

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI



**ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA OSTEOPOROZ İLE
İLİŞKİLİ YENİ BİYOKİMYASAL MARKERLERİN
TANIDAKİ YERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Meryem KORKMAZ

Danışman
Prof. Dr. Abdullah ARPACI

HATAY – 2020

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA OSTEOPOROZ İLE
İLİŞKİLİ YENİ BİYOKİMYASAL MARKERLERİN
TANIDAKİ YERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Meryem KORKMAZ

Danışman
Prof. Dr. Abdullah ARPACI

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
16797 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2020

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**ORAK HÜCRE ANEMİLİ HASTALARDA OSTEOPOROZ İLE
İLİŞKİLİ YENİ BİYOKİMYASAL MARKERLERİN
TANIDAKİ YERİ**

Yüksek Lisans Tezi
Meryem KORKMAZ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 24/01/2020 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof. Dr. Abdullah ARPACI

Üye: Prof. Dr. Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Serdar DOĞAN

Bu tez, Enstitümüz Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

24/01/2020

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, yetişmemde büyük emeği geçen, benimle bilgi ve deneyimlerini samimiyetle paylaşan, bu yolda bana destek olan Anabilim Dalı başkanı, saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Abdullah ARPACI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek öğrenim öğrencilik hayatım boyunca derslerini dinlemekten büyük zevk aldığım gerek teorik bilgi gerek laboratuvar pratiği konusunda bana çok büyük katkı sağlayan, örnek aldığım, değerli hocam Doç. Dr. Oğuzhan ÖZCAN'a gönülden teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında gerekli örneklerin toplanması aşamasında bana tüm imkanlarını sunan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Bölümü'nden değerli hocam Doç. Dr. Gül İlhan'a ayrıca teşekkür ederim.

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı değerli hocalarından Dr. Öğr. Üyesi Serdar DOĞAN'a, Çukurova Üniversitesi değerli hocalarından Prof. Dr. Şule YILMAZ MENZİLETOĞLU'na tezime olan ilgilerinden dolayı özellikle teşekkür ederim.

Çalışmamın başından son aşamasına kadar bu çalışmada doğrudan ya da dolaylı olarak emeği geçen, özelinde yüksek lisans dönem arkadaşım Berna Kuş olmak üzere, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi çatısı altında olan herkese teşekkür ederim.

Hayatımın bu zorlayıcı ve çok büyük emek isteyen döneminde, bebeğimle ilgilenerek, tezimi yazabilmem için gerekli zamanı bulmama olanak sağlayan, canım kızımın kıymetli teyzesi, kardeşim sevgili Yeşim ZATERİ'ye bu süreçte hayatımı kolaylaştırdığı her an için ayrı ayrı teşekkürü bir borç bilirim.

Meryem Korkmaz

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ÖZET.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hemoglobin	4
2.1.1. Hemoglobin Molekülünün Tarihçesi	4
2.1.2. Hemoglobin Sentezi.....	4
2.1.3. Hemoglobinin Yapısı ve İşlevi	4
2.1.4. Hem'in Yapısı.....	6
2.1.5. Hemoglobinin Deoksihemoglobin ve Oksihemoglobin Formları	7
2.1.6. Hemoglobin Genleri	7
2.1.7. İnsan Hemoglobinleri	8
2.2. Orak Hücre Anemisi.....	9
2.2.1. Tarihçe	9
2.2.2. Epidemiyoloji.....	10
2.2.3. Genetik.....	12
2.2.4. Patofizyoloji.....	13
2.2.5. OHA'da Gerçekleşen Patofizyolojik Mekanizmalar	16
2.2.6. Klinik Bulgular	20
2.3. Vitamin D (25(OH)D).....	21
2.4. Osteoporoz	22

