ile ICAM-1 ve laktik asit düzeyleri arasında korelasyon bulunmadı (sırasıyla $p=0.15$, $p=0.42$, $p=0.54$).

İleri eklem hasarı olan hastalarda serum TM düzeyi ile MIF arasında pozitif bir korelasyon, serum MIF ile ES düzeyleri arasında negatif bir korelasyon bulundu, ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla $p=0.70$, $p=0.33$).

5.TARTISMA

Ağır hemofilik hastalarda erken yaşta başlanan düzenli F VIII konsantresi replasmanlarına rağmen subklinik ve klinik bulgu veren eklem içi kanamalar halen tam olarak önlenmemekte ve kalıcı eklem hasarları oluşmaya devam etmektedir (2-4). Bazı hastalarda klinik bulgular, laboratuvar ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile eklem içi kanamayı ilk başladığında saptamak henüz mümkün değildir. Bu da hastalardaki eklem hasarının artmasında önemli bir neden olabilmektedir. Çalışmamızda, ağır hemofili A hastalarında eklem bulguları ile plazma anjiogenik ve inflamatuvar faktör düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılması ve eklem kanaması olduğunda bu faktör düzeylerindeki değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Lökositler sahip oldukları antimikrobiyal, sekretuar ve fagositik aktivitelerden dolayı inflamasyonda önemli rol oynamaktadırlar (97). Biz, bu çalışmamızda eklem hasarı olan ve olmayan hemofili hastaları ile sağlıklı kontrol grubu arasında lökosit ve monosit sayıları açısından bir fark bulmadık. Eklem kanaması olan hastalarda da önemli bir farklılık yoktu. Bu sonuç kanamalı hastaların sayısının az olması veya lokal kanamanın sistemik bir yanıtı neden olmamasına bağlanabilir.

Yara yerindeki hücrelerin hipoksiye maruz kalması anjiogenezin başlaması için temeldir. Dokularda vasküler perfüzyonun azalması ile hem lokal hipoksi hem de glikoz azalması olduğu, bundan dolayı hücrelerin anaerobik metabolik yola geçtiği, böylece laktat yapımının arttığı ve ekstrasellüler PH'nın azaldığı, oluşan bu yeni ortamın makrofajlardan proanjiogenik sitokin/enzim salınımına yol açtığı gösterilmiştir (35,45,46). Hemofili hastalarında akut eklem kanaması sırasında serum laktik asit düzeylerinde anlamlı bir artış saptamadık. Serum laktik asit düzeyindeki artışın doku hipoksisini gösterdiği bilinmektedir.

Sepsisli hastalarda, miyokard infarktüsü geçirenlerde ve travma hastalarında sistemik olarak da serum laktat düzeylerinin yükseldiği ve izlemde kullanılabileceği literatürde gösterilmiştir (98-100). Hemofili hastalarında akut eklem kanaması sırasında sistemik hiperlaktatemiye yol açıp açmadığını araştırdığımızda anlamlı bir artış saptamadık.

Kan normalde eklem aralığında bulunmamaktadır. Eklem içine kanama olduğunda eritrositlerden açığa çıkan demiri sinovyal makrofajlar ve kondrositler absorbe etmektedirler. Eğer kanama atakları sıklaşırsa sinovya yenilenmekte yetersiz kalmakta ve demir birikmektedir (76-78). Bu çalışmada akut eklem kanaması olan ve olmayan tüm hemofili hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum ferritin düzeylerini hemofili hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulduk. Hem akut eklem kanaması olan hemofili hastaları ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında hem de kanaması olmayan hemofili hastaları ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında serum ferritin düzeylerini sağlıklı kontrollere göre yüksek bulduk. Sekiz hastanın akut kanama sırasındaki ve kanamadan sonraki 1. ay laboratuvar tetkikleri karşılaştırıldığında serum ferritin düzeyleri arasında ise anlamlı olarak fark bulmadık. Ferritinin bir akut faz reaktanı olarak romatoid artritli hastalarda dolaşımında yükseldiği gösterilmiştir (101-102). Yetersiz tedavi edilmiş hemofilik farelerde iyileşme sırasında yeniden kanama olduğunda daha fazla makrofaj gelmiş olmasına rağmen demir boyanmasının persiste ettiği ve daha derin dokularda da biriktiği gözlenmiştir. Hemofilik fareler ile sağlıklı farelerin yara yerleri incelendiğinde angiogenesis hızı açısından benzer olduğu ancak hemofilik farelerde yeni oluşan damar sayısının daha fazla olduğu bulunmuştur. Doku demirinin proinflamatuvar ve proangiogenik etkisinin buna yol açabileceği düşünülmüştür (10). Serum ferritin düzeyini akut kanama sırasında sağlıklı kontrollere göre yüksek bulmamız ferritinin bir akut faz reaktanı olmasına bağlanabilir. Ancak akut kanama olmadığı dönemde de hemofili hastalarında sağlıklı kontrollere göre

