

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI



Hemofilik Artropatide Eklem İçi Bevacizumab Enjeksiyonunun
Kıkırdak ve Sinovya Üzerindeki Etkisinin Araştırılması: Deneysel
Hayvan Çalışması

(Uzmanlık Tezi)

DR. LEZGİN MERT

Tez Danışmanı

PROF. DR. HAYATİ DURMAZ

İSTANBUL-2021

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI



Hemofilik Artropatide Eklem İçi Bevacizumab Enjeksiyonunun
Kıkırdak ve Sinovya Üzerindeki Etkisinin Araştırılması: Deneysel
Hayvan Çalışması

(Uzmanlık Tezi)

DR. LEZGİN MERT

Tez Danışmanı

PROF. DR. HAYATİ DURMAZ

İSTANBUL-2021

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamada etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu çalışmayla elde edilmemiş olan bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı ve son olarak bu tezin çalışılması ve yazımı aşamasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Lezgin MERT

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hemofilik artropati (HA); kanama diyatezi mevcut olan hastalarda eklem içi kanamaların neden olduğu, sinovyum ve kıkırdakta hasara yol açan ve son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda etiyopatogenezinde neoanjiogenezin ön plana çıktığı bir morbidite sebebidir. Birçok kanser tedavisinde kullanımı artan Bevacizumab'ın, neoanjiogenez vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üzerinden inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, kanama diyatezine bağlı tekrarlayan eklem içi kanama görülen hastalıkların tedavisinde Bevacizumab'ın hedefe yönelik tedavide eklem içi uygulamasının etkinliğini araştırmaktır.

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda tıpta uzmanlık eğitimine başladığım ilk günden itibaren her zaman desteğini hissettiğim, her türlü sorunumda tecrübeleriyle ve keyifli sohbetleriyle bana yol gösteren, yeniliklere hep açık olarak bana vizyon katan çok değerli tez hocam anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hayati Durmaz hocama teşekkür ederim.

Asistanlık eğitim sürecimin başında kısa bir sürede olsa çalışma şansı yakaladığım hekimlik mesleğinin ahlakını bana öğreten Prof. Dr. Önder Yazıcıoğlu'na, kocaman yüreğiyle verdiği eğitimlerin yanı sıra aileye, örf ve adetlere değer vermeyi öğreten, spor cerrahisini sevdiren Prof. Dr. Mehmet Aşık hocama, kıdemlilik döneminde çalışma şansı yakaladığım eğitimimde büyük katkısı olan Prof. Dr. Cengiz Şen hocama, bilgisi ve tecrübelerini bizden esirgemeyen Prof. Dr. Cüneyt Şar, Prof. Dr. İrfan Öztürk, Prof. Dr. Ata Can Atalar hocalarıma teşekkür ederim.

Akademisyenliği, cerrahisi, kültür birikimi ile örnek aldığım, çok yönlü bakış açısıyla her zaman yolumu aydınlatan, desteğini hiçbir zaman benden esirgemen, hemofilik artropati hastalarının uzun yıllar tedavisinde önemli rol üstlenen, kendisiyle çalışmaktan büyük onur duyduğum, çok sevdiğim değerli hocam Prof. Dr. Önder Kılıçoğlu'na teşekkür ederim.

Eğitimim süresince iş ahlakını, hastaya verilmesi gereken önemi öğreten, teorik ve pratik anlamda eğitimimin her döneminde bana yol gösteren, tezimin oluşmasında ve devamında her zaman elimden tutan değerli hocam Doç. Dr. Gökhan Polat'a teşekkür ederim.

Kısa bir süre çalışma şansı yakalamama rağmen kendisiyle vakit geçirmekten büyük keyif aldığım ve her zaman minnet duyacağım Prof. Dr. Bilge Bilgiç hocama, tezimde yardımlarını

III

esirgemeyen Prof. Dr. Bülent Zülfişar, Prof. Dr. Memduh Dursun, Doç. Dr. S. Başak Koç Şenol, Dr. Seçkin Çobanoğlu, Arş.Gör.Dr. Sezen Atasoy'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman kapılarını çalabildiğim, eğitimimde büyük katkıları olan hocalarımdan; fikirlerime değer veren Doç. Dr. Fuat Bilgili'ye, bilgisi ve tecrübesiyle bana yol gösteren Doç. Dr. Halil İbrahim Balcı'ya, çok sevdiğim Doç. Dr. Turgut Akgül'e, sohbetinden büyük keyif aldığım Doç. Dr. Ali Erşen'e, Doç. Dr. Ömer Naci Ergin'e teşekkür ederim.

Eğitimim süresince bana olan katkılarından dolayı Op. Dr. Yavuz Sağlam, Op. Dr. Murat Korkmaz, Op. Dr. Taha Kızılkurt'a, bilgileriyle beni aydınlatan ve her türlü çalışmada desteklerini benden esirgemeyen çok sevdiğim Op.Dr. Mehmet Demirel, Op.Dr. Serkan Bayram'a, asistanlık hayatımda her zaman yanımda olan ve gelecekte her zaman yanımda olmalarını dilediğim Dr. Berkan Anarat, Dr. Şahin Karalar, Dr. Alper Şükrü Kendirci, Dr. Koray Şahin, Dr. Emre Kocazeybek, Dr. Emre Meriç, Dr. Fatih Şentürk, Dr. İlhan Sulejmani ve diğer asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca yanımda olan, sonsuz sevgi ve saygı duyduğum annem Nazifer Mert'e, çok sevdiğim biricik kardeşim Baver Mazlum Mert'e, desteklerini esirgemeyen Ömer İskender Kaya ve Nurgül Kaya'ya teşekkür ederim.

Dr. Lezgin MERT

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VII
RESİMLER LİSTESİ.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR LİSTESİ.....	XI
I. ÖZET	1
II. GİRİŞ	5
III. GENEL BİLGİLER	7
III.A. SİNOVYAL DOKU VE HİSTOLOJİSİ	7
III.B. KIKIRDAK DOKUSU VE HİSTOLOJİSİ	9
III.C. HEMOFİLİ A VE B	14
III.C.1. Tanım, Prevalans, Kalıtım.....	14
III.C.2. Koagülasyon Kaskadı ve Hemofili Patofizyolojisi	16
III.C.3. Hemofili Hastalarında Klinik Bulgular	19
III.D. HEMOFİLİK ARTROPATİ	20
III.D.1. HEMOFİLİK ARTROPATİ PATOFİZYOLOJİSİ	21
III.D.1.a. Sinovyal İnflamasyon.....	21
III.D.1.b. Kıkırdak Dejenerasyonu	22
III.D.1.c. Kemik Hasarı	23
III.D.2. HEMOFİLİK ARTROPATİ RADYOLOJİK SINIFLAMASI	26
III.D.3. HEMOFİLİK ARTROPATİ TEDAVİSİ	28
III.D.3.A. PROFİLAKTİK FAKTÖR REPLASMAN TEDAVİSİ.....	28
III.D.3.B. HEMOFİLİK ARTROPATİDE AKUT HEMARTROZ TEDAVİSİ.....	30
III.D.3.C. HEMOFİLİK ARTROPATİDE KRONİK SİNOVİTİN TEDAVİSİ	32
III.D.3.d. Hemofilik Artropatide Eklem İçi İlaçlar.....	35

III.D.3.e. Fizik Tedavi.....	35
III.D.3.f. Cerrahi Tedavi	36
III.D.3.g. HA Patogenezine Dayalı Tedavi İçin Potansiyel Hedefler ve İlaçlar	37
III.E. VEGF	39
III.F. BEVACİZUMAB	40
IV. AMAÇLAR	43
V. GEREÇ VE YÖNTEM	45
V.A. DENEY HAYVANLARI VE GRUPLANDIRMA	45
V.B. HEMOFİLİK ARTROPATİ MODELİNİN OLUŞTURULMASI	45
V.C. GRUPLARA GÖRE EKLEM İÇİ ENJEKSİYONLAR	47
V.D. GÖRÜNTÜLEME VE SAKRİFİKASYON.....	49
V.D.1. Manyetik Rezonans (MR)	49
V.D.2. Sakrifikasyon	51
V.E. MAKROSKOPİK İNCELEME	51
V.F. MİKROSKOPİK DEĞERLENDİRME	52
V.F.1. Hematoksilen Eozin Boyama Prosedürü	52
V.F.2. Safranin O Boyama Prosedürü	52
V.F.3. İmmünohistokimyasal İnceleme.....	53
V.F.4. Histolojik Değerlendirme ve Skorlamalar.....	53
V.F.5. İstatistiksel Analiz Yöntemi.....	54
VI. BULGULAR.....	57
VI.A. MAKROSKOPİK BULGULAR.....	57
VI.B. MİKROSKOPİK BULGULAR.....	60
VI.B.1. Sinovyal Doku.....	60
VI.B.2. Kıkırdak	65
VI.B.3. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	67
VI.C. GÖRÜNTÜLEME BULGULARI.....	70
VI.C.1. MR	70
VII. TARTIŞMA	73

VIII. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	80
IX. KAYNAKLAR.....	81
X. ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM.....	100



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Hemofili geni aktarımının şansı.....	15
Şekil 2: Koagülasyon kaskadı	16
Şekil 3: Hücre merkezli hemostaz modeli	18
Şekil 4: Hemartroz, kronik sinovit ve ilerleyici artropati döngüsü.....	20
Şekil 5: Hemofilik artropatinin şematik görünümü	21
Şekil 6: Hemofilik artropatinin patofizyolojisi	25
Şekil 7: Akut hemartrozun yönetimi.....	31
Şekil 8: VEGF ailesi üyeleri ve izoformlarının reseptörlerine etkileri	40
Şekil 9: Bevacizumabın etkilerinin şematik görünümü	41
Şekil 10: Çalışma yönetiminin şeması	48
Şekil 11: Western blot yöntemiyle analiz edilen VEGFA proteini.....	68

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Diartroz eklemler	8
Resim 2: Kıkırdak sinovyum	8
Resim 3: Sinovyal membran mikroskopik ve şematik görünümü	9
Resim 4: Kıkırdak tabakalarının şematik ve mikroskopik görüntüsü.....	12
Resim 5: Tavşan kıkırdak dokusu.....	13
Resim 6: Modifiye Arnold-Hilgartner sınıflaması.....	28
Resim 7: Tavşan dorsal kulak veninden kan alınması	46
Resim 8: Tavşan diz eklemi enjeksiyonu	47
Resim 9: Dinamik kontrastlı MR.....	50
Resim 10: Eklem çaplarının kumpas yardımıyla ölçülmesi	51
Resim 11: Makroskopik diz eklemi görüntüleri	57
Resim 12: Makroskopik diz eklemi görüntüleri 2	58
Resim 13: Sinovyal doku histopatolojik değerlendirme 1	60
Resim 14: Sinovyal doku histopatolojik değerlendirme 2.....	61
Resim 15: Sinovyal doku histopatolojik değerlendirme 3	62
Resim 16: Sinovyal doku histopatolojik değerlendirme 4	63
Resim 17: Kıkırdak dokusunun histopatolojik incelemesi	65
Resim 18: Kıkırdak dokusunun histopatolojik incelemesi 2	66
Resim 19: Dinamik MR görüntülerinde sinyal değişimleri.....	70
Resim 20: Dinamik MR görüntülerinde sinyal değişimleri 2.....	71

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Kıkırdak dokusu tipleri ve özellikleri.	10
Tablo 2: Kanama şiddetinin pıhtılaşma faktörü düzeyi ile ilişkisi	19
Tablo 3: Farklı anatomik bölgelerdeki yaklaşık kanama sıklığı.....	19
Tablo 4: Hemofilik artropati radyolojik skorlamasında kullanılan Pettersson skoru	26
Tablo 5: Arnold-Hilgartner radyolojik sınıflaması.....	27
Tablo 6: Kimyasal, radyoaktif ve cerrahi sinovektomi tedavilerinin karşılaştırılması.....	34
Tablo 7: HA patogenezinin dayalı tedavi için potansiyel hedefler	38
Tablo 8: Sinovyal skorlama	55
Tablo 9: Tavşan dizi eklem kıkırdağı OARSI skorlaması.....	56
Tablo 10: Makroskopik eklem çap ölçümlerinin grup içi karşılaştırmaları	59
Tablo 11: Sinovyal skorlarda grup içi karşılaştırmalar	64
Tablo 12: OARSI skorunda grup içi karşılaştırmalar	66
Tablo 13: Dinamik MR sinyal değişimi	72

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1: Eklem çapları gruplara göre karşılaştırılması	59
Grafik 2: Sinovyal skorların gruplara göre karşılaştırılması.....	64
Grafik 3: OARSI skorunun gruplara göre karşılaştırılması.....	67
Grafik 4: Western blot yöntemiyle analiz edilen VEGFA proteini.....	69
Grafik 5: Dinamik kontrastlı MR çekimi sinyal yoğunluk değişimlerinin karşılaştırılması	72



KISALTMALAR LİSTESİ

AHL: Antihemofilik Faktör

APC: Aktive Protein C

DNA: Deoksiribonükleik asit

Faktör I: Fibrinojen

Faktör IIa: Trombin

FII: Faktör II

FIV: Faktör IV

FV: Faktör V

FVa: Faktör V aktive

FVII: Faktör VII

FVIII: Faktör VIII

FX: Faktör X

FXI: Faktör XI

FXIa: Faktör XI aktive

FXII: Faktör XII

FXIIa: Faktör XII aktive

FXIII: Faktör XIII

HA: Hemofilik artropati

IFN γ : İnterferon gama

IL: İnterlökin

ISTH: Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Derneği

İA: İntraartiküler

KMY: Kemik mineral yoğunluğu

MCP-1: Monosit kemoatraktan protein-1

MIF: Migrasyon inhibitör faktör

MMP: Matriks metalloproteinazlar

NFκB: Nükleer faktör kappa B

NRP: Nöropilin

OA: Osteoartrit

OPG: Osteoprotegerin

PAR: Proteinaz aktive edilmiş reseptör

PlGF: Plasenta büyüme faktörü

PRP: Trombositten zengin plazma

RANK-L: Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör κB Ligand

RANK: Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör κB

ROI: İlgili alan boyutu

SDF-1α: Stromal hücre kaynaklı faktör 1α

TDA: Total diz artroplastisi

Tf: Doku faktörü

TFPI: Doku faktörü yolak inhibitörü

TNFα: Tümör nekroz faktör α

UKHCDO: Birleşik Krallık Hemofili Merkezi Doktorları Organizasyonu

VEGF: Vasküler kaynaklı endotelyal büyüme faktörü

WFH: Dünya Hemofili Federasyonu

I. ÖZET

Hemofilik Artropatide Eklem İçi Bevacizumab Enjeksiyonunun Kıkırdak ve Sinovya Üzerindeki Etkisinin Araştırılması: Deneysel Hayvan Çalışması

Amaç: Hemofilik Artropati (HA), en sık hemofili hastalarında görülen ve tekrarlayan hemartrozlara bağlı olarak sinovyum ve kıkırdakta ciddi hasara yol açabilen önemli bir morbidite nedenidir. Bevacizumab son yıllarda belli kanser türlerinin tedavilerinde kullanımı artan monoklonal vasküler endotelyal büyüme faktörü inhibitörüdür. Bu çalışmanın amacı HA'lı hastalarda hedefe yönelik tedavide eklem içi Bevacizumab uygulamasının kıkırdak ve sinovyum üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Yöntem: 21 adet Yeni Zelanda tavşanı HA modeli oluşturmak üzere 3 gruba ayrıldı. HA modeli oluşturmak için tavşanların kulaklarından alınan otolog kan sağ ve sol diz eklemlerine; haftada 2 kez olmak üzere hafif artropati oluşturmak için 8 hafta süresince, ağır artropati oluşturmak için 16 hafta süresince enjekte edildi. Hafif artropati grubunda sağ diz eklemlerine 2 haftada bir kez Bevacizumab eklem içi enjeksiyonu yapıldı. Ağır artropati gruplarından birinin sağ diz eklemlerine 16 hafta süresince 2 haftada bir kez eklem içi Bevacizumab, ağır artropati gruplarından diğerine 8. haftadan sonra 2 haftada bir kez eklem içi Bevacizumab enjeksiyonu sağ diz eklemlerine yapıldı. Bütün artropati gruplarının sol diz eklemlerine Bevacizumab'a eşit hacimde %0.9 salin enjeksiyonu yapıldı. 4 adet Yeni Zelanda tavşanının 8 adet diz eklemi kontrol grubu olarak belirlendi ve herhangi bir işlem uygulanmadı. Bevacizumab'ın etkinliğini değerlendirmek için Manyetik Rezonans (MR) görüntüleme sonrası kıkırdak ve sinovyumdan alınan örneklerde makroskopik, mikroskopik ve immünohistokimyasal değerlendirme yapıldı.

Bulgular: Ağır artropati grubunda kıkırdak ve sinovyumda hemosiderin birikimine bağlı renk değişikliği hafif artropati grubuna göre daha fazlaydı. Ağır artropati gruplarında eklem içi bevacizumab uygulanan diz eklemi çapı, karşı dize göre daha düşük bulundu ($p=0,016$), ($p=0,0313$). Ağır artropati gruplarından başlangıçtan itibaren eklem içi bevacizumab tedavisi almış olan grupta, kıkırdak hasarını gösteren OARSI skoru ve sinovyal hasarı gösteren skorlar daha düşük olduğu görüldü ($p=0,016$). Ağır artropati gruplarında perfüzyonu gösteren dinamik

kontrastlı MR'da sinyal yoğunluk değişimi kontrol grubu dize göre artmış olarak görüldü (p=0,012).

Sonuç: Bevacizumab eklem içi enjeksiyonu; HA gelişimi sırasında erken tedaviye başlandığı zaman kıkırdak ve sinovya üzerinde oluşacak hasarı azalttığı çalışmamızda gösterilmiştir. Bu alışma HA'da tekrarlayan kanamalara sekonder oluşan sinovyal değişiklikler ve kıkırdak yıkımını yavaşlatmak ya da engellemek açısından hedefe yönelik tedavide eklem içi Bevacizumab'ın kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir.



ABSTRACT

Investigation of the Effect of Bevacizumab on Cartilage and Synovium in Hemophilic Arthropathy: An Experimental Animal Study

Background/objective: Hemophilic Arthropathy (HA) is an important cause of morbidity that is most commonly seen in patients with hemophilia and can cause serious damage to the synovium and cartilage due to recurrent hemarthrosis. Bevacizumab is a monoclonal vascular endothelial growth factor inhibitor that has been increasingly used in the treatment of certain cancer types in recent years. This study aims to investigate the effect of intra-articular Bevacizumab administration on cartilage and synovium in targeted therapy in patients with HA.

Methods: 21 New Zealand rabbits were divided into three groups to form the HA model. To create the HA model, autologous blood from the ears of rabbits was injected into the right and left knee joints twice a week for eight weeks for mild arthropathy and sixteen weeks for severe arthropathy. In the mild arthropathy group, bevacizumab was injected into the right knee once every two weeks. Bevacizumab was injected into the right knee of one of the severe arthropathy groups once every two weeks for 16 weeks, and intra-articular Bevacizumab injections were administered to the right knees of the other group of severe arthropathy once every two weeks after the 8th week. An equal volume of 0.9% saline was injected into the left knee of all arthropathy groups. Eight knee joints of four New Zealand rabbits were determined as the control group and no action was taken. To evaluate the efficacy of bevacizumab, macroscopic, microscopic, and immunohistochemical evaluations were performed on samples, which has taken from cartilage and synovium after Magnetic Resonance (MR) imaging.

Results: In the severe arthropathy group, discoloration due to hemosiderin deposition in the cartilage and synovium was higher than in the mild arthropathy group. In severe arthropathy groups, intra-articular bevacizumab applied knee joint diameter was found to be lower than the contralateral knee ($p=0.016$). In the severe arthropathy group, the OARSI score indicating cartilage damage and the scores indicating synovial damage was lower in the group that received intra-articular bevacizumab treatment from the beginning ($p=0.016$). Signal intensity change in the dynamic contrast MRI showing perfusion in severe arthropathy groups was observed to be increased compared to the control group knee ($p=0.012$).

Conclusions: It has been shown in our study that Bevacizumab intra-articular injection when treatment is started early during the development of HA, it reduces the damage to the cartilage and synovium. This study supports the view that intra-articular Bevacizumab can be used in targeted therapy to slow down or prevent synovial changes and cartilage destruction secondary to recurrent bleeding in HA.



II. GİRİŞ

Hemofili, X'e bağılı resesif olarak aktarılan Faktör VIII veya Faktör IX eksikliği giden kalıtsal bir hastalıktır. Faktör VIII eksikliği sonucu oluşan Hemofili A tüm hemofili vakalarının %85'ini oluşturur ve insidansı 5.000 canlı erkek doğumda 1'dir. Faktör IX eksikliği sonucu oluşan Hemofili B ise tüm hemofili vakalarının %15'ni oluşturur ve insidansı 30.000 canlı erkek doğumda 1'dir [3]. Tekrarlayan spontan eklem kanamaları, hemofilinin en sık görülen belirtisidir [4].

Hemofilik artropati; en sık hemofili hastalarında görünen tekrarlayan hemartrozlar nedeniyle gelişen, kronik sinovit ve kıkırdak hasarı ile seyreden önemli bir morbidite nedenidir [5]. Sinovyumun kana maruz kalması, sinovyal dokunun polimorfonükleer hücreler ve daha sonra monositler ve lenfositler tarafından infiltrasyonu ile akut bir inflamatuvar reaksiyona neden olur. Bunun sonucunda villöz hipertrofi, hemosiderin birikimi ve sinovyal dokunun vaskülaritesinde artış yani neovaskülarizasyon oluşur [6, 7]. İnflame, villöz, hipervaskülarize ve kırılğan damarlara sahip sinovyal doku, bir kısır döngüye neden olarak daha fazla kanamaya duyarlı bir eklem oluşturur. Bu duruma kronik sinovit adı verilir [8].

Neoanjiogenez, önceden var olan kılcal damarlardan yeni kan damarları oluşumu olarak tanımlanır [9]. Vasküler endotel hücrelerinden salgılanan vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) neoanjiogenezde anahtar mediyatör olarak görülmektedir [10]. Yapılan çalışmalar sonucunda VEGF'nin hemofilik artropatide oluşan neoanjiogenezde önemli bir rol üstlendiği ortaya konulmuştur [11].

Bevacizumab (Avastin®, Genentech/Roche), metastatik kolorektal kanserlerin, ileri non-skumöz küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin, metastatik renal hücreli karsinomun, tekrarlayan glioblastomanın, ileri evre serviks kanserinin tedavisi için onaylanmış bir anjiyogenez inhibitörüdür [12]. Bevacizumab, hem normal hem de tümör anjiyogenezi için gerekli olan insan VEGF A'nın tüm izoformlarına ve biyoaktif proteolitik fragmanlarına bağlanan bir rekombinant insanlaştırılmış monoklonal antikor olarak etki gösterir [13].

Hemofilik artropati tedavisinde en temel yaklaşım faktör replasmanı ile eklem içi kanamaların önüne geçmek ve kanamaları durdurmaştır [14]. Genellikle profilaktik pıhtılaşma faktörü replasmanına rağmen artropatinin ilerlemesinin nedenleri halen belirsizliğini korumaya

devam etmektedir [15]. Patogenezi göz önüne alındığında hemofilik artropatide, hastalık modifiye edici tedaviler için potansiyel hedefler demir, inflamasyon, vasküler yeniden şekillenme, hiperfibrinoliz, kemik remodelasyonu ve kırıkta yenilenmesidir [16].

Çalışmamızın amacı hemofilik artropatide kısır döngüye neden olan neoanjiogenezi ortadan kaldırmak ve bunun sonucunda sinovya ve kırıkta dokusundaki oluşacak sekonder hasarı engellemektir. Bu bağlamda eklem içi bevacizumab uygulamasının hemofilik artropati gelişimi sırasında, tekrarlayan eklem içi kanamalarda hedefe yönelik tedavide kırıkta ve sinovya üzerinde koruyucu etki yapacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamız doğrultusunda yaptığımız literatür incelemesinde hemofilik artropatide Bevacizumab'ın kullanımı ile ilgili yapılan bir çalışma saptamadık. Bu sebeple çalışmamızı deney hayvanları üzerinden planladık. Eklem anatomisi ve kırıkta yapısı mikroskopik ve makroskopik olarak insanlardakine benzediğinden, aynı cins, ağırlık ve cinsiyeti bulmak nispeten daha kolay olduğundan deney hayvanı tavşan olarak belirledik. İnsanlardaki hemofilik artropatiye benzer diz eklemi oluşturabilmek için Madhok ve ark. daha önce tanımladığı hemofilik artropati tavşan modelini çalışmamızda uyguladık [17]. Aşağıda verilen hipotezlerin çalışmamızın amacını gerçekleştirmede yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

Hipotez I: Eklem içi bevacizumab enjeksiyonu hafif hemofilik artropati gelişimi sırasında VEGF inhibisyonu ile sinovya ve kırıkta hasarı azaltır.

Hipotez II: Eklem içi bevacizumab enjeksiyonu ağır hemofilik artropati gelişimi sırasında VEGF inhibisyonu ile sinovya ve kırıkta hasarı azaltır.

Hipotez III: Eklem içi bevacizumab enjeksiyonu hafif artropati geliştikten sonra ağır artropatiye gidişi engeller.

III. GENEL BİLGİLER

III.A. Sinovyal Doku ve Histolojisi

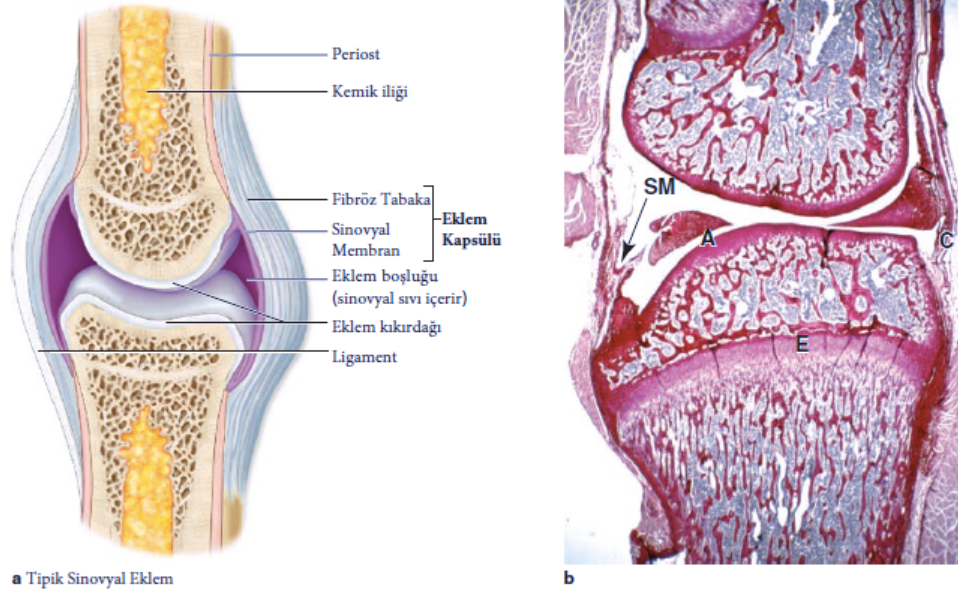
Eklem, iki veya daha fazla kemiğin hareket edebilmesini sağlayan, iskelet sistemini işlevsel bir bütün haline getiren, vücuttaki kemikler arasındaki bağlantıdır [18]. Fonksiyonel olarak eklemler sinartroz (hareketsiz), amfiartroz (kısmi hareketli) ve diartroz (hareketli) olarak üçe ayrılır. Diartroz eklemler kemikler arası harekete izin verir [19]. Sinovyum, eklem kıkırdağının kenarlarından uzanan; temporomandibular eklem ve vertebral cisimlerin faset eklemleri dahil olmak üzere diartroz eklemlerin kapsülünü örten membranöz bir yapıdır [20, 21]. Sağlıklı sinovyum, eklem içi tendonları, bağları, yağ yastıklarını örter. Ancak eklem kıkırdağı veya menisküs dokusunu örtmez. Sinovyum ya da diğer adıyla sinovyal membran histolojik olarak iki tabakaya ayrılır. Bu tabakalar intima ve subintima olarak adlandırılır. İntima, sinovyal sıvı içeren kavite ile subintimal tabaka arasındaki ara yüzü temsil eder. Plevra veya perikardın aksine genellikle sıkı bağlantılar, epitel hücreleri ve bazal membrandan yoksundur. Subintima tabakası, fibrovasküler bağ dokusundan oluşur ve fibröz eklem kapsülü ile birleşir [22].

Sinovyal intima tabakası, eklem boşluğunun luminal yönü üzerinde dizilmiş sinovyal yüzey hücrelerinden oluşur. Sinoviyositler olarak adlandırılan sinovyal yüzey hücreleri, homojen değildir ve A tipi (makrofaj benzeri) sinoviyositler ve B tipi (fibroblast benzeri) sinoviyositler olmak üzere iki gruba ayrılırlar [23].

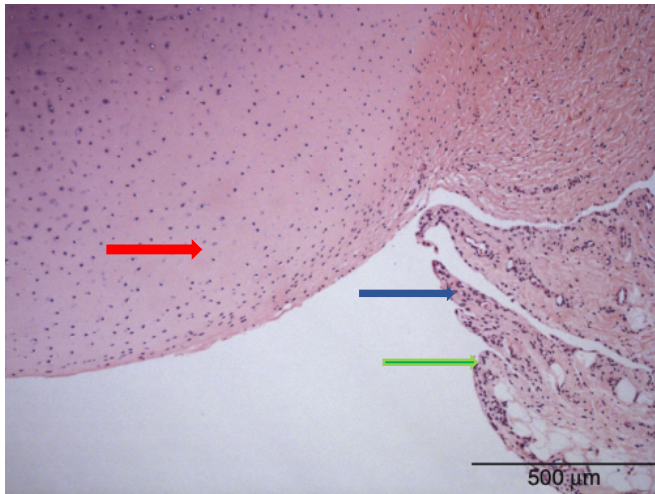
A tipi hücreler olarak da adlandırılan makrofaj benzeri sinovyal hücreler, monositlerden köken alır. Sinovyal sıvıdaki aşınma ve yıpranma bağlı oluşan kalıntıları fagosit ederler. Sinovyum kaplayan hücrelerin yaklaşık %25'ini temsil eden bu modifiye makrofajlar, diartroz grubu eklemlerdeki inflamatuvar olayların düzenlenmesinde rol alırlar [23].

Fibroblastik sinovyal hücreler veya diğer adıyla B tipi hücreler, bol miktarda hyalüronan ve daha az miktarda proteoglikan üretirler. B tipi hücrelerden üretilen bu maddeler, kapiller damarlardan su ile beraber salgılanarak sinovyal sıvıyı oluştururlar. Sinovyal sıvı eklem lubricasyonunda ve eklem kıkırdağına besin ve oksijen taşınmasında önemli rol oynar [1].

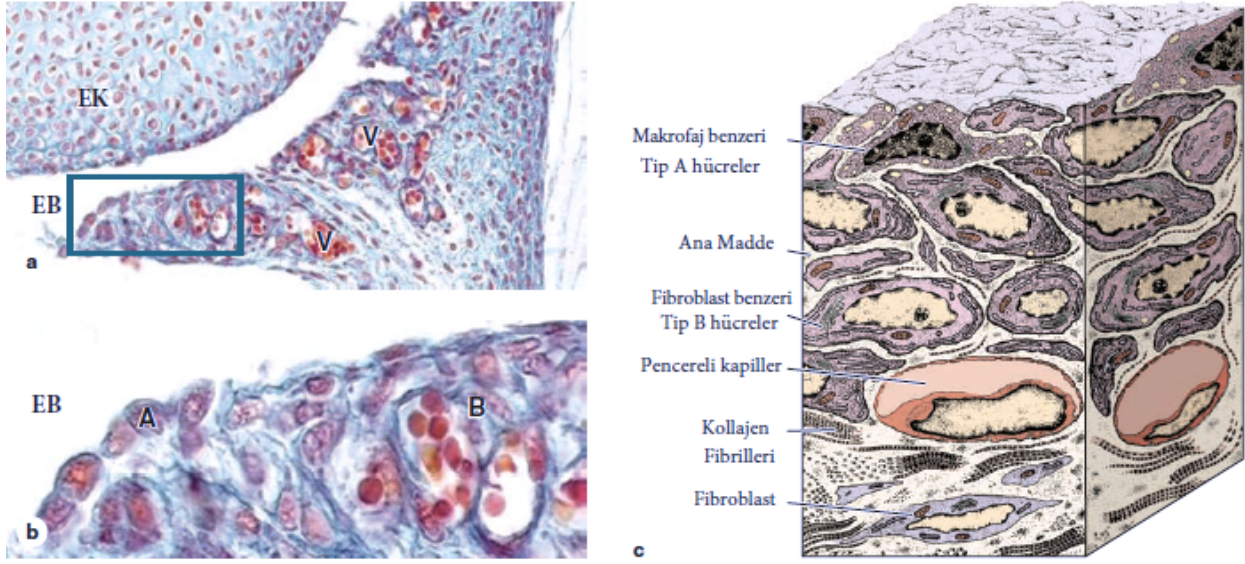
Diartroz eklemlerin anabileşenlerini gösteren şematik görünüm ve diartroz eklemlere örnek olarak gösterilen fare diz eklemine mikroskopik görünümü Resim 1'de gösterilmiştir.



Resim 1: Diartroz eklemler, diz ve dirsek eklemleri gibi eklemlerin serbest hareketine izin veren eklemlerdir. a: Diartroz eklemın ana bileşenlerini gösteren şematik görünüm. Şekilde gösterildiği gibi sinovyal membran kapsülü içerden örter ve sinovyal sıvıyı üretir. b: Diartroz eklemlere örnek olarak fare diz eklemının görüntüsü. E: Enkondral kemikleşmenin meydana geldiği epifiz tabakası. C: Eklem Kapsülü. A: Eklem kıkırdağı ve SM: Sinovyal membran. Sinovyal membran kıvrımları ok ile gösterilmiştir. L Mescher, Anthony. "Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, FIFTEENTH." (2018) kitabından alıntılanarak yeniden düzenlenmiştir [1].



Resim 2: Kıkırdak sinovyum birleşimi. Hiyalin eklem kıkırdağının görüntüsü kırmızı ok ile gösterilmiş olup; sinovyal membran mavi ok ile gösterilmiştir. Yeşil ok birkaç sıra halinde dizilen sinovyal intima tabakası hücrelerini göstermektedir. Firestein, Gary S., et al. Firestein & Kelley's Textbook of Rheumatology-E-Book. Elsevier Health Sciences, 2020. kitabından alıntılanarak yeniden düzenlenmiştir [22].



Resim 3: Sinovyal membran mikroskopik ve şematik görünümü. Sinovyal membran sinovyal eklemlerin kapsüllerini örten özel bir bağ dokusudur. a) Sinovyal membran uzantıları eklem boşluğuna (EB) doğru uzanır ve birçok küçük kan damarı (V) içerir. Eklem boşluğu eklem kıkırdığını (EK) çevreler (X100; Mallory Trikrom boyama). b) Sinoviyosit adı verilen iki özel hücre tipini gösteren sinovyal uzantının daha fazla büyütülmesi. A: Doku yüzeyinde sinovyal sıvı ile temas eden, monositlerinden köken alan birçok yuvarlak makrofaj benzeri sinovyal hücre (tip A hücreler). Bu hücreler genellikle doku yüzeyinde bir tabaka oluşturur. Ancak bazal membranları yoktur ve hücreler hücre bağlantılarıyla birbirine bağlanmazlar. B: Fibroblast benzeri sinovyal hücreler (tip B hücreler) mezenkimal dokudan köken alır ve sinovyal sıvıya giren ve onu yenileyen hyalüronanın sentezini sağlar. c) Sinovyal membran histolojisinin şematik gösterimi. L Mescher, Anthony. "Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, FIFTEENTH." (2018) kitabından alınılanarak yeniden düzenlenmiştir [1].