2.4.1. Kemik Döngüsü ve Kemik Döngüsü Belirteçleri	24
2.4.2. Kemik Hücreleri ve Metabolik Aktiviteleri.....	27
2.4.3. Kemik Yapım Markerleri.....	28
2.4.4. Kemik Yıkım Markerleri.....	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Çalışma Şekli	32
3.1.1. Ölçümler ve İzlenecek Parametreler.....	32
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	33
3.2. ELISA Yöntemi ile Serumda KDB ölçümleri	33
3.2.1. PINP Analizi	33
3.2.2. PICP Analizi	34
3.2.3. BALP Analizi	34
3.2.4. OT (Osteokalsin) Analizi.....	34
3.2.5. CTX Analizi.....	34
3.2.6. PYD (Piridinolin) Analizi	35
3.2.7. Hyp (Hidroksiprolin) Analizi.....	35
3.3. Spektrofotometrik Yöntem ile 25(OH)D Tayini.....	35
3.4. İstatistiksel Yöntem.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Grupların Yaş ve Cinsiyet dağılımı.....	36
4.2. Yapım Marker Düzeylerinin Gruplara göre Karşılaştırılması	36
4.3. Yıkım Marker Düzeylerinin Gruplara göre Karşılaştırılması	36
4.4. Vitamin D Düzeylerinin Gruplara göre Karşılaştırılması.....	46
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ.....	64
7. KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Hemoglobin ve yapısındaki Hem molekülü	5
Şekil 2.2. Hem'in ferröz demir (Fe^{+2}) ile oluşturduğu tetrapirrol yapısının açık gösterimi....	6
Şekil 2.3. Oksijenin distal histidin ile stabilizasyonu	6
Şekil 2.4. Hemoglobinin deoksihemoglobin (T) ve oksihemoglobin (R) formları	7
Şekil 2.5. β -globin gen kümesi; orak hücreli anemi ve β -talasemiye yol açan mutasyon..... tiplerinin β -globin geni üzerindeki yerleri	8
Şekil 2.6. Doğum öncesi ve sonrası sentezlenen globin zincirleri.....	8
Şekil 2.7. Orak hücre hastalarının İngiltere ve Fransa'daki dağılım haritaları..	11
Şekil 2.8. Orak hücre haplotiplerinin görülme sıklığı yüksek olan ülkelerdeki coğrafik..... dağılımı.	12
Şekil 2.9. OHA taşıyıcısı ebeveynlerin Mendel genetikleri	13
Şekil 2.10. OHA hastası bir ebeveyn ile OHA taşıyıcısı bir ebeveynin Mendel genetikleri... ..	13
Şekil 2.11. Beta-globin zincirindeki normal aminoasit düzeni ve mutasyona uğramış zincir yapısı.....	14
Şekil 2.12. Orak hücre ve normal kırmızı kan hücresi	15
Şekil 2.13. Orak hücreli anemi patofizyolojisinin (kısmen) şematik gösterimi.	16
Şekil 2.14. Osteoporoz şiddetine göre deforme olan kemik matriksinin kemik kesitlerindeki görünümü	24
Şekil 2.15. Kemik döngüsü yapım/yıkım markerleri.....	31
Şekil 4.1. PINP düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı.....	36
Şekil 4.2. PICP düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı.....	37
Şekil 4.3. BALP düzeylerinin (U/L) gruplara göre değer dağılımı	37
Şekil 4.4. OT düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı	38

Şekil 4.5. Kontrol ve Hasta grubu OT düzeylerinin frekans dağılımlarına göre gösterilmesi	38
Şekil 4.6. Grupların PINP düzeyleri (ng/mL).....	39
Şekil 4.7. Grupların PICP düzeyleri (ng/mL).....	40
Şekil 4.8. Grupların BALP düzeyleri (U/L)	40
Şekil 4.9. Grupların OT düzeyleri (ng/mL)	41
Şekil 4.10. CTX düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı	42
Şekil 4.11. Hyp düzeylerinin (nmol/mL) gruplara göre değer dağılımı	42
Şekil 4.12. PYD düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı	43
Şekil 4.13. Grupların CTX düzeyleri (ng/mL)	44
Şekil 4.14. Grupların Hyp düzeyleri (nmol/mL)	44
Şekil 4.15. Grupların PYD düzeyleri (ng/mL)	45
Şekil 4.16. Vitamin D düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı.	46
Şekil 4.17. Vitamin D düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre karşılaştırılması	47
Şekil 4.18. Kontrol ve Hasta grubu 25(OH)D düzeylerinin frekans dağılımlarına göre gösterilmesi.....	47
Şekil 4.19. Yapım/yıkım markerleri ve VitD konsantrasyonlarının gruplara göre değerlendirilmesi	49
Şekil 4.20. Tüm parametrelerinin korelasyon katsayılarına göre grafikte gösterilmesi	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. 25(OH)D konsantrasyonlarının yeterlilik düzeyleri	21
Çizelge 2.2. Biyokimyasal Kemik Döngüsü Belirteçleri.....	27
Çizelge 4.1. Grupların yaş dağılımı	36
Çizelge 4.2. Yapım marker konsantrasyonlarının gruplara göre karşılaştırılması	39
Çizelge 4.3. Yıkım marker konsantrasyonlarının gruplara göre karşılaştırılması.....	43
Çizelge 4.4. 25(OH)D düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması	46
Çizelge 4.5. Yapım/yıkım markerleri ve 25(OH)D konsantrasyonlarının cinsiyetlere göre karşılaştırılması.....	48
Çizelge 4.6. Tüm parametrelerinin kontrol grubunda ki korelasyon değerlendirmesi	50
Çizelge 4.7. Tüm parametrelerin hasta grubunda ki korelasyon değerlendirmesi.....	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