yüksek bulunması fare modellerinde gösterildiği gibi tekrarlayan kanamalar sonucunda demirin daha derin dokularda birikimi olabilir. Ancak artmış ferritin düzeyleri normal sınırlarda olduğu için hemofilik hastalarda önemli bir belirteç olarak kabul edilemez.

Hipoksinin etkisi ile salınan proanjiogenik moleküllerden biri olan VEGF anjiogenezis için temel sinyal molekülüdür (11,47,64). Bu çalışmada akut eklem kanaması olan ve olmayan tüm hemofili hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum VEGF düzeyleri arasında bir fark bulmadık. Sekiz hastanın akut kanama sırasındaki ve kanamadan sonraki 1. ay laboratuvar tetkikleri karşılaştırıldığında da serum VEGF düzeyleri arasında anlamlı olarak fark bulmadık. Literatürde Acharya ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada eklem kanaması olan hemofili hastalarında hem sinovya hem de serumda VEGF düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (11). Ondört hastalık bu çalışmada, hemofilik artropatili hastalarda hem sinovya hem de periferik kanda proanjiogenik makrofaj/monositlerin ($VEGF^+/CD68^+$ ve $VEGFR1^+/CD11b^+$) arttığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada hemofilik artropatide hem sinovya hem de periferik kanda VEGF-A, Stromal deriviye faktör-1 ve Matriks metalloproteaz-9'un 4 kat arttığı gösterilmiş ve hücre kültürü çalışması yapılarak insan anti-VEGF antikor (bevacizumab) kullanılarak sinovyal hücre proliferasyonun durduğu gösterilerek tedavide VEGF inhibisyonunun gelecekte bir alternatif olabileceği belirtilmiştir. Az sayıda hasta olması nedeniyle biz VEGF düzeylerinde artışı gösterememiş olabiliriz.

MIF inflamatuvar ve immün cevabın düzenlenmesinde rol oynayan önemli bir sitokindir. Bu çalışmada akut eklem kanaması olan ve olmayan tüm hemofili hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum MIF düzeyleri arasında bir fark bulmadık. Ancak akut eklem kanaması olan hastalarda kanama sırasındaki ve kanamadan sonraki 1. ay laboratuvar tetkikleri karşılaştırıldığında da serum MIF düzeylerinin kanama sırasında anlamlı

olarak yükseldiğini bulduk. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanamalı ateş, septik şok, romatoid artrit, otoimmün hastalıklar, ateroskleroz gibi pek çok hastalıkta MIF'in rol oynadığı gösterilmiştir (53,54,56).

TM endotelial hücre yüzeyinde yer alan ve trombin reseptörü olarak görev yapan bir hücre membran glikoproteinidir. İnsanlarda esas olarak vasküler endotelial hücrelerde bulunmaktadır (57). Bu çalışmada akut eklem kanaması olan ve olmayan tüm hemofili hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum TM düzeyleri arasında bir fark bulmadık. Akut eklem kanaması olan hastalarda kanama sırasındaki ve kanamadan sonraki 1. ay laboratuvar tetkikleri karşılaştırıldığında serum TM düzeylerinin kanama sırasında yükseldiğini ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk. TM domain 2 ve domain 3'ünün angiogenik-promoting fonksiyonu olduğu yeni saptanmıştır. Rekombinant TM fragmanı olan TMD23'ün in vitro olarak endotelial migrasyonu, proliferasyonu ve tüp formasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. TMD23'ün, matriks metallo proteinlerinin ve plazminojen aktivatörlerinin endotelial hücrelerden salınımını arttırarak anjiogenezisin erken evrelerinde endotelial hücre invazyonuna ve migrasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (103).