III.B. Kıkırdak Dokusu ve Histolojisi

Kıkırdak, yüksek konsantrasyonlarda glikozaminoglikan ve proteoglikan içeren, kolajen ve elastik liflerden zengin, hücre dışı matriks ile karakterize, sert, dayanıklı, destekleyici bağ dokusudur. Kıkırdak, iskelet sisteminde matriksinin yapısal özellikleri nedeniyle mekanik ve koruyucu rollere sahiptir. Esnek, pürüzsüz ve kaygan yüzeyi nedeniyle kıkırdak, iskelet sisteminde

mekanik stresler sonucu oluşan şokun emilmesini, eklem hareketi sırasında sürtünmeyi azaltarak eklem hareketlerinin kolaylıkla yapılmasını sağlar. Kıkırdak aynı zamanda hem doğumdan önce hem de doğumdan sonra uzun kemiklerin gelişimine ve büyümesine rehberlik eder. Ekstrasellüler matrikse gömülü kondrosit adı verilen hücrelerden oluşur [1].

Histolojik ve mekanik özellikler temelinde üç farklı tip kıkırdak dokusu bulunmaktadır. Bunlar hiyalin, elastik ve fibröz kıkırdak olarak isimlendirilirler [24].

	Hiyalin Kıkırdak	Elastik Kıkırdak	Fibröz kıkırdak
Hücre dışı matriksin ana özellikleri	Tip II kollajen ve agrekan ile homojen yapıda	Tip II kollajen, agrekan ve daha koyu elastik lifler	Tip II kollajen ve tip I kollajen
Temel hücreler	Kondrosit, Kondroblast	Kondrosit, Kondroblast	Kondrosit, Fibroblast
Kondrositlerin düzeni	İzole veya küçük izogen gruplar halinde	Genellikle küçük izogen gruplar halinde	Tek tek ya da izogen grup dizileri halinde
Perikondrium varlığı	Evet (epifiz ve eklem kıkırdağı hariç)	Evet	Hayır
Bulunduğu yerler	Üst solunum yollarının birçok bileşeni, uzun kemiklerin eklem uçları ve epifiz, embriyonik iskelet	Dış kulak, eksternal akustik meatus, epiglot	İntervertebral disk, simfizis pubis, menisküs, tendonların inersiyoları
Fonksiyon	Eklemlerde düşük sürtünmeli yüzeyler sağlar; solunum yolu için yapısal destek	Yumuşak dokulara esnek şekil ve destek sağlar	Kompresyon ve gerilime karşı direnç sağlar

Tablo 1: Kıkırdak dokusu tipleri ve özellikleri. L Mescher, Anthony. "Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, FIFTEENTH." (2018). kitabından alıntılanarak yeniden düzenlenmiştir [1].

Hiyalin Kıkırdak: Vücutta en fazla bulunan kıkırdak tipidir. Homojen ve yarı saydamdır. Yetişkinlerde hiyalin kıkırdak, hareketli eklemlerin eklem yüzeylerinde, solunum yollarının duvarlarında, kaburgaların ventral uçları ve sternum ile eklem yaptıkları yerlerde, epifiz tabakalarında bulunur. Uzun kemiklerin boyuna büyümesinde rol alır. Embriyoda hiyalin kıkırdak geçici iskeleti oluşturur [1].

Elastik Kıkırdak: Elastik kıkırdak kulak kepçesi, işitme ve östaki kanallarının duvarlarında bulunur. Elastik kıkırdak hiyalin kıkırdağa benzer ancak farklı olarak matriks boyunca dağılmış elastik demetler (elastin) içerir. Böylelikle sert ancak elastik bir doku özelliği kazanır [25].

Fibröz kıkırdak: İntervertebral diskler, simfizis pubis gibi sert destek ve büyük gerilme kuvveti gerektiren alanlarda, tendonları veya bağları kemiklere bağlayan bölgelerde bulunur [25].

Eklem kıkırdağı hiyalin kıkırdaktan oluşur. Vasküler, lenfatik doku içermez. Olgunluğa eriştiğinde çok zayıf yenilenme potansiyeline sahiptir. Beslenmesini esas olarak sinovyal sıvısından ve bazal subkondral kemikten (kemik iliği) basit difüzyonla sağlar [26, 27]. Yetişkinlerde sinovyal sıvıdan difüzyonla beslenme, ana beslenme kaynağını oluşturmaktadır [28]. Eklem kıkırdağında iki ana bileşen vardır. Bunlar; ekstrasellüler matriks ve kıkırdak boyunca sporadik olarak dağılan kondrositlerdir. Ağırlıklı olarak tip II kolajen, negatif yüklü proteoglikanlar, su ve bazı glikoprotein bileşenlerinden oluşur. Tip II kolajen ve eklem kıkırdağının hidrofilik davranışına katkıda bulunan proteoglikanlar, eklem kıkırdağının gerilme kuvvetlerine karşı direncinde rol oynarlar [29].

Eklem kıkırdağı, yüzeyel tabaka (toplam kıkırdak hacminin %10-20'si), orta tabaka (toplam kıkırdak hacminin %40-60'ı), derin tabaka (toplam kıkırdak hacminin %30-40'ı) ve kalsifiye tabaka olmak üzere 4 farklı tabakadan oluşur. Bu bölgelerin her biri benzersiz yapısal, işlevsel ve mekanik özelliklere sahiptir. Farklı tabakalardaki kondrositler, farklı proteinler salgılayarak uyarılara karşı özel tepkiler gösterirler [30].

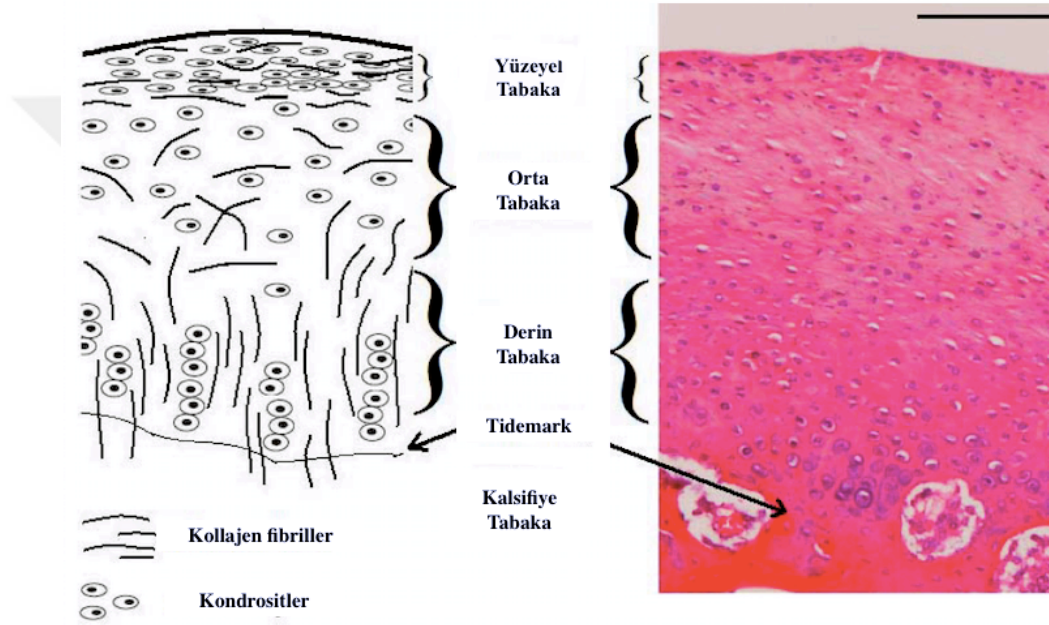
Lamina splendens olarak da bilinen yüzeyel tabaka, toplam kıkırdak kalınlığının %10 ile %20'sini oluşturur. Bu tabakada kondrositler düz ve uzun bir görünüme sahiptir. Kolajen lifleri ağırlıklı olarak tip II kolajenden oluşmuştur. Bu kolajen lifleri yoğun bir şekilde paketlenir ve kıkırdağın tam yüzeyinde yatay olarak dizilirler. Tip II kolajen yüksek oranda çapraz bağlantılar içeren bir kolajen fibril ağı oluşturur. Yüzeyel tabaka sinovyal sıvıya bitişiktir ve diğer tabakalara kıyasla en yüksek miktarda kolajen, ancak en düşük miktarda proteoglikan içeriği içerir. Daha derindeki katmanları deformasyondan korur. Eklem hareketi sırasında yapısındaki kolajen dizilimi nedeniyle kompresyon kuvvetlerine dayanıklıdır [31, 32].

Yüzeyel tabakanın hemen altında orta tabaka bulunur. Orta tabaka, toplam kıkırdak hacminin yaklaşık %40 ile %60'ını oluşturur. Diğer tabakalara göre daha yüksek proteoglikan içeriğine sahiptir ve daha kalın kolajen fibrilleri içerir. Bu bölgedeki kondrositler küresel, sayıları daha az ve dağılımları rastgeledir [30].

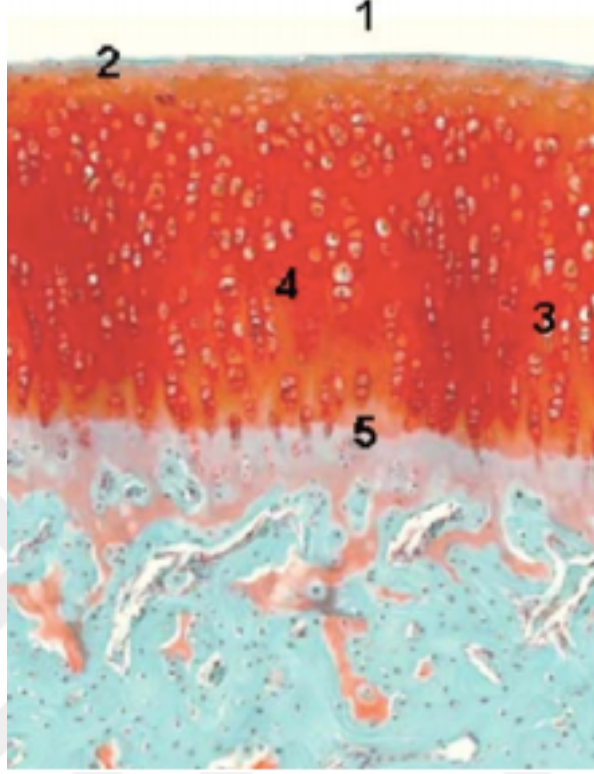
Derin tabaka toplam kıkırdak kalınlığının %30-40'ını oluşturur. Bu katmandaki kondrositler küreseldir ve sütunlar halinde dizilmişlerdir. Bu tabaka en yüksek düzeyde proteoglikan

içerdiğinden, kolajen fibriller daha büyük ve yüzeye dik olarak dizildiğinden kompresyon kuvvetlerine karşı en büyük direnç bu tabakada sağlanır [27].

Derin ve kalsifiye bölge, tidemark adı verilen ince bazofilik bir çizgi ile ayrılır. Tidemark mineralli katmanı mineralsiz katmandan ayırır. Derin tabakadan gelen kolajen fibriller, subkondral kemiğe tutunur. Böylelikle kıkırdak dokuyu kemik dokuya bağlar. Kalsifiye tabakada çok az hücre vardır [30]. Resim 4 ve Resim 5'te kıkırdak tabakaları şematik ve mikroskopik olarak gösterilmiştir.



Resim 4: Kıkırdak tabakalarının şematik ve mikroskopik görüntüsü. Soldaki resim, farklı tabakalar içindeki kolajen lifleri ve kondrositlerin dizilimleri ve şekillerindeki farklılıkları göstermektedir. Sağdaki görüntü Hemotoksilen Eozin boyaması ile boyanan tavşan diz ekleminin femoral kondilinin kıkırdak tabakalarını histolojik olarak göstermektedir. Matsiko, Amos, Tanya J. Levingstone, and Fergal J. O'Brien. "Advanced strategies for articular cartilage defect repair." Materials 6.2 (2013): 637-668. yayınından alınarak yeniden düzenlenmiştir [33].



Resim 5: Tavşan kıkırdak dokusu (Safranin O boyası).1: Pürüzsüz yüzeyel tabaka, 2: Yüzeyel tabakadaki hücreler küçük ve düzdür. 3: Orta tabakadaki hücreler sütunlar halinde dizilmiştir. 4: Kıkırdak matriksi Safranin O ile boyanır. 5: Tidemark. Lorenz, Helga, and Wiltrud Richter. "Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage." Progress in histochemistry and cytochemistry 40.3 (2006): 135-163. yayınından alınmıştır [34].

III.C. Hemofili A ve B

III.C.1. Tanım, Prevalans, Kalıtım

Hemofili A ve B sırasıyla pıhtılaşma faktörleri olan faktör VIII (FVIII) ve faktör IX'u (FIV)kodlayan genlerdeki mutasyonların neden olduğu, X'e bağlı konjenital kanama bozukluğudur. Faktör eksiklikleri, faktör VIII ve faktör IX'u kodlayan pıhtılaşma faktörü genlerindeki patojenik varyantların sonucunda ortaya çıkmaktadır [14].

Hemofili prevalansına ilişkin ulusal hasta kayıt verilerine ve son Dünya Hemofili Federasyonu (WFH) yıllık küresel anketlerine göre; dünya çapında hemofilili erkek sayısının 1.125.000 olduğu tahmin edilmektedir. Bu kişilerin yaklaşık 418.000'i ağır hemofili hastası olduğu ve bu hastaların büyük çoğunluğunun tanı konulmadığı düşünülmektedir. Hemofili A, hemofili B'den çok daha yaygındır. Hemofili A'nın tüm hemofili vakalarının %80-85'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Tahmini prevalans, Hemofili A'nın 100.000 erkekte 17.1 (ağır Hemofili A için 6.0 vaka) ve Hemofili B'nin 100.000 erkekte 3.8 vakadır (ağır Hemofili B için 1.1). Doğumdaki tahmini prevalansı, Hemofili A için 100.000 erkekte 24.6 (ağır Hemofili A için 9.5) ve Hemofili B'nin 100.000 erkekte 5.0 vakadır (ağır Hemofili B için 1.5) [35].

Hemofili genellikle bir FVIII veya FIX gen mutasyonuna sahip X kromozomu yoluyla kalıtılır. Bununla birlikte hem FVIII hem de FIX genleri yeni mutasyonlara eğilimlidir ve tüm vakaların yaklaşık %30'u spontan genetik varyantlardan kaynaklanır. Prospektif çalışmalar, yeni tanı konulan şiddetli hemofili hastalarının %50'sinden fazlasının ailelerinde daha önce hemofili öyküsü olmadığını bildirmektedir [36, 37].

Hemofili A'da kadınlar taşıyıcı olabilir. Taşıyıcıların bir normal ve bir hastalıklı geni vardır. Her çocuğa hastalıklı hemofili genini verme şansı %50'dir. Hastalıklı geni alan erkek çocuklar hemofili olurken kız çocuklar ise taşıyıcı olurlar. Bir ailenin babası hemofili hastasıysa ve annede hemofili geni varsa, kız çocuğuda hemofili olabilir. Fenotiple ilgili olarak, taşıyıcılar genellikle etkilenmez veya hafif derecede etkilenir. Pıhtılaşma FVIII düzeyleri %50'den fazla olan taşıyıcılar kanama eğilimi göstermeyebilir [38]. Ancak bunların yarısında FVIII %50'nin altındadır ve bu nedenle kanlarındaki seviyenin ne kadar düşük olduğu ile orantılı bir kanama eğilimi gösterirler.

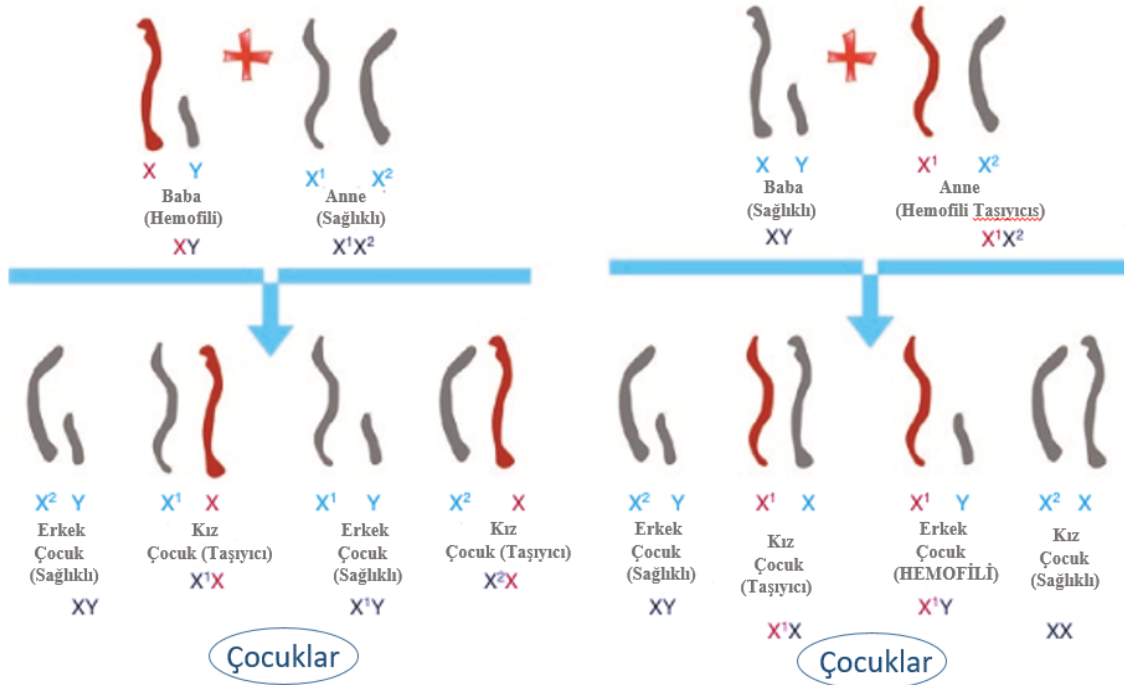
Taşıyıcılar etkilenen X kromozomunu mutlaka taşıyan zorunlu taşıyıcılar ve olası taşıyıcılar olarak ikiye ayrılır.

Zorunlu Taşıyıcılar:

- Hemofilili bir erkeğin tüm kız çocukları
- Hemofilili bir erkek çocuğa sahip ve en az bir aile üyesinde (erkek kardeş, büyükanne, büyükbaba, amca, yeğen veya kuzen) hemofili bulunan anneler
- Hemofili hastası bir erkek çocuğa sahip ve hemofili genini taşıyan bir aile üyesi (anne, kız kardeş, annenin büyükannesi, teyze veya amca) olan anneler
- Hemofilili iki veya daha fazla erkek çocuk annesi

Olası Taşıyıcılar:

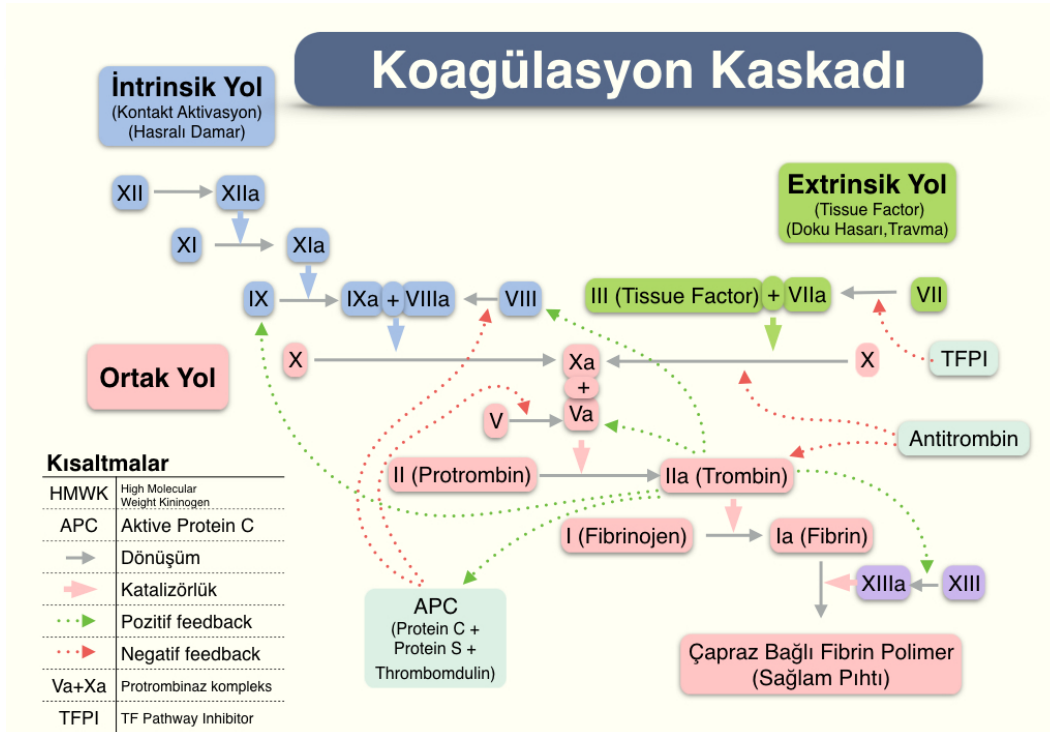
- Bir taşıyıcıdan doğan tüm kız çocukları
- Ailede başka hemofili hastası veya hemofili taşıyıcısı olmayan bir erkek çocuğu hemofili olan anneler
- Taşıyıcıların kız kardeşleri, anneleri, anneanneleri, teyzeleri, yeğenleri ve kadın kuzenleri (Şekil 1) [39].



Şekil 1: Hemofili geni aktarımının şansı: Sol; baba hasta, sağ; anne taşıyıcı olduğunda. Akbar Dorgalaleh (ed.) Congenital Bleeding Disorders Diagnosis and Management kitabından alıntılanıp yeniden düzenlenmiştir [39].

III.C.2. Koagülasyon Kaskadı ve Hemofili Patofizyolojisi

Vücut vasküler sisteminde bir yaralanma gerçekleştiğinde, hasar bölgesinde kan kaybını en aza indirmek ve hemostazı yeniden sağlamak için fizyolojik yanıt ortaya çıkar. Pıhtılaşma kaskadı, vasküler travma tarafından tetiklenen mekanizmalardan biridir. Bu yolun son ürünü fibrin iskelesi üzerine kümelenmiş trombositlerin oluşturduğu pıhtıdır. Koagülasyon kaskadı, her biri farklı bir olay tarafından başlatılan ve hemostazın sağlanmasında benzersiz bir rol oynayan iki farklı yoldan oluşur (Şekil 2).



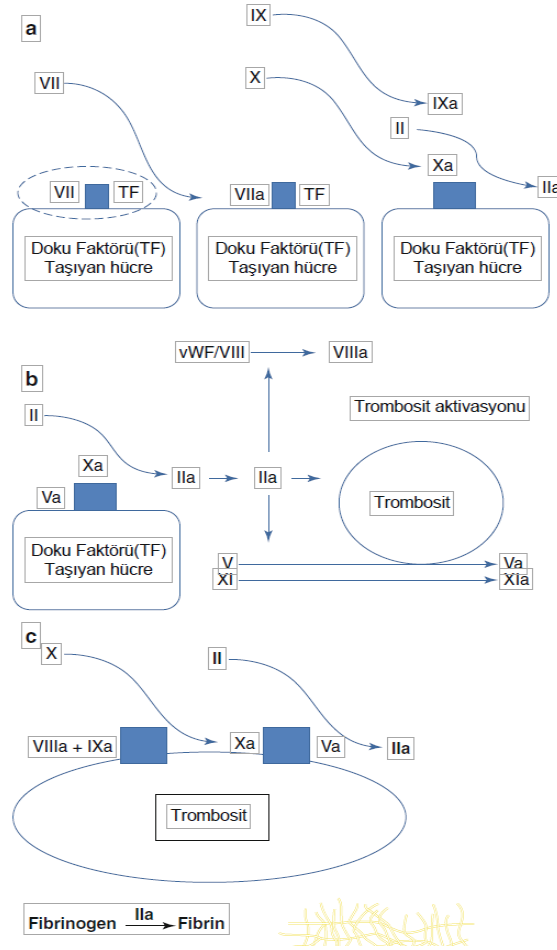
Şekil 2: Koagülasyon Kaskadı. XII: Faktör XII, XIIa: Faktör XII aktive, XI: faktör XI, XIa: Faktör XI aktive, VIII: Faktör VIII, X: Faktör X, V:Faktör V, Va: Faktör V aktive, APC: Aktive Protein C, I: Fibrinojen, XIII: Faktör XIII, XIIIa: Faktör XIII aktive, TFPI: Doku faktörü yolak inhibitörü, II: Faktör II (protrombin), IIa: Trombin, VII: Faktör VII, Tissue factor: Doku faktörü (www.turkcerrahi.com websitesinden alıntıdır.) [40].

Ekstrinsik yolak, hasarlanan endotel hücreleri tarafından serbest bırakılan, faktör VII'yi bağlayan ve aktive eden doku faktörü ile başlar [41]. Ortaya çıkan kompleks, protrombinaz kompleksini oluşturmak için faktör V ile birleşen faktör X'i aktive eder. Protrombinaz, protrombini inaktif fibrinojenden fibrin oluşturan trombine aktive eder. Aynı zamanda faktörler XIII, V ve VIII

de dahil olmak üzere pıhtılaşma kaskadının intrinsek yolunun çeşitli bileşenlerini de aktive eder [42]. Ekstresek yolağın ana işlevi, başlangıçta bir trombin patlaması oluşturmaktır. Doku faktörü yolu inhibitörü tarafından hızlı bir şekilde inhibe edilir, bu noktada kinetik olarak daha etkili intrinsek yol, fibrin pıhtısının büyümesi ve korunması için sorumluluk alır [43]. İntrinsik yol, pıhtılaşma faktörü XII'nin kolajene bağlanması ile başlar. Faktör XII, faktör XI'i proteolitik olarak ayırır. Faktör XI'i, Faktör IX'u etkinleştirir. FIX, Faktör X'nu da aktive eden bir kompleks oluşturmak için ko-faktör VIII ile birleşir. İntrinsik kompleks tarafından faktör X aktivasyon hızının, ekstrinsik karşılığına göre en az 50 kat daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir; sonuç olarak trombinin büyük çoğunluğu (%95) bu yolla üretilir [44, 45]. Ortak yolla Faktör Xa, FVa ile kombinasyon halinde protrombinaz kompleksini oluşturur. Bu kompleks protrombini (Faktör II) trombine dönüştürür ve trombin fibrinojeni fibrin monomerlerine dönüştürür. Bu fibrin monomerleri kararsızdır ve kararlı olmaları için Faktör XIIIa tarafından çapraz bağlanır [39].

Ancak kademeli tip hemostaz modeli uzun süre kabul görmesine rağmen, in vivo gerçek hemostatik süreci tanımlayamadığı için bu modelin eleştirilmesine yol açmıştır. Daha önceki pıhtılaşma modellerindeki başarısızlıklar, 2001 yılında Monroe ve Hoffman tarafından hücre merkezli hemostaz modelinin ("*the cell-based coagulation model*") daha fazla araştırılmasına ve geliştirilmesine yol açmıştır [46]. Bugün bu model geniş çapta kabul edilmekte ve hemostaz sürecinin en iyi tanımı olarak kabul edilmektedir. Hücre merkezli pıhtılaşma modeli, hemostatik sürecin üç farklı örtüşen aşamasını tanımlamaktadır. Bu konseptte göre, birinci basamak olan pıhtılaşmanın başlaması yaralanma meydana geldiğinde ve kan, doku faktörü (TF) taşıyan bir hücreye maruz kaldığında, FVIIa TF'ye hızla bağlanır. TF-FVIIa daha sonra faktör VII'ye bağlanır ve bu da faktör VII'nin faktör VIIa'ya aktivasyonuna yol açar. Uyaran yeterince güçlüyse, protrombinin enzimatik bölünmesiyle üretilen küçük miktarlarda trombinin oluşumuyla sonuçlanan başka pıhtılaşma faktörleri etkinleştirilir. Oluşan küçük miktarlardaki trombin, fibrinojenin fibrine dönüştürülmesi ve fibrin pıhtısının pıhtılaşma faktörü XIII aracılığıyla stabilizasyonu için yeterli değildir. Pıhtılaşma sürecinin ikinci aşaması olan amplifikasyonda; trombin tarafından trombositler aktive edilir ve negatif yüklü fosfolipidler trombojenik aktiviteye katkı sağlar. Bu süreçte pıhtılaşma süreci katalize edilir ve böylece yoğunlaştırılır. Yayılma (propagation) fazında trombin, aktive trombosit yüzeylerine bağlanan ve trombin oluşumunu büyük ölçüde artıran diğer pıhtılaşma faktörlerini aktive eder. Bu mekanizmalar tarafından üretilen

"trombin patlaması", yoğun bir hemostaz uyarımı sağlamakla beraber, fibrinojeni fibrine dönüştürüp, fibrin liflerini çapraz bağlayan ve fibrin pıhtısını stabilize eden faktör XIII'ü faktör XIIIa'yı aktive etmek için yeterlidir (Şekil 3). Önceki modellerin aksine, en son bulgular fibrin oluşumu için pıhtılaşma faktörü XII'nin gerekli olmadığını ve normal hemostaz için uygun olmadığını göstermektedir [47].



Şekil 3: Hücre Merkezli Hemostaz Modeli. a: başlama fazı, b: amplifikasyon fazı, c: Yayılma fazı. Christoph Sucker and Rainer B. Zotz "The Cell-Based Model of Hemostasis" kitabundan alıntılanarak yeniden düzenlenmiştir [47].

Hemofili A ve B de yani FVIII ve FIX'un eksikliğinde, faktör X aktifleşemez ve pıhtılaşma reaksiyonlarının son ürünü olan fibrin oluşmaz. Trombositlerin adhezyon ve agregasyon sonucu meydana getirdiği primer tıkaç, sekonder hemostazda fibrin ile desteklenemeyip pıhtı oluşmaz. Böylelikle hemofili hastalarında görülen kanama ortaya çıkar [48].

III.C.3. Hemofili Hastalarında Klinik Bulgular

Hemofilide karakteristik klinik tablo kanama eğilimidir. Kolay morarma, spontan kanama (eklemlerde, kaslar ve yumuşak dokularda), travma veya ameliyat sonrası aşırı kanama hemofili hastalarında görülen semptomlardır. Hemofilide kanama belirtilerinin şiddeti genellikle pıhtılaşma faktörü eksikliğinin derecesi ile ilişkilidir. Kanama şiddetinin pıhtılaşma faktörü düzeyi ile ilişkisi Tablo 2'de gösterilmiştir [49].

Şiddet	Pıhtılaşma Faktör Düzeyi	Kanama Sıklığı
Ağır	<1 IU/dL (<0.01 IU/mL) ya da <1% normal	Eklemlerde veya kaslarda genellikle spontan kanama
Orta	1-5 IU/dL (0.01-0.05 IU/mL) ya da 1-5% normal	Ara sıra spontan kanama; minör travma veya cerrahi ile uzun süreli kanama
Hafif	5-40 IU/dL (0.05-0.40 IU/mL) ya da 5-40% normal	Büyük travma veya cerrahi ile şiddetli kanama; nadir spontan kanama

Tablo 2: Kanama şiddetinin pıhtılaşma faktörü düzeyi ile ilişkisi [49].

Hafif hemofilisi olan kişilerde ciddi bir travma yaşayana ya da ameliyat olana kadar anormal veya uzun süreli kanama sorunları olmayabilir. Özellikle yenidoğan ve bebeklerde eklem kanamaları şiddetli hemofilinin önemli bir göstergesi olabilir. Yenidoğanlarda ve 2 yaşından küçük ağır hemofilisi olan çocuklarda yaygın kanama türleri arasında; yumuşak doku ve kas içi kanama, tıbbi bir prosedürle ilişkili kanama (örn. damar yolu açılması, sünnet, topuktan kan alınması), mukokutanöz kanama (örn. oral, nazal), ekstrakraniyal kanama görülebilmektedir [50, 51]. Bazı kanama türleri yaşamı tehdit edebilir, acil tedavi ve tıbbi müdahale gerektirebilir. Şiddetli hemofilisi olan kişilerde en sık eklemlerde, kaslarda ve iç organlarda kanama görülür. Anatomik bölgelere göre yaklaşık kanama sıklığı Tablo 3'te gösterilmiştir [14].

Kanama Bölgesi	Yaklaşık Sıklık (%)
Menteşeli eklemlerde daha yaygın: ayak bileği, diz, dirsek. Çok eksenli eklemlerde daha az yaygın: omuz, el bileği, kalça	70-80%
Kaslar	10-20%
Diğer	5-10%
Santral Sinir Sistemi	<5%

Tablo 3: Farklı anatomik bölgelerdeki yaklaşık kanama sıklığı. WFH Guidelines For The Management Of Hemophilia 3rd edition klavuzundan alıntıdır [14].

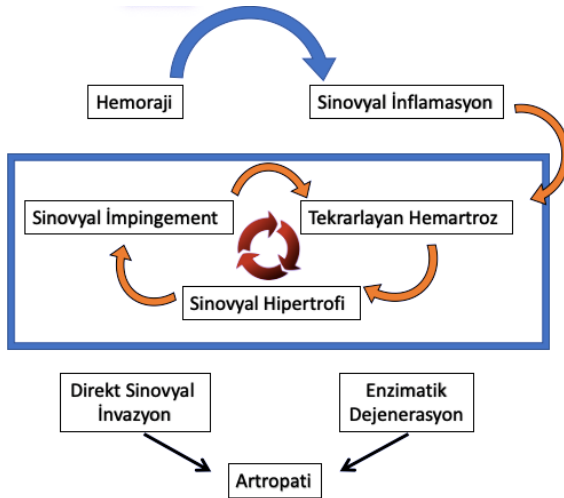
III.D. Hemofilik Artropati

Spontan eklem kanaması, kalıtsal pıhtılaşma bozukluğu olan hemofilinin karakteristik belirtisidir. Ayrıca antikoagülan tedavinin bir komplikasyonu, Von Willebrand hastalığı gibi diğer kanama bozukluklarında, travma veya eklem ameliyatları sırasında da meydana gelebilir [52-55]. Altta yatan nedenden bağımsız olarak hemartroz; eklem dokusu hasarına ve ardından büyük morbiditeye yol açabilir.

HA, tek bir kanamadan veya tekrarlayan kanamalardan kaynaklanabilir. Genellikle hemartroz, kronik sinovit ve eklem yüzeyinin erozyonlarına doğru ilerler ve eklem yıkımının son aşaması olan kronik HA ile sonuçlanır [56]. Özellikle profilaktik tedavinin mevcut olmadığı veya yetersiz olduğu durumlarda sıklıkla yaşamın ikinci on yılında ortaya çıkar. Şiddetli hemofili hastalarının yaklaşık %25'inde diğer eklemlere kıyasla sonraki kanamalara daha duyarlı hale gelen ve son altı ayda üç veya daha fazla hemartrozun meydana geldiği eklem "hedef eklem" olarak tanımlanır [57].