25(OH)D	: 25 hidroksivitamin D
AFDPHE	: Fransız Çocuk Engellerini Tarama ve Önleme Derneği
BALP	: Kemik Alkalen Fosfataz
BGP	: Kemik Gla Protein (Osteokalsin)
BMD	: Bone Mineral Density (Kemik mineral yoğunluğu)
BMI	: Body Mass Index (Vücut Kitle İndeksi)
CAR	: Orta Afrika Cumhuriyeti
CTX	: Tip 1 kolajen karboksiterminal çapraz-bağlı telopeptit
DEXA	: Dual Enerjili X ışını Absorpsiyometri
DPD	: Deoksipiridinolin
Glu	: Glutamik Asit
Hb	: Hemoglobin
HbA	: Erişkin Hemoglobin
HbF	: Fetal Hemoglobin
HbS	: Orak Hemoglobin
Hyp	: Hidroksiprolin
KDB	: Kemik Döngüsü Belirteçleri
KMY	: Kemik Mineral Yoğunluğu
NHR	: İngiltere Ulusal Hemoglobinopati Kayıt Defteri
NTX	: Tip 1 kolajen karboksiterminal çapraz-bağlı telopeptit
OHA	: Orak Hücre Anemisi
OHH	: Orak Hücre Hastalığı
OT	: Osteokalsin
PICP	: Tip 1 kolajen C-terminal propeptit
PINP	: Tip 1 kolajen N-terminal propeptit
PYD	: Piridinolin
SCA	: Sickle Cell Anemia
SS	: Standart Sapma
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ÖZET

Orak Hücre Anemili Hastalarda Osteoporoz ile İlişkili Yeni Biyokimyasal Markerlerin Tanıdaki Yeri

Otozomal resesif geçiş gösteren **Orak Hücre Anemisi (OHA)**, β -globin zincirini kodlayan gendeki tek nokta mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Hemoglobinin yük dengesinin değişmesine neden olan bu mutasyon, yetersiz oksijen bulunan ortamlarda HbS'in polimerize olmasına sebep olur. Sonuç olarak, alyuvarların bikonkav disk şekli değişir ve hücreler orak şeklini alır. Doku ve organların oksijensiz kalıp beslenememesine ve kemik yoğunluğunun düşmesine bağlı olarak kemik deformiteleri ve takibinde bir kemik hastalığı olan **Osteoporoz** gelişebilir. Bu çalışmada, OHA hastalarında **Kemik Döngüsü Belirteçleri (KDB)** serum düzeyleri ölçülerek orak hücre anemisi ile osteoporoz ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu amaçla 33 orak hücreli birey (HbSS (30) / HbS β (3)) hasta grubu ve 34 adet sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi ve bu bireylerden alınan kan örnekleri, 3500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra serumları ayrılıp biyokimyasal analizler için -80°C'de saklandı. Serum örneklerinde kemik döngüsü yapım belirteçleri; PINP, PICP, BALP ve Osteokalsin (OT) ile kemik döngüsü yıkım belirteçleri; CTX, Hidroksiprolin (Hyp) ve Pridinolin (PYD) düzeyleri ELISA yöntemi ile analiz edildi. Ayrıca, 25(OH)D düzeyleri spektrofotometrik olarak Immunoassay (EIA) ile ölçüldü. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Deney sonucunda, PINP ($p=0,345$), PICP ($p=0,071$) ve BALP ($p=0,607$) düzeylerinde orak hücreli anemi çalışma grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Bununla birlikte, OT düzeyi hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,016$). Ek olarak, hasta grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CTX ($p=0,763$), Hyp ($p=0,546$) ve Piridinolin ($p=0,890$) serum düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı. Son olarak, 25(OH)D orak hücre çalışma grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde düşük bulundu ($p=0,01$).