Yara oluştuğunda kan akımı ile gelen monositlerin yüzeylerindeki LFA-1 ve endotelial hücre yüzeyindeki ICAM-1 sitokinleri aracılığıyla monositler dolaşımdan dokuya geçmektedirler (35). Bu çalışmada akut eklem kanaması olan ve olmayan tüm hemofili hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum ICAM-1 düzeyleri arasında bir fark bulmadık. ICAM-1'in inflamatuvar yolda önemli rol oynadığı, osteoartrit ve romatoid artrit erken evrelerinde serum ICAM-1 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (49-51).

Akut eklem kanaması sırasında MIF ve CRP serum düzeylerinin yükseldiğini bulduk. MIF'in hem ICAM-1 hem de TM salınımını arttırdığı çok yeni olarak gösterilmiştir (54). CRP bir akut faz reaktanı olduğundan akut kanama sırasında CRP yükselmesi beklenmektedir. Bizim de çalışmamızda eklem hasarı olan hastalarda CRP'nin yüksek olduğu saptanmıştır. Literatürde ICAM-1 yüksekliği ile CRP yüksekliği arasında anlamlı ilişki bulunduğu bildirilmektedir (51,104).

Anjiogenezis sürecinde proanjiogenik ajanlar ile antianjiogenik ajanlar arasında bir denge vardır. Anjiostatin, trombospondin, ES ve fibrinojen E fragmanı başlıca antianjiogenik ajanlardır (35,61). Bu çalışmada akut eklem kanaması olan ve olmayan tüm hemofili hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum ES düzeyleri arasında bir fark bulmadık. Sekiz hastanın akut kanama sırasındaki ve kanamadan sonraki 1. ay laboratuvar tetkikleri karşılaştırıldığında da serum ES düzeyleri arasında anlamlı olarak fark bulmadık. Tümör dokularında neoangiogenezisin arttığı ve aynı zamanda endostatin salınımının da arttığı gösterilmiştir (61-63).

Bu çalışmada erken eklem hasarı olan hastalarda serum TM düzeyi VEGF ve ICAM-1 ve laktik asit düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulduk, ancak bu sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulmadık. Bu sonuçlar, bu gruptaki olgu sayısının düşük olmasından kaynaklanabilir. Serum VEGF ile ICAM-1 ve laktik asit düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon bulmadık. İleri eklem hasarı olan hastalarda serum TM düzeyi ile MIF arasında pozitif bir korelasyon, serum MIF ile ES düzeyleri arasında negatif bir korelasyon bulduk, ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulmadık. İstatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, TM düzeyi ile VEGF ve MIF arasındaki pozitif korelasyonun önemli olduğunu

düşünüyoruz. İnflamasyonda proanjiogenik sinyal molekülleri arasında bu korelasyon farklı hastalık grupları arasında da gösterilmiştir (11,54).

MR'ın düz radyografiye üstünlüklerine rağmen kolay ulaşılabilir olmaması, küçük çocuklarda çekim için sedasyon gerektirmesi ve pahalı olmasından dolayı hemofilik artropati gelişimini erken evrede gösterebilecek biyolojik belirteçlere ihtiyaç vardır (5-11). Çalışmamızda CRP'nin akut kanama sırasında belirgin yükselmesi, CRP'nin iyi bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca MIF düzeyleri kanama durumunda yükselmekte ve eklem hasarının derecesine bağlı olmadan kanama varlığını desteklemektedir. Bu faktörlerin daha fazla sayıda ağır hemofili A hastasında akut kanamalarda, kanamanın erken safhasında düzeylerinin bilgi verebileceğini düşünmekteyiz. Bu sayede, uygulanacak antianjiogenik veya antiinflamatuvar tedavilerin rekürrent kanama ve izleyen artropatiyi önleyeceğini ummaktayız.