Eklem içine tekrarlayan kanamalar, sinovyal dokuda kan hücre kalıntılarının birikmesiyle sinovyal inflamasyonu ve proliferasyonu tetikleyen bir kısır döngüye yol açar [58, 59]. Aynı zamanda, sinovyal dokuda zengin, yeni, kırılabilir kan damarı ağının gelişimini indüklenir [60]. Hastanın fizik muayenesinde eklem ödemli görünür, ısı artışı vardır ancak genellikle eklem gergin ve ağrılı değildir. Sinovitin erken evrelerinde eklem hareket açıklığı korunur, ancak kronik

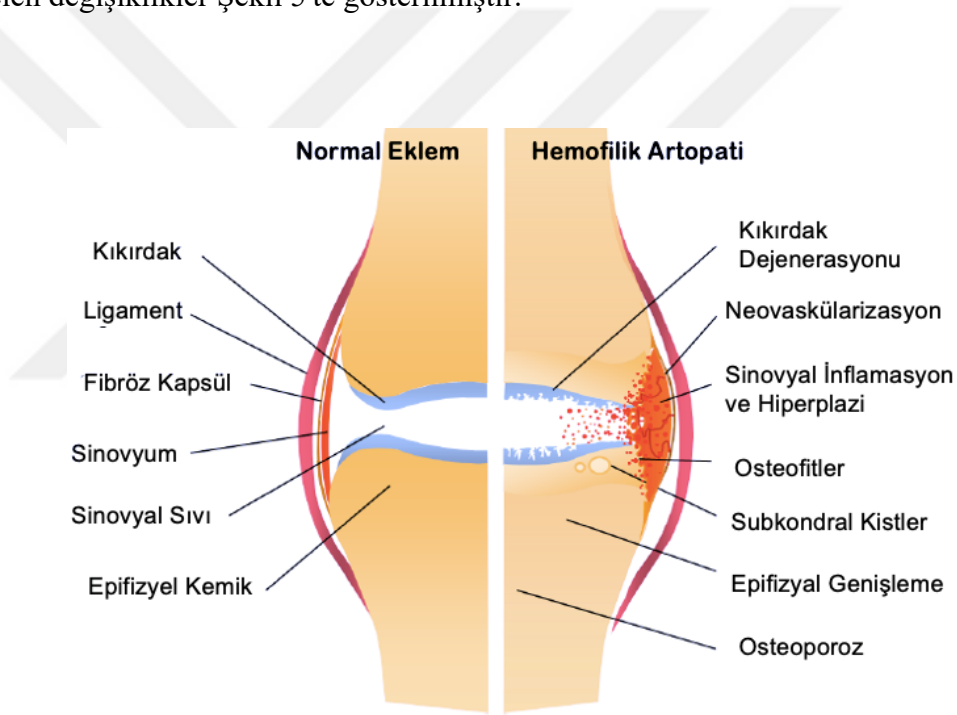
evrelerde hafif bir kısıtlılık ve fleksiyon deformitesi gelişebilir. Kendi kendine devam eden hemartroz - sinovit - hemartroz döngüsü eklem ilerleyici dejenerasyonuna neden olmaktadır [54] (Şekil 4). Sinovit kontrol altına alınmazsa kıkırdak hasarı meydana gelir. HA daha sonra klinik ve radyografik olarak belirginleşip etkilenen eklemden fonksiyonel bozulmaya neden olur [61].



Şekil 4: Hemartroz, kronik sinovit ve ilerleyici artropati döngüsü [2].

III.D.1. Hemofilik Artropati Patofizyolojisi

HA gelişimi sinovyal inflamasyon ve kıkırdak dejenerasyonu ile karakterizedir [59, 62]. Bu açıdan HA'nın hem Romatoid Artrit gibi inflamatuvar eklem hastalıkları ile hem de osteoartrit (OA) gibi dejeneratif eklem hastalıkları ile ortak bazı özellikleri vardır [63, 64]. Hemartroz kaynaklı eklem hasarının iyi bilinen ancak daha az araştırılan bir başka belirtisi de kemik hasarıdır. HA ilerledikçe, osteoklastik kemik rezorpsiyonu ve osteoblastik kemik oluşumu arasındaki dengesizlik ile kemiğin remodelasyonu değişir [65]. Tekrarlayan hemartrozlar nihayetinde sinovyum, kıkırdak ve subkondral kemiğin hasar gördüğü bir durum olan HA'ya yol açar. Sağlıklı eklem ve HA'da meydana gelen değişiklikler Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: Sağlıklı bir eklemin (solda) ve hemofilik artropatinin (sağda) şematik gösterimi Astrid E. Pulles, Simon C. Mastbergen, Pathophysiology of hemophilic arthropathy and potential targets for therapy, Pharmacological Research, Volume 115, 2017 yayınından alıntılanarak yeniden düzenlenmiştir [66].

III.D.1.a. Sinovyal İnflamasyon

Akut bir hemartrozu takiben, eklem boşluğundaki kanın sinovyal hücreler tarafından temizlenmesi yaklaşık bir hafta kadar sürer [67]. Ekleme göç eden makrofajlar ve diğer inflamatuvar hücreler bu temizlenme sürecine katkıda bulunur. Tekrarlayan ekstretravazasyon veya devam eden

kanama durumunda, sinovyal hücrelerin temizleme kapasitesi aşılr [66]. Eritrosit kaynaklı demir, sinovyal hemosiderin birikintilerine sebep olur [58]. Bunun sonucunda sinovyal inflamasyon tetiklenir [68, 69]. Makroskopik olarak hemosiderin yüklü sinovyumun normal dokuya göre çok daha fazla inflamatuvar sitokin içerdiği gösterilmiştir [58]. Nükleer faktör kappa B (NF κ B) ile ilişkili sinyal yolları inflamasyonda anahtar rol üstlenir ve murin hemofili modelinde artan NF κ B regülasyonu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Hemartroz, NF- κ B yolunun bazı genlerinin, interlökin (IL)-1 β , IL-6, interferon-gama (IFN γ) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin artışına yol açar [70]. Bu durum NF- κ B'nin sinovit [71], osteoartrit [72] ve romatoid artrit [73] kıkırdak dejenerasyonundaki rolüne ilişkin gözlemlerle uyumludur. HA'lı hastalarda, Reseptör Aktivatör NF- κ B'nin (RANK) sinovyal seviyelerinin yüksek ekspresyonu daha önceki çalışmalarda gözlemlenmiştir [74]. Eklem içindeki dokularda artan demir yükü ince sinovyal dokuyu, Deoksiribonükleik Asit (DNA) sentezi ve hücre çoğalmasının indüklenmesi yoluyla hipertrofik, villöz bir yapıya dönüştürür. Demir, hücre proliferasyonu ile ilişkili bir protoonkogen olan c-myc ve p53 tümör baskılayıcı geni hedefleyen bir protein olan mdm2'nin amplifikasyonunu uyarır, böylece sinovyal hücre apoptozisini inhibe eder [75, 76]. İnflamasyonlu ve hipertrofik sinovyum, vasküler kaynaklı endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerinin salınımına neden olur. VEGF hem lokal hem de sistemik olarak neoanjiyogenezi destekler. Eklem kanamasına yanıt olarak salınan anjiyojenik faktörler hipervaskülariteye neden olur [77].

Demir, inflamasyon, hipertrofi ve neovaskülarizasyonun kombinasyonu bir kısır döngüye neden olur. Hemartroz sinovit'e yol açar; etkilenen sinovyal dokular hipertrofiye uğrar, bu durum sinovyalı mekanik hasara daha duyarlı hale getirir. Oluşan neovaskülarizasyon ile sonraki kanamaya karşı eklem daha savunmasız hale gelir. Bu şekilde, şiddetli hemofili hastalarının yaklaşık %25'inde meydana gelen, hedef eklem gelişir [78].

III.D.1.b. Kıkırdak Dejenerasyonu

Eklem kanamasını takiben kıkırdak dejenerasyonu hem sinovyal bağımlı hem de bağımsız mekanizmalardan kaynaklanır. İlk olarak hemofilik sinovit, kıkırdak yüzeyi üzerinde invaziv ve yıkıcı bir tabaka (pannus) oluşturur [79]. Pannus dokusu makrofaj, fibroblast benzeri mezenkimal hücreler gibi kolajenolitik enzimleri serbest bırakan inflamatuvar hücrelerden oluşur [80]. Sinovyal kaynaklı pro-inflamatuvar sitokinler, plazmin ve matriks metalloproteinazlar (MMP) kıkırdak

matriksinin daha fazla bozulmasına yol açar [58, 65, 81, 82]. Plazmin, insan kıkırdagından proteoglikan salınımına neden olarak doğrudan [81, 83] veya dolaylı olarak pro-MMP'lerin aktivasyonu yoluyla kıkırdak hasarına katkıda bulunur [84]. MMP'ler, kolajen ve proteoglikanlar gibi hücre dışı matriks bileşenlerinin bozulmasında rol oynayan endopeptidazlardır [85]. Ek olarak, plazmin, proteinaz aktive edilmiş reseptörler (PAR) yoluyla hücre sinyallerini etkileyerek sinovite ve kıkırdak bozulmasına neden olur. Eklem kanaması sonrası kondrositlerde ve sinovyumda artmış PAR ekspresyonu olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [66].

Sinovyal dokuya bağımlı bu mekanizmanın yanı sıra hemartroz kıkırdak üzerinde doğrudan zararlı bir etki de gösterir. Kıkırdak, kondrositlerden ve hücre dışı matriksten oluşan bir dokudur. Kondrositler, matriks sentezinden sorumludur. Kıkırdakta kan akışı olmadığı için beslenmesi sinovyal sıvıdan kaynaklanır. Kan maruziyeti, hücre dışı matriks bozulmasının yanı sıra kondrosit apoptozuna neden olur. Düşük miktarda kana kısa süreli maruz kalma, matriks döngüsünde uzun süreli ve geri dönüşü olmayan sorunlara yol açabilmektedir [86, 87].

III.D.1.c. Kemik Hasarı

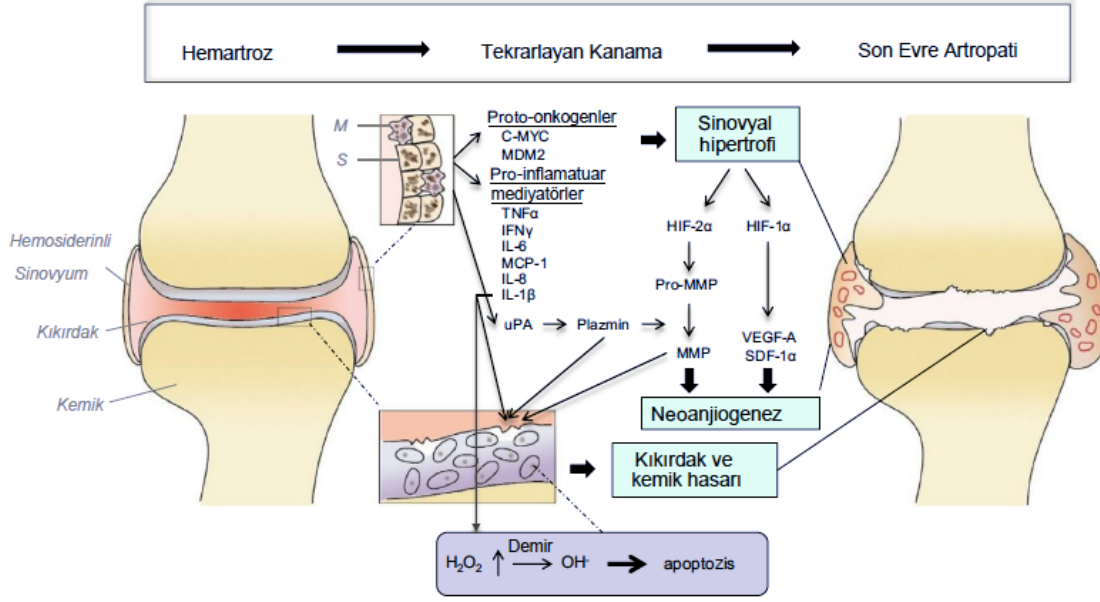
Sinovit ve kıkırdak dejenerasyonunun gelişimi ilerledikçe, alttaki kemik metabolizması da etkilenir. Kemik değişiklikleri artan kemik rezorpsiyonu ve azalan yeni kemik oluşumundaki bozulan dengeden kaynaklanır. Bunun sonucunda kemik mineral yoğunluğunda azalma ve osteoporoz ortaya çıkar [88, 89]. Hem çocuk hem de daha yaşlı hemofili hastalarında azalmış kemik mineral yoğunluğu ve lokal osteoporoz hemofilik artropatiye eşlik etmektedir [90-93]. Hemofili hastalarındaki diğer görülen kemik değişiklikleri subkondral kist oluşumu, subkondral skleroz, osteofit oluşumu ve epifiz büyümesidir [94].

Hemartrozun kemik üzerine etkisi inflamasyon tarafından indüklenen kemik rezorpsiyonunda önemli bir yol olan Reseptör Aktivator nükleer faktör- κ B Ligandı (RANK-L), reseptör aktivatör NF- κ B (RANK), osteoprotegerin (OPG) yolundaki değişikliklerden kaynaklandığı varsayılır [95]. RANK-L esas olarak osteoblastlar ve stromal hücreler üzerinden eksprese edilir. Ayrıca reaktif lenfositler ve sinovyal hücreler tarafından da sentezlenir [95]. Reseptörü RANK'a bağlanarak osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunu uyarır [65]. OPG, bir tuzak reseptör görevi görür ve RANK-L'ye bağlanma için RANK ile rekabet eder. OPG, RANK-L ve RANK arasındaki etkileşimi önleyerek kemikleri aşırı rezorpsiyondan korur. Yapılan

Çalışmalarda sinovyumda yüksek oranda RANK ve RANKL ekspresyonu görülürken , OPG azalmış olduğu ve bunun sonucunda bir osteoklastik aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir [74].

Özetle, hemartroz demir birikimine, inflamasyona, sinovyal proliferasyona, kıkırdak bozulmasına, neoanjiyogeneze ve fibrinolyze yol açarak eklemi tekrarlayan kanamalara karşı savunmasız hale getirir ve bu şekilde bir kısır döngüye neden olur. HA'nin patofizyolojisinin şematik görünümü şekil 6 'da gösterilmektedir [96].





Şekil 6: Hemofilik artropatinin patofizyolojisi. Eklem boşluğundaki eritrositler ve eritrositlerden salınan demir, sinovyal hücreler (S) ve doku makrofajları (M) tarafından hemosiderin olarak depolanır. Demire yanıt olarak onkoproteinler olan C-MYC ve MDM2'nin ekspresyonu, sinovyal hipertrofi ile sonuçlanır. Sinovyal hipertrofi, hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF)-1α ve HIF-2α'da artışa neden olan hipoksik bir ortam yaratır. Pro-anjiyogenik mediatörler, vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A) ve stromal hücre kaynaklı faktör 1α (SDF-1α) ekspresyonun artmasına neden olduğu gibi ayrıca pro-matriks metalloproteinazları da (pro-MMP) artırır. VEGF-A, sinovyal neoanjiyogenezi uyarmakla beraber plazmin aracılığı ile MMP'lere dönüşümüne, kıkırdak matriksten glikozaminoglikan salınımına, kıkırdak ve subkondral kemik yıkımına neden olur. Sinovyal hücreler ve doku makrofajları ayrıca tümör nekroz faktör alfa (TNF-α), interferon-γ, interlökin (IL)-1β, IL-6 yoluyla monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi proinflamatuvar aracılara da serbest bırakır. Salgılanan IL-1β, kondrositlerde artan hidrojen peroksit (H₂O₂) üretimini indükler, bu da demir (Fe²⁺) ile reaksiyona girerek sitotoksik hidroksil radikalleri (OH·) oluşturur ve kondrosit apoptozisine neden olur. Neoanjiyogenezi ve vasküler yeniden şekillenme; sinovyal hipertrofi, kıkırdak ve kemik yıkımı ile karakterize ilerleyici hemofilik artropati ile sonuçlanan kısır kanama döngüsüne neden olur. "Wyseure T, Mosnier LO, von Drygalski A. Advances and challenges in hemophilic arthropathy. Semin Hematol. 2016" yayınından alıntılanarak yeniden düzenlenmiştir [96].

III.D.2. Hemofilik Artropati Radyolojik Sınıflaması

HA'da hastalığın evresini belirlemek, seyrini takip edebilmek ve hekimler için ortak bir dil oluşturmak amacıyla radyolojik sınıflamalar ortaya konulmuştur. HA'nın radyolojik değerlendirmesinde iki ana sınıflama sistemi kullanılmaktadır. Bunlardan Arnold-Hilgartner sınıflaması en yüksek dereceli bulgunun nihai evreyi belirlediği sınıflamadır. Pettersson skoru ise her bir bulgunun ayrı ayrı puanlandığı ve puanların toplanarak nihai puan elde edildiği sınıflamadır [97]. Pettersson skoru Tablo 4'te gösterilmiştir.

Radyolojik Parametre	Bulgu	Skor
Osteoporoz	Yok	0
	Var	1
Epifiz genişlemesi	Yok	0
	Var	1
Düzensiz subkondral yüzey	Yok	0
	Hafif	1
	Belirgin	2
Eklem aralığında daralma	Yok	0
	< 50%	1
	> 50%	2
Subkondral kist	Yok	0
	Tek kist	1
	Birden fazla kist	2
Eklem kenarlarında erozyonlar	Yok	0
	Var	1
Eklemi oluşturan kemik bölgelerinde angulasyon/translasyon	Yok	0
	Hafif	1
	Belirgin	2
Eklemde deformite	Yok	0
	Hafif	1
	Belirgin	2

Tablo 4: Hemofilik artropati radyolojik skorlamasında kullanılan Pettersson skoru. Pettersson, Holger, Å. Ahlberg, and Inga Marie Nilsson. "A radiologic classification of hemophilic arthropathy." Clinical orthopaedics and related research 149 (1980): 153-159. yayını temel alınarak tablolastırılmıştır [94].

Arnold-Hilgartner radyolojik sınıflaması eklem aralığında daralma, subkondral kist, iskelet anormallikleri gibi parametreleri değerlendirerek Evre 1'den 5'e kadar hastalığı sınıflandırır. Arnold-Hilgartner sınıflaması Tablo 5'te gösterilmiştir [98].

Evre	Bulgular
0	Normal eklem
I	İskelet anormallikleri yok; yumuşak doku ödemi mevcut
II	Juksta artiküler osteoporoz ve epifizin aşırı büyümesi; erozyon yok, eklem aralığında daralma yok
III	Erken subkondral kemik kistleri, patellanın kareleşmesi, distal femur veya humerusta interkondiler çentik genişlemesi var, eklem aralığı korunmuş
IV	Evre 3 bulgularına ek olarak eklem aralığında daralma
V	Son evre, eklem tahribatı ve kemik değişiklikleri, eklemde kontraktür

Tablo 5: Arnold-Hilgartner radyolojik sınıflaması. Arnold WD, Hilgartner MW. Hemophilic arthropathy. Current concepts of pathogenesis and management. J Bone Joint Surg Am. 1977 Apr;59(3):287-305. yayını kullanılarak tablolastırılmıştır [98].

Modifiye Arnold-Hilgartner sınıflaması beş yerine dört evreyi içerir. Modifiye sınıflandırmada tedavi için özel bir anlamı olmayan orijinal evre II'yi (epifiz genişlemesi ve juxta-artiküler osteoporoz) ortadan kaldırır. Modifiye Arnold-Hilgartner sınıflaması örnek radyolojik görüntüler Resim 6'da gösterilmiştir.

Konvansiyonel radyografi, HA'da kırık ve kemik hasarının ileri aşamalarını izlemek için yararlıdır. Ancak HA'nın erken evrelerini göstermede ve tedavi etkinliğini değerlendirmek için yetersizdir. Ultrasonografi HA'da eklem ve yumuşak doku durumunu değerlendirmek için giderek daha yararlı bir araç haline gelmektedir. Manyetik rezonans (MR) görüntüleme yöntemleri hemofilinin kas-iskelet sistemi komplikasyonlarının teşhisinde en duyarlı yöntemdir [99]. Bu nedenle incelemenin uygun bir protokole göre yapılması ve görüntülerin özel eğitimli radyologlar tarafından değerlendirilmesi koşuluyla MR, hemofilik artropatinin semikantitatif değerlendirilmesinde yararlı olabileceğini yapılan çalışmalar düşündürmektedir [100].



Resim 6: Modifiye Arnold-Hilgartner sınıflaması örnek radyolojik görüntüler. A: Evre 1, yumuşak doku ödemi. B: Evre 2, genişlemiş epifizler ve juksta-artiküler osteopeni. C: Evre 3, medial kompartmanda yüzey düzensizliği, subkondral kistler. D: Evre 4, kıkırdak aralığının tam kaybı. Luck JV Jr, Silva M, Rodriguez-Merchan EC, Ghalambor N, Zahiri CA, Finn RS. Hemophilic arthropathy. J Am Acad Orthop Surg. 2004 Jul-Aug;12(4):234-45. yayınından alıntılanmıştır [101].

III.D.3. Hemofilik Artropati Tedavisi

III.D.3.a. Profilaktik Faktör Replasman Tedavisi

HA'nın başarılı bir şekilde önlenmesinin anahtarı, kronik sinovit ve kıkırdak hasarı gelişmeden önce hemartrozun yönetimidir [102]. Ağır hemofilisi olan hastalarda erken başlanan profilaktik faktör replasmanı daha az eklem kanaması, daha az artropati gelişimi ve daha iyi yaşam kalitesiyle ilişkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir [103]. Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Derneği (ISTH); profilaktik faktör replasmanlarını primer, sekonder ve tersiyer olarak üç gruba ayırmış ve replasmanların amaçlarını bu üç grup altında belirtmiştir [104].

Primer profilaksi; erken çocukluk döneminde, en geç ikinci eklem kanamasından veya 3 yaşından önce, radyolojik ve klinik olarak kanıtlanmış artropati gelişmeden başlar. Çocuğun normal eklemlerle olgunluğa erişmesini amaçlar [105, 106].

Sekonder profilaksi; iki veya daha fazla eklem kanamasından sonra, ancak kanıtlanmış artropati gelişmeden başlar. Bu kanamaların subklinik geri dönüşü olmayan eklem hastalığına neden olması muhtemeldir. Sekonder profilaksi, daha fazla kanamayı önleyerek eklem hasarını sınırlamayı ve uzun vadede eklem fonksiyonunu en üst düzeye çıkarmayı amaçlar [105, 106].

Tersiyer profilaksi; klinik ve radyolojik olarak belirgin artropati geliştikten sonra başlar. Artropatinin ilerlemesini yavaşlatmayı, ağrıyı azaltmayı ve yaşam kalitesini korumayı amaçlar. Ancak gelişmiş olan artropatiyi geriye döndüremez [107].

Birleşik Krallık Hemofili Merkezi Doktorları Organizasyonu (UKHCDO), 2020 yılında yayınladıkları Hemofili A ve B hastaları için profilaktik faktör replasmanının kullanımına ilişkin kılavuzda birçok öneride bulunmuşlardır. Bu öneriler;

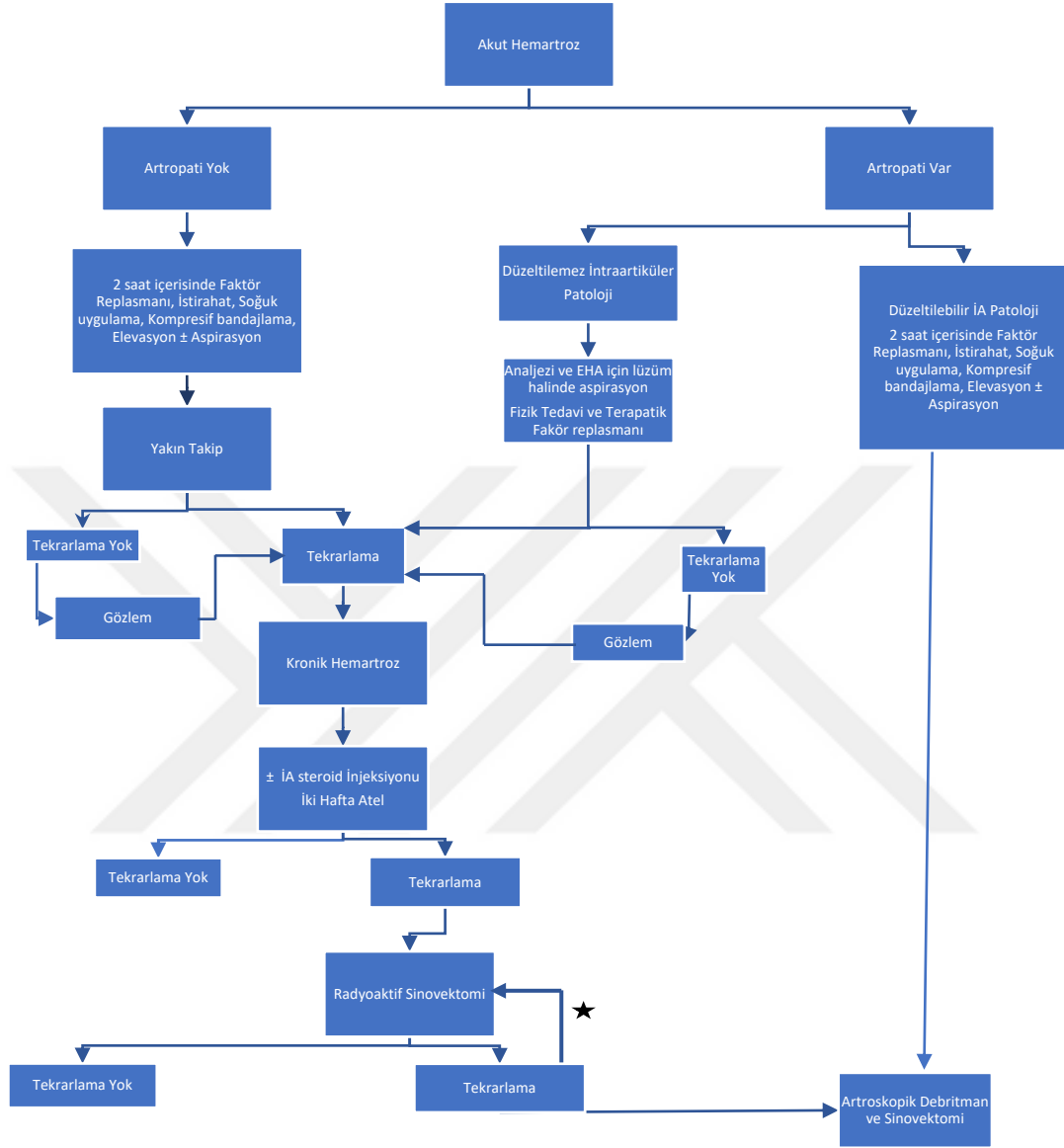
- Ağır hemofilili tüm çocuklar primer profilaksi almalıdır.
- Faktör seviyeleri 1-3 iu/dl olan tüm çocuklar için primer profilaksi düşünülmelidir.
- Bir veya daha fazla spontan eklem kanaması olan herhangi bir hemofili hastasına profilaksi önerilmelidir.
- Hemartroza bağlı eklem hasarı oluşan hemofili hastalarına profilaksi önerilmelidir [108].
- Faktör replasmanı için ilaç seçimi, hemofili hastası ve/veya ebeveyni ya da yasal vasisi ile ortak karar vererek seçilmelidir.
- Spontan intrakraniyal kanamanın ilk tedavisini takiben profilaksi başlatılmalı ve uzun süreli devam edilmelidir.
- Rekombinant FVIII ve FIX uzatılmış yarı ömürlü ilaçlar, yayınlanmış UKHCDO kılavuzuna göre kullanılmalı ve yalnızca standart yarı ömürlü ürünlere göre net klinik fayda sağladıklarında kullanılmalıdır.
- Profilaktik faktör replasmanı için kullanılan ilaçların dozları, kanamayı önleyen en uygun ilaç dozu olarak belirlenmelidir [108].

III.D.3.b. Hemofilik Artropatide Akut Hemartroz Tedavisi

HA oluşumunu engellemek ve oluşan HA'nın ilerlemesini önlemek için en önemli tedavi profilaktik faktör replasmanıdır [109]. Faktör replasman profilaksisi alan hastalar için travma genellikle eklem içi kanamanın başlıca tetikleyicisidir. Yetersiz faktör seviyeleri, atlanan dozlar, altta yatan sinovit veya gelişmiş olan artropati, profilaksiye rağmen travmalara bağlı akut hemartroz gelişimine neden olur [54].

Akut hemartroz yönetimi acil faktör replasmanı tedavisine ve istirahat, soğuk uygulama, kompresif bandajlama, elevasyon rejimine dayanmaktadır. Akut fazda ilk terapötik yaklaşım kanamanın başlamasından sonraki 2 saat içinde pıhtılaşma faktörünün enjekte edilmesidir. Klasik olarak önerilen doz 25 ile 40 IU/kg FVIII veya şiddetli hemartroz vakalarında 50 IU/kg'dır [110]. İlgili eklem birkaç gün atele alınması, tekrarlayan kanama riskini azaltmaya yardımcı olabilir ve sinovitin çözülmesini kolaylaştırabilir. Eklem tam hareket açıklığı sağlanana ve ödem geçene kadar takip muayeneleri yapılması gerekmektedir [102].

Akut hemartrozda eklem aspirasyonu; 48-72 saat içinde faktör replasmanına yanıt vermeyen hemartrozlarda, analjezik tedaviye yanıt vermeyen hastalarda, kanama ile orantısız ağrı ve ödem olan kişilerde septik artriti ekarte etmek için uygulanmalıdır. Cilt enfeksiyonu olması durumunda aspirasyon yapılmamalıdır. Yeterli faktör replasmanına rağmen inatçı kanama devam ediyorsa inhibitörlerin varlığı araştırılmalı ve aspirasyon yapılmadan önce ekarte edilmelidir. Aspirasyon yapıldığı durumlarda faktör seviyeleri 48-72 saat süreyle en az %30-50 olmalıdır. Faktör replasmanının mümkün olmadığı durumlarda eklem aspirasyonu yapılmamalıdır [111]. HA'da akut hemartrozun yönetimi algoritması Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7: Akut hemartrozun yönetimi. EHA: Eklem hareket açıklığı, İA: İntraartiküler ★: İkinci bir radyosinovektomi yapılabilir. Luck, James V Jr et al. “Hemophilic arthropathy.” The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons vol. 12,4 (2004): 234-45. yayımından alıntılanarak güncel bilgiler eşliğinde yeniden düzenlenmiştir [102, 112].

III.D.3.c. Hemofilik Artropatide Kronik Sinovitin Tedavisi

Kronik hemofilik sinovit tedavisinin amacı; kanamaların ve ağrının azaltılması, iltihaplı ve hipertrofik sinovyal dokunun ortadan kaldırılması veya etkisiz hale getirilmesidir. Sinovektomi ameliyatla ya da radyoaktif veya kimyasal fibrozan maddelerin eklem içi enjeksiyonu kullanılarak elde edilebilir. Yayınlanmış çalışmalar, cerrahi olmayan yaklaşımların, daha az komplikasyon ve önemli ölçüde daha az maliyetle ameliyatlara benzer faydalar sağladığını göstermektedir [113, 114]. Cerrahi olmayan sinovektomi uygulamasında kimyasal ve radyoaktif ajanlar kullanılmaktadır.

III.D.3.c.1. Kimyasal Sinovektomi

Kimyasal sinovektomi 50 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Tiotepa, ozmik asit, D-penisilamin, rifampisin ve oksitetrasiklin gibi farklı ajanlar sinovektomi için kullanılmıştır. Ancak şu anda halen kullanımda olan ürünler; rifampisin ve oksitetrasiklidir. Rifampisin, enjekte edilebilir formunda kullanılmaktadır. Oksitetrasiklin, kullanımı çok kısıtlı olup bazı etik kurullar tarafından kullanımı reddedilmektedir [115, 116].

Rifampisinin sinovitteki etkinliği, ilk olarak kalıcı diz efüzyonu olan 30 Romatoid Artrit hastasında gösterilmiştir [117]. Çift kör bir çalışmada, rifampisin ile salin solüsyonu karşılaştırılmış ve rifampisin grubunda diz efüzyonunun tamamen kaybolduğu görülmüştür. Bu çalışmaya dayanarak; hemofili hastalarında rifampisin ile kimyasal sinovektomi, radyoaktif sinovektomi için gerekli radyoizotopların elde edilmesinin daha zor olduğu ülkelerde tercih edilmektedir [115, 116, 118]. Ancak rifampisin ile sinovektomi sonrası eklem hareket açıklığı, ağrı, tekrarlayan hemartroz sayısı gibi parametreler değerlendirildiğinde radyoaktif sinovektomi ile elde edilen sonuçlara göre daha az avantajlıdır [119]. Rifampisin ile tek bir tedavi radyoaktif sinovektomi ile karşılaştırıldığında nispeten ucuzdur. Fakat rifampisin ile sinovektomide beklenen sonuçları elde etmek için genellikle haftalık ya da iki haftada bir enjeksiyon gerektirir. Bazı hastalarda enjeksiyonların sayısı 10'nun üzerine çıkabilmektedir. Her enjeksiyondan önce faktör replasmanı maliyeti düşünüldüğünde radyoaktif sinovektomiye göre daha fazla maliyete neden olabilir. Rifampisin ile sinovektomi sonrası 1 haftaya kadar ciddi ağrı görülebilmektedir [116].

III.D.3.c.2. Radyoaktif Sinovektomi

Radyoaktif sinovektomi tedavisi, radyofarmasötik ajanların eklem içi uygulaması ile elde edilir. Romatoid artritli hastalarda kontrol altına alınamayan sinovitlerde ve hemofilik artropatide

kronik sinovitin tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Kolloid sitrat veya silikat formlarındaki Yttrium-90 (90Y) ve Renyum (186Re) sülfür Avrupa'da tercih edilen beta ışını yayan radyoizotoplar iken; Kromik Fosfor (32P) Kuzey Amerika'da en çok kullanılan radyofarmasötiktir. Bu radyofarmasötiklerle uygulanan sinovektomi ile hemofilik kronik sinoviti olan hastalarda; hemartroz sayısı ve ağrının azaldığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olup hareket açıklığını iyileştirme açısından da etkili bulunmuşlardır [120].

III.D.3.c.3. Cerrahi Sinovektomi

Hemofilide kronik sinovit tedavisi için açık cerrahi sinovektomi ilk olarak Storti ve ark. tarafından tanımlanmıştır [121]. Açık cerrahi ile uygulanan sinovektomi, patolojik iltihaplı sinoviyumu uzaklaştırarak sonraki hemartroz sayısını %80'den fazla azaltmaktadır. Ancak bu invaziv girişim sonrası enfeksiyon, eklem hareket açıklığında azalma, intraoperatif kırık gelişimi, postoperatif hemartroz riskleri nedeniyle sınırlı sayıda hastada tercih edilmektedir [122].

Artroskopi sinovektomi; 3-6 ay uygulanan konservatif tedavilere yanıt vermeyen subakut veya kronik sinovitli tek eklem tutulumu olan hastalar için ideal cerrahi yöntemdir. Daha az invaziv, daha hızlı iyileşme, postoperatif kanamanın az olması, hastanede kalış süresinin kısalığı, daha fazla hareket açıklığını artırması nedeniyle cerrahi tedavi olarak açık cerrahiye göre daha üstündür [123]. Hemofili hastalarında osteofitler ve kemik deformiteleri nedeniyle diz arka kompartmanının artroskopik değerlendirilmesi zor olabilir. Bunun sonucunda ameliyat sonrası diz ekleminin posteriorundan kaynaklanan kanamalar devam edebilir. Yoon ve ark. patolojik dokuların optimal olarak çıkarılmasını gerçekleştirebilmek için tüm vakalarda posterior trans-septal portal ile birlikte altı portalinde (iki anterior, iki suprapatellar, iki posterior) kullanılmasını önermiştir [124]. Artroskopik sinovektominin başarısı; deneyimli ortopedi uzmanına sahip donanımlı bir hemofili merkezine, yeterli faktör replasmanına, postoperatif fizyoterapiye ve uygun hasta seçimine bağlıdır [125].