Çalışma sonucu kemik yapım belirteci olan osteokalsine göre değerlendirildiğinde orak hücre anemili hastalarda osteoblastik aktivitenin ve dolayısıyla kemik döngüsünün arttığı söylenebilir. Orak hücre hasta grubunun artan osteokalsin düzeyi ve düşük 25(OH)D sonucu, osteoporoz patolojisini destekler nitelikte olup tanı için yeterli değildir. Sonuç olarak, orak hücre anemisinin kemik metabolizmalarına olan etkisini anlamak için KDB serum düzeylerinin, kemik mineral yoğunluğu (KMY) ile desteklenerek değerlendirilmesi ve orak hücre hastalarının örneklem büyüklüğü artırılarak daha fazla araştırılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Kemik Döngüsü Belirteçleri, Orak Hücre, Osteopeni, Osteoporoz

ABSTRACT

The Role of New Biochemical Markers Associated with Osteoporosis in Patients with Sickle Cell Anemia in Diagnosis

Autosomal recessive inherited sickle cell anemia (SCA), originates from the single point mutation in the gene encoding the β -globin chain. This mutation, which causes the load balance of hemoglobin to change, causes HbS to polymerize in environments with insufficient oxygen. As a result, the biceps of the red blood cells change the shape and take the form of a sickle. Osteoporosis, which is a bone disease, may develop due to the low bone mass density caused by bone deformities occurred by depending on remaining the tissues and organs without oxygen. In this study, we aimed to investigate the relationship between sickle cell anemia and osteoporosis in sickle cell patients by measuring serum levels of bone turnover markers.

For this purpose, in this study, 33 adult patients with SCA (30 patients with HbSS/3 patients with HbS β) compared with a sex- and age-matched control group. Blood of all patients and healthy individuals were collected and the collected blood samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 minutes, then the blood serum of those were separated and stored at -80°C for biochemical analysis. Working day in serum samples; bone formation markers of bone turnover; PINP, PICP, BALP and Osteocalcin, bone resorption markers of bone turnover; CTX, Hydroxyproline, and Pridinoline were studied by ELISA and 25(OH)D levels measured spectrophotometrically by Immunoassay (EIA). The data were evaluated statistically, and the results were discussed.

As a result, there was no statistically significant difference between sickle cell anemia study group and control group in PINP ($p=0,345$), PICP ($p=0,071$) and BALP ($p=0,607$) levels. However, the OT level was significantly higher in the study group ($p=0,016$). In addition, no statistically significant difference was found between CTX ($p=0,763$), Hyp ($p=0,546$) and PYD ($p=0,890$) levels when compared with the control group. Finally, 25(OH)D sickle cells were significantly lower in the study group compared to the control group ($p=0,01$).

In conclusion, when the results of the study were evaluated according to osteocalcin which is a marker of bone formation, it can be said that osteoblastic activity and thus bone turnover increased in patients with sickle cell anemia. Increased osteocalcin level and low 25(OH)D result of patient group support the pathology of osteoporosis but are not sufficient for diagnosis. In conclusion, to understand the effect of sickle cell anemia on bone metabolism, biochemical markers need to be further investigated by supporting BMD and increasing the sample size of patients.

Key Words: Bone Tunover Markers, Osteopenia, Osteoporosis, Sickle Cell Anemia

1. GİRİŞ

Dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kan hastalıkları, doku ve organlara oksijen taşımak gibi hayati bir önemi olan hemoglobin molekülünün polipeptid zincirlerinin yapısında meydana gelen değişikliklerden veya bu zincirlerin sentez bozukluklarından kaynaklanan hemoglobinopatilerdir (Apak 2001).

Hemoglobinopatiler, yaygın görülen kalıtsal kan hastalıkları olarak sadece ülkemizde değil dünyada da önemli bir halk sağlığı sorunudur (Ulusal Tanı Kılavuzu 2011). Kalıtsal olan hemoglobinopatiler, anormal hemoglobinler ve talasemiler olarak ikiye ayrılır. Anormal hemoglobinler, hemoglobinin polipeptid zincirlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların sonucudur. Bu mutasyonlar sonucunda, normal bir hemoglobinin globin zincirinde olması gereken düzen değişir ve yeni kurallara uygun zincir yapısına sahip anormal bir hemoglobin sentezlenmiş olur (Aguilar ve ark. 2005).