6. KAYNAKLAR

- 1- Jelbert A, Vaidya N, Fotiadis N. Imaging and staning of haemophilic arthropathy. Clin Radiol 2009; 64; 1119-1128.
- 2- Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD ve ark. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. N Engl J Med 2007; 357: 535-44.
- 3- Hakobyan N, Enockson C, Cole AA ve ark. Experimental haemophilic artropathy in a mouse model of a massive haemarthrosis: gross, radiological and histological changes. Haemophilia 2008; 14: 804-809.
- 4- Rodriguez-Merchan EC. Pathogenesis, early diagnosis and prophylaxis for chronic hemophilic synovitis. Clin Orthop 1997; 343: 6-11.
- 5- Nuss R, Kilcoyne RF, Geraghty S ve ark. MRI findings in haemophilic joints treated with radiosynoviorthesis with development of an MRI scale of joint damage. Haemophilia 2000; 6: 162-169.
- 6- Nuss R, Kilcoyne RF, Rivard GE ve ark. Late clinical, plain X-ray and magnetic imaging findings in haemophilic joints treated with radiosynoviorthesis. Haemophilia 2000; 6: 658-663.
- 7- Dobon M, Lucia JF, Aguidar C ve ark. Value of magnetic resonance imaging for the diagnosis and follow-up of haemophilic arthropathy. Haemophilia 2003; 9: 76-85.
- 8- Funk MB, Schmidt H, Becker S ve ark. Modified magnetic resonance imaging score compared with orthopaedic and radiological scores fort he evaluation of haemophilic arthropathy. Haehophilia 2002; 8: 98-103.
- 9- Hoffman M, Harger A, Lenkowski A ve ark. Cutaneous wound healing is impaired in hemophilia B. Blood 2006; 108: 3053-3060.

- 10- Hoffman M, Monroe DM. Wound healing in haemophilia- breaking the vicious cycle. *Haemophilia* 2010; 16 (Suppl. 3): 13-18.
- 11- Acharya SS, Kaplan RN, Macdonald D ve ark. Neo-angiogenesis contributes to the development of hemophilic synovitis. *Blood*. 2011 Feb 24; 117(8): 2484-2493.
- 12-Valentino LA, Hakobyan N, Enockson C ve ark. Exploring the biological basis of haemohilic joint disease: experimental studies. *Haemophilia* 2012; 18: 310-318.
- 13- Hematology: basic principles and practise/ editorler, Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ ve ark; 5. baskı, Çin: Elsevier, 2009. bölüm 125; 1911-1930.
- 14- Guidelines for management of hemophilia. World Federation of Hemophilia, 2013.
- 15- Fang H, Wang L, Wang H. The protein structure and effect of factor VIII. *Thromb Res*. 2007; 119(1): 1-13.
- 16- Kulkarni R, Soucie M. Pediatric hemophilia: a review *Semin Thromb Hemost*. 2011 Oct; 37(7): 737-744.
- 17- Soucie M, Evatt B, Jackson D. Ocurrence of hemophilia in the United States. The hemophilia Surveillance System Project Investigators. *Am J Hematol* 1998; 59: 288-294.
- 18- Gitschier J,Wood WI, Goralka TM ve ark. Characterisation of the human factor VIII gene. *Nature* 1984; 312: 326-330.
- 19- Becker J, Schwaab R, Möller-Taube A ve ark. Characterization of the factor VIII defect in 147 patients with sporadic hemophilia A: family studies indicate a mutation type dependent sex ratio of mutation frequencies. *Am J Hum Genet*1996; 58: 657-670.
- 20- Oldenburg J. Mutation profiling in hemophilia A. *Thromb Haemost* 2001; 85(4): 577-579.
- 21- Raffini L, Manno C. Modern management of haemophilic arthropathy. *Br J Haematol* 2007; 136(6): 777-787.
- 22- van Dieijen G, Tans G, Rosing J ve ark. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem* 1981; 256: 3433-3442.

- 23- Chambost H, Gaboulaud V, Coatmelec B ve ark. What factors influence the age at diagnosis of hemophilia? Results of the French Hemophilia Cohort. *J Pediatr* 2002; 141: 548-552.
- 24- Pollmann H, Richter H, Ringkamp H ve ark. When are children diagnosed as having severe haemophilia and when do they start to bleed? A 10-year single-centre PUP study *Eur J Pediatr* 1999; 158(Suppl 3): 166–170.
- 25- Rodriguez-Merchan EC. Common orthopedic problems in hemophilia. *Hemophilia* 2000; 5: 53-60.
- 26-Roosendal G, Lafaber F. Blood- induced joint damage im hemophilia. *Semin Thromb Hemos* 2003 Feb; 29(1): 37-42.
- 27- Gilbert MS. The hemophilic pseudotumor. *Prog Clin Biol Res* 1990; 324: 257-262.
- 28- Plug I, Peters M, Mauser-Bunschoten EP ve ark. Social participation of patients with hemophilia in the Netherlands. *Blood* 2008 Feb 15; 111(4): 1811-1815.
- 29- Nilsson IM. Experience with prophylaxis in Sweden. *Semin Hematol*. 1993 Jul; 30(3 Suppl 2): 16-19.
- 30- Acharya SS. Exploration of the pathogenesis of haemophilic joint arthropathy: understanding implications for optimal clinical management. *Br J Haematol* 2012 Jan; 156(1): 13-23.
- 31- Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN ve ark. Biochemical, immunological and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood* 1993; 81(11): 2925 – 2935.
- 32- Wolberg AS. Thrombin generation and fibrinclot stracture. *Blood* 2007; 21: 131-142.
- 33-Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* 2003; 16: 17-20.