Hemofilik sinovit için sinovektomilerde başarılı sonuç, büyük ölçüde zamanında cerrahi müdahaleye bağlıdır. Genç hastalarda yaşlı hastalara göre hareket açıklığında daha olumlu bir iyileşme olduğu için sinovektominin erken yapılması önerilmektedir [120]. Hemofilili hastalarda kronik sinovit için uygulanan kimyasal, radyoaktif ve cerrahi sinovektomilerin karşılaştırılması Tablo 6'da gösterilmiştir.

Parametre	Cerrahi Olmayan Tedaviler		Cerrahi Tedaviler	
	Rifampisin	Radyoaktif Sinovektomi	Artroskopik Sinovektomi	Açık Sinovektomi
İnvazivlik	Minimal	Minimal	Orta	Yüksek
Pıhtılaşma faktörü gereksinimi	Hemartroz tedavisine eşit	Hemartroz tedavisine eşit	Orta	Yüksek
Hastanede kalış	Ayaktan tedavi	Ayaktan tedavi	Gerekli, Kısa	Gerekli, uzun
İşlem sonrası kanama	Çok Nadir	Çok Nadir	Nadir	Artmış Risk
İşlem sonrası eklem sertliği gelişimi	Rapor edilmemiş	Bazı yayınlarda aşırı fibrozise bağlı sertlik gelişimi gösterilmiştir.	Düşük insidans	Yüksek insidans
Eklem hareket açıklığı	Korunur ya da artar	Korunur ya da artar	Korunur	Azalabilir
Enfeksiyon riski	Çok nadir	Çok nadir	Az	Yüksek
Ekstra artriküler dokuların morbiditesi	Minimal	İğne giriş yolunda radyoaktif ilaç bulaşı	Daha az	Daha Fazla
Etkililik	Etkili ancak radyoaktif sinovektomiye göre daha fazla girişim gerekli	Artroskopik sinovektomiye eşdeğer	Posteriomedial ve posteriolateral köşelerde etkililik az	Tamamiyle etkili
Ekipman ve uzmanlık	Minimal	Yerel ve uluslararası yönergeler eşliğinde uygulanabilir	Ekipman gerekli Sınırlı merkezlerde uygulanabilir	Ekipman gerekli
Finansal	Nispeten ucuz ancak tekrarlayan dozlar gerekli	Rifampisinden pahalı, nispeten artroskopik cerrahiden ucuz	Pahalı	Uzun hastane yatışı ve morbiditeleri nedeniyle daha pahalı
Kontraendikasyonlar ve kısıtlılıklar	1. Rifampisinin yerel üretiminin veya ithalatının olmaması 2. Hastanın işlem sırasında veya sonrasında ciddi ağrı hissetmesi 3. Masif akut hemartroz (kronik kanamalar kontraendike değil)	1. Cerrahi tecrübe 2. Radyofarmasötik ekipman, kurulum, üretim veya ithalatının olmaması 3. Çocuklarda bireysel risk ve fayda kararına göre seçim yapılmak zorunda 4. Masif akut hemartroz (kronik kanamalar kontraendike değil.)	1. Cerrahi tecrübe 2. Artroskopi malzemelerinin temin edilmesinde zorluk 3. Göreceli olarak ileri artropatide kısıtlı kullanım	1. Yüksek inhibitör düzeylerine sahip hastalarda kontraendike 2. Ağır artropatide kullanımı kısıtlı

Tablo 6: Kimyasal, radyoaktif ve cerrahi sinovektomi tedavilerinin karşılaştırılması. Van Vulpen, Lize FD, et al. "Synovitis and synovectomy in haemophilia." Haemophilia 27 (2021): 96-102. yayınından alıntılanarak yeniden düzenlenmiştir [120].

III.D.3.d. Hemofilik Artropatide Eklem İçi İlaçlar

Dejeneratif osteoartritli hastalarda ve hemofilik hastalarda çeşitli ilaçların eklem içi enjeksiyonları yaygın olarak kullanılmaktadır. Eklem içi hyalüronik asit, mezenkimal kök hücre, PRP (trombositten zengin plazma) ve kortikosteroidler bunlardan bazıları olup hemofilik artropatide kullanımı açısından bir çok çalışma mevcuttur [126].

Hyalüronik asit, osteoartriti tedavi etmek için kullanılan tipik bir eklem içi ilaçtır. Rodriguez Merchan tarafından hemofilik artropati hakkında 2012 yılında yapılan bir çalışmada; diz eklemünde ağrı ve fonksiyon bozukluğu içeren hastalarda tek başına eklem içi hyalüronik asit enjeksiyonlarının etkinliği olduğunu savunulmuştur. Ancak sadece vaka serilerini içerdiğinden kanıt düzeyi düşüktür. Bu nedenle uzun vadede hastaların daha iyi takip edildiği daha iyi tasarlanmış araştırmaların yapılması gerekmektedir [127].

Kortikosteroidler HA tedavisinde rutin olarak kullanılmamaktadır. Rodriguez Merchan 2017'de ağırlı hemofilik artropatili hastalarda intraartiküler kortikosteroid enjeksiyonlarının etkinliğini gözden geçirmiş ve kortikosteroid enjeksiyonları eklem ağrısını birkaç hafta hafifletmesine rağmen rutin kullanımlarını önermemiştir [128].

PRP, kandan elde edilen trombosit konsantrasyonudur. Normalde trombositlerin içinde bulunan yüksek konsantrasyonda büyüme faktörlerini içerir. Bu büyüme faktörleri hücre proliferasyonu, matriks yeniden şekillenmesini ve anjiyogenez sağlayarak doku yenilenmesine yol açtığı öne sürülmektedir [129]. 22 HA hastasında PRP'nin hyaluranik asit ile karşılaştırmasını yapan bir çalışmada PRP kullanımının pratik ve etkili olabileceğini ve daha fazla araştırma yapılması gerektiğini belirtilmiştir [130].

III.D.3.e. Fizik Tedavi

Dünya Hemofili Federasyonu'nun (WFH) 2020 yılında yayınladığı kılavuzda belirtildiği üzere; kas gücünü ve fonksiyonel yeteneği korumayı amaçlayan fizik tedavi, kronik hemofilik artropati tedavisinin temel bir bileşeni olarak kabul edilmektedir. Kılavuzun önerilerine göre fizik tedavinin yoğunluğu kademeli olarak artırılmalı ve profilaksi yeterliliğine göre düzenlenmelidir. Faktör replasmanına sınırlı erişimi olan hastalarda fizik tedavi daha az yoğun bir şekilde önerilmekle beraber; kısıtlı kaynaklara ve faktör replasmanına sahip yerlerde, tedavi kas-iskelet

sistemi uzmanlığına sahip deneyimli multidisipliner bir ekip tarafından koordine edilirse faktör kapsamı olmadan fizik tedavi yapılabileceği belirtilmiştir [131, 132].

III.D.3.f. Cerrahi Tedavi

Kronik HA'lı hemofili hastalarında tatmin edici şekilde analjezi ve fonksiyonel kapasite sağlanamayan hastalar için WFH, cerrahi müdahale seçenekleri hakkında bir ortopedi uzmanına danışılmasını önerir [132]. Cerrahi müdahale kararı multidisipliner yaklaşım ile yapılmalıdır. Yapılacak olan cerrahinin seçiminde Arnold-Hiltgarner sınıflaması, Pettersson skoru gibi sınıflamalar eklem koruyucu ya da eklem replasmanı cerrahisi seçimi için yol gösterici olabilir. Özel durumlara bağlı olarak cerrahi prosedürler şunları içerebilir:

- Gerekirse sinovektomi ve eklem debridmanı [133],
- Özellikle ayak bileği veya dirsek ekleminde eklem içi yapışıklıkları gevşetmek ve impingementları düzeltmek için artroskopi [122],
- Kontraktürleri tedavi etmek için eklem dışı yumuşak doku gevşetmesi [134],
- Açısal deformiteyi düzeltmek için osteotomi, deformitenin düzeltilmesine yardımcı olmak için fiksator uygulamaları [135],
- Protez ile eklem replasmanı (diz, kalça, omuz, dirsek veya ayak bileği) [136],
- Radiokapitellar artropatili seçilmiş hastalarda radius başı eksizyonu [137],
- Ağrılı ayak bileği eklem artropatisi için artrodez [132].

III.D.3.f.1. Hemofilik Artropatide Total Diz Artroplastisi

Total diz artroplastisi (TDA) için en yaygın endikasyon ağrıdır. Diz ekleminin ağır hemofilik artropatisinde eklem hareket açıklığında kısıtlılık ve aşırı ağrı görülebilmektedir [54]. TDA konservatif yöntemlerin başarısız olduğu ve artroskopik tedavinin yeterli fayda sağlamayacağı hastalar için tedavi seçeneğidir [138, 139]. Solimeno ve ark. yaşam kalitesini bozan ağrı ve fonksiyon bozukluğunda hastalara TDA uygulanmasını önermişlerdir [140]. Hemofili hastalarında radyografik bulgular klinik bulgulardan çok daha kötüdür ve hekimler röntgeni değil hastayı tedavi etmeleri gerektiğini bilmelidirler [141]. TDA'nın iyi sonuçlarına rağmen, protez gevşemesi ve geç eklem enfeksiyonları riski hemofilili hastalarda artmış olduğu mutlaka akılda tutulmalıdır [142]. Güncel literatüre göre hemofili hastalarında TDA için tanımlanmış bir kriter yoktur. Analjeziklere, ortezlere ve fizik tedaviye yanıt vermeyen hastalarda multidisipliner bir ekibin kararı ile eklem koruyucu cerrahiler yapılamaması halinde TDA uygulanması önerilmektedir [143].

III.D.3.g. HA Patogenezinine Dayalı Tedavi İçin Potansiyel Hedefler ve İlaçlar

Pıhtılaşma faktörü replasmanı her yerde bulunmayan pahalı bir tedavi yöntemidir. Pıhtılaşma faktörünün replasmanı sağlanmasına rağmen; hemartroz gelişen hastalarda eklem hasarı meydana gelecektir. Bu nedenle, hemofilik artropatinin patogenezindeki kısır döngüyü ortadan kaldıran uygun maliyetli tedavilere ihtiyaç vardır. Hemofilik artropatinin patogenezinin mevcut bilgisine dayanarak yeni tedavi seçenekleri denenmektedir. Bu tedavi seçeneklerinin amaçları arasında demir birikimini önlemek, hiperfibrinoliz sağlamak, inflamasyonu ve kıkırdak hasarını azaltmak, kemik remodelasyonunu düzenlemek, neoanjigenezi engellemek bulunmaktadır. Tablo 7'de HA patogenezinine yönelik ilaçlar ve bunlarla ilgili çalışmalar özetlenmiştir [144].

Teoride, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) inhibitörleri kullanılarak neoanjiyogenezin inhibisyonu, yeni kanamalara yol açabilen yeni kırılabilir kan damarlarının oluşumunu önlemede etkili olabilir [144]. Çalışmamızda neoanjiogenezi engellemede etkili olabilecek ilaç olan VEGF inhibitörü bevacizumabın, hemofilik artropatide sinovya ve kıkırdak üzerine etkisini araştırmayı amaçlanmıştır.

Hedef	Müdehale	HA'da Araştırma Aşaması	Kıkırdak	Sinovyum	Kemik	Referans
Demir	Demir Şelatörleri					
	• Deferoksamin • Deferasiroks	<i>In vivo</i> (i.a.) <i>In vivo</i> (p.o.)	+ +	+ -	? ?	[145] [146]
İnflamasyon	Anti İnflamatuar					
	• IL-4&IL-10	<i>In vitro</i> + <i>in vivo</i> (i.a.)	+	-	?	[147, 148]
	• IL-1 β	<i>In vitro</i>	+	?	?	[149]
	• TNF α	<i>In vitro</i> + <i>in vivo</i> (i.a.)	-	+	?	[149]
Fibrinolitik sistem	Anti Fibrinolitik					
	• Anti plazmin	<i>In vivo</i> (i.a.)	+	+	?	[150]
	• Amilorid	<i>In vivo</i> (i.a., p.o.)	-	-	?	[150]
	• PAR-inhibitörleri	<i>In vitro</i> + <i>in vivo</i> (i.a.)	+	+	?	[151]
Kemik	Anti-rezorptif					
Remodelasyonu	• Bifosonatlar	<i>In vivo</i> (p.o.)	?	?	+	[152]
Anjigenez Rejeneratif	• VEGF inhibitörleri	<i>Henüz çalışılmadı</i>				
	• Mezenkimal kök hücreler	<i>In vitro</i> + <i>in vivo</i> (i.a.)	+	+	?	[153-155]
Yaklaşımlar	• Kemik iliği kaynaklı hücre nakli	<i>Vaka serisi</i>	+	?	+	[156]
	• Eklem distraksiyonu	<i>Vaka serisi</i>	+	-	+	[156]

Tablo 7: HA patogenezinine dayalı tedavi için potansiyel hedefler. +: Faydalı etki, - : Faydalı etki yok, ?: Etkisi bilinmiyor, HA: Hemofilik artropati; i.a.: intraartiküler, IL: interlökin; p.o.: Peroral, PAR: proteaz aktive reseptör, RANK-L: Nükleer faktör (NF)- κ B ligandı reseptörü, TNF α : Tümör nekrozu faktör-alfa; VEGF: vasküler endotelyal büyüme faktörü. "Van Vulpen, L. F. D. Iron and inflammation: a joint problem: in blood-induced arthropathy. Diss. Utrecht University, 2017" yayınından alıntılanarak yeniden düzenlenmiştir [144].

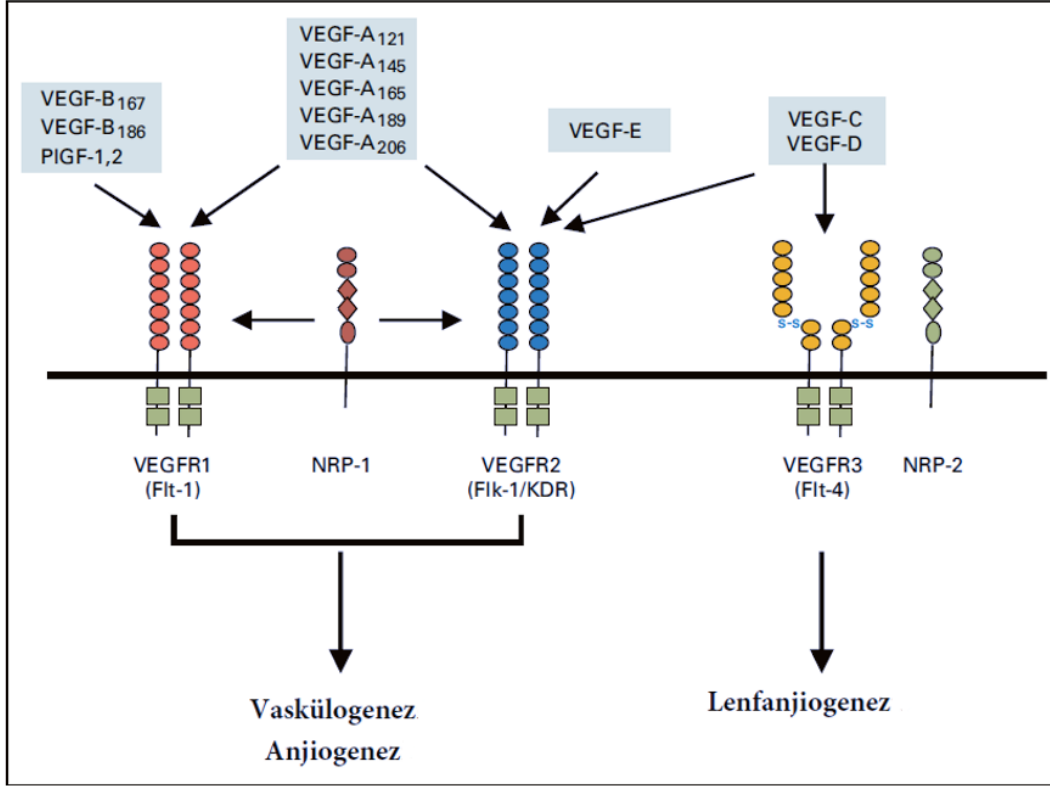
III.E. VEGF

VEGF ve reseptörleri, normal ve patolojik anjiyogenezde önemli bir rol oynar. VEGF/VEGF-reseptörünün (VEGFR) aktivasyonu ile endotel hücrelerinin hayatta kalması, mitojenezi, migrasyonu, diferansiyasyonu olmakla beraber; vasküler geçirgenlik ve endotelyal progenitör hücrelerin kemik iliğinden periferik dolaşıma mobilizasyonu ile sonuçlanan çoklu sinyal ağları tetiklenir [157]. VEGF, hipoksik koşullar gibi kan dolaşımı yetersiz olduğunda dokulara oksijen ihtiyacını geri kazandıran sistemin bir parçasıdır [158]. Bronşiyal astım ve Diabetes Mellitus'ta VEGF'nin serum konsantrasyonu yüksek olduğu gösterilmiştir [159]. Ayrıca VEGF damar geçirgenliğine aracılık eder ve malign efüzyonlarla ilişkilendirilmiştir [160, 161]. VEGF'nin neden olduğu geçirgenlik, interstisyumda anjiyogenezi kolaylaştıran proteinlerin birikmesine yol açar. Aşırı ekspresyonu kolorektal karsinom [162, 163], gastrik karsinom [164, 165], pankreas karsinomu [166, 167], meme kanseri [168, 169], prostat kanseri [170] akciğer kanseri [171], melanom [172] dahil olmak üzere çeşitli tümörlerin ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Tümör anjiyogenezindeki merkezi rolü nedeniyle VEGF/VEGFR yolu, onkoloji alanında temel araştırma ve ilaç geliştirmenin ana odak noktası olmuştur [157].

VEGF ile ilişkili anjiyojenik ve lenfanjiyojenik büyüme faktörleri ailesi, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörü (PlGF) 1 ve 2 olarak adlandırılan salgılanmış glikoproteinleri içerir. (22-24) VEGF ailesi üyeleri ve izoformları, Şekil 8'de gösterildiği gibi VEGF reseptörü (VEGFR)-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 tirozin kinaz reseptörlerine spesifik bağlanma afinitelerine sahiptir. Ek olarak, nöropilin (NRP) -1 ve NRP2, VEGF ailesi üyelerinin spesifik izoformları için ortak reseptörlerdir ve bu ligandların ilgili reseptörlerine bağlanma afinitesini artırır. Son çalışmalar, belirli VEGF izoformlarının ekspresyon paternlerinin dokuya özgü olduğunu ve bu izoformların neovaskülarizasyonda ve muhtemelen tümör anjiyogenezinde tanımlanmış rollere sahip olduğunu ileri sürmektedir [157].

Yeterli oksijen almayan bir hücrede VEGF-A üretimi indüklenebilir [173]. Bir hücre oksijenden yoksun olduğunda, bir transkripsiyon faktörü olan HIF (hipoksi ile indüklenebilir faktör) üretir. HIF, diğer işlevlerin yanı sıra (eritropoezin modülasyonu) VEGF-A'nın salınımını uyarır. Dolaşan VEGF-A daha sonra endotel hücreleri üzerindeki VEGF reseptörlerine bağlanır ve anjiyogeneze yol açan bir tirozin kinaz yolunu tetikler [174]. Bu yolların sonucunda neoanjiyogenez sağlanmış olur.

Kanser ve oftalmatolojik hastalıklarda son yıllarda anti-VEGF tedavilerine yönelim artmış olup birçok yeni ilaç bu alanda kullanılmaya başlanmıştır. Metastatik renal hücreli karsinomda Axitinib [175], kolorektal kanserlerde bevacizumab [176], medüller tiroid kanserinde cabozantinib [177] bu ilaçlardan bazılarıdır.

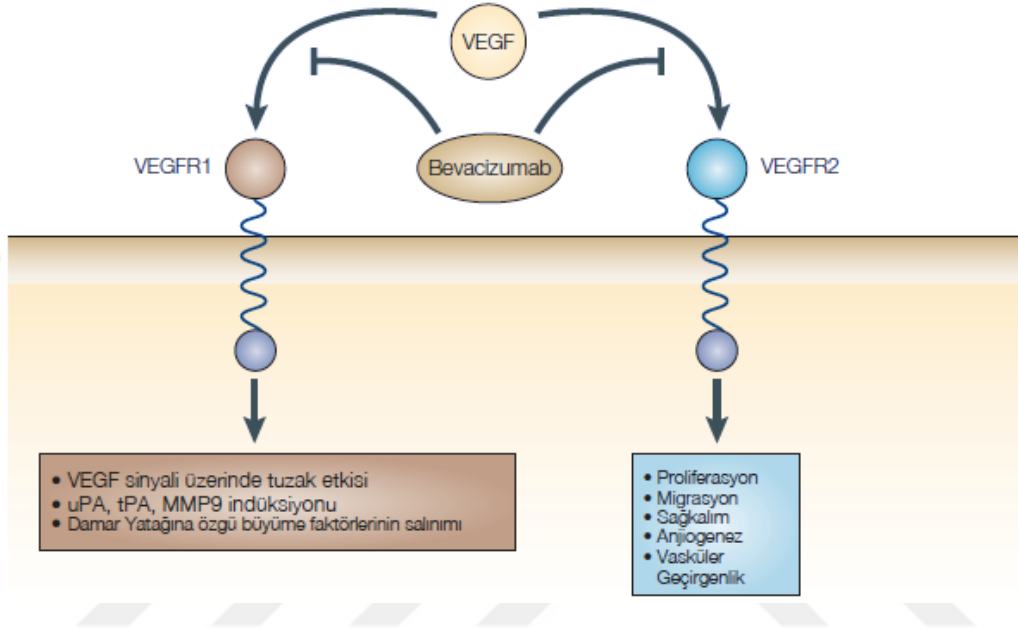


Şekil 8: VEGF ailesi üyeleri ve izoformlarının reseptörlerine etkileri. NRP-1: Nöropilin 1, NRP-2: Nörolipin 2, Flt-1: Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1 (VEGFR1), Flk-1/KDR: Fetal Liver Kinase 1/ Kinase insert domain receptor, VEGFR2: Vasküler endotelial büyüme faktörü resöptör 2, Flt-4: Fetal Liver Kinase 4. "Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol. 2005" yayınından alıntıdır [157].

III.F. Bevacizumab

Bevacizumab (Altuzan®/Avastin®; Genentech/Roche) moleküler ağırlığı 150 kDA olan, VEGF-A izoformlarına bağlanan insanlaştırılmış monoklonal antikordur. Anti-VEGF tedavisinin etkinliğinin kanıtlandığı malignite olan kolorektal kanserlerde ilk olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yarılanma ömrü ortalama 20 gün (11-50 gün) olan bevacizumab neoanjiogenezi ve endotel

hücrelerinin proliferasyonunu engeller. Endotel hücrelerinin apoptozisini uyararak oluşmuş olan damarların regresyonuna neden olur [178]. Bevacizumabın etkilerinin şematik görünümü Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9: Bevacizumabın etkilerinin şematik görünümü. VEGFR1 (vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1) tümör büyümesi ve metastazında önemli aktivitelere sahip olduğu varsayılmaktadır. Ayrıca matriks metalloproteinazlarının (MMP); tPA (doku plazminojen aktivatörü) ve uPA'nın (ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü) indüksiyonuna neden olur. VEGFR2'nin endotelial hücre mitojenezi, sağkalım ve mikrovasküler geçirgenliğin ana aracısı olduğu düşünülmektedir. Bevacizumab bu yollar üzerindeki etkisini Anti-VEGF özelliğiyle gösterir. "Muhsin, Mohamed, Joanne Graham "Beverizumab." Nature Reviews Drug Discovery 3.12 (2004): 995-997." yayınından alıntılanarak yeniden düzenlenmiştir [179].

Beverizumab, Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılan ilk anjiyogenez inhibitörüdür [180]. Metastatik kolon kanseri, serviks kanseri, glioblastom, skumaöz ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, over kanseri, primer periton kanseri, metastatik renal hücreli karsinom gibi hastalıklarda FDA (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından kullanım onayı almıştır [181]. Birçok kanser ve hastalıklarda kullanımı açısından çalışmalar günümüzde hala devam etmektedir [182].

İntravenöz Bevacizumab uygulaması sonrası bazı yan etkiler görülebilmektedir. Bu yan etkilerden bazıları; bulantı, kusma, artralji, gastrointestinal sistem perforasyonları, hipertansiyon, venöz tromboemboli, alopesi, ekfoliyatif dermatit, hiperglisemidir [183]. Bevacizumab lokal uygulama olarak intravitreal enjeksiyon şeklinde diyabetik retinopati, koroid neovaskülarizasyonu ve santral retinal ven tıkanıklığı gibi hastalıklarda kullanılmaktadır [184]. İntravitreal uygulamalarda endoftalmi, retina dekolmanı veya ön kamara iltihabı gibi yan etkiler bildirmiştir [185]. Yaptığımız literatür incelemesinde Bevacizumab'ın eklem içi uygulaması ile ilgili bildirilen bir yan etki göremedik. Bunun nedeni literatürde yeterli sayıda deneysel çalışma olmamasıdır.



IV. AMAÇLAR

Çalışmamızdaki amacımız; HA tavşan modelinde eklem içi uygulanan Bevacizumab'ın sinovyal dokulara ve kıkırdığa etkisini araştırmaktır. Bu bağlamda çalışmamız süresince amaçlarımız;

1. 8 hafta süresince haftada 2 kez eklem içi otolog kan enjeksiyonu ile insanlardakine benzer hafif hemofilik artropati tavşan modeli oluşturmak.
2. 16 hafta süresince haftada 2 kez eklem içi otolog kan enjeksiyonu ile insanlardakine benzer ağır hemofilik artropati tavşan modeli oluşturmak.
3. Eklem içi bevacizumab enjeksiyonun hafif hemofilik artropati gelişimi sırasında sinovya ve kıkırdak üzerinde etkisini araştırmak;
 - Makroskopik değerlendirme
 - Eklem çapı ölçümü
 - Radyolojik değerlendirme
 - Dinamik kontrastlı MR sonuçlarının değerlendirilmesi
 - Mikroskopik değerlendirme
 - Sinovyal skor değerlendirmesi
 - Kıkırdak hasarı skorları değerlendirilmesi
 - İmmun histokimyasal değerlendirme
4. Eklem içi bevacizumab enjeksiyonun erken tedaviye başlandığı zaman ağır hemofilik artropati gelişimi sırasında sinovya ve kıkırdak üzerinde etkisini araştırmak;
 - Makroskopik değerlendirme
 - Eklem çapı ölçümü
 - Radyolojik değerlendirme
 - Dinamik kontrastlı MR sonuçlarının değerlendirilmesi
 - Mikroskopik değerlendirme
 - Sinovyal dokularda hasarı değerlendirme
 - Kıkırdak hasarını değerlendirme
 - İmmun histokimyasal değerlendirme

5. Eklem içi bevacizumab enjeksiyonun geç tedaviye başlandığı zaman ağır hemofilik artropati gelişimi sırasında sinovya ve kıkırdak üzerinde etkisini araştırmak;

- Makroskopik değerlendirme
 - Eklem çapı ölçümü
- Radyolojik değerlendirme
 - Dinamik kontrastlı MR sonuçlarının değerlendirilmesi
- Mikroskopik değerlendirme
 - Sinovyal dokularda hasarı değerlendirme
 - Kıkırdak hasarını değerlendirme
 - İmmun histokimyasal değerlendirme

V. GEREÇ VE YÖNTEM

"Hemofilik Artropatide Eklem İçi Bevacizumab Enjeksiyonunun Kıkırdak ve Sinovya Üzerindeki Etkisinin Araştırılması: Deneysel Hayvan Çalışması" başlıklı, 2020/223 sayı numaralı araştırma projemiz T.C. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu kararıyla 28.12.2020 tarihinde bilimsel ve etik açıdan uygun görülüp onaylanmıştır. Araştırma bütçemiz 08.03.2021 tarihinde, 2021/5 toplantısında alınan karar ile İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) bünyesinden karşılanmıştır.

V.A. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Çalışmamızda Bezmialem Üniversitesi hayvan deneyleri laboratuvarından temin edilen 25 adet Yeni Zelanda deney tavşanı kullanıldı. Denekler; yaşları 1,5 ile 2 yaş arasında, ağırlıkları 2,5 kg ile 3,2 kg arasında ve cinsiyet farkı gözetiilmeden seçildi. Deney süresince tüm denekler 12 saat gündüz 12 saat gece olacak şekilde aydınlatma altında, %50-60 nem ve 20-24 °C derece oda sıcaklığında tekli kafeslerde tutuldu. Standart laboratuvar diyeti ve su ile ad libitum beslenme şekliyle beslendi.

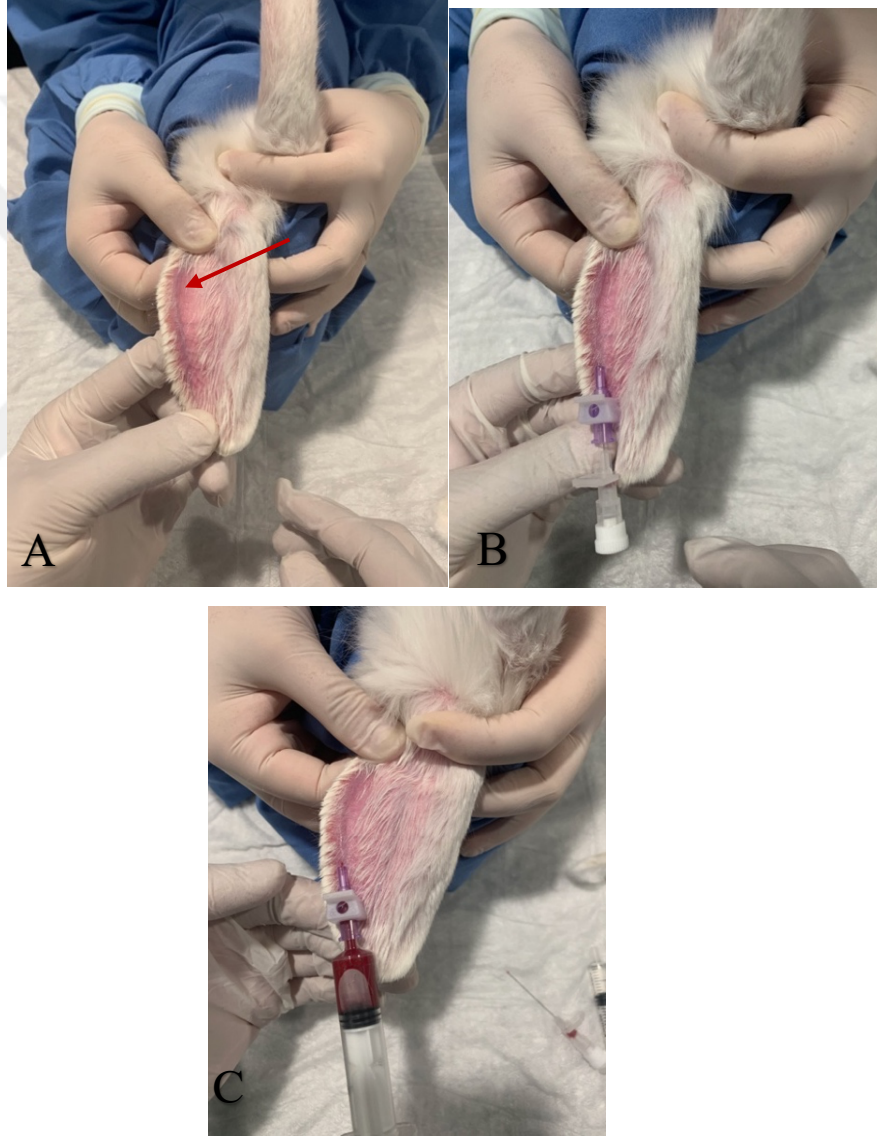
Herhangi bir girişim uygulanmayan 4 adet deney hayvanının 8 diz eklemi normal diz eklemi kabul edilerek kontrol grubu (Grup N) olarak belirlendi. Geriye kalan 21 deney hayvanı 7 şerli olarak 3 gruba ayrıldı. Grup A, Grup B, Grup C olarak gruplar adlandırıldı. Her bir gruptaki deney hayvanına 1'den 7'ye kadar numaralar verildi. Her gruptaki deneklerin sağ diz eklemleri tedavi (T) grubu ve sol diz eklemleri kontrol grubu (K) olarak isimlendirildi. Böylelikle 50 diz eklemi gruplandırılmış ve isimlendirilmiş oldu. Örneğin: A1T; Grup A, 1 numaralı denek, tedavi uygulanan diz, C3K; Grup C, 3 numaralı denek, kontrol diz, N1: Normal diz kontrol grubu, 1 numaralı diz.

V.B. Hemofilik Artropati Modelinin Oluşturulması

Madhok ve ark. ilk olarak tanımladığı deneysel hemofilik artropati modelindeki ortaya çıkan yıkıcı artrit; insanlardaki hemofilik artritte benzer makroskopik ve mikroskopik değişiklikler göstermektedir [186]. Bu nedenle çalışmamızın tasarımında bu model temel alınarak hemofilik artropati modeli oluşturuldu.

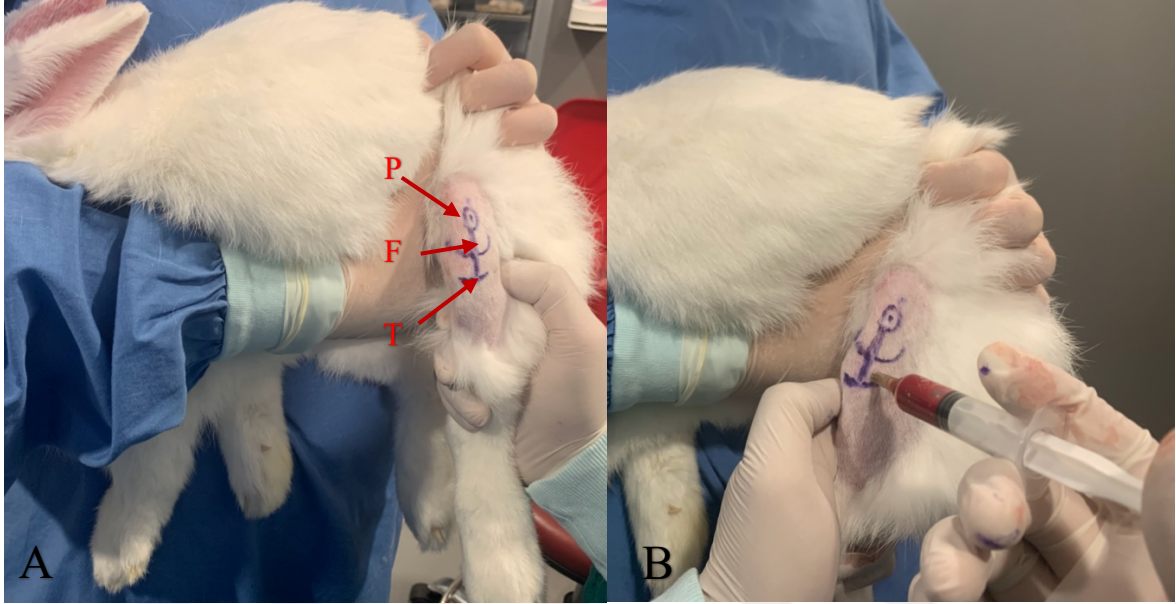
Diz eklem içi enjeksiyonu için her tavşanın diz eklemindeki tüyler, 35mg / kg Ketamin Hidroklorid (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul) ve 6mg/kg Xylazine® (Rhompun, Bayer, İstanbul) uygulanarak anestezi altında traş edildi.