Orak hücre anemisi (OHA), hemoglobinin beta globin zincirini kodlayan gende meydana gelen mutasyonlarla karakterize ve hemoglobin molekülünün anormal bir versiyonundan kaynaklı bir hemoglobinopatidir. OHA'da anormal globin sentezi sonucunda mutant bir hemoglobin olan Hemoglobin S (HbS) meydana gelir. Hemoglobin, özdeş olmayan 2 α ve 2 β globin zincirinden oluşan tetramerik bir moleküldür. Mutant HbS; beta globin zincirindeki asidik ve hidrofilik bir aminoasit olan glutamik asit yerine hidrofobik bir aminoasit olan valin aminoasidinin geçmesiyle oluşur (β 6Glu $\rightarrow$ Val) (Rees 2010). Bu yanlış kodlama, mutasyona uğramış bir HbS ve bunun sonucunda eritrositlerin orak fenotipinin oluşması ile sonuçlanır (Paredes 2019). Negatif yüklü glutamik asidin kaybı, elektroforetik mobilitenin değişmesine neden olur (Gabriel ve Przybylski 2010). Oraklaşan ve esnek yapılarını kaybederek kırılğanlaşan eritrositler elastikiyetlerini kaybederler ve küçük damarlarda tıkanıklık yaparak bu damarların tıkanmasına neden olurlar (Rees 2010, Aguilar ve ark. 2005).

Hücrelerin orak şekli ve bu şekil ile ilişkili kırılğanlık, hastanın kendi vücudu tarafından hızlı eritrosit yıkımı ile sonuçlanır. Bu da erken yaşta dalakta tıkanmaya ve dalağın fibrozisine yol açar (Gabriel ve Przybylski 2010). Dalakta erken yıkılan kırmızı kan hücreleri, toksik içeriğin serbest kalmasına, dolayısıyla doku ve organlarda tahribata ve kan akışkanlığının da azalmasıyla hastalığın tipik klinik özelliklerinin oluşmasına neden olur

(Stapeysinki ve Martin2004). OHA'nın klinik belirtileri temel olarak deoksijenlenmiş hemoglobin S'nin (deoksi HbS) polimerizasyonundan kaynaklanır (Paredes 2019).

OHA olağanüstü bir fenotipik karmaşıklık ile karakterizedir (Kato ve ark. 2018). Hastalığın en önemli belirtileri kronik hemolitik anemi, sürekli tekrar eden vazooklüziv ataklar ve tahribata uğrayan organlarda meydana gelen işlev bozukluğudur (Richard 2009, Embury 2000). Ayrıca, tedavi amacıyla uygulanan kan transfüzyonları doku ve organlarda demir birikimi ile sonuçlanmakta ve etkilenen organların fonksiyonları bozulmaktadır (Kato ve ark. 2007, Söylemez-Gökyer ve Kayaaltı 2016).

Orak hücre anemisi sıtma endemitesi bölgelerinde yaygın olduğu gibi, popülasyon dinamiklerindeki değişiklikler, mutasyona uğramış genin Kuzey Amerika ve Avrupa gibi diğer alanlara hareketini de sağlamıştır (Paredes 2019).

Orak hücre anemisi, dünya çapındaki en yaygın şiddetli monogenetik hastalıklardan biridir (Rees ve ark. 2018). HbS en sık olarak Ekvator Afrikası'nda ve Afrika kökenlilerde görülür. Sahraaltı Afrikası'ndaki görülme sıklığının her yıl küresel olarak 300.000 ile 400.000 yenidoğan arasında olduğu tahmin edilmektedir (Kato ve ark. 2018). OHA'ya en sık Orta Asya'da rastlanır ve bu bölgelerin bazı etnik gruplarında %40 oranında taşıyıcı birey kaydedilmiştir (Dover ve Platt 2003).

Orak hücre hemoglobine bağlı bir kan hastalığı olduğundan direk oksijen metabolizmasını bozmakta ve bunun sonucu olarak hayat kalitesini dolayısı ile günlük yaşamı doğrudan negatif yönde etkilemektedir. Bununla birlikte osteoporoz bir kemik deformitesi hastalığı olup, kırıklara sebep olabilmekte ve yine doğrudan günlük yaşamı sınırlandırarak yaşam kalitesini düşürmektedir (Eastell ve Hannon 2008).