- 34- Hoffman M. Animal models of bleeding and tissue repair. *Haemophilia* 2008;14 (Suppl. 3): 62–67.
- 35- Crowther M, Brown J, Bishop ET ve ark. Microenviromental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 478–490.
- 36- Sunderkotter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K ve ark. Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacol Ther* 1991; 51: 195–216.
- 37- DiPietro LA. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* 1995; 4: 233–240.
- 38- Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE. Macrophage phagocytosis of wound neutrophils. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 35–42.
- 39- Vinckier F, Vermynen J. Wound healing following dental extractions in rabbits: effects of tranexamic acid, warfarin anti-coagulation, and socket packing. *J Dent Res* 1984; 63: 646–649.
- 40- McDonald A, Hoffman M, Hedner U ve ark. Restoring thrombin generation does not normalize cutaneous wound healing in hemophilia. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1577–1583.
- 41- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438(7070): 932–936.
- 42- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931–10934.
- 43- Conway EM, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 507–521.
- 44- Collen A, Koolwijk P, Kroon M ve ark. Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary-like tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis* 1998; 2: 153–165.
- 45- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671–674.

- 46- Xiong M, Elson G, Legarda D ve ark. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Pathol* 1998; 153: 587–598.
- 47- Leek RD, Hunt NC, Landers RJ ve ark. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 2000; 190: 430–436.
- 48- Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I ve ark. Clinical implications of expression of interleukin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *Cancer Res* 2000; 60: 2632–2635.
- 49- Frank PG, Lisanti MP. ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295: 926–927.
- 50- Cush JJ, Rothlein R, Lindsley HB ve ark. Increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in the sera of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993 Aug; 36(8): 1098-1102.
- 51- Klimiuk PA, Fiedorczyk M, Sierakowski S ve ark. Soluble cell adhesion molecules (sICAM-1, SVCAM-1, and sE-selectin) in patients with early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2007; 36: 345-350.
- 52- Baugh JA, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* 2002; 30: 27–35.
- 53- Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 751–762.
- 54- Shyu LY, Yeh TM, Chang HH ve ark. Macrophage migration inhibitory factor induces ICAM-1 and thrombomodulin expression in vitro. *Thromb Res.* 2012 Jan; 129(1): 43-49.
- 55- Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 791–800.
- 56- Lue H, Kleemann R, Calandra T ve ark. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* 2002; 4: 449–460.

- 57- Boffa MC, Karmochkine M. Thrombomodulin: an overview and potential implications in vascular disorders. *Lupus* 1998; 7(Suppl 2): 120–125.
- 58- Suzuki K, Kusumoto H, Deyashiki Y ve ark. Structure and expression of human thrombomodulin, a thrombin receptor on endothelium acting as a cofactor for protein C activation. *Embo J* 1987; 6(7): 1891-1897.
- 59- Boehme MWJ, Galle P, Stremmel W. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxtgen radicals. *Immunology* 2002; 107: 340-349.
- 60- Li JY, Su CH, Wu JY ve ark. Therapeutic angiogenesis of human early endothelial progenitor cells is enhanced by thrombomodulin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 Nov; 31(11): 2518-2525.
- 61- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y ve ark. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88, 277–285.
- 62- Sasaki T, Larsson H, Kreuger J ve ark. Structure basis and potential of heparin/hepatan sulfate binding to the angiogenesie inhibitor endostatin. *Embo J* 1999; 18: 6240–6248.
- 63- Uematsu S, Higashi T, Nouse K ve ark. Altered expression of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2 and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 583–588.
- 64- Ortega N, Jonca F, Vincent S ve ark. Systemic activation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/flk-1 selectively triggers endothelial cells with an angiogenic phenotype. *Am J Pathol* 1997; 151(5): 1215-1224.
- 65- Maeno N, Takei S, Imanaka H ve ark. Increased circulating vascular endothelial growth factor is correlated with disease activity in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26(10): 2244-2248.