Her tavşanın kulağındaki marjinal venden 26 gauge branül ile damar yolu açıldıktan sonra 2,5 ml otolog kan antikoagülansız olarak alındı (Resim 7). Kan alındıktan sonra eklem içi enjeksiyona kadar geçen sürede pıhtılaşma olması halinde işlem yeniden tekrarlandı.



Resim 7: Tavşan dorsal kulak veninden kan alınması. A; Marjinal ven kırmızı ok ile gösterilmiştir. B; 26 gauge mor anjiokatk ile damar yolu açılması. C; 2,5 ml kan alınması

Alınan 2,5 ml otolog kan ikiye bölünerek tavşanların her iki diz eklemlerine femur, tibia ve patella palpasyonla tespit edildikten sonra lateral eklem aralığına her bir diz eklemi için 1,25ml olacak şekilde enjekte edildi (Resim 8).



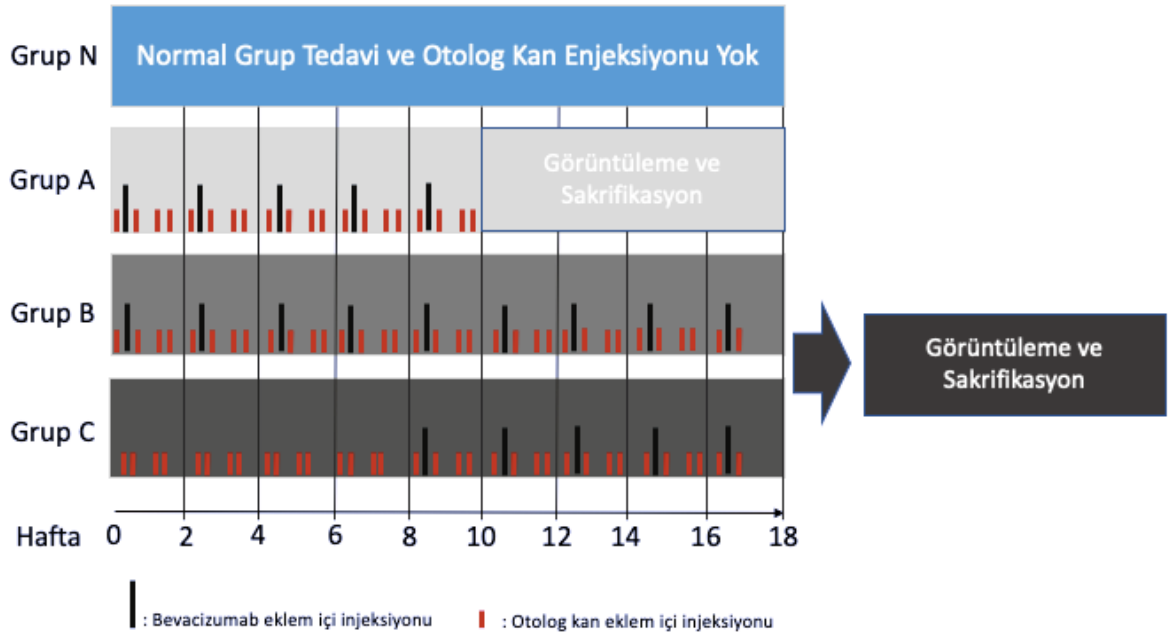
Resim 8: Eklem içi 1,25ml otolog kan enjeksiyonu A: P, patella; F, femur; T: Tibia palpasyonla tespiti. B: Her bir diz eklemi içerisine otolog kan enjeksiyonu.

V.C. Gruplara Göre Eklem İçi Enjeksiyonlar

Daha önce tanımlanan Grup A'daki her tavşanın her iki diz eklemine "hafif artropati" oluşturmak için 8 hafta boyunca, haftada 2 kere otolog kan eklem içi enjeksiyonu uygulandı. Grup B ve C'de her tavşanın her iki diz eklemine "şiddetli artropati" oluşturmak amacıyla 16 hafta otolog kan eklem içi enjeksiyonu uygulandı [17, 187-189]. Şekil 10'da çalışma şeması gösterilmiştir.

- Hafif artropati grubundaki etkinliği görmek için A grubunun sağ diz eklemine 0,2,4,6,8. haftalarda 4mg/kg dozunda Bevacizumab (Avastin®; Genentech) eklem içi enjeksiyonu uygulandı.
- Şiddetli artropatideki etkinliği görmek için B grubunun sağ diz eklemine 0,2,4,6,8,10,12,14,16. haftalarda 4mg/kg dozunda Bevacizumab eklem içi enjeksiyonu uygulandı.

- Hafif artropati geliştikten sonra şiddetli artropatiye ilerleyiş üzerindeki etkiyi değerlendirmek için C grubunun sağ diz eklemine 8,10,12,14,16. haftalarda 4mg/kg dozunda Bevacizumab eklem içi enjeksiyonu uygulandı.
- A, B, C gruplarına uygulanan bevacizumaba karşılık karşı dize (sol diz eklemlerine) aynı hacimde steril %0,9 salin eklem içi enjeksiyonu yapıldı. Böylelikle A, B, C gruplarındaki deneklerin sol diz eklemleri kendi gruplarının kontrol grubu olarak kabul edildi.



Şekil 10: Çalışma yönetiminin şeması. Eklem içi enjeksiyonların haftalara göre dağılımları gösterilmiştir.

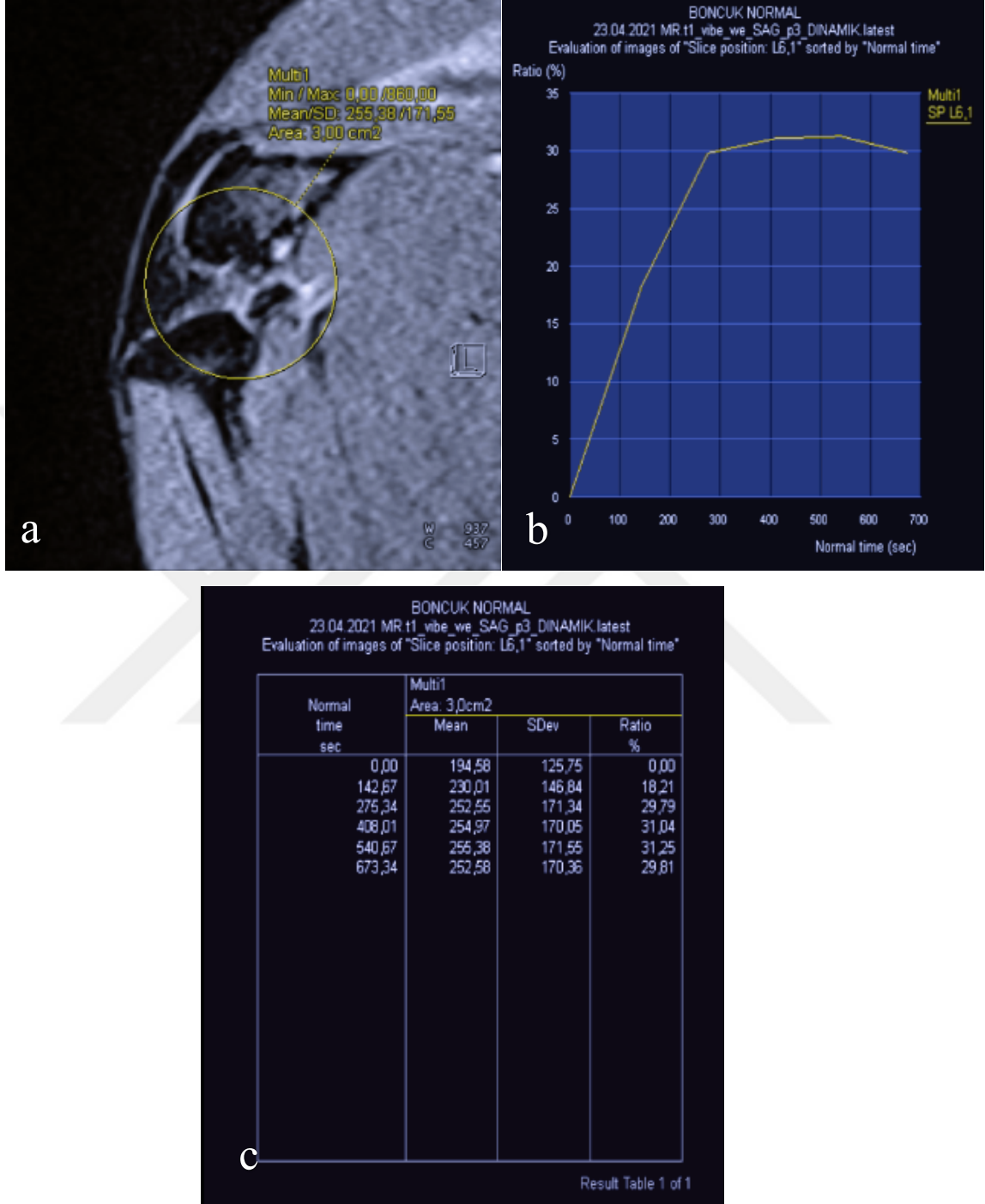
V.D. Görüntüleme ve Sakrifikasyon

V.D.1. Manyetik Rezonans (MR)

Grup A'daki Tavşanlar 10. haftada, Grup B ve C' deki tavşanlar 18. haftada 35mg/kg Ketamin ve 6mg/kg Ksilazin sedasyonu uygulandıktan sonra supin pozisyonunda yatırıldıktan sonra MR çekimi uygulandı.

Görüntüler 1.5 Tesla MR cihazında (Siemens Magnetom Aera,Erlangen,Almanya) 15 kanallı tx/rx diz koili kullanılarak elde edildi. Sedatize supin pozisyonundaki tavşan dizlerine yönelik sagittal T1 ağırlıklı 3D gradient eko sekansları kullanılarak çekim yapıldı (TE/TR=6.8/17 ms, 0.7 mm kesit kalınlığı, FOV 148 mm, 256×128 matrix, flip angle 10°, çekim süresi 11:20 s). Bir tanesi kontrast madde enjeksiyonu öncesi, 5 tanesi ise pompa enjektörü yardımıyla 0.1 mM/kg MR kontrast madde (gadobutrol; Gadovist,Bayer Ag,Almanya) uygulanması sonrasında olacak şekilde toplamda 6 görüntü elde edildi. Tavşan başına total çekim süresi yaklaşık 20 dakikaydı.

Tavşanların dizlerindeki kontrast tutulumunu değerlendirmek amacıyla ilk olarak ilgili alan boyutu (ROI) belirlendi [190]. Femurun aksiyal planda interkondiler bölgesine karşılık gelen sagittal plan görüntüleri elde edildi. Anteriorda infrapatellar bölge posteriorda posterior kapsülü içine alacak şekilde ROI çizildi. ROI çapı ortalama 3cm olarak belirlendi. Çizimler tek operator tarafından post-kontrast serilerden elde edildi. İlgili alan çizimleri sonrası zamana göre sinyal yoğunluk değişim grafikleri iş istasyonundan (syngo.via; Siemens Healthineers) elde edildi. İlgili alanda her bir postkontrast zaman noktasında sinyal yoğunluğundaki değişim ölçülerek ortalamanın ortalaması sinyal yoğunluğu, maksimum ortalama sinyal yoğunluğu ve maksimum sinyal yoğunluğuna ulaşma süresi bevacizumab uygulanan ve uygulanmayan her iki dizde karşılaştırıldı. Resim 9'da Kontrol grubu (Normal) tavşan dizi MR görüntüsü, ROI çizilmesi ve kontrastlanma oranı-zaman grafiği ve çıkan veriler gösterilmiştir.



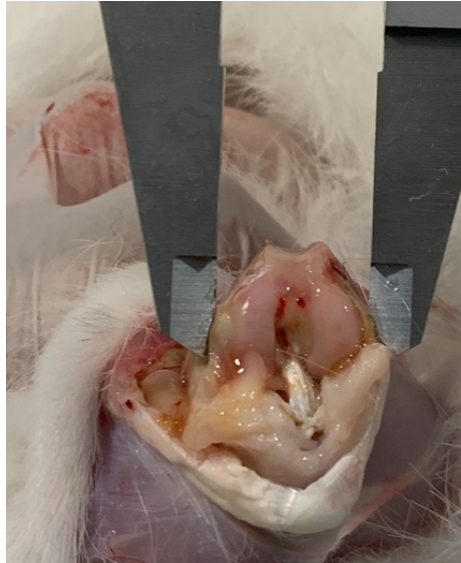
Resim 9: Kontrol grubu (Normal) tavşan dizi MR (manyetik rezonans) görüntüsü a: ROI (region of interest (ilgili alan)) çizilmesi, b: Kontrastlanma oranı-zaman grafiği, c: Kontrast tutulumu düzeyi verileri. Syngo.via; Siemens Healthineers programı kullanılarak elde edilmiştir.

V.D.2. Sakrifikasyon

Grup A'daki tavşanlar 10. haftada, Grup B ve C' deki tavşanlar 18. haftada MR çekimi sonrası yüksek doz Thiopental Sodium (Pental, İbrahim Etem Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş.) uygulanarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrasında, her iki diz eklemleri üzerinden yapılan insizyon ile cilt ve cilt altı geçildi. Ekleme medial artromi yapıldıktan sonra patellar tendon kesilip patella laterale alındı. Femur kondilleri ve diz eklem ortaya konuldu. Diz eklemine yaklaşık 4cm proksimalden, diz eklemine yaklaşık 3cm distalinden gigli teli yardımıyla kemik kesileri yapıldıktan sonra diz eklemleri alındı. Makroskopik inceleme yapıldıktan sonra, immunhistokimya için örnekler alındı. Daha sonra eklemler histopatolojik inceleme için %10 tamponlanmış formaldehid solüsyonuna konuldu.

V.E. Makroskopik İnceleme

Sakrifikasyon sonrası alınan eklemlerde doku rengi, eklem efüzyonu, sinovyum ve kıkırdak yapıları dahil olmak üzere patolojik değişiklikler, Bevacizumab tedavisi uygulanan veya uygulanmayan hafif ve ağır HA dizleri arasında dikkatlice değerlendirildi. Eklemlerin çapı, çevre sinovyal dokular dahil edilerek femoral kondiller arasındaki en uzun mesafe olarak kabul edildi [189]. Kumpas yardımıyla eklem çapları dikkatlice ölçülüp not edildi. Resim 10 eklem çaplarının ölçülmesi gösterilmiştir.



Resim 10: Eklem çaplarının kumpas yardımıyla ölçülmesi

V.F. Mikroskopik Değerlendirme

Dokuların fiksasyonu ve histolojik incelemeler için dokular %10'luk formolde 24-48 saat bekletildi. Daha sonra kemik dokunun dekalsifikasyonu için dokular, %10'luk nitrik asit içinde kontrollü şekilde bekletildi. Nitrik asitin uzaklaştırılması amacıyla 20 dakika akan musluk suyu altında yıkandı. Sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutularak dehidratasyon sağlandı. Ardından 30'ar dakika 2 farklı ksilene tabi tutuldu. Birer saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlanan dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı.

Kesitlerin mikroskopik incelemesi için Hematoksilen Eozin ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Kıkırdak dokusunun histopatolojik incelemesi için femur lateral kondilinden alınan kesitlere Safranin O boyama işlemi gerçekleştirildi.

V.F.1. Hematoksilen Eozin Boyama Prosedürü

Kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra ilki 20 dakika etüv içerisinde diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Dehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile suya 40 dakika maruz bırakıldıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, fazla boyaların dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akan suda yıkanan kesitler daha sonra, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

V.F.2. Safranin O Boyama Prosedürü

Femur lateral kondilini içeren deparafinize 5 µm büyüklüğünde lam üzerine alınmış olan kesitler distile su yıkandı. Weigert'in hematoksilen solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Solüsyondan çıkarılan kesitler 10 dakika boyunca akan musluk suyu altında bekletildi. Daha sonra 5 dakika bekletilmek üzere Fast Green solüsyonuna alındı. Fast Green solüsyonundan çıkarılan kesitler 10 saniyeyi geçmeyecek şekilde %1'lik asetik asit solüsyonunda bekletildi. Asetik asit solüsyonundan çıkarıldıktan sonra %0.1 Safranin O solüsyonunda 5 dakika boyunca bekletildi. Safranin O solüsyonundan çıkarılan kesitler her bir turda 2 dakika olmak üzere sırasıyla %95 Etil

Alkol, %100 Etil alkol ve ksilen solüsyonlarından 2 kez geçirildi. Kesitler entellan ile kapatıldı. Böylelikle çekirdekler siyah, sitoplazma mavimsi yeşil, kıkırdak ve müsin turuncudan kırmızıya renk skalasında boyanmış oldu [191-193].

V.F.3. İmmünohistokimyasal İnceleme

Western Blot yöntemi ile protein analizi için in vivo çalışmalar sonucu alınan dokular sıvı azot kullanarak donduruldu ve -80°C'de deneysel aşamalara kadar saklandı. 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerinde saklanan dokular sonikatör kullanılarak parçalandı ve üstlerinde yaklaşık 300 µL proteaz inhibitörleri ve sodyum ortovanadat içeren RIPA solüsyonu eklendi. 5 dk buz üzerinde bekletildikten sonra 2 kere vortekslenerek -80°C'de bekletildi. Ertesi gün 10000 x g, 4°C, 20 dk boyunca santrifüj sonrası supernatantlar toplanarak konsantrasyon ölçümleri bişinkoninik asit (BCA) yöntemine göre ölçüldü [194]. Elde edilen proteinler, kuyucuk başına 100 µg protein olacak şekilde 2x Laemmli solüsyonu ile hazırlandı ve %4-10 SDS jelde yürütüldü. Dikey elektroforez soğuk odada, sabit voltajda (130 V) yaklaşık 100 dakika yürütüldü. Elektroforez işlemi bittikten sonra proteinler transfer sistemi kullanılarak poliviniliden diflorür membrana aktarıldı. Bloklama işleminin ardından primer antikorlar (Anti-VEGF antibody, Abcam, MA, ABD ve Anti-Beta Aktin antibody, Cell Signaling) %5 süt tozu içerisinde 1:500 oranında hazırlandı ve membranların üzerine döküldükten sonra +4°C'de hafif sallanarak gece boyu bekletildi. 1XTBST ile yıkandıktan sonra sekonder antikor (Goat Anti-Mouse, Abcam) ile oda sıcaklığında 1 saat hafif sallanarak bekletildi. Membranlar yıkandıktan sonra bantların görüntülenmesi için kemilüminesans kit (Clarity Western ECL Substrate, Biorad, CA, ABD) kullanıldı ve görüntüleme cihazı ile resimleri çekildi. Elde edilen bantların derecelendirilmesi ImageJ (Ulusal Sağlık Enstitüsü, ABD) programı ile yapıldı [195]. İstatistiksel analizler Bezmialem Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde Student's t test (paired) yöntemi kullanılarak, %95 güven aralığında GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, CA, ABD) programında yapıldı, p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

V.F.4. Histolojik Değerlendirme ve Skorlamalar

Sinovyal dokunun histomorfolojik değişikliklerini kantitatif olarak değerlendirmek için Kern V. ve ark.nın tariflediği; sinovyal stroma hücreliliğini ve inflamasyonu değerlendiren skorlama ile beraber sinovyal vaskülarizasyon, hemosiderin birikimi, villus formasyonu gibi HA'de görülen histopatolojik değişiklikleri değerlendirmek amacıyla Valentino ve ark. tariflediği skorlama birlikte kullanılarak HE ile boyanan preparatlar deneyimli patolog tarafından değerlendirildi [196,

197]. Sinovyal lining (yüzeyel tabaka) hücre tabakasının genişlemesi; tek sıra halinde 0 puan, 2-3 sıra halinde 1 puan, 4-5 sıra halinde ve mutlinükleer hücreler görülüyorsa 2 puan, 5 ten fazla sıra halinde ve hücreler ülserleşmiş ve çok çekirdekli hücreler görülüyorsa 3 puan olarak değerlendirildi. Sinovyal stromada; hücresellik biraz artmış 1 puan, orta derecede artmış ve çok çekirdekli hücreler 2 puan, büyük ölçüde artmış ve çok çekirdekli dev hücreler, pannus oluşumu ve granülomlar 3 puan olarak değerlendirildi. İnflamasyon değerlendirmek için; birkaç yerleşmiş lenfosit veya plazma hücresi 1 puan, birçok lenfosit veya plazma hücresi, bazen folikül benzeri kümeler 2 puan, yoğun bant benzeri inflamatuvar hücre infiltrasyon veya çok sayıda büyük folikül benzeri agregatlar 3 puan olarak değerlendirildi. Sinovyal vaskülarizasyon; normal 0 puan, hafif artmış 1 puan, orta derece artmış 2 puan, şiddetli artmış 3 puan olarak değerlendirildi. Hemosiderin renk değişikliği olmaması 0 puan, olması halinde 1 puan; villus formasyonu; yok 0 puan, var 1 puan olarak hesaplandı. Hematoksilen Eozin ile değerlendirilen preparatların sinovyal skorlaması Tablo 8'de gösterilmiştir.

Kıkırdak dokusunun histomorfolojik değişikliklerinin incelenmesinde tavşanda osteoartritin histolojik değerlendirmeleri için önerilen ve Osteoartrit Uluslararası Araştırma Topluluğu (OARSI) tarafından 2010 yılında oluşturulan skorlamadaki parametler kullanıldı. Safranin O ile boyanan preparatların değerlendirilmesi amaçları doğrultusunda eklem kıkırdakı dört bölgeye ayrıldı. Bölge 1: Yüzeyel bölge: üst 1/3 hiyalin kıkırdak; Bölge 2: Orta bölge: orta 1/3 hiyalin kıkırdak; Bölge 3: Derin bölge: derin 1/3 hiyalin kıkırdak; Bölge 4: Kalsifiye bölge. Boyanma kaybının derecesi, kıkırdak yapısındanki değişiklikler, kondrosit yoğunluğu, küme formasyonu değerlendirme kriterleri olarak kabul edildi [198]. Kıkırdak değerlendirilmesi için kullanılan skorlama Tablo 9'da gösterilmiştir.

V.F.5. İstatistiksel Analiz Yöntemi

İstatistiksel analizler, GraphPad Prism 8.3.0 yazılımı ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistiksel parametreler, medyan (min-maks.) olarak verildi. Grup içi karşılaştırmalar için Wilcoxon testi kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırma için çoklu karşılaştırmalarda non-parametrik şartlarda Kruskal-Wallis testi ve beraberinde ikili karşılaştırmalar (post hoc analizler) için Dunn's testi uygulandı. $p < 0,05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Parametre	Açıklama	Puan
Sinovyal yüzeyel hücre tabakasının genişlemesi	Tek sıra halinde	0
	2-3 sıra halinde	1
	4-5 sıra halinde, multinükleer hücreler görülebilir	2
	5 ten fazla sıra halinde, hücreler ülserleşmiş olabilir ve çok çekirdekli hücreler oluşabilir	3
Sinovyal stroma	Hücresellik biraz artmış	1
	Hücresellik orta derecede artmıştır; çok çekirdekli hücreler oluşabilir	2
	Hücresellik büyük ölçüde artar; çok çekirdekli dev hücreler, pannus oluşumu ve granulomlar oluşabilir	3
İnflamasyon	Birkaç yerleşmiş lenfosit veya plazma hücresi	1
	Birçok lenfosit veya plazma hücresi, bazen folikül benzeri kümeler	2
	Yoğun bant benzeri inflamatuvar infiltrasyon veya çok sayıda büyük folikül benzeri agregatlar	3
Sinovyal vaskülarizasyon	Normal	0
	Hafif artmış	1
	Orta derece artmış	2
	Şiddetli artmış	3
Hemosiderin renk değişikliği	Yok	0
	Var	1
Villus formasyonu	Yok	0
	Var	1

Tablo 8: Hematoksilen Eozin ile değerlendirilen preparatların skorlaması Valentino L ve ark, Kern V ve ark yaptıkları skorlama sistemlerinden alıntılanarak yeniden düzenlenmiştir [196, 197].

Safranin O Fast Green Boyanma	Puan
Eklem kıkırdağı boyunca tek tip boyanma	0
Hyalin kıkırdağın yüzeyel bölgesinde boyanma kaybı, kondil veya platonun uzunluğunun <%50	1
Hyalin kıkırdağın yüzeyel bölgesinde boyanma kaybı, kondil veya platonun uzunluğunun ≥%50	2
Hyalin kıkırdağın üst 2/3'ünde boyanma kaybı, kondil veya platonun uzunluğunun <%50	3
Hyalin kıkırdağın üst 2/3'ünde boyanma kaybı, kondil veya platonun uzunluğunun ≥%50	4
Tüm hyalin kıkırdağda boyanma kaybı, kondil veya platonun uzunluğunun <%50	5
Tüm hyalin kıkırdağda boyanma kaybı, kondil veya platonun uzunluğunun ≥%50	6
Küme formasyonu	Puan
Normal	0
<4 küme	1
≥4 ancak <8 küme	2
≥8 küme	3
Kondrosit yoğunluğu	Puan
Hücrelerde azalma yok	0
Hücrelerde fokal azalma	1
Hücrelerde multifokal azalma	2
Hücrelerde multifokal konfluent azalma	3
Hücrelerde diffüz azalma	4

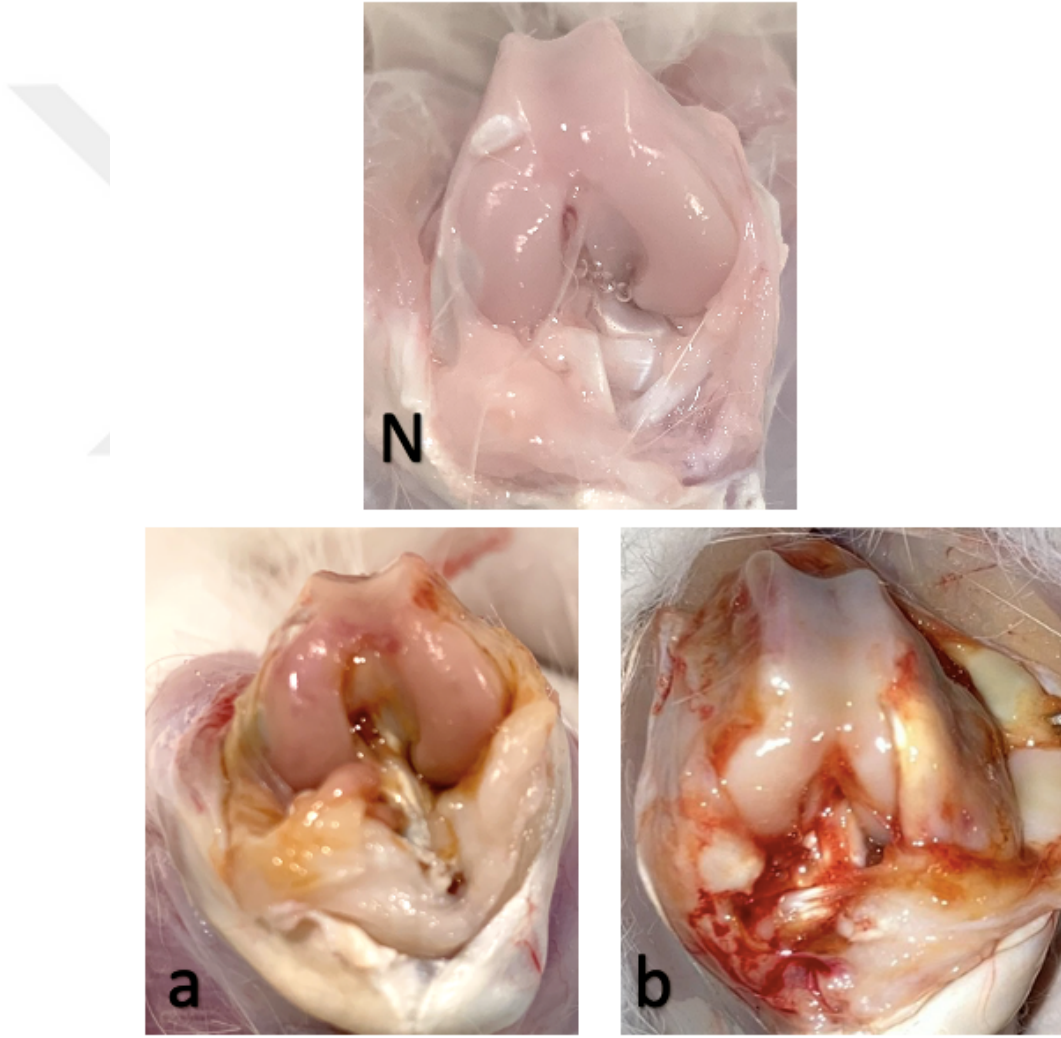
Yapı	Puan
Normal	0
Yüzey düzensizlikleri	1
Fissürler yüzeyin <%50	2
Fissürler yüzeyin ≥%50	3
1/3 hyalin kıkırdak erozyonu, yüzeyin <%50	4
1/3 hyalin kıkırdak erozyonu, yüzeyin ≥%50	5
2/3 hyalin kıkırdak erozyonu, yüzeyin <%50	6
2/3 hyalin kıkırdak erozyonu, yüzeyin ≥%50	7
Tam derinlikte hyalin kıkırdak erozyonu <%50	8
Tam derinlikte hyalin kıkırdak erozyonu ≥%50	9
Hyalin ve kalsifiye kıkırdağın tam derinlikte subkondral kemiğe kadar erozyonu, yüzeyin <%50	10
Hyalin ve kalsifiye kıkırdağın tam derinlikte subkondral kemiğe kadar erozyonu, yüzeyin >%50	11

Tablo 9: Tavşan dizinin eklem kıkırdağı değişikliklerinin histokimyasal/histolojik değerlendirmesi için kullanılan OARSI skorlaması. Laverty, S et al. "The OARSI histopathology initiative recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit." Osteoarthritis and cartilage vol. 18 Suppl 3 (2010) yayından alınarak yeniden düzenlenmiştir [198].

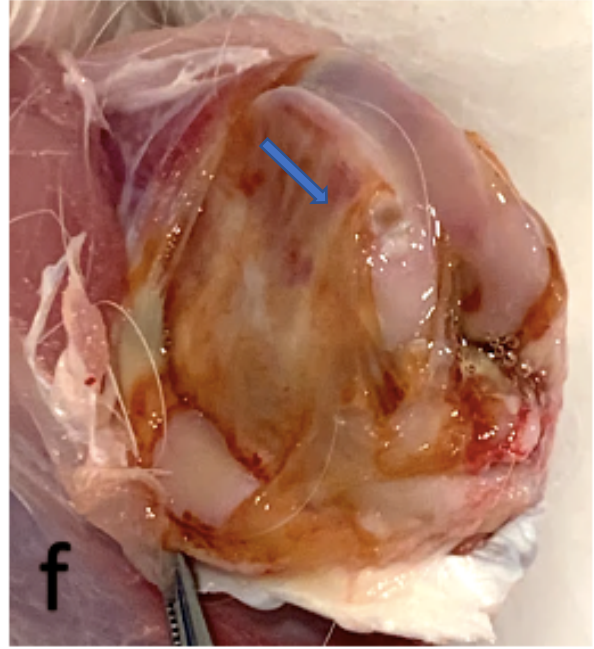
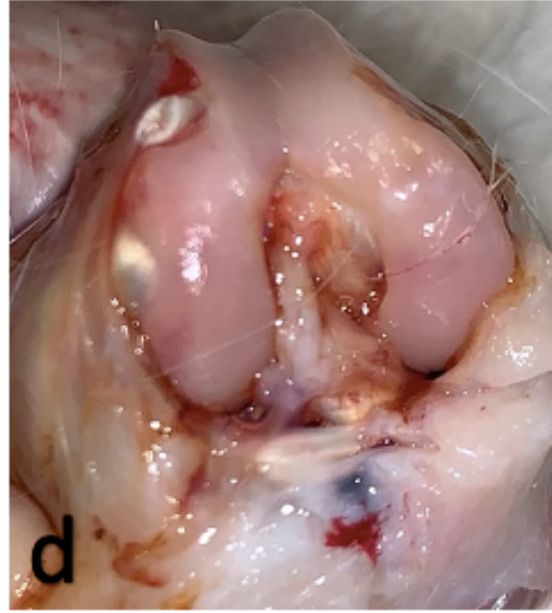
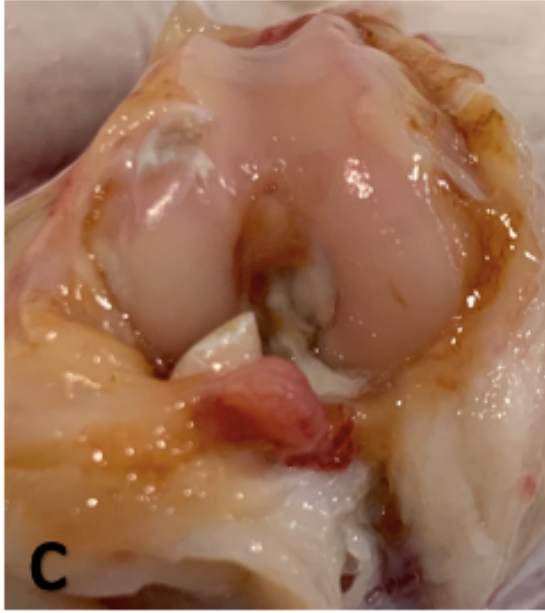
VI. BULGULAR

VI.A. Makroskopik Bulgular

Tüm gruplarda kontrol grubuna göre; femur kondilerinin ve sinovyal dokuların renginin sarıya döndüğünü ve eklemlerdeki efüzyonun daha fazla olduğunu gördük. Sinovyal sıvı ve dokulardaki beyazdan sarıya dönme hafif artropati grubunda ağır artropati grubuna göre daha azdı (Resim 11, 12).



Resim 11: Sakrifikasyon sonrası makroskopik diz eklemi görüntüleri. N: Kontrol (normal) diz eklemi, a: Hafif artropati grubu (A Grubu) tedavi uygulanan diz eklemi, b: Hafif artropati grubu (A grubu) kontrol diz eklemi.



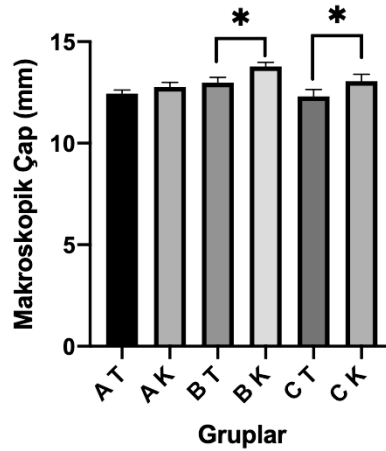
Resim 12: c: Ağır artropati grubu 16 hafta süresince tedavi uygulanan diz (B grubu). d: Ağır artropati grubu 8 hafta sonra tedavi başlanan (C grubu) diz eklemi e: C grubu (ağır artropati) kontrol diz eklemi anteriordan görünümü f: Ağır artropati C grubu kontrol diz eklemi lateralden görüntüsü. Mavi ok: Hemosiderin birikimine bağlı eklem içi dokulardaki renk değişikliği. Kırmızı ok: Kıkırdak dokusundaki eklem içi hemartroza bağlı hasar.