Orak hücre anemili hastaların osteoporoz riski olduğuna dair çelişkili veriler literatürde mevcuttur. Bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmış fakat, orak hücreli anemide osteopeni ve osteoporoz ile karşılaşma ihtimali henüz bütünüyle ortaya konmamıştır (Acıpayam ve İlhan 2015). Doku ve organların oksijensiz kalıp beslenememesine ve kemik yoğunluğunun düşmesine bağlı olarak kemik deformiteleri ve takibinde bir kemik hastalığı olan **osteoporoz** gelişebilir (Acıpayam ve ark. 2013, Acıpayam ve İlhan 2015, Sarrai ve ark. 2007, Canatan 2003, Nelson ve ark. 2003). Osteoporoz, osteoblast aktivitede (kemik yapım) yavaşlama veya osteoklast aktivitede (kemik yıkım) oluşan bir artış sonucu oluşur (Tanakol 2004). Hastalığın klinik öncesi dönemi **osteopeni** olarak adlandırılır. Bu dönem, sessiz

seyreden asemptomatik bir dönemdir. Patolojik süreç ağırlaştıkça, osteoporoz hastalığının klinik durumları ortaya çıkar (Örmeci 2008).

Bu çalışmada, OHA hastalarında osteoporoz ile ilişkili yapım/yıkım belirteçleri; Tip 1 kolajen N-terminal propeptit (P1NP), Tip 1 kolajen C-terminal propeptit (P1CP), Kemiğe özgü Alkalen Fosfataz (BALP), Osteokalsin (OT), Tip 1 kolajen karboksiterminal çapraz-bağlı telopeptit (CTX), Tip 1 kolajen aminoterminal çapraz-bağlı telopeptit (NTX), Hidroksiprolin, Pridinolin ve Deoksiipridinolin belirteçleri ELISA ile çalışılmış ve Vitamin D düzeyleri spektrofotometrik olarak Immunoassay (EIA) ile ölçülmüştür. Daha sonra veriler istatistiksel olarak analiz edilerek sonuçlar tartışılmıştır. Sonuçta yetişkin bireylerde orak hücre anemisi ve osteoporoz ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, radyolojik tetkikler yanında biyokimyasal belirteçlerin kemik oluşum ve yıkım mekanizmalarının hız göstergesi olarak kemik hastalıklarının tanısında nerede yer aldıkları araştırılacaktır. Kemik döngüsü belirteçleri tayini radyolojik tekniklere kıyasla, örneğe ulaşmanın kolaylığı, düşük test maliyeti, kolayca uygulanabilmesi ve kemik hastalıkları takibinde kısa zaman aralıkları ile yararlanabilme özelliklerine sahip bir yöntem olarak önem arz etmektedir. Ayrıca, osteoporoz ilaçlarının çok yüksek fiyatlar ile hastalara ulaştığı bu dönemde, bu yöntem ile çok daha erken tanı yöntemi oluşturabilecek ve bu tedavi edici ilaçların kullanımı da azaltılarak ülke ekonomisine katkı sağlanacaktır.

İlk defa doktora başvuran bir hastada hastanın kemik kaybı hızı hakkında kemik döngüsü belirteçleri ile bilgi alınması kemik kaybının engellenebilmesini sağlayacaktır.

Ek olarak, bu çalışmada osteoporoz ile ilişkili olan belirteçler topluca değerlendirilecek ve birbirleri ile korelasyonu incelenecektir. Böylece orak hücre hastalarındaki osteoporoz riskinde en sağlıklı verileri elde edebileceğimiz belirteçler belirlenecek ve aşırı test talebi azaltılarak test maliyeti düşürülebilecek ve akıllı laboratuvar kullanımı için pozitif bir adım atılabilecektir.

Bu projenin gerçekleştirilmesi ile, orak hücre anemili hastalarda erken yaşlarda ortaya çıkabilen bir kemik hastalığı olan osteoporozun biyobelirteçler kullanılarak çok erken tanınması, dolayısıyla bu hastaların yaşam kalitelerinin yükseltilmesi ve ancak çok yüksek fiyatlara temin edilebilen tedavi amaçlı osteoporoz ilaçların kullanımı azaltılarak ülke ekonomisine katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemoglobin

2.1.1. Hemoglobin Molekülünün Tarihçesi

Hemoglobin ifadesi ilk kez 1862 yılında Hoppe ve Seyler tarafından kullanılmıştır. Oksijen taşıyan pigment olarak işaret edilen hemoglobin böylece literatürdeki yerini almıştır. Hemoglobin molekülünün yapısı ilk defa 1950'lerde Sanger tarafından proteinler üzerine yapılan çalışmalarla birlikte anlatılmıştır. Takip eden yıllarda, Pauling, Schroeder, Rhinesmith ve Ingram hemoglobin molekülünün 2 α ve 2 β globin zincirinden meydana gelen tetramer yapıda bir protein olduğunu belirtmişlerdir. Hemoglobinin üç boyutlu yapısı tetramer yapının ileri sürüldüğü bu yıllarda