- 66- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM ve ark. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983–985.
- 67- Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM ve ark. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999; 126: 1149–1159.
- 68- Achen MG, Stacker SA. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol* 1998; 79: 255–265.
- 69- Gerber HP, Condorelli F, Park J ve ark. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes: Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272(38): 23659-23667.
- 70- D’Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM ve ark. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res* 2000; 86: 312–318.
- 71- Dunn LA. Pathophysiology, diagnosis and prevention of arthropathy in patient with haemophilia. *Haemophilia* 2011; 17: 571-578.
- 72- Rodriguez-Merchan EC. Effects of hemophilia on articulations of children and adults. *Clin Orthop Relat Res* 1996; 328:7–13.
- 73- Tan AH, Mitra AK, Chang PC ve ark. Assessment of blood-induced cartilage damage in rabbit knees using scanning electron microscopy. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2004; 12: 199–204.
- 74- Wen FQ, Jabbar AA, Chen YX ve ark. c-myc proto-oncogene expression in hemophilic synovitis: in vitro studies of the effects of iron and ceramide. *Blood* 2002; 100: 912–916.
- 75- Arnold WD, Hilgartner MW. Hemophilic arthropathy. Current concepts of pathogenesis and management. *J Bone Joint Surg Am* 1977; 59: 287-305.
- 76- Mainardi CL, Levine PH, Werb Z ve ark. Proliferative synovitis in hemophilia: biochemical and morphologic observations. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 137-144.

- 77- Hakobyan N, Kazarian T, Jabbar AA ve ark. Pathobiology of hemophilic synovitis: I. Overexpression of mdm2 oncogene. *Blood* 2004; 104(7): 2060-2064.
- 78-Wen FQ, Jabbar AA, Chen YX, et al. C-myc protooncogene expression in hemophilic synovitis: in vitro studies on the effects of iron and ceramide. *Blood* 2002; 100(3): 912-916.
- 79- Klukowska A, Czyrny Z, Laguna P ve ark. Correlation between clinical, radiological and ultrasonographical image of knee joints in children with haemophilia. *Haemophilia* 2001; 7; 286-292.
- 80- Hooiveld MJ, Roosendaal G, van den Berg HM ve ark. Haemoglobin-derived iron-dependent hydroxyl radical formation in blood-induced joint damage: an in vitro study. *Rheumatol (Oxford)* 2003; 42: 784-790.
- 81-Lafeber FP, Miossec P, Valentino LA. Physiopathology of haemophilic arthropathy. *Haemophilia*. 2008 Jul; 14 Suppl 4: 3-9.
- 82- Valentino LA, Hakobyan N, Rodriguez N ve ark. Pathogenesis of haemophilic synovitis: experimental studies on blood-induced joint damage. *Haemophilia* 2007; 13(Suppl. 3): 10-13.
- 83- Roosendaal G, Lafaber F. Pathogenesis of haemophilic arthropathy. *Haemophilia* 2006; 12 (suppl.3): 117-121.
- 84- Hilliard P, Funk S, Zourikian N ve ark. Hemophilia joint health score reliability study. *Haemophilia* 2006; 12: 518–525.
- 85- Lundin B, Petterson H, Ljung R. A new magnetic resonance imaging scoring method for assesment of haemophilic arthropathy. *Haemophilia* 2004; 10: 383-389.
- 86-Petterson H, Ahlberg A, Nilsson IM. A radiologic classification of hemophilic arthropathy. *Clin Orthop* 1980; 149: 153-159.
- 87- Jansen NW, Vincken KL, Marijissen AC ve ark. Digital scoring of haemophilic arthropathy using radiographs is feasible. *Haemophilia* 2008; 14: 999-1006.