Eklem içi Bevacizumab uygulanan ile uygulanmayan dizlerin makroskopik çap ölçümleri karşılaştırılmıştır. Hafif artropati grubu değerlendirildiğinde; AT (eklem içi bevacizumab uygulanan diz grubu) ve AK (eklem içi %0.9 salin grubu) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,063$). Ağır artropati grubundan 16 hafta boyunca Bevacizumab tedavisi alan BT grubu ile 16 hafta %0.9 salin grubu (BK) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,016$). Tedavi uygulanan grupta makroskopik eklem çapı anlamlı olarak kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Ağır artropati grubundan 8. hafta Bevacizumab tedavisi başlanan CT grubu ile bevacizumab uygulanmamış ağır artropati grubu olan CK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,0313$). Bevacizumab uygulanan (CT) grupta eklem çapı ölçümü anlamlı olarak tedavi olmayan kontrol grubuna (CK) göre düşük bulundu.

Tablo 10: Makroskopik eklem çap ölçümlerinin grup içi karşılaştırmaları

Değişkenler	Kontrol	AT	AK	BT	BK	CT	CK
	Medyan (Min-Maks.)						
Makroskopik Eklem Çapı (mm)	-	12,5 (11,8-13,0)	12,5 (12,3-14,0)	12,7 (12,3-14,0)	14 (13,1-14,5)	12,2 (11,3-14,0)	13,3 (12,0-14,4)

Wilcoxon İşaretli Sıralar testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlıdır.

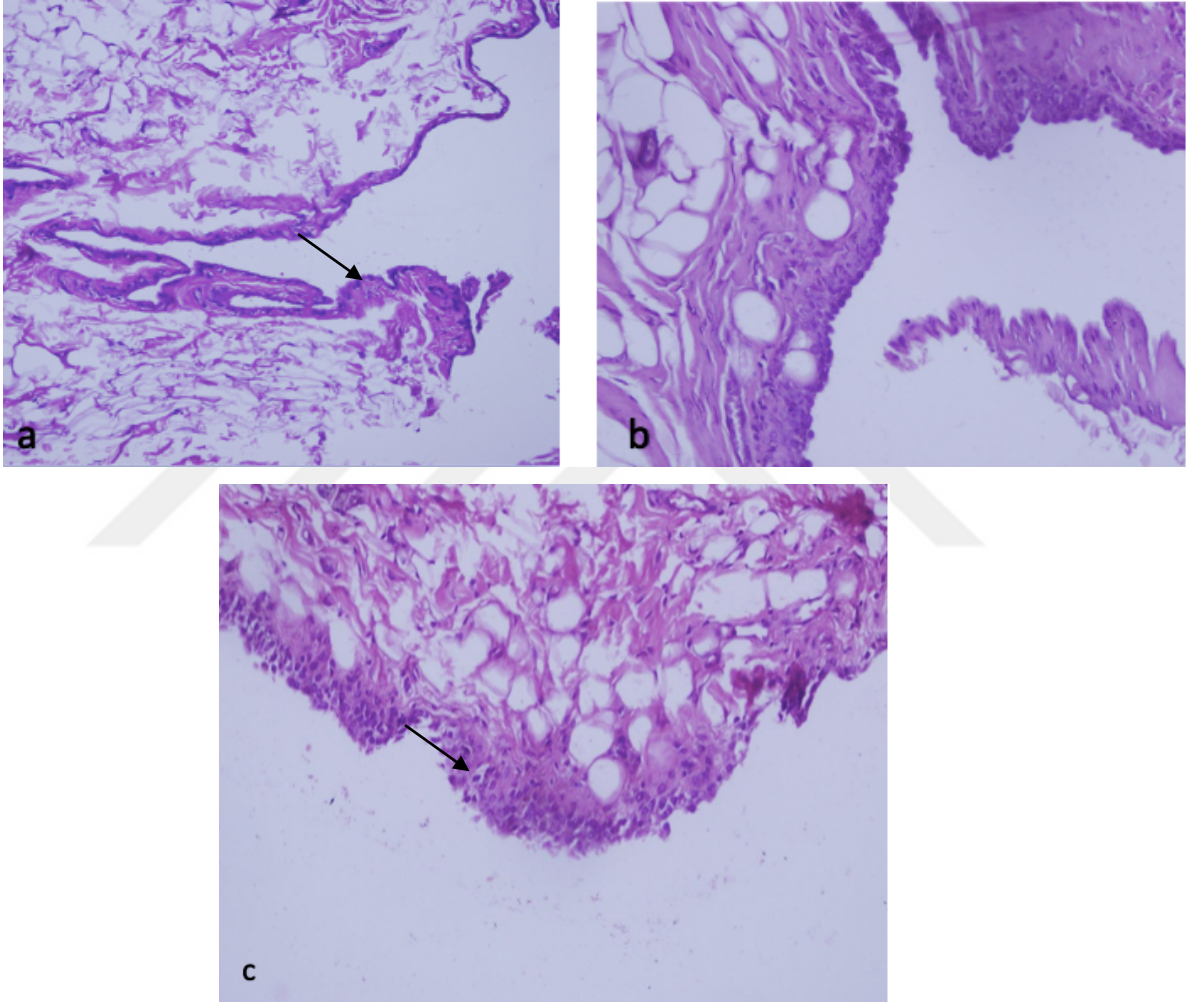


Grafik 1: Tüm gruplarda bevacizumab uygulanan diz eklemi ile uygulanmayan gruplara göre eklem çapı daha düşük bulunmuştur. Ancak BT grubunun BK grubuna göre, CT grubunun CK grubuna göre düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlıdır (*): $p<0,05$.

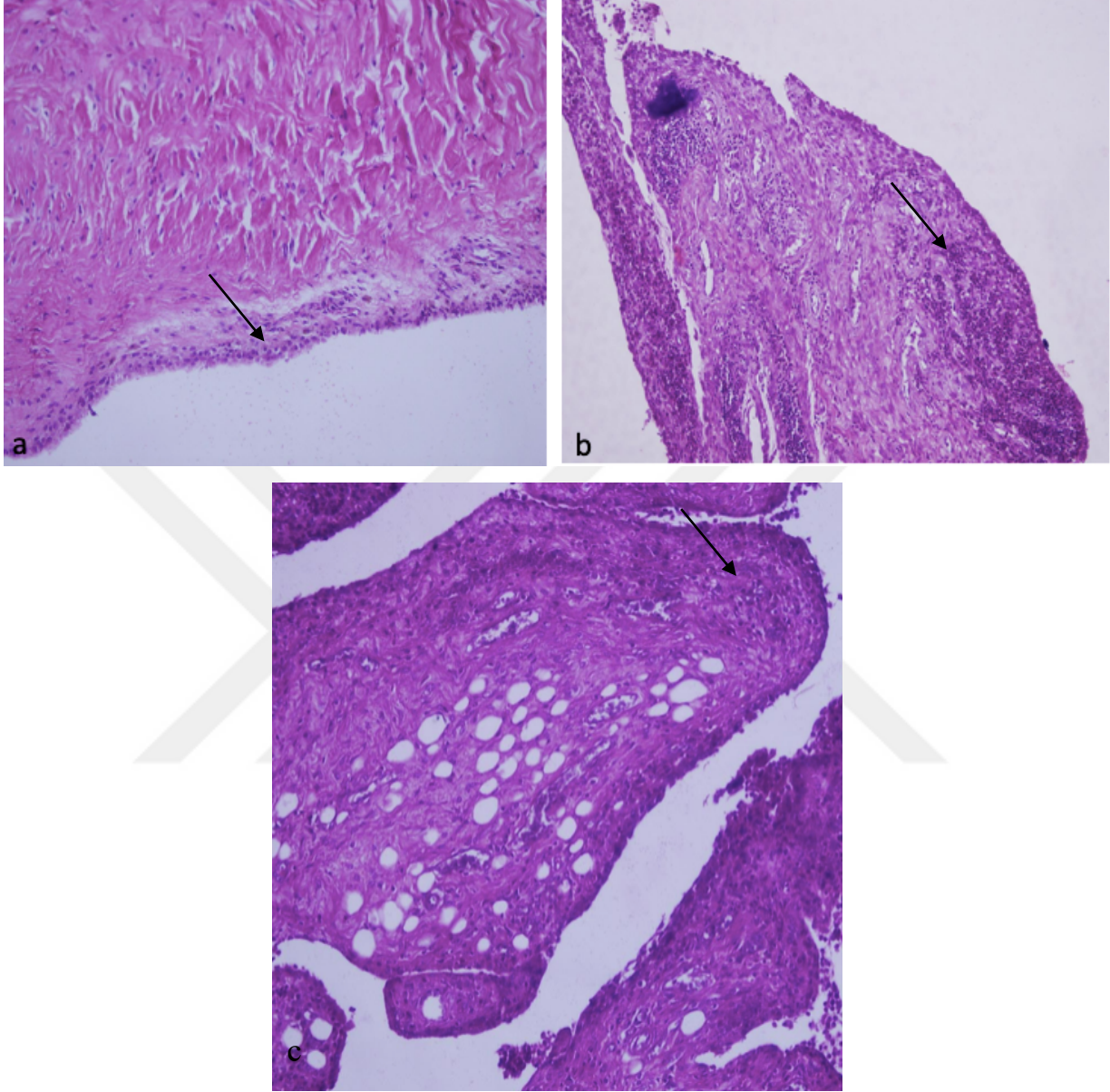
VI.B. Mikroskopik Bulgular

VI.B.1. Sinovyal Doku

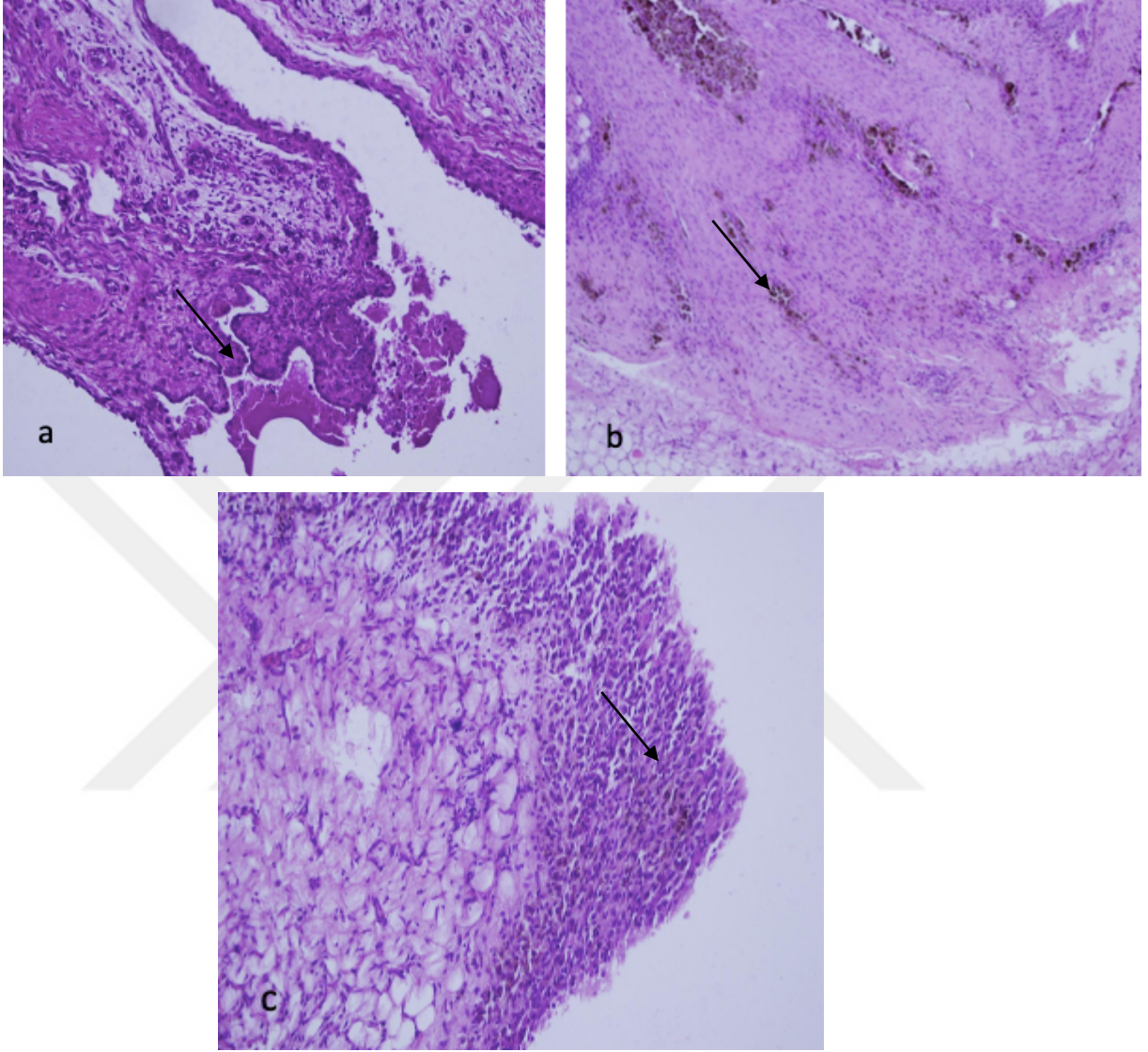
Sinovyal lining (yüzeyel tabaka) hücre tabakası, inflamasyon, sinovyal stroma hücreliliği sinovyal vaskülarizasyon, hemosiderin renk değişikliği villus formasyonu sinovyal doku kesitlerinde değerlendirildi (Resim 13,14,15,16).



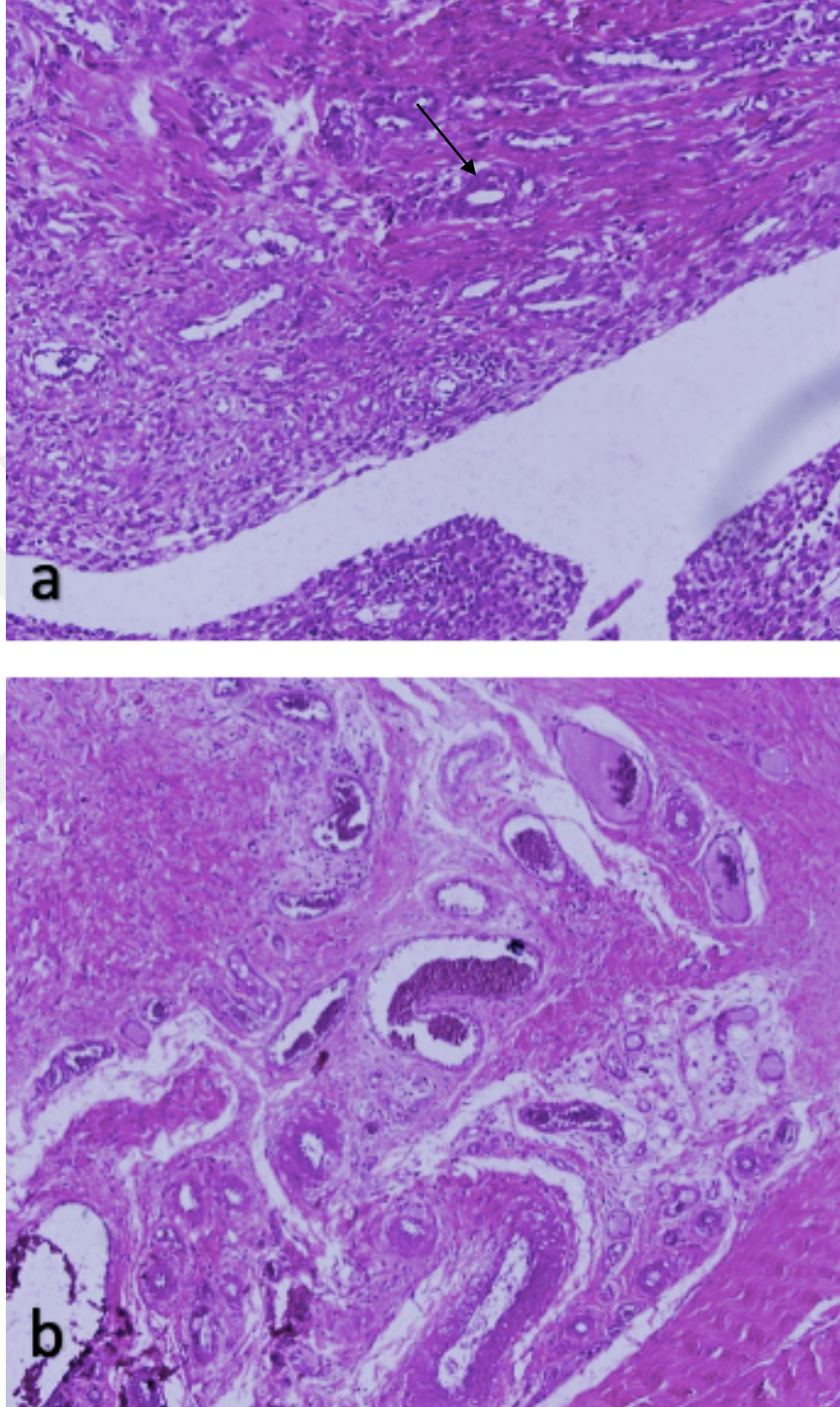
Resim 13: Sinovyal doku histopatolojik değerlendirme 1. a,b: Kontrol (Normal) tavşan sinovyal dokusu görüntüleri. Tek sıra sinovyal yüzeyel hücre tabakası (ok ile gösterilmiştir), stromada normal hücrelilik. c: Grup AK (hafif artropati grubu tedavisiz diz eklemi) sinovyal yüzeyel hücre tabakasında artış (ok ile gösterilmiştir).



Resim 14: Sinovyal doku histopatolojik değerlendirme 2. a: Hafif artropati grubunda (AT) bevacizumab uygulanan dizde 2-3 sıra halinde sinovyal yüzeyel doku hücreleri (ok ile gösterilmiştir), b: BK (ağır artropati B kontrol grubu) grubunda sinovyal stromada artmış hücresellik (ok ile gösterilmiştir), c: BK grubunda sinovyal yüzeyel hücre tabakasında ve stromada artmış hücresellik (ok ile gösterilmiştir).



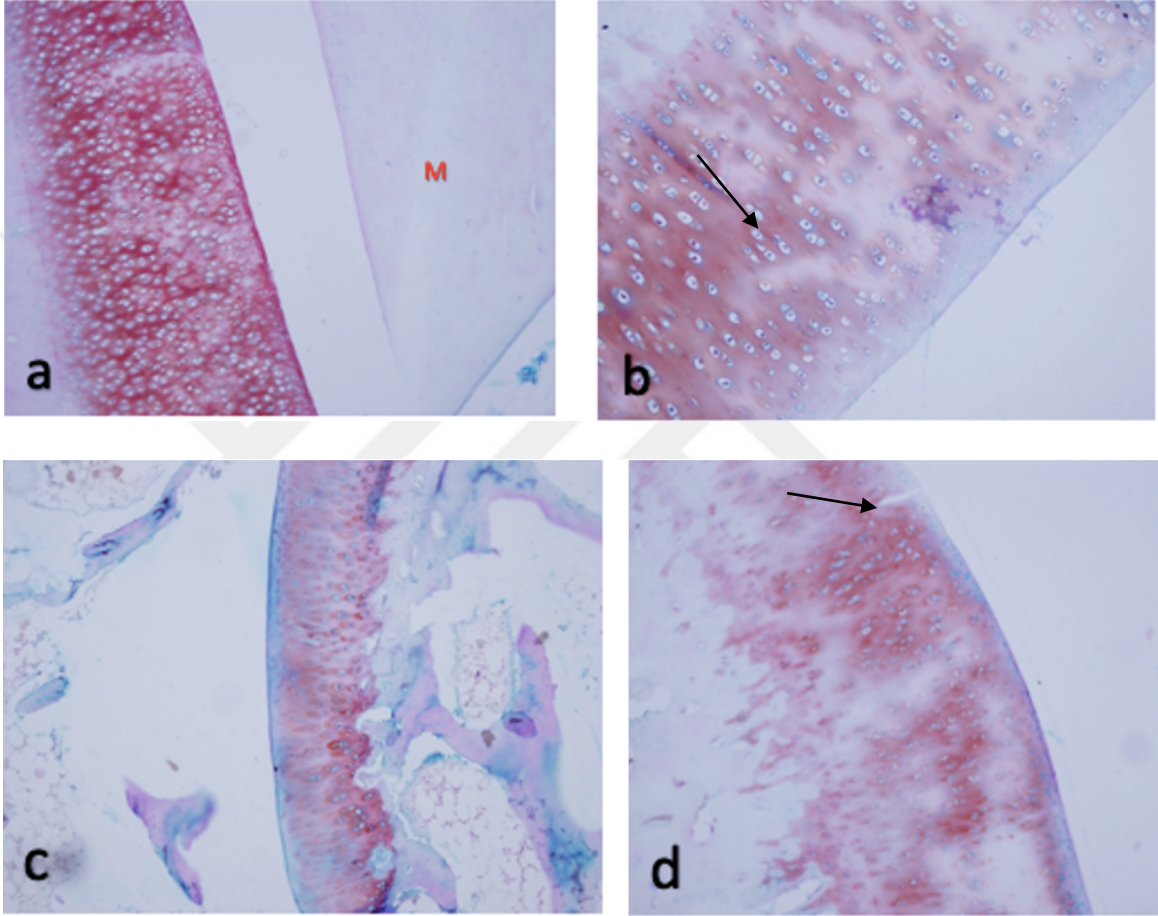
Resim 15: Sinovyal doku histopatolojik değerlendirme 3. a: CT (ağır artropati 8 hafta sonra tedavi başlanan grup) grubundan alınan sinovyal dokuda artmış villüs formasyonu (ok) ve 2-3 sıra halinde sinovyal yüzeyel hücreler, stromada artmış hücresellik, b: CK (ağır artropati kontrol grubu) grubunda dokulardaki hemosiderin birikimi (ok) , c: BK (tedavi uygulanmamış ağır artropati grubu) grubundan alınan dokuda 5-6 sıradan fazla sinovyal hücre tabakasında artış (ok), stromada hücresellik artışı.



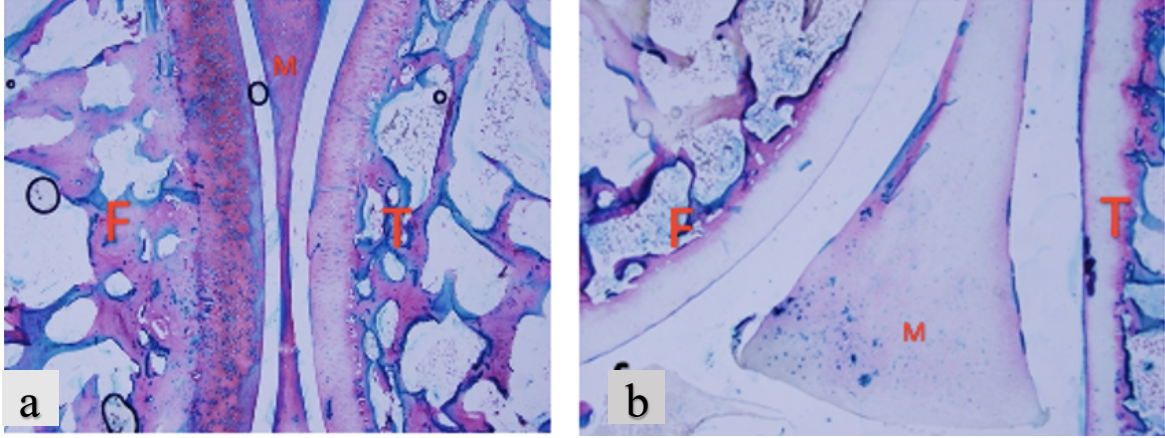
Resim 16: Sinovyal doku histopatolojik değerlendirme 4. a: BK grubunda artmış vaskülarizasyon (ok), stromada hücre sayısında artış, b: CK grubunda artmış vaskülarizasyon

VI.B.2. Kıkırdak

Safranin O ile boyanan femur lateral kondilerindeki kıkırdak, tavşan dizinin eklem kıkırdağı değişikliklerinin histokimyasal/histolojik değerlendirmesi için kullanılan OARSI skorlaması ile değerlendirilmiştir. Resim 17, 18'de kesitlerden görüntüler gösterilmiştir.



Resim 17: Kıkırdak dokusunun histopatolojik incelemesi. a: Kontrol (Normal) lateral femur kondili kıkırdak dokusu, b: Hafif artropati bevacizumab uygulanan diz eklemi (AT grubu); kıkırdak hücrelerinde kümeleşmeler (ok ile gösterilmiştir), c: Hafif artropati grubu bevacizumab uygulanan (AT grubu) diz eklemi, d: Hafif artropati grubu serum fizyolojik uygulanan diz eklemi (AK grubu) safranin boya tutulumunda azalma, yer yer kıkırdak dokusunda fissürler (ok). M: Menisküs.



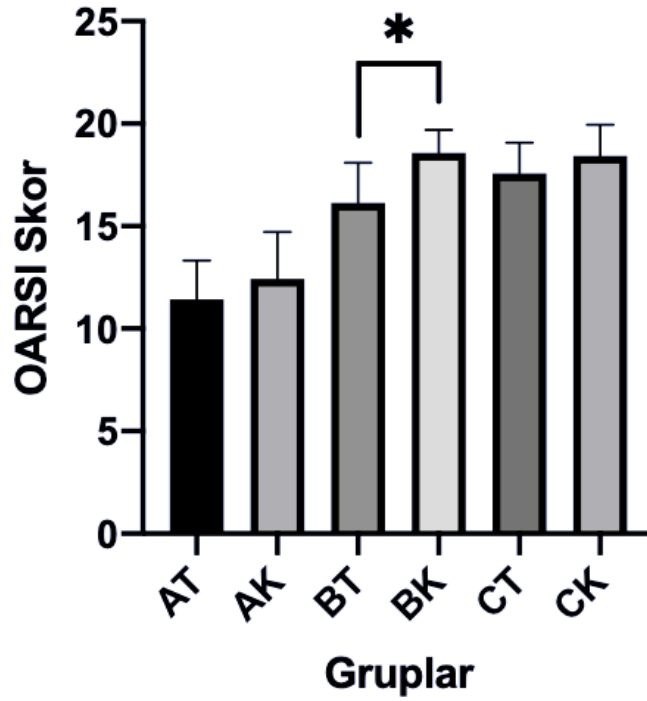
Resim 18: Kıkırdak dokusunun histopatolojik incelemesi 2. a: Ağır artropati grubu 16 hafta bevacizumab uygulanan diz eklemi (BT grubu), b: ağır artropati %0.9 salin uygulanan diz eklemi (BK grubu). Kontrol grubunda tedavisiz dize göre safranin tutulumunda azalma, kıkırdak dokusunda erezyonlar. T: Tibia, F: Femur, M: Menisküs.

Eklem içi bevacizumab uygulanan (T) ile uygulanmayan grup (K) arasında OARSI skorları karşılaştırılmıştır. AT grubunda AK grubuna göre daha düşük OARSI skoruna sahip olmasına rağmen; AT ve AK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,172$). BT grubu BK grubuna göre daha düşük skora sahip olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,016$). Ağır artropati gelişimi sırasında erken tedaviye başlandığı zaman kıkırdak hasarını gösteren OARSI skorunda düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). CT ve CK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,250$). OARSI Skorunda grup içi karşılaştırmaların sonuçları Tablo 12 ve grafikleri Grafik 3'te gösterilmiştir.

Tablo 12: OARSI skorunda grup içi karşılaştırmalar

Değişkenler	N	AT	AK	BT	BK	CT	CK
	Medyan (Min-Maks.)						
OARSI		11,0 (9,0-	12,0	17,0	18,0	17,0	18,0
Skor	-	14,0)	(10,0-17,0)	(13,0-18,0)	(17,0-20,0)	(16,0-20,0)	(17,0-20,0)

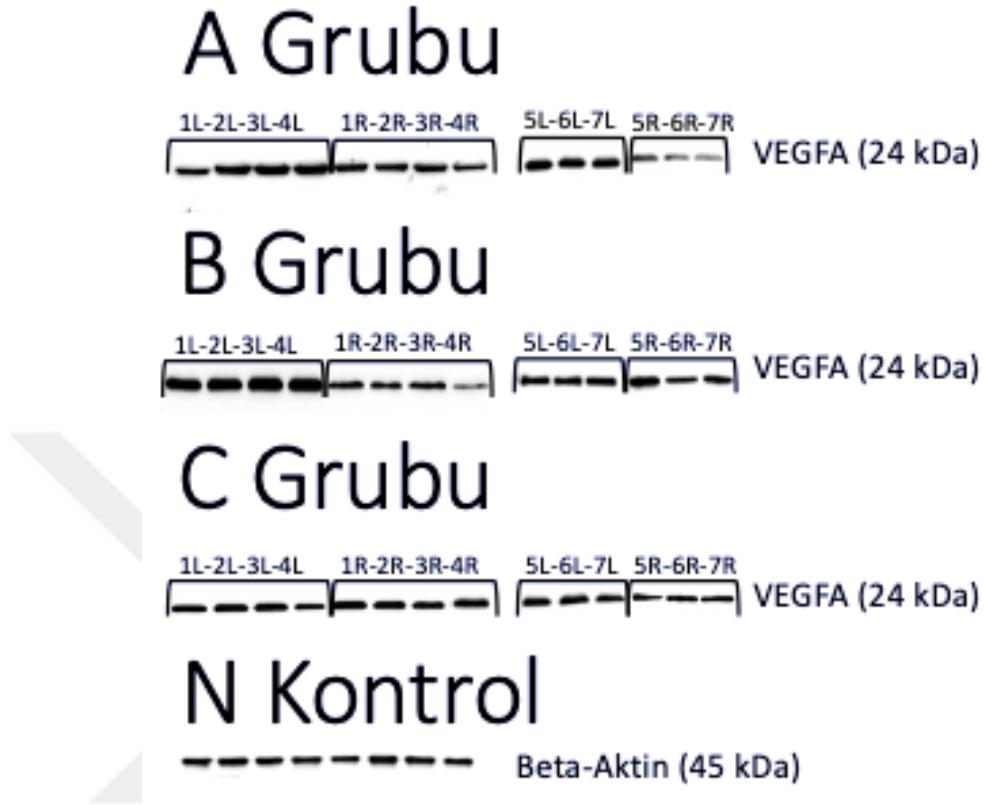
Wilcoxon İşaretli Sıralar testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlıdır.



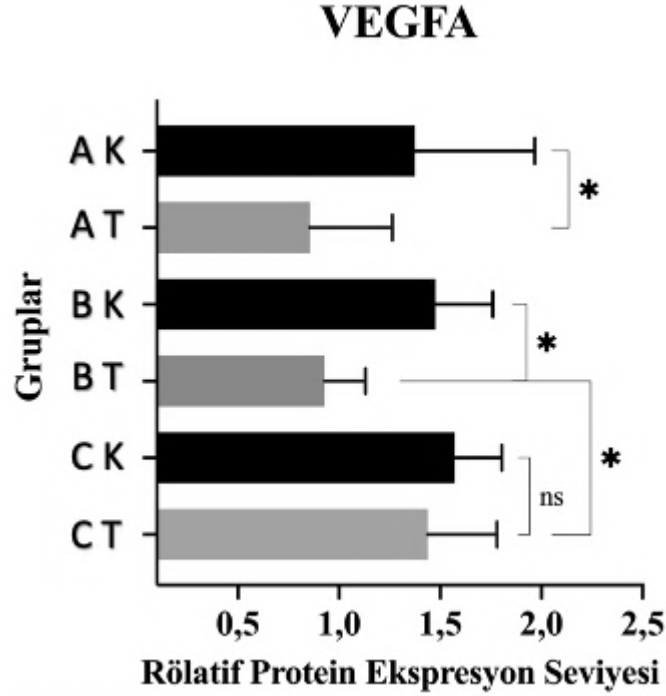
Grafik 3: Kıkırdak dokusunu histokimyasal/histolojik değerlendirmesi için kullanılan OARSI skora göre grupların skorları. BT ve BK arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,016$). *: $p<0,05$

VI.B.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

VEGFA protein seviyelerinin belirlenmesi için immün blotlama yöntemi kullanıldı ve deney sonucunda elde edilen bantların görüntülenmesi kemilüminesans olarak gerçekleştirildi. Görüntülenen bantların analizleri dansitometrik olarak gerçekleştirildi (Şekil 11). Protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için normal (N) kontrol grubunda analiz edilen beta aktin (housekeeping protein) protein ekspresyon düzeyleri ile normalizasyon gerçekleştirildi ve analizi gerçekleştirilen örneklerin VEGFA protein ekspresyon seviyelerindeki değişimler rölatif olarak belirlendi. VEGFA, endotelial büyüme faktörü olduğu kadar vasküler geçirgenliğin de düzenleyicisi olarak işlev göstermektedir. VEGFA'nın fonksiyonları arasında anjiyogenez, monosit kemotaksisi ve vazodilatasyonun uyarılması da yer almaktadır [199].



Şekil 11: Western blot yöntemiyle analiz edilen VEGFA proteininin A, B, C gruplarındaki, iç kontrol olarak beta aktin proteininin ise N (normal diz) kontrol grubundaki bant düzeyleri. Bantların kalınlıkları VEGFA proteinin miktarıyla orantılıdır. L: Sol diz (tedavi uygulanmamış diz), R: Sağ diz (tedavi uygulanmış diz), kDa: kilodalton, VEGFA: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A.



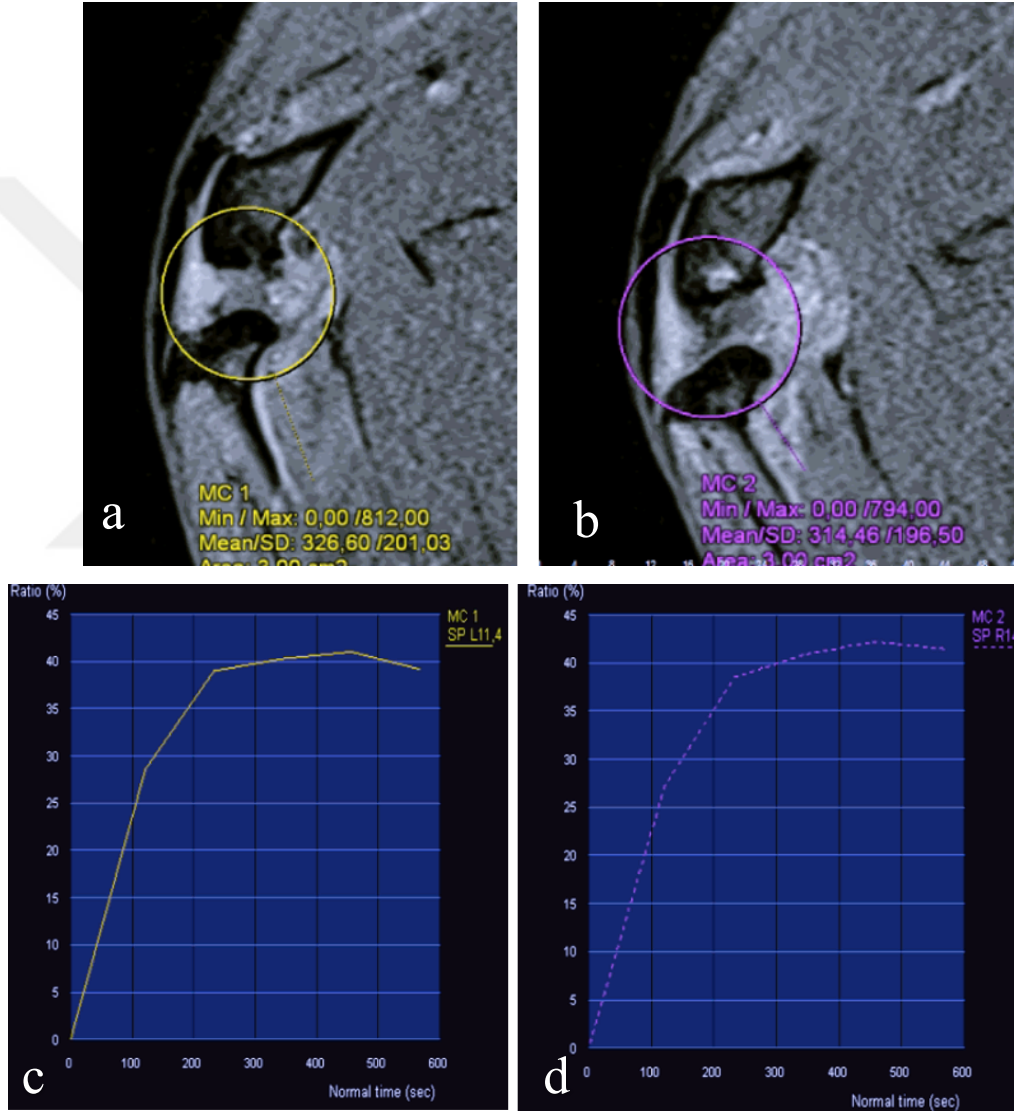
Grafik 4: Western blot yöntemiyle analiz edilen VEGFA proteininin A, B ve C gruplarında rölatif ekspresyon seviyelerinin (beta-aktin) istatistiksel analiz değerlendirmeleri, * $p < 0,05$ ve ns: İstatistiksel anlamsız.

Yapılan analizler sonucunda, A Grubunda Bevacizumab uygulaması yapılmamış sol taraf ile ilaç uygulaması yapılmış sağ taraftaki VEGFA protein ekspresyon seviyelerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,015$). AT grubundaki VEGFA protein ekspresyon seviyeleri AK grubuna göre 1,4 kat azalmıştır. B grubunda Bevacizumab uygulaması yapılmamış sol taraf ile ilaç uygulaması yapılmış sağ taraftaki VEGFA protein ekspresyon seviyelerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0134$). BT grubundaki VEGFA protein ekspresyon seviyeleri BK grubuna göre 1,6 kat azalmıştır. C grubunda ise ilaç uygulaması yapılmamış sol taraf ile Bevacizumab yapılmış sağ taraftaki VEGFA protein ekspresyon seviyelerindeki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). CT grubundaki VEGFA protein ekspresyon seviyeleri CK grubuna göre daha düşük olarak görülmesine rağmen bu farklılık istatistiksel anlamlılık seviyeleri içerisinde değerlendirilmemiştir. İlaç uygulaması gerçekleştirilmiş B ve C grupları karşılaştırıldığında ise BT grubunda VEGFA protein seviyelerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur ($p < 0,0286$) (Grafik 4).

VI.C. Görüntüleme Bulguları

VI.C.1. MR

İlgili alan çizimleri sonrası zamana göre sinyal yoğunluk değişim grafikleri ve değerleri iş istasyonundan (syngo.via; Siemens Healthineers) elde edildikten sonra sinyal yoğunluk değişimlerinin ortalamasının ortalaması parametre olarak değerlendirildi (Resim 19, 20).



Resim 19: Dinamik MR görüntülerinde sinyal değişimleri. a: Hafif artropati grubunda bevacizumab uygulanan gruptan (AT3) tavşan dizi MR görüntüsü ve çizilen ROI, b: Hafif artropati grubunda bevacizumab uygulanmayan gruptan (AK3) tavşan dizi MR görüntüsü ve çizilen ROI. c: AT3 dizinin sinyal yoğunluk değişimi grafiği, d: AK3 dizinin sinyal yoğunluk değişimi grafiği diz Syngo.via; Siemens Healthineers iş istasyonundan elde edilmiştir.

Normal time sec	MC 1 Area: 3,0cm2		
	Mean	SDev	Ratio %
0,00	231,62	131,76	0,00
121,49	297,82	176,60	28,58
232,97	321,95	192,77	39,00
344,46	324,90	198,00	40,27
455,94	326,60	201,03	41,01
567,43	322,32	203,23	39,16

a

Result Table 1 of 1

Normal time sec	MC 2 Area: 3,0cm2		
	Mean	SDev	Ratio %
0,00	221,16	129,11	0,00
121,49	281,37	166,99	27,23
232,97	306,32	189,67	38,50
344,46	311,53	195,76	40,86
455,94	314,46	196,50	42,19
567,43	312,80	199,44	41,44

b

Result Table 1 of 1

Resim 20: Dinamik MR görüntülerinde sinyal değişimleri 2. a: İş istasyonundan elde edilen AT3 tavşanındaki sinyal değişim grafiği verileri, b: İş istasyonundan elde edilen AK3 tavşanındaki sinyal değişim grafiği verileri. Syngo.via; Siemens Healthineers iş istasyonundan elde edilmiştir.

Bevacizumab uygulanan gruplar ile bevacizumab uygulanmayan gruplar arasında MR sinyal yoğunluğu değişimi verilerinden ortalamaların ortalaması verisi karşılaştırılmıştır. AT ve AK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,094$). BT ve BK arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,375$). BT grubunda BK grubuna göre düşüş görülmüştür ama istatistiğe yansımamıştır. CT ve CK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,297$). CT grubunda MR sinyal yoğunluğunda düşüş gözlenmiş olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ağır artropati gruplarından 16 hafta süresince bevacizumab tedavisi alan dizlerde ortalamaların ortalaması sinyal yoğunluk değişimlerinde düşüş yaşanmasına rağmen istatistiğe yansımamıştır.

Ayrıca, kontrol grubu ile birlikte diğer grupların sol tarafları birbirleriyle de karşılaştırılarak değerlendirilmiştir ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($K-W=17,16$; $p=0,0007$). Kontrol grubu ile AK arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır

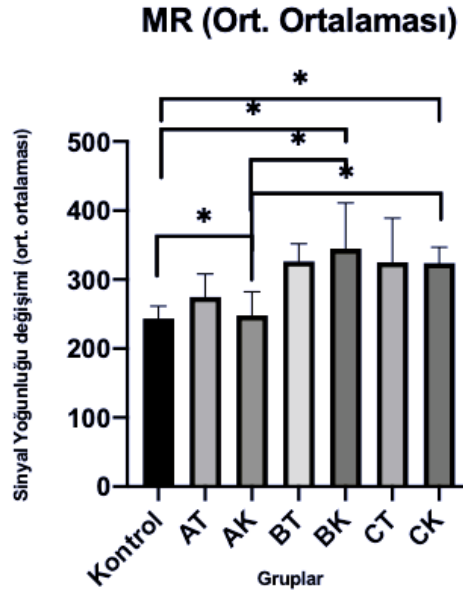
($p>0,999$). Kontrol grubu ile BK arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ve B grubunun kontrol dizinde oluşturulan HA modeli kontrol (normal diz) grubuna göre MR sinyal yoğunluğu anlamlı yüksektir ($p=0,012$). Benzer durum kontrol grubu ile CK arasında da vardır ve istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. CK grubunun HA modeli kontrol grubuna (normal diz) göre MR sinyal yoğunluğu anlamlı yüksektir ($p=0,025$). AK ve BK ($p=0,018$) ve AK ile CK ($p=0,036$) arasında anlamlı fark bulunmuştur (Grafik 5), (Tablo 13).

Tablo 13: Dinamik MR sinyal değişimi ortalamalarının ortalaması değişkeni için grup içi karşılaştırmaları

Değişkenler	Kontrol	AT	AK	BT	BK	CT	CK
	Medyan (Min-Maks.)						
MR Sinyal Yoğunluğu	244,3 (217,6- 272,4)	276,0 (237,8- 317,9)	234,1 (212,5- 304,2)	311,6 (301,4- 361,2)	354,6 (239,5- 446,6)	315,1 (269,7- 460,4)	328,6 (295,5- 358,3)

Grup içi; Wilcoxon İşaretli Sıralar testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlıdır.

Gruplar arası; Kruskal-Wallis (K-W) testi ve post hoc Dunn's testi kullanıldı.



Grafik 5: Dinamik kontrastlı MR çekimi sonrası ROI belirlenip ölçülen sinyal yoğunluk değişimi ortalamalarının ortalamasının gruplara göre karşılaştırılması. * $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlıdır.

VII. TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmamızda hemofilik artropati tavşan modelinde eklem içi uygulanan Bevacizumab'ın sinovya ve kıkırdak üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığı makroskopik, histolojik, radyolojik görüntüleme ve immünohistokimyasal olarak araştırıldı.

Hemofili, X'e bağlı faktör VIII veya IX eksikliğinin neden olduğu bir pıhtılaşma bozukluğudur [200]. Hemofilinin en yaygın klinik belirtisi olan hemofilik artropati, tekrarlayan hemartrozlara ve kronik sinovite bağlı oluşan sekonder artropatidir. Sık eklem kanamasının sinovyal hipertrofiyi, kıkırdak hasarını ve kemik değişikliklerini indüklediğine dair iyi kanıtlar olsa da [5, 201] sıklıkla profilaktik pıhtılaşma faktörü replasmanına rağmen artropatinin ilerlemesinin nedenleri halen belirsizliğini korumaya devam etmektedir [15]. Bu yüzden birçok araştırmacı bu konu üzerinde çalışmalarını sürdürmektedir.

Hemofili hastalarında artropati gelişiminin önlenmesinde en önemli yaklaşım profilaktik faktör replasman tedavisidir. Bu nedenle hemofili tanısı konulan hastalara gelişebilecek kanamaları kontrol altına almak için profilaktik faktör replasmanı erken zamanda başlanmalıdır [202]. Ancak tanı konulmamış hastalar, tedaviye rağmen yetersiz faktör seviyeleri, atlanan dozlar, inhibitör varlığı ve travmalara bağlı olarak hastalarda akut hemartroz gelişebilir [54]. Akut hemartroz tedavisinde amaç kanamayı bir an önce durdurmaktır. Akut hemartroz gelişen hastalarda kanama durdurulana kadar intravenöz pıhtılaşma faktörü konsantresi tedavisi hemen başlanmalıdır [203]. Hastanın ağrı, ödem gibi semptomlarını geçirmek için istirahat, soğuk uygulama, kompresyon, elevasyon (RICE) ve analjezik tedavi önerilmektedir. Hemofili hastalarında gelişen akut hemartrozda, immobilizasyon da tedavinin bir parçasıdır. Bu nedenle bölgenin “korunması” kavramını içeren PRICE uygulaması genellikle tavsiye edilir [204]. Tekrarlayan akut hemartrozlar ve subklinik hemartrozlar hastalarda kronik sinovit gelişmesine neden olur. Gelişen kronik sinovit eklemi kanamaya daha yatkın hale getirir [205]. Bu nedenle kronik sinovitin yönetimi ve tedavisi önemlidir. Multidisipliner bir ekip tarafından tedavinin yapılması gerekmektedir. Bu multidisipliner ekip içerisinde hematoloji, ortopedi, fizik tedavi ve psikiyatri hekimleri bulunmalıdır [206, 207]. Kronik sinovitin tedavisinde kimyasal, radyoaktif ve cerrahi sinovektomi tedavi seçenekleri mevcuttur. Ancak bu tedavi seçeneklerinin uygulamalarında istenmeyen etkiler görülebilir [120]. Kimyasal sinovektomide kullanılan rifampisin ciddi ağrıya, radyoaktif ajanlar

kıkırdak hasarına, cerrahi sinovektomilerde anestezi gerektiğinden anesteziye bağı komplikasyonlara yol açabilmektedir [114, 120, 208]. Bütün bu tedavilere rağmen bazı hastalarda ileri evre artropati gelişebilir. İleri artropati gelişen hastalarda eklem koruyucu ya da eklem replasman cerrahileri uygulanmaktadır [132]. Eklem replasman cerrahisi kararı verilirken hastanın Hemofili Eklem Sağlığı Skoru (HJHS) ve Arnold Hilgartner sınıflamasının yol gösterici olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [143, 209]. Eklem replasman cerrahisi uygulanmasına rağmen bazı hastalar yeteri kadar eklem hareket açıklığı kazanamamaktadır [210]. Tüm tedavilere rağmen; HA hemofili hastaları için kalıcı bir sorun ve zorluk olmaya devam etmektedir. Bu nedenle patogenezi daha net olarak ortaya koymak ve bu yönde hedefe yönelik yeni tedaviler denenmesi fazlasıyla gerekmektedir [211]. Çalışmamız öncesinde HA'nın patofizyolojisini güncel literatür eşliğinde araştırdık ve hedefe yönelik tedavi seçeneklerini değerlendirdik.

Son yıllarda HA'nın patofizyolojisini aydınlatma yönünde yapılan çalışmalar sonucunda neoanjiogenezin HA patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı görüşü ortaya çıkmıştır [15]. Neoanjiogenez, yara iyileşmesi [212, 213] ve üreme döngüsü [214] gibi fizyolojik süreçlerde kritik rol oynayan, önceden var olan kılcal damarlardan yeni kan damarlarının oluşumu olarak tanımlanır [9]. Vasküler endotel hücrelerinden salgılanan VEGF neoanjiogenezde anahtar mediyatör olarak görülmektedir [10]. HA'da oluşan neoanjiogenezde VEGF önemli bir yer tutmaktadır. Acharya S. ve ark. yaptıkları tek merkezli bir çalışmada HA'ya sahip hastalardan toplanan plazma ve sinovya örneklerinde kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda artmış VEGF düzeyi saptamışlardır [11]. Zetterberg E. ve ark. yaptıkları bir çalışmada diz veya kalça artroplastisi yapılan şiddetli hemofili hastalarından alınan sinovyal doku ve sıvı örneklerinde hemofilik olmayan hastalardan oluşan bir kontrol grubundan alınan örneklerle göre anjiogenezin arttığını ve VEGF ekspresyonunun daha fazla olduğunu göstermişlerdir [215]. Karapınar ve ark. inhibitörlü hasta dahil edilmeden yaptıkları bir çalışmada akut hemartrozu olan 10 şiddetli Hemofili A hastasında ve akut hemartrozu olmayan 25 ağır Hemofili A hastasında tam kan hücre sayımı, CRP, serum ferritin, laktik asit, VEGF, MIF (migrasyon inhibitör faktör) düzeylerine bakmışlardır. CRP ve MIF seviyelerini, akut hemartrozlu şiddetli Hemofili A hastalarında anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. Ayrıca serum trombomodulin, VEGF ve MIF seviyeleri arasında pozitif bir ilişki de bu çalışmada gösterilmiştir [216]. Deneysel hayvan modelleri ile ilgili çalışmalara baktığımızda FVIII eksikliği olan bir hemofilik fare modelinde Bhat ve ark., hemartroza yanıt olarak bir dizi

parametreyi (sinovyal, vasküler, stromal ve kıkırdak değişiklikleri) incelemişlerdir. Hemofilik farelerde hemartroz sonrası önemli ölçüde neoanjyogenez indüksiyonu ve anormal vaskülarizasyon ile birlikte yumuşak doku hiperproliferasyonunu gözlemlemişlerdir. Yumuşak doku değişikliklerinin geri dönüşümlü olduğunu, ancak anormal damarlanmanın aylarca sürdüğünü ve şaşırtıcı bir şekilde yaralanmamış eklemelerde de görüldüğünü bulmuşlar ve oluşan bu vaskülarizasyonu VEGF ile ilişkendirmişlerdir [15]. Çalışmamızda oluşturulan hemofilik artropati modelinde her üç grupta sinovyal dokulardaki VEGF düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek çıkmıştır ($p<0.05$). Bu durum diğer çalışmalara benzer şekilde, tekrarlayan eklem içi kanamaların sinovyal dokuda VEGF düzeyini yükseltmesi ile uyumludur.

Antianjiyojenik ilaçlar, son on yılın en önemli ilaç keşif alanlarından birini oluşturmaktadır ve kullanılabilecekleri çok sayıda patolojik durum nedeniyle üzerinde çalışmalar devam etmektedir [217]. Bunlardan biri olan bevacizumab VEGF üzerinden etki göstererek antianjiyojenik etki gösterdiği bildirilmiştir [218]. Bevacizumabın Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılan ilk VEGF inhibitörü olması [219] ve bir çok kanser türü üzerinde FDA (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi) onayı alması nedeniyle çalışmamızda tercih edilen ilaç olmuştur. Kullanılacak Bevacizumab'ın tavşan diz eklem içerisine uygulanacak olan dozunun belirlenmesi için yaptığımız literatür araştırmasında; Li W. ve ark. yaptıkları çalışmada 4 mg dozun güvenli bir doz olduğunu belirttiklerini gördük [220]. Ancak ilaç dozunun tavşanın ağırlığına göre ayarlanması gerektiğini düşündüğümüzden çalışmamızda eklem içi 4 mg/kg her bir tavşan diz eklemi için uygulandı. İlaç uygulaması sonrası yan etki değerlendirmesi için tavşanların aktivite, tüy dökümü, dışkı, idrar, iştah düzeylerine bakıldı ve herhangi bir yan etki ile çalışmamızda karşılaşılmadı.

Çalışmamızda Bevacizumab uygulanan hafif artropati grubu (Grup AT) ile 16 hafta boyunca tedavi uygulanan ağır artropati grubunda (Grup BT) VEGF düzeyleri istatistiksel anlamda kontrol dizlerine göre daha düşük bulunmuştur. Bu durum Bevacizumab'ın tavşan modelimizde anti-VEGF etkisinin olduğunu göstermektedir. Ağır artropati gruplarında ilaç uygulanan taraflar arasında tedavisi 16 haftalık olan B grubunda, tedavisi 8 hafta sonra başlayan C grubuna göre VEGF düzeyinde istatistiksel olarak daha fazla düşüş yaşanmıştır. Bu düşüş bevacizumabın uygulama süresi ile uyumludur. Ağır artropatisi olan ve tedavisi 8 haftalık sinovit gerçekleştikten sonra başlayan grupta (CT grubu) VEGF düzeylerinde düşüş yaşanmıştır. Ancak bu düşüş istatistiksel anlamda anlamlı bulunmamıştır. İstatistiksel düşüşün olamama nedeni olarak; ilaç dozunun yeterli miktarda

gelmemesi, tedavi süresinin kısalığı ve deney hayvanı sayısının azlığı olabileceğini düşünmekteyiz.

Makroskopik bulguları incelediğimizde kontrol grubundaki (normal diz) kıkırdak pürüzsüz ve beyazdı. Tüm gruplarda kontrol grubuna (normal diz) göre; femur kondilinin ve sinovyal dokuların renginin sarıya döndüğünü ve eklemlerdeki efüzyonun daha fazla olduğunu gördük. Sinovyal efüzyon ve dokulardaki beyazdan sarıya dönme, hafif artropati grubunda ağır artropati grubuna göre daha azdı. Eklem çapları (sinovyal dokular dahil edilerek femur kondilleri arasındaki en uzun mesafe) arasındaki farkı incelediğimizde; ağır artropati gruplarında (Grup B ve C) Bevacizumab uygulanan tarafta diz eklem çapı, tedavi edilmemiş tarafa göre istatistiksel olarak daha düşüktü. PRP'nin etkinliğini hemorajik artropati tavşan modelinde değerlendiren Xue Y. ve ark. yaptığı çalışmada; PRP ile tedavi edilen grubun diz eklem çap farkının tedavisiz gruba göre daha düşük olduğunu göstermişlerdi [189]. Benzer şekilde çalışmamız sonucunda ağır artropati grubunda bevacizumabın etkisiyle eklem çapı daha düşük kaldığını düşünmekteyiz. Ancak hafif artropati grubunda (Grup A), bevacizumab tedavisi gören diz eklemine tedavi görmeyen tarafa göre çap farkı daha az olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamı düzeyde değildi. İstatistiksel olarak bu farkın oluşmama nedeni olarak 8 haftalık hafif artropati grubunda artropatinin daha hafif seyretmesini neden olarak düşünmekteyiz.

Kronik sinovit, hemofilinin en sık görülen komplikasyonudur ve eklem yıkımına ve sonunda 20-30 yaşlarda sakatlayıcı bir artrite yol açar [221] . Eklem kanamasını önleyerek böylece kronik sinovit gelişimini engelleme girişimleri her zaman başarılı olmaz [222-224] ve hemofilisi olan birçok hastada kronik sinovit gelişir [225]. Cerrahi ve radyoaktif sinovektomi gibi tedaviler mevcuttur ancak çoğu zaman kanamayı iyileştirmez ve birçok eklemden tekrarlayan hastalık görülür [223, 225]. Sinovitin deneysel araştırmalarda değerlendirilebilmesi için Valentino ve ark. HA murin modeli için kantitatif skorlama sistemi geliştirmişlerdir. Bu skorlama sisteminde sinovyal hiperplazi, vaskülarizasyon, villus formasyonu, hemosiderin birikimi, kıkırdak hasarı parametrelerine yer verilmiştir [196]. Kern V. ve ark. romatizmal ve romatizmal olmayan eklem hastalıklarının teşhisine katkıda bulunmak ve sinovyal doku örneklerinin histopatolojik değerlendirmesini standart hale getirmek için sinovyal yüzeyel hücrelerin oluşturdukları katman sayısı, stromadaki hücresellik, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu kullanarak skorlama sistemi oluşturmuşlardır [197]. Literatürde hemofilik artropati tavşan modelinde sinovyal dokuyu

değerlendirmek için tavşan modeline özgün bir skrolama sistemi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda Kern V. ve arkadaşlarının oluşturduğu skrolama sistemi ile Valentino ve Ark. oluşturduğu skrolama sistemlerindeki parametrelerden yararlanarak Bevacizumab'ın etkinliğini değerlendirmek için sinovyal yüzeyel hücre tabakasının genişlemesi, sinovyal stroma hücresellığı, inflamasyon, sinovyal vaskülarizasyon, hemosiderin renk değişikliği, villus formasyonunu içeren skrolama sistemi kullandık (Tablo 8). Kıkırdak dokusundaki hasarı değerlendirmek için ayrı bir skrolama kullandığımızdan, kıkırdak hasarını sinovyal skrolama sistemine çalışmamızda dahil etmedik. Çalışmamız sonucunda her üç grupta bevacizumab uygulanan diz eklemlerinde karşı diz eklemlerine göre sinovyal skorların daha düşük olduğu görüldü. 16 hafta boyunca 2 haftada bir tedavi almış olan B grubunda bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu bulgu bevacizumabın sinovyal doku üzerinde ağır hemofilik artropati gelişimi sırasında koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Hafif artropati grubunda düşüş olsada istatistiksel anlamda farklılık görülmemiştir. Bu farkın istatistiksel olarak anlam kazanmamasının nedeni olarak hafif artropati grubunda sinovyal doku hasarının daha az olması ve deney hayvan sayısının azlığını düşünmekteyiz. 8 hafta sonra tedavisi başlayan ağır artropati grubunda (Grup CT) kontrol grubuna göre (CK) sinovyal skorların daha düşük olup istatistiksel olarak anlamlı olmamasının nedeni; bevacizumabın uygulanan doz azlığı ve tedavi süresinin kısalığı olarak düşünmekteyiz.

Çalışmamızda kıkırdak durumunu değerlendirmek amacıyla tavşan dizinin eklem kıkırdağı değişikliklerinin histokimyasal/histolojik değerlendirmesi için kullanılan OARSI skrolama sistemi kullanılmıştır. Çalışmamız sonucunda tüm tedavi gören grupların dizlerinde karşı dizlerine göre OARSI skoru daha düşük bulunmuştur. Ağır artropatisi olan 16 hafta süresince bevacizumab uygulanan B grubunun diz eklemlerinde kontrol grubuna (BK) göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p=0,016$). Nagai T. ve ark. yaptıkları çalışmada intravenöz bevacizumab (40 mg/kg) ve eklem içi bevacizumab (25 mg) enjeksiyonu, travmatik diz osteoartriti olan tavşan modelinde kıkırdak protein ekspresyonunu ve kıkırdak rejenerasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca bevacizumabın dozu ve olası yan etkileri göz önüne alındığında, bevacizumabın lokal uygulanması sistemik uygulamaya göre daha avantajlı bir yaklaşım olduğu görüşünü ortaya koymuşlardır [226]. Wi L. ve ark. 24 tavşanla yaptıkları osteoartrit tavşan modelinde eklem içi uygulanan bevacizumab, sodyum hyaluronat ve %0.9 salinin etkilerini 3 grupta değerlendirmişlerdir. Yaptıkları çalışmalarında kıkırdak ve sinovyumun histolojik

incelemeleri, elektron mikroskobu incelemesi, VEGF ekspresyonu, sinovyum için MMP-1 ekspresyonu, Mankin skalası, makroskopik gözlem parametrelerini kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda VEGF ve MMP-1 ekspresyonu, Mankin skalası bevacizumab grubunda salin grubu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı sonucu ulaşılmıştır. Bevacizumabın osteoartritte inflamasyonu azalttığını ve osteoartrit tedavisinde gelecekte kullanılabileceğini bildirmişlerdir [227]. Çalışmamızın sonucunda; bevacizumabın kıkırdak üzerindeki koruyucu ve tedavi edici etkisi diğer çalışmalarla uyumludur. Çalışmamızda Hafif artropati grubunda (Grup A) ve 8 hafta sonra tedavisi başlayan ağır artropati grubunda (Grup C) OARSI skoru bevacizumab uygulanan dizde aynı gruplardaki kontrol dizlere göre daha düşük olmasına rağmen istatistiksel fark görülmemiştir. Bunun nedeni olarak hafif artropati grubunda kıkırdak hasarının daha az olması, tedavisi hafif artropati sonrası başlayan ağır artropati grubunda (C grubu) ise; ilaç uygulama süresinin azlığı, uygulanan dozun yetersizliği olarak düşünmekteyiz.

Çalışmamızda görüntüleme yöntemi olarak kontrastlı dinamik 1.5 tesla MR kullanıldı. MR çekiminde kontrastlanma sonrası alınan görüntülerde sinyal değişimine bakılarak vasküler geçirgenlik, perfüzyon hakkında bilgi sahibi olunması amaçlandı. In vivo kapiler geçirgenlik ve sinyal değişimi deneysel artritin tanısı değerlendirilmesinde kullanılabileceği, MR parametrelerinin doğruluğu ve hastalığın evresine göre farklılık gösterdiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [228, 229]. Hemofilik artropati modeli oluşturulan ve bevacizumab uygulanmayan kontrol dizlerdeki ortalama değerlerin ortalaması sinyal yoğunluk değişiminde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü (K-W=17,16; $p=0,0007$). Bu durum ağır artropatide sinovyal dokularda artan perfüzyon ve kontrast tutulumu ile uyumlu bir bulgu olarak görüldü. Ortalama değerlerin ortalaması sinyal yoğunluğu değişiminde bevacizumab uygulanan ve uygulanmayan dizler arasında istatistiksel anlamda herhangi bir fark görülmedi. Ağır artropati gruplarında bevacizumab uygulanan dizlerdeki ortalama değerlerin ortalaması ile uygulanmayan dizler arasında düşüklük görülmüş olsada bu istatistiğe yansımada ($p>0,05$). Hafif artropati grubunda bevacizumab uygulanan ve uygulanmayan dizlerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik veya düşüklük görülmedi. Hafif artropati kontrol grubunda ağır artropati kontrol grubuna göre ortalamasının ortalaması sinyal yoğunluk değişimlerinde düşüklük istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu durum hafif artropati ile ağır artropati arasındaki ayırmda dinamik kontrastlı MR'ın kullanılabileceğini düşündürmektedir. Tavşan dizlerinin küçük olması, çekilen MR'ın 1.5 tesla

olması, çizilen ROI'lerin çizimi sırasında tek bir bölgenin seçilmesi, eklem içi enjeksiyonların sonrasında infrapatellar bölgede inflamasyona neden olabileceği gibi nedenlerden dolayı istatistiksel farkın çıkmadığını düşünmekteyiz. Literatürde ROI çizim önerileri olarak farklı görüşler bulunmaktadır. Doria A.S. ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel artritte, sinovyum mikrosirkülasyonunun dinamik kontrastlı MR ölçümü çalışmasında tavşanların dizlerinin suprapatellar bölgesine tek bir ROI yerleştirmişlerdir. Başka bir çalışmada 3 farklı ROI çizimini artrit varlığının veya yokluğunun ayırımı açısından değerlendirmişler ve ROI çizimlerini karşılaştırmışlardır [230]. Çalışmamızda femurun aksiyal planda interkondiler bölgesine karşılık gelen sagittal plan görüntüleri elde edilmiş, anteriorda infrapatellar bölge posteriorda posterior kapsülü içine alacak şekilde ROI çizilmiştir. ROI çapı ortalama 3cm olarak belirlenmiştir. Fakat suprapatellar bölge ROI içerisine dahil edilememiştir. Başka çalışmalarda istatistiksel olarak daha anlamlı fark bulunabilmesi için tavşan dizi küçüklüğü nedeniyle daha yüksek kaliteli görüntü elde edilmesi için daha yüksek çekim gücüne sahip MR kullanılması ve tavşan modellerinde standart kullanılmak üzere ROI çizim bölgeleri açısından daha fazla çalışma yapılmasını önermekteyiz.

Araştırmamız sonucunda çalışmamız, hemofilik artropatide Bevacizumab'ın tavşan diz eklemine kullanımını değerlendiren literatürdeki ilk çalışmadır. Çalışmamızdaki takip süresinin kısalığı, deney hayvanı sayısının azlığı, sadece 10. ve 18. haftalardaki ilaç etkinlik düzeyinin değerlendirilmiş olması, VEGF düzeyi immunhistokimyası dışında diğer immünhistokimya çalışmalarının yapılmamış olması, kantitatif veri olarak sinovyal dokuda hücre sayımı gerçekleştirilmemiş olması çalışmamızın önemli kısıtlılıklarıdır. Ayrıca Nagai T. ve ark yaptıkları osteoartrit üzerinde bevacizumabın etkisini değerlendiren çalışmada; bevacizumabın eklem içi uygulaması ağrı davranışını azalttığını belirtmişlerdir [231]. Ancak çalışmamızda bevacizumabın hemofilik artropatide önemli bir semptom olan ağrı üzerindeki etkisi araştırılmamıştır. Çalışmamız Bevacizumab'ın enjeksiyonunun hemofilik artropatide faydalı olabileceğini öne sürmüş olsa da bu sonuçların klinik öneme sahip olması için hastalar üzerinde denemeye ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

VIII. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. İnsanlardakine benzer şekilde tavşanlarda da diz eklem içi kanama sinovyal dokularda VEGF düzeyini artırmaktadır. Bu hemofilik artropatideki neoanjiogenezin bir nedeni ve kısır döngünün kaldırılması için bir hedef olabilir.

2. Eklem içi bevacizumab uygulaması ağır ve hafif HA'da VEGF inhibisyonuna neden olmaktadır ve çalışmamızda istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

3. Ağır hemofilik artropati gelişimi sırasında eklem içi uygulanan Bevacizumab, diz ekleminde çap farkı artışını istatistiksel anlamlı olarak azaltır.

4. Eklem içi uygulanan Bevacizumab, çalışmamızda istatistiksel anlamlı çıktığı üzere; erken tedaviye başlanıldığı zaman ağır hemofilik artropatide, tavşan diz ekleminin kırıkdağı üzerinde hasarı gösteren OARSI skorlarında düşüşe neden olmaktadır.

5. Eklem içi uygulanan Bevacizumab; çalışmamızda gösterildiği gibi erken tedaviye başlanıldığı zaman ağır hemofilik artropatide tavşan dizinde sinovyal hasarı gösteren skorlarda istatistiksel anlamlı olarak düşüşe neden olmaktadır.

6. Hemofilik artropati tavşan modelinde dinamik kontrastlı MR çekimi sonrası sinyal yoğunluk değişimleri ağır artropatinin göstergesi olarak ve hafif artropatiyle ayırımında kullanılabilir.

7. Bevacizumab'ın hemofilik artropatide kullanımı için daha fazla deneysel ve klinik çalışma yapılması, diğer tedavi yöntemleri ile beraber kombine kullanımı açısından değerlendirilmesi gerekmektedir.

IX. KAYNAKLAR

1. L Mescher, A., *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, FIFTEENTH*. 2018, McGraw-Hill Education.
2. Poenaru, D.V., et al., *Orthopaedic and surgical features in the management of patients with haemophilia*. Eur J Orthop Surg Traumatol, 2014. 24(5): p. 685-92.
3. Soucie, J.M., B. Evatt, and D. Jackson, *Occurrence of hemophilia in the United States. The Hemophilia Surveillance System Project Investigators*. Am J Hematol, 1998. 59(4): p. 288-94.
4. Handelsman, J.E., *The knee joint in hemophilia*. Orthop Clin North Am, 1979. 10(1): p. 139-73.
5. Lafeber, F.P., P. Miossec, and L.A. Valentino, *Physiopathology of haemophilic arthropathy*. Haemophilia, 2008. 14 Suppl 4: p. 3-9.
6. Stein, H. and R.B. Duthie, *The pathogenesis of chronic haemophilic arthropathy*. J Bone Joint Surg Br, 1981. 63b(4): p. 601-9.
7. Hakobyan, N., T. Kazarian, and L.A. Valentino, *Synovitis in a murine model of human factor VIII deficiency*. Haemophilia, 2005. 11(3): p. 227-32.
8. Raffini, L. and C. Manno, *Modern management of haemophilic arthropathy*. Br J Haematol, 2007. 136(6): p. 777-87.
9. Shakiba, Y., et al., *Corneal neovascularization: molecular events and therapeutic options*. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2009. 3(3): p. 221-31.
10. Carmeliet, P., *VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer*. Oncology, 2005. 69 Suppl 3: p. 4-10.
11. Acharya, S.S., et al., *Neoangiogenesis contributes to the development of hemophilic synovitis*. Blood, 2011. 117(8): p. 2484-93.
12. Ferrara, N. and A.P. Adamis, *Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2016. 15(6): p. 385-403.
13. Ferrara, N., et al., *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2004. 3(5): p. 391-400.

14. Srivastava, A., et al., *WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition*. Haemophilia, 2020. 26 Suppl 6: p. 1-158.
15. Bhat, V., et al., *Vascular remodeling underlies rebleeding in hemophilic arthropathy*. Am J Hematol, 2015. 90(11): p. 1027-35.
16. Pulles, A.E., et al., *Pathophysiology of hemophilic arthropathy and potential targets for therapy*. Pharmacological Research, 2017. 115: p. 192-199.
17. Madhok, R., et al., *Mechanisms of joint damage in an experimental model of hemophilic arthritis*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 1988. 31(9): p. 1148-1155.
18. Whiting, W.C. and S. Rugg, *Dynatomy: Dynamic human anatomy*. Vol. 10. 2006: Human Kinetics 1.
19. Juneja, P., A. Munjal, and J.B. Hubbard, *Anatomy, Joints*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
20. Vandenabeele, F., et al., *In vitro loading of human synovial membrane with 5-hydroxydopamine: evidence for dense core secretory granules in type B cells*. Archives of histology and cytology, 2001. 64(1): p. 1-16.
21. Nozawa-Inoue, K., et al., *Immunocytochemical demonstration of the synovial membrane in experimentally induced arthritis of the rat temporomandibular joint*. Arch Histol Cytol, 1998. 61(5): p. 451-66.
22. Firestein, G.S., et al., *Firestein & Kelley's Textbook of Rheumatology-E-Book*. 2020: Elsevier Health Sciences.
23. Castor, C.W., *The microscopic structure of normal human synovial tissue*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 1960. 3(2): p. 140-151.
24. Grässel, S. and A. Aszódi, *Cartilage: Volume 1: Physiology and Development*. 2016: Springer.
25. Parvizi, J., *High Yield Orthopaedics E-Book*. 2010: Elsevier Health Sciences.
26. Stoddart, M.J., et al., *Cells and biomaterials in cartilage tissue engineering*. 2009.
27. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports health, 2009. 1(6): p. 461-468.