- 88- Ljung R, van der Berg M, Valentino LA ve ark. The fourth annual meeting of the international network for pediatric hemophilia: current challenges and recommendations in the clinical care of children with hemophilia. *Transfus Med Hemother* 2010; 37: 209-212.
- 89- Zukotynski K, Jarrin J, Babyn PS ve ark. Sonography for assessment of haemophilic arthropathy in children: a systemic protocol. *Haemophilia* 2007; 13: 293-304.
- 90- Hermann G, Gilbert MS, Abdelwahab IF. Haemophilia: evaluation of musculoskeletal involvement with CT, sonography, and MR imaging. *AJR AM J Roentgenol* 1992; 158: 119-123.
- 91- Soler R, Lopez-Fernandez F, Rodriguez E ve ark. Hemophilic arthropathy. A scoring system for magnetic resonance imaging. *Eur Radiol* 2002; 12: 836-843.
- 92- Kilcoyne RF, Nuss R. Radiological assessment of haemophilic arthropathy with emphasis on MRI findings. *Haemophilia* 2003; 9(Suppl. 1): 57-64.
- 93- Lundin B, Berntorp E, Petterson H ve ark. Gadolinium contrast agent is of limited value for magnetic resonance imaging assessment of synovial hypertrophy in haemophiliacs. *Acta radiol* 2007; 48: 520-530.
- 94- Doria AS, Lundin B, Kilcoyne RF ve ark. Reliability of progressive and additive MRI scoring systems for evaluation of haemophilic arthropathy in children: expert MRI Working Group of the International Prophylaxis Study Group. *Haemophilia* 2005 May; 11(3): 245-253.
- 95- Rudolf Pediatrics: editör Rudolf A ; bölüm yazarı Dallman PR. 16. baskı, Newyork, Appleton-Century-Crofts, 1977,1111.
- 96- Lockitch G, Halstead AC, Quigley G, ve ark. Age-and sex-specific pediatric reference intervals for zinc, copper, selenium, iron, vitamin A and E and related proteins. *Clin Chem* 1988;34: 1625.
- 97- Ulbrich H, Eriksson EE, Lindbom L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 640-647.

- 98- Guyette F, Syffoletto B, Castillo JL, ve ark. Prehospital serum lactate as predictor of outcomes in trauma patients: a retrospective observational study. *The J of Trauma* 2011; 70: 782-786.
- 99- Shapiro NI, Howell MD, Talmor D, ve ark. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. *Ann Emerg Med* 2005; 45:524 –528.
- 100- Jansen TC, van Bommel J, Mulder PG, ve ark. The prognostic value of blood lactate levels relative to that of vital signs in the pre-hospital setting: a pilot study. *Crit Care* 2008; 12: R160.
- 101- Bentley DP, Williams P. Serum ferritin concentration in patients with rheumatoid arthritis [letter]. *J Rheumatol* 1978; 5: 239.
- 102- Mewar D, Moore DJ, Young-Min S, ve ark. Antiferritin antibodies discovered by phage display expression cloning are associated with radiographic damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005 Dec; 52(12): 3868-3872.
- 103- Shi CS, Shi GY, Chang YS, ve ark. Evidence of human thrombomodulin domain as a novel angiogenic factor. *Circulation* 2005; 111(13): 1627-1636.
- 104- McMurray RW. Adhesion molecules in autoimmune disease. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 25: 215–234.

7. SONUÇLAR

1- Ağır hemofilisi olan çocuklarla kontrol grubu hemoglobin, trombosit, lökosit ve monosit sayıları açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

2- Akut eklem kanaması olan ve olmayan tüm hemofili hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CRP, serum ferritin ve laktik asit düzeyleri hemofili hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Serum ferritin ile laktik asit düzeyleri istatistiksel olarak yüksek bulunduyorsa da bu değerler normal sınırlar içindeydi. Akut kanamalı hemofilik hastalarda CRP normal değerlerin üst sınırından 2 kat daha yüksekti. Serum VEGF, MIF, TM, ES ve ICAM-1 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

3- Akut eklem kanaması olan hemofili hastaları ile akut eklem kanaması olmayan hemofili hastaları karşılaştırıldığında sadece CRP düzeyleri akut kanaması olan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Akut kanamalı hemofilik hastalarda CRP normal değerlerin üst sınırından 2 kat daha yüksekti. Akut eklem kanaması olan hemofili hastaları ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında ise CRP ve serum ferritin düzeyleri akut eklem kanaması olan hastalarda anlamlı olarak yüksek bulundu. Akut eklem kanaması olmayan hemofili hastaları ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında serum ferritin ve laktik asit düzeyleri kanaması olmayan hemofili hastalarında anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu değerler normal sınırlardaydı.