28. Wang, Y., et al., *Nutrition and degeneration of articular cartilage*. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy, 2013. 21(8): p. 1751-1762.
29. Maldonado, M. and J. Nam, *The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis*. BioMed research international, 2013. 2013.
30. Ng, H.Y., K.A. Lee, and Y.-F. Shen, *Articular cartilage: structure, composition, injuries and repair*. JSM Bone Joint Dis, 2017. 1(2): p. 1010.
31. Decker, R.S., E. Koyama, and M. Pacifici, *Articular cartilage: structural and developmental intricacies and questions*. Current osteoporosis reports, 2015. 13(6): p. 407-414.
32. Mow, V.C. and X.E. Guo, *Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies*. Annual review of biomedical engineering, 2002. 4(1): p. 175-209.
33. Matsiko, A., T.J. Levingstone, and F.J. O'Brien, *Advanced strategies for articular cartilage defect repair*. Materials, 2013. 6(2): p. 637-668.
34. Lorenz, H. and W. Richter, *Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage*. Progress in histochemistry and cytochemistry, 2006. 40(3): p. 135-163.
35. Iorio, A., et al., *Establishing the prevalence and prevalence at birth of hemophilia in males: a meta-analytic approach using national registries*. Annals of internal medicine, 2019. 171(8): p. 540-546.
36. Calvez, T., et al., *Recombinant factor VIII products and inhibitor development in previously untreated boys with severe hemophilia A*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2014. 124(23): p. 3398-3408.
37. Gouw, S.C., et al., *Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A*. New England Journal of Medicine, 2013. 368(3): p. 231-239.
38. Mauser-Bunschoten, E.P., *Symptomatic carriers of hemophilia*. Treatment of Hemophilia, 2008. 46: p. 1-9.
39. Dorgalaleh, A. and F. Rad, *Congenital bleeding disorders*, in *Congenital Bleeding Disorders*. 2018, Springer. p. 27-53.

40. Tarhan, Ö.R. *Koagulasyon Kaskadı*. Available from: <https://www.turkcerrahi.com/makaleler/hemostaz-kan-urunleri-transfuzyonu/hemostaz/>.
41. Davie, E.W., *Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade*. Thrombosis and haemostasis, 1995. 74(07): p. 001-006.
42. Davie, E.W., K. Fujikawa, and W. Kisiel, *The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation*. Biochemistry, 1991. 30(43): p. 10363-10370.
43. McGee, M. and L. Li, *Functional difference between intrinsic and extrinsic coagulation pathways. Kinetics of factor X activation on human monocytes and alveolar macrophages*. Journal of Biological Chemistry, 1991. 266(13): p. 8079-8085.
44. Brummel, K.E., et al., *Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2002. 100(1): p. 148-152.
45. Rand, M.D., et al., *Blood clotting in minimally altered whole blood*. 1996.
46. Hoffman, M. and D.M. Monroe III, *A cell-based model of hemostasis*. Thrombosis and haemostasis, 2001. 85(06): p. 958-965.
47. Sucker, C. and R.B. Zotz, *The cell-based coagulation model*, in *Perioperative hemostasis*. 2015, Springer. p. 3-11.
48. Wintrobe, M.M., *Wintrobe's clinical hematology*. Vol. 1. 2008: Lippincott Williams & Wilkins.
49. Rosendaal, F., *Definitions in hemophilia, Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis Factor VII and Factor IX Subcommittee*. Thrombosis and haemostasis, 2001. 85: p. 560.
50. Kulkarni, R., et al., *Complications of haemophilia in babies (first two years of life): a report from the Centers for Disease Control and Prevention Universal Data Collection System*. Haemophilia, 2017. 23(2): p. 207-214.
51. Ragni, M., et al., *Survey of current prophylaxis practices and bleeding characteristics of children with severe haemophilia A in US haemophilia treatment centres*. Haemophilia, 2012. 18(1): p. 63-68.
52. Andes, W.A. and J.O. Edmunds, *Hemarthroses and warfarin: joint destruction with anticoagulation*. Thrombosis and haemostasis, 1983. 49(03): p. 187-189.

53. Shaerf, D. and A. Banerjee, *Assessment and management of post-traumatic haemarthrosis of the knee*. British Journal of Hospital Medicine (2005), 2008. 69(8): p. 459-463.
54. Srivastava, A., et al., *Guidelines for the management of hemophilia*. Haemophilia, 2013. 19(1): p. e1-e47.
55. Van Galen, K., E. Mauser-Bunschoten, and F. Leebeek, *Hemophilic arthropathy in patients with von Willebrand disease*. Blood reviews, 2012. 26(6): p. 261-266.
56. Poenaru, D.V., et al., *Orthopaedic and surgical features in the management of patients with haemophilia*. European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology, 2014. 24(5): p. 685-692.
57. Mulder, K. and A. Llinás, *The target joint*. Haemophilia, 2004. 10 Suppl 4: p. 152-6.
58. Roosendaal, G., et al., *Iron deposits and catabolic properties of synovial tissue from patients with haemophilia*. The Journal of bone and joint surgery. British volume, 1998. 80(3): p. 540-545.
59. Lefeber, F., P. Miossec, and L. Valentino, *Physiopathology of haemophilic arthropathy*. Haemophilia, 2008. 14: p. 3-9.
60. Acharya, S.S., et al., *Neoangiogenesis contributes to the development of hemophilic synovitis*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2011. 117(8): p. 2484-2493.
61. Rodríguez-Merchán, E.C., *Pathogenesis, early diagnosis, and prophylaxis for chronic hemophilic synovitis*. Clinical orthopaedics and related research, 1997(343): p. 6-11.
62. Valentino, L., et al., *Exploring the biological basis of haemophilic joint disease: experimental studies*. Haemophilia, 2012. 18(3): p. 310-318.
63. Blobel, C.P., et al. *Blood-induced arthropathy in hemophilia: mechanisms and heterogeneity*. in *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2015. Thieme Medical Publishers.
64. Roosendaal, G., et al., *Haemophilic arthropathy resembles degenerative rather than inflammatory joint disease*. Histopathology, 1999. 34(2): p. 144-153.
65. Valentino, L., *Blood-induced joint disease: the pathophysiology of hemophilic arthropathy*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2010. 8(9): p. 1895-1902.

66. Pulles, A.E., et al., *Pathophysiology of hemophilic arthropathy and potential targets for therapy*. Pharmacological research, 2017. 115: p. 192-199.
67. Letizia, G., et al., *Ultrastructural appearance of human synovial membrane in the reabsorption phase of acute haemarthrosis*. Italian journal of orthopaedics and traumatology, 1980. 6(2): p. 275-277.
68. Wood, D.D., E.J. Ihrie, and D. Hamerman, *Release of interleukin-1 from human synovial tissue in vitro*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 1985. 28(8): p. 853-862.
69. Brennan, F., et al., *Cytokine production in culture by cells isolated from the synovial membrane*, in *T-Cell Activation in Health and Disease*. 1989, Elsevier. p. 177-186.
70. Sen, D., et al., *Nuclear factor (NF)- κ B and its associated pathways are major molecular regulators of blood-induced joint damage in a murine model of hemophilia*. J Thromb Haemost, 2013. 11(2): p. 293-306.
71. Müller-Ladner, U., R.E. Gay, and S. Gay, *Role of nuclear factor κ B in synovial inflammation*. Current rheumatology reports, 2002. 4(3): p. 201-207.
72. Ma, B., et al., *T cell factor 4 is a pro-catabolic and apoptotic factor in human articular chondrocytes by potentiating nuclear factor κ B signaling*. Journal of biological chemistry, 2013. 288(24): p. 17552-17558.
73. Min, S.Y., et al., *Intra-articular nuclear factor- κ B blockade ameliorates collagen-induced arthritis in mice by eliciting regulatory T cells and macrophages*. Clinical & Experimental Immunology, 2013. 172(2): p. 217-227.
74. Melchiorre, D., et al., *RANK-RANKL-OPG in hemophilic arthropathy: from clinical and imaging diagnosis to histopathology*. The Journal of rheumatology, 2012. 39(8): p. 1678-1686.
75. Wen, F.-Q., et al., *C-myc proto-oncogene expression in hemophilic synovitis: in vitro studies of the effects of iron and ceramide*. Blood, 2002. 100(3): p. 912-916.
76. Hakobyan, N., et al., *Pathobiology of hemophilic synovitis I: overexpression of mdm2 oncogene*. Blood, 2004. 104(7): p. 2060-2064.
77. Bhat, V., et al., *Vascular remodeling underlies rebleeding in hemophilic arthropathy*. American journal of hematology, 2015. 90(11): p. 1027-1035.

78. Donadel-Claeyssens, S., *Current co-ordinated activities of the PEDNET (European Paediatric Network for Haemophilia Management)*. Haemophilia, 2006. 12(2): p. 124-7.
79. Hoots, W.K. *Pathogenesis of hemophilic arthropathy*. in *Seminars in hematology*. 2006. Elsevier.
80. Furuzawa-Carballeda, J., P. Macip-Rodriguez, and A. Cabral, *Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response*. Clinical & Experimental Rheumatology, 2008. 26(4): p. 554.
81. Nieuwenhuizen, L., et al., *Haemarthrosis stimulates the synovial fibrinolytic system in haemophilic mice*. Thrombosis and haemostasis, 2013. 110(07): p. 173-183.
82. Rippey, J., H. JJ, and L. RRH, *Articular cartilage degradation and the pathology of haemophilic arthropathy*. South African Medical Journal, 1978. 54(9): p. 345-351.
83. Furmaniak-Kazmierczak, E., et al., *Studies of thrombin-induced proteoglycan release in the degradation of human and bovine cartilage*. The Journal of clinical investigation, 1994. 94(2): p. 472-480.
84. Cawston, T.E. and D.A. Young, *Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown*. Cell and tissue research, 2010. 339(1): p. 221-235.
85. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovascular research, 2006. 69(3): p. 562-573.
86. Hooiveld, M.J., et al., *Haemoglobin-derived iron-dependent hydroxyl radical formation in blood-induced joint damage: an in vitro study*. Rheumatology, 2003. 42(6): p. 784-790.
87. Roosendaal, G., et al., *Blood-induced joint damage: a human in vitro study*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 1999. 42(5): p. 1025-1032.
88. Katsarou, O., et al., *Increased bone resorption is implicated in the pathogenesis of bone loss in hemophiliacs: correlations with hemophilic arthropathy and HIV infection*. Annals of hematology, 2010. 89(1): p. 67-74.
89. Kovacs, C.S., *Hemophilia, low bone mass, and osteopenia/osteoporosis*. Transfusion and Apheresis Science, 2008. 38(1): p. 33-40.

90. Tlacuilo-Parra, A., et al., *Inactivity is a risk factor for low bone mineral density among haemophilic children*. British journal of haematology, 2008. 140(5): p. 562-567.
91. Barnes, C., et al., *Reduced bone density among children with severe hemophilia*. Pediatrics, 2004. 114(2): p. e177-e181.
92. Nair, A.P., et al., *Osteoporosis in young haemophiliacs from western India*. American journal of hematology, 2007. 82(6): p. 453-457.
93. Wallny, T., et al., *Osteoporosis in haemophilia—an underestimated comorbidity?* Haemophilia, 2007. 13(1): p. 79-84.
94. Pettersson, H., Å. Ahlberg, and I.M. Nilsson, *A radiologic classification of hemophilic arthropathy*. Clinical orthopaedics and related research, 1980(149): p. 153-159.
95. Boyce, B.F. and L. Xing, *The Rankl/Rank/Opg pathway*. Current osteoporosis reports, 2007. 5(3): p. 98-104.
96. Wyseure, T., L.O. Mosnier, and A. von Drygalski, *Advances and challenges in hemophilic arthropathy*. Semin Hematol, 2016. 53(1): p. 10-9.
97. Waldt, S., M. Eiber, and K. Woertler, *Measurements and classifications in musculoskeletal radiology*. 2013: Thieme.
98. Arnold, W.D. and M.W. Hilgartner, *Hemophilic arthropathy. Current concepts of pathogenesis and management*. J Bone Joint Surg Am, 1977. 59(3): p. 287-305.
99. Cross, S., S. Vaidya, and N. Fotiadis, *Hemophilic arthropathy: a review of imaging and staging*. Semin Ultrasound CT MR, 2013. 34(6): p. 516-24.
100. Lundin, B., H. Pettersson, and R. Ljung, *A new magnetic resonance imaging scoring method for assessment of haemophilic arthropathy*. Haemophilia, 2004. 10(4): p. 383-9.
101. Luck, J.V.J., et al., *Hemophilic Arthropathy*. JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2004. 12(4): p. 234-245.
102. Luck, J.V., Jr., et al., *Hemophilic arthropathy*. J Am Acad Orthop Surg, 2004. 12(4): p. 234-45.

103. Richards, M., et al., *A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology: guideline on the use of prophylactic factor VIII concentrate in children and adults with severe haemophilia A*. Br J Haematol, 2010. 149(4): p. 498-507.
104. Blanchette, V.S., et al., *Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH*. J Thromb Haemost, 2014. 12(11): p. 1935-9.
105. Manco-Johnson, M.J., et al., *Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia*. N Engl J Med, 2007. 357(6): p. 535-44.
106. Gringeri, A., et al., *A randomized clinical trial of prophylaxis in children with hemophilia A (the ESPRIT Study)*. J Thromb Haemost, 2011. 9(4): p. 700-10.
107. Manco-Johnson, M., et al., *Randomized, controlled, parallel-group trial of routine prophylaxis vs. on-demand treatment with sucrose-formulated recombinant factor VIII in adults with severe hemophilia A (SPINART)*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013. 11(6): p. 1119-1127.
108. Rayment, R., et al., *Guidelines on the use of prophylactic factor replacement for children and adults with Haemophilia A and B*. Br J Haematol, 2020. 190(5): p. 684-695.
109. Rayment, R., et al., *Guidelines on the use of prophylactic factor replacement for children and adults with Haemophilia A and B*. British journal of haematology, 2020. 190(5): p. 684-695.
110. Hermans, C., et al., *Management of acute haemarthrosis in haemophilia A without inhibitors: literature review, European survey and recommendations*. Haemophilia, 2011. 17(3): p. 383-92.
111. Alhaosawi, M., *Guidelines of management of musculoskeletal complications of hemophilia*. Journal of Applied Hematology, 2014. 5(3): p. 75-85.
112. Hanley, J., et al., *Guidelines for the management of acute joint bleeds and chronic synovitis in haemophilia: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO) guideline*. Haemophilia, 2017. 23(4): p. 511-520.
113. Silva, M., J.V. Luck Jr, and A. Llinás, *Chronic hemophilic synovitis: the role of radiosynovectomy*. Treatment of Hemophilia. World Fed Hemophilia, 2004. 33: p. 1-10.
114. Rodriguez-Merchan, E., H. De la Corte-Rodriguez, and V. Jimenez-Yuste, *Radiosynovectomy in haemophilia: long-term results of 500 procedures performed in a 38-year period*. Thrombosis research, 2014. 134(5): p. 985-990.

115. Bosch, D. and D. Saez, *Synovectomy with rifampicine in haemophilic haemarthrosis*. Haemophilia, 2000. 6(5): p. 562-565.
116. Ali, T., F. Abou Fakher, and J. Schved, *Chemical vs. radioactive synoviorthesis for treatment of chronic haemophilic synovitis: Syrian experience*. Haemophilia: the official journal of the World Federation of Hemophilia, 2016. 22(6): p. e573-e575.
117. Caruso, I., et al., *Rheumatoid knee synovitis successfully treated with intra-articular rifamycin SV*. Annals of the rheumatic diseases, 1982. 41(3): p. 232-236.
118. Caviglia, H., et al., *Chemical synoviorthesis with rifampicin in haemophilia*. Haemophilia, 2001. 7: p. 26-30.
119. Suh, H.C., et al., *Clinical and radiological evaluation after chemical synovectomy with rifampicin in hemophilic arthropathy: Korean experience with a 2-week interval protocol*. Annals of rehabilitation medicine, 2018. 42(3): p. 449.
120. van Vulpen, L.F., et al., *Synovitis and synovectomy in haemophilia*. Haemophilia, 2021. 27: p. 96-102.
121. Storti, E., et al., *Synovectomy, a new approach to haemophilic arthropathy*. Acta haematologica, 1969. 41(4): p. 193-205.
122. Wiedel, J., *Arthroscopic synovectomy: state of the art*. Haemophilia, 2002. 8(3): p. 372-374.
123. Triantafyllou, S.J., et al., *Open and arthroscopic synovectomy in hemophilic arthropathy of the knee*. Clinical orthopaedics and related research, 1992(283): p. 196-204.
124. Yoon, K.H., et al., *Arthroscopic synovectomy in haemophilic arthropathy of the knee*. International orthopaedics, 2005. 29(5): p. 296-300.
125. Ebelin, M., et al., *Synovectomy of the elbow in young hemophilic patients*. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 1987. 69(2): p. 264-269.
126. Buccheri, E., et al., *Haemophilic arthropathy: A narrative review on the use of intra-articular drugs for arthritis*. Haemophilia, 2019. 25(6): p. 919-927.
127. Rodriguez-Merchan, E.C., *Intra-articular injections of hyaluronic acid (viscosupplementation) in the haemophilic knee*. Blood coagulation & fibrinolysis, 2012. 23(7): p. 580-583.

128. Rodriguez-Merchan, E.C., *Intra-articular corticosteroid injections in haemophilic arthropathy: are they recommended?* Hospital Practice, 2018. 46(1): p. 1-4.
129. Dohan Ehrenfest, D.M., L. Rasmusson, and T. Albrektsson, *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. Trends Biotechnol, 2009. 27(3): p. 158-67.
130. Li, T.Y., et al., *An exploratory comparison of single intra-articular injection of platelet-rich plasma vs hyaluronic acid in treatment of haemophilic arthropathy of the knee*. Haemophilia, 2019. 25(3): p. 484-492.
131. John, J., R. Mani, and R. Thomas, *Low-cost treatment for haemophilic knee contractures. BMJ Rapid responses 6 April 2007 to Editorial by Christine Lee, Caroline Sabin, and Alexander Miners. High cost, low volume care: the case of haemophilia*. BMJ, 1997. 315: p. 962-963.
132. Srivastava, A., et al., *WFH guidelines for the management of hemophilia*. Haemophilia, 2020. 26: p. 1-158.
133. Silva, M. and J.V. Luck Jr, *Radial head excision and synovectomy in patients with hemophilia*. JBJS, 2007. 89(10): p. 2156-2162.
134. Rodriguez-Merchan, E., *Therapeutic options in the management of articular contractures in haemophiliacs*. Haemophilia, 1999. 5: p. 5-9.
135. Balci, H., et al., *Knee flexion contracture in haemophilia: treatment with circular external fixator*. Haemophilia, 2014. 20(6): p. 879-883.
136. Goddard, N., H. Mann, and C. Lee, *Total knee replacement in patients with end-stage haemophilic arthropathy: 25-year results*. The Journal of bone and joint surgery. British volume, 2010. 92(8): p. 1085-1089.
137. Atalar, A., et al., *Benefits of radial head excision in patients with haemophilia: mid-term functional results*. Haemophilia, 2016. 22(1): p. e25-e29.
138. Mortazavi, S., et al., *Functional outcome of total knee arthroplasty in patients with haemophilia*. Haemophilia, 2016. 22(6): p. 919-924.
139. Rodriguez-Merchan, E., *Total joint arthroplasty: the final solution for knee and hip when synovitis could not be controlled*. Haemophilia, 2007. 13: p. 49-58.

140. Solimeno, L., et al., *Knee arthropathy: when things go wrong*. Haemophilia, 2012. 18: p. 105-111.
141. Rodriguez-Merchan, E.C. and M. Heim. *Hemophilia orthopedic management with emphasis on developing countries*. in *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2005. Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New
142. Rodriguez-Merchan, E., *Aspects of current management: orthopaedic surgery in haemophilia*. Haemophilia, 2012. 18(1): p. 8-16.
143. Mortazavi, S.J., et al., *Total Knee Arthroplasty in Patients with Hemophilia: What Do We Know?* Arch Bone Jt Surg, 2020. 8(4): p. 470-478.
144. van Vulpen, L., *Iron and inflammation: a joint problem: in blood-induced arthropathy*. 2017, Utrecht University.
145. Kocaoğlu, B., et al., *Preventing blood-induced joint damage with the use of intra-articular iron chelators: an experimental study in rabbits*. Arch Orthop Trauma Surg, 2009. 129(11): p. 1571-5.
146. Nieuwenhuizen, L., et al., *Deferasirox limits cartilage damage following haemarthrosis in haemophilic mice*. Thrombosis and haemostasis, 2014. 112(11): p. 1044-1050.
147. van Meegeren, M.E., et al., *A short time window to profit from protection of blood-induced cartilage damage by IL-4 plus IL-10*. Rheumatology, 2013. 52(9): p. 1563-1571.
148. van Meegeren, M.E.R., et al., *A single intra-articular injection with IL-4 plus IL-10 ameliorates blood-induced cartilage degeneration in haemophilic mice*. British journal of haematology, 2013. 160(4): p. 515-520.
149. van Vulpen, L.F., et al., *IL-1 β , in contrast to TNF α , is pivotal in blood-induced cartilage damage and is a potential target for therapy*. Blood, 2015. 126(19): p. 2239-46.
150. Nieuwenhuizen, L., et al., *Antiplasmin, but not amiloride, prevents synovitis and cartilage damage following hemarthrosis in hemophilic mice*. J Thromb Haemost, 2014. 12(2): p. 237-45.
151. Nieuwenhuizen, L., et al., *Silencing of protease-activated receptors attenuates synovitis and cartilage damage following a joint bleed in haemophilic mice*. Haemophilia, 2016. 22(1): p. 152-159.

152. Anagnostis, P., et al., *The effect of monthly ibandronate on bone mineral density and bone turnover markers in patients with haemophilia A and B and increased risk for fracture.* Thrombosis and haemostasis, 2013. 110(08): p. 257-263.
153. Ebihara, Y., et al., *Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of haemophilic arthropathy.* Haemophilia, 2013. 19(2): p. e87-e89.
154. Kashiwakura, Y., et al., *Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice.* Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2012. 10(9): p. 1802-1813.
155. Ravanbod, R., et al., *Experimental study on the role of intra-articular injection of MSCs on cartilage regeneration in haemophilia.* Haemophilia, 2015. 21(5): p. 693-701.
156. Buda, R., et al., *Treatment of hemophilic ankle arthropathy with one-step arthroscopic bone marrow-derived cells transplantation.* Cartilage, 2015. 6(3): p. 150-155.
157. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis.* Journal of Clinical Oncology, 2005. 23(5): p. 1011-1027.
158. Palmer, B.F. and D.J. Clegg, *Oxygen sensing and metabolic homeostasis.* Molecular and cellular endocrinology, 2014. 397(1-2): p. 51-58.
159. Cooper, M.E., et al., *Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes.* Diabetes, 1999. 48(11): p. 2229-2239.
160. Zebrowski, B.K., et al., *Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions.* Clinical Cancer Research, 1999. 5(11): p. 3364-3368.
161. Zebrowski, B.K., et al., *Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites.* Annals of surgical oncology, 1999. 6(4): p. 373-378.
162. Lee, J.-C., et al., *Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients.* European journal of cancer, 2000. 36(6): p. 748-753.
163. Takahashi, Y., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer.* Cancer research, 1995. 55(18): p. 3964-3968.

164. Takahashi, Y., et al., *Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer*. Clinical Cancer Research, 1996. 2(10): p. 1679-1684.
165. Maeda, K., et al., *Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma*. Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society, 1996. 77(5): p. 858-863.
166. Fujimoto, K., et al., *Expression of two angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor in human pancreatic cancer, and its relationship to angiogenesis*. European journal of cancer, 1998. 34(9): p. 1439-1447.
167. Ikeda, N., et al., *Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer*. British journal of cancer, 1999. 79(9): p. 1553-1563.
168. Berns, E.M., et al., *Combined vascular endothelial growth factor and TP53 status predicts poor response to tamoxifen therapy in estrogen receptor-positive advanced breast cancer*. Clinical Cancer Research, 2003. 9(4): p. 1253-1258.
169. Manders, P., et al., *The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy*. British journal of cancer, 2002. 87(7): p. 772-778.
170. George, D.J., et al., *Prognostic significance of plasma vascular endothelial growth factor levels in patients with hormone-refractory prostate cancer treated on Cancer and Leukemia Group B 9480*. Clinical Cancer Research, 2001. 7(7): p. 1932-1936.
171. Fontanini, G., et al., *Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study*. Journal of the National Cancer Institute, 1997. 89(12): p. 881-886.
172. Gorski, D.H., A.D. Leal, and J.S. Goydos, *Differential expression of vascular endothelial growth factor-A isoforms at different stages of melanoma progression*. Journal of the American College of Surgeons, 2003. 197(3): p. 408-418.
173. Holmes, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*. Cellular signalling, 2007. 19(10): p. 2003-2012.
174. Shibuya, M., *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies*. Genes Cancer, 2011. 2(12): p. 1097-105.

175. Escudier, B. and M. Gore, *Axitinib for the Management of Metastatic Renal Cell Carcinoma*. *Drugs in R & D*, 2011. 11(2): p. 113-126.
176. Cutsem, E.V., et al., *Lessons From the Adjuvant Bevacizumab Trial on Colon Cancer: What Next?* *Journal of Clinical Oncology*, 2011. 29(1): p. 1-4.
177. Elisei, R., et al., *Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer*. *J Clin Oncol*, 2013. 31(29): p. 3639-46.
178. Ferrara, N., et al., *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer*. *Nature reviews Drug discovery*, 2004. 3(5): p. 391-400.
179. Muhsin, M., J. Graham, and P. Kirkpatrick, *Bevacizumab*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3(12): p. 995-6.
180. Shih, T. and C. Lindley, *Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies*. *Clin Ther*, 2006. 28(11): p. 1779-802.
181. Gerriets, V. and A. Kasi, *Bevacizumab*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
182. Garcia, J., et al., *Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook*. *Cancer Treat Rev*, 2020. 86: p. 102017.
183. Taugourdeau-Raymond, S., et al., *Bevacizumab-induced serious side-effects: a review of the French pharmacovigilance database*. *Eur J Clin Pharmacol*, 2012. 68(7): p. 1103-7.
184. Afarid, M., et al., *Intravitreal Injection of Bevacizumab: Review of our previous Experience*. *Iran J Pharm Res*, 2018. 17(3): p. 1093-1098.
185. Gordon-Angeloizzi, M., et al., *Bevacizumab local complications*. *Ophthalmology*, 2009. 116(11): p. 2264-2264. e3.
186. Madhok, R., et al., *Mechanisms of joint damage in an experimental model of hemophilic arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1988. 31(9): p. 1148-55.
187. Wang, K., et al., *Longitudinal assessment of bone loss using quantitative ultrasound in a blood-induced arthritis rabbit model*. *Haemophilia*, 2015. 21(5): p. e402-e410.
188. Shamma, A., et al., *Pilot study on 18F-FDG PET/CT for detection of inflammatory changes in blood-induced knee arthropathy in a rabbit model*. *Haemophilia*, 2017. 23(1): p. e25-e32.

189. Xue, Y., et al., *Pure platelet-rich plasma facilitates the repair of damaged cartilage and synovium in a rabbit hemorrhagic arthritis knee model*. Arthritis Res Ther, 2020. 22(1): p. 68.
190. Nasui, O.C., et al., *Physiologic characterization of inflammatory arthritis in a rabbit model with BOLD and DCE MRI at 1.5 Tesla*. Eur Radiol, 2014. 24(11): p. 2766-78.
191. Camplejohn, K.L. and S.A. Allard, *Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies*. Histochemistry, 1988. 89(2): p. 185-8.
192. Tran, D., et al., *Hematoxylin and safranin O staining of frozen sections*. Dermatol Surg, 2000. 26(3): p. 197-9.
193. Kahveci, Z., F.Z. Minbay, and L. Cavusoglu, *Safranin O staining using a microwave oven*. Biotech Histochem, 2000. 75(6): p. 264-8.
194. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. 150(1): p. 76-85.
195. Gallo-Oller, G., R. Ordoñez, and J. Dotor, *A new background subtraction method for Western blot densitometry band quantification through image analysis software*. Journal of immunological methods, 2018. 457: p. 1-5.
196. Valentino, L.A. and N. Hakobyan, *Histological changes in murine haemophilic synovitis: a quantitative grading system to assess blood-induced synovitis*. Haemophilia, 2006. 12(6): p. 654-62.
197. Krenn, V., et al., *Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis*. Histopathology, 2006. 49(4): p. 358-64.
198. Lavery, S., et al., *The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. 18 Suppl 3: p. S53-65.
199. MacDonald, I.J., et al., *Implications of Angiogenesis Involvement in Arthritis*. Int J Mol Sci, 2018. 19(7).
200. Loomans, J.I., et al., *[Haemophilia]*. Ned Tijdschr Geneesk, 2014. 158: p. A7357.
201. Valentino, L.A., *Blood-induced joint disease: the pathophysiology of hemophilic arthropathy*. J Thromb Haemost, 2010. 8(9): p. 1895-902.

202. Hanley, J., et al., *Guidelines for the management of acute joint bleeds and chronic synovitis in haemophilia: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation (UKHCDO) guideline*. Haemophilia, 2017. 23(4): p. 511-520.
203. Berntorp, E., *Importance of rapid bleeding control in haemophilia complicated by inhibitors*. Haemophilia, 2011. 17(1): p. 11-16.
204. Stephensen, D., M. Bladen, and P. McLaughlin, *Recent advances in musculoskeletal physiotherapy for haemophilia*. Therapeutic advances in hematology, 2018. 9(8): p. 227-237.
205. Rodriguez-Merchan, E.C., *Hemophilic arthropathy: current treatment challenges and future prospects*. Expert Opinion on Orphan Drugs, 2018. 6(8): p. 477-483.
206. De la Corte-Rodriguez, H. and E. Rodriguez-Merchan, *The current role of orthoses in treating haemophilic arthropathy*. Haemophilia, 2015. 21(6): p. 723-730.
207. Rodriguez-Merchan, E.C. and A.D. Liddle, *Pathogenesis and treatment options for hemophilic synovitis*. Expert Opinion on Orphan Drugs, 2017. 5(2): p. 173-179.
208. Jahangier, Z.N., et al., *Radiation synovectomy with yttrium-90 for persisting arthritis has direct harmful effects on human cartilage that cannot be prevented by co-administration of glucocorticoids: an in vitro study*. Ann Rheum Dis, 2006. 65(10): p. 1384-9.
209. Bae, D.K., et al., *Total knee arthroplasty in hemophilic arthropathy of the knee*. The Journal of arthroplasty, 2005. 20(5): p. 664-668.
210. Rodriguez-Merchan, E.C., *Correction of fixed contractures during total knee arthroplasty in haemophiliacs*. Haemophilia, 1999. 5 Suppl 1: p. 33-8.
211. Haxaire, C., et al., *Blood-induced bone loss in murine hemophilic arthropathy is prevented by blocking the iRhom2/ADAM17/TNF- α pathway*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2018. 132(10): p. 1064-1074.
212. Mostafaei, S., et al., *Effectiveness of platelet-rich plasma therapy in wound healing of pilonidal sinus surgery: A comprehensive systematic review and meta-analysis*. Wound Repair Regen, 2017. 25(6): p. 1002-1007.
213. Mohammadi, S., et al., *Evaluation of platelet-rich plasma gel potential in acceleration of wound healing duration in patients underwent pilonidal sinus surgery: A randomized controlled parallel clinical trial*. Transfus Apher Sci, 2017. 56(2): p. 226-232.

214. Norooznezhad, A.H. and F. Norooznezhad, *Cannabinoids: Possible agents for treatment of psoriasis via suppression of angiogenesis and inflammation*. Med Hypotheses, 2017. 99: p. 15-18.
215. Zetterberg, E., et al., *Angiogenesis is increased in advanced haemophilic joint disease and characterised by normal pericyte coverage*. Eur J Haematol, 2014. 92(3): p. 256-62.
216. Karapnar, T.H., et al., *The investigation of relationship between joint findings and serum angiogenic and inflammatory factor levels in severe hemophilia A patients*. Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis, 2014. 25(7): p. 703-708.
217. Rodriguez-Merchan, E.C., *Pathophysiology of the disturbed angiogenesis in hemophilia*. Expert Rev Hematol, 2016. 9(10): p. 933-8.
218. Ranieri, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic*. Curr Med Chem, 2006. 13(16): p. 1845-57.
219. Cohen, M.H., et al., *FDA drug approval summary: bevacizumab plus FOLFOX4 as second-line treatment of colorectal cancer*. Oncologist, 2007. 12(3): p. 356-61.
220. Li, W., et al., *Bevacizumab tested for treatment of knee osteoarthritis via inhibition of synovial vascular hyperplasia in rabbits*. J Orthop Translat, 2019. 19: p. 38-46.
221. Aledort, L.M., R.H. Haschmeyer, and H. Pettersson, *A longitudinal study of orthopaedic outcomes for severe factor-VIII-deficient haemophiliacs. The Orthopaedic Outcome Study Group*. J Intern Med, 1994. 236(4): p. 391-9.
222. Manco-Johnson, M.J., et al., *Results of secondary prophylaxis in children with severe hemophilia*. Am J Hematol, 1994. 47(2): p. 113-7.
223. Dunn, A.L., et al., *Radionuclide synovectomy for hemophilic arthropathy: a comprehensive review of safety and efficacy and recommendation for a standardized treatment protocol*. Thromb Haemost, 2002. 87(3): p. 383-93.
224. Valentino, L.A., *Secondary prophylaxis therapy: what are the benefits, limitations and unknowns?* Haemophilia, 2004. 10(2): p. 147-57.
225. Rodríguez-Merchán, E.C., *Pathogenesis, early diagnosis, and prophylaxis for chronic hemophilic synovitis*. Clin Orthop Relat Res, 1997(343): p. 6-11.

226. Nagai, T., et al., *Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, inhibits osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2014. 16(5): p. 427.
227. Li, W., et al., *[Intraarticular injection of bevacizumab in treatment of osteoarthritis: a laboratory research on a rabbit model]*. Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2016. 48(2): p. 203-9.
228. Yuh, W.T., *An exciting and challenging role for the advanced contrast MR imaging*. J Magn Reson Imaging, 1999. 10(3): p. 221-2.
229. Doria, A.S., et al., *Dynamic contrast-enhanced MRI quantification of synovium microcirculation in experimental arthritis*. AJR Am J Roentgenol, 2006. 186(4): p. 1165-71.
230. Doria, A.S. and P. Dick, *Region-of-interest-based analysis of clustered BOLD MRI data in experimental arthritis*. Acad Radiol, 2005. 12(7): p. 841-52.
231. Nagai, T., et al., *Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, inhibits osteoarthritis*. Arthritis Research & Therapy, 2014. 16(5): p. 427.

X. ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM

1. Ad Soyad:

Lezgin MERT

Tıpta Uzmanlık Öğrencisi

Ortopedi ve Travmatoloji

4: Unvan :

Doktora Öğrencisi

5: Bölüm :

6: Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Tıp Fakültesi	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	2006-2013
Yüksek Lisans	Tıp Fakültesi	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	2006-2013
Doktora	Tıp Fakültesi	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı	2015- Halen