4- Akut eklem kanaması olan 8 hastanın akut kanama sırasındaki ve kanamadan sonraki 1. ay laboratuvar tetkikleri karşılaştırıldığında CRP ve MIF düzeylerinin akut kanama sırasında anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu. ICAM 1 düzeylerinde azalma bulundu. Lökosit sayısı, hemoglobin düzeyleri, serum ferritin ve laktik asit düzeyleri, serum VEGF, TM ve ES düzeyleri arasında ise anlamlı olarak fark bulunmadı.

5-Akut eklem kanaması olan hastalar içinde erken eklem hasarı olanlar (n=3) ile ileri eklem hasarı olanlar (n=7) arasında laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. Akut eklem kanaması olmayan ileri eklem hasarı olanlar (n=6) ile erken eklem hasarı olanların (n=3) laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak karşılaştırılan bu gruptaki olgu sayısının çok az olması nedeniyle bu sonuçları değerlendirme dışı bıraktık.

6-Akut eklem kanaması olan ve olmayan tüm hemofili hastaları içinden erken eklem hasarı olanlar (n=6) ile ileri eklem hasarı olanların (n= 13) laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında hemoglobin düzeyi ileri eklem hasarı olanlarda anlamlı olarak daha yüksek bulundu, lökosit sayısı, serum ferritin ve laktik asit düzeyleri, serum VEGF, MIF, TM ve ES düzeyleri arasında ise anlamlı olarak fark bulunmadı.

7-Tüm hemofili hastaları içinde eklem hasarı olanlar (n= 19) ile eklem hasarı olmayanların (n= 16) laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında eklem hasarı olanlarda CRP anlamlı olarak yüksek, eklem hasarı olmayanlarda serum laktik asit düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu.

8-Erken eklem hasarı olan hastalarda serum TM düzeyi VEGF ve ICAM-1 ve laktik asit düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulundu, ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Serum VEGF ile ICAM-1 ve laktik asit düzeyleri arasında korelasyon bulunmadı.

9-İleri eklem hasarı olan hastalarda serum TM düzeyi ile MIF arasında pozitif bir korelasyon, serum MIF ile ES düzeyleri arasında negatif bir korelasyon bulundu, ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

EK 1:Olgu Kayıt Formu

AĞIR HEMOFİLİ A HASTALARINDA EKLEM BULGULARI İLE PLAZMA VE ANJİYOGENİK FAKTÖR DÜZEYLERİNİN İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

OLGU KAYIT FORMU

Hasta No:

Tarih:

İleri eklem hasarı gelişmiş: ☐

Erken eklem hasarı gelişmiş: ☐

Eklem hasarı gelişmemiş: ☐

Kontrol grubu: ☐

Ad-Soyad:

Hastane:

Protokol no:

Telefon:

Yaşı:

Doğum tarihi:

Yakınma:

İlk tanı tarihi:

Kanayan eklemın direkt grafi bulguları:.....

Kanayan eklemın MR bulguları:.....

Kaçıncı eklem kanaması atağı:

Eklem kanamasının olduğı tarih:

Eklem kanamasından sonra geçen süre:

En son faktör aldığı tarih:

LABORATUVAR BULGULARI

	Akut kanama esnasında	1 ay sonra
WBC		
Monosit sayısı		
Hb		
PLT		
CRP		
F VIII düzeyi		
İnhibitör tayini		-----
Ferritin		-----
Laktik asit düzeyi		-----
VEGF düzeyi		-----
ICAM 1 düzeyi		
Trombomodulin		
MIF düzeyi		-----
Endostatin düzeyi		-----

EK 2: Etik Kurul Onay Formu

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/03-24	Tarih: 26.01.2012
	Prof.Dr.Hale ÖREN'in sorumlusu olduğu "Ağır Hemofili A Hastalarında Eklem Bulguları ile Plazma İnflamatuvar ve Anjiyogenik Faktör Düzeylerinin İlişkisinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
---------------	---

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr.Besti ÖSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEÜ Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Besti</i>
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Osman</i>
Prof.Dr.Mehmet MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Mehmet</i>
Prof.Dr. Zuhâl BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEÜ Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Zuhâl</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Nejat</i>
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEÜ Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ece</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Hüseyin</i>
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ayşe</i>
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>İhsan</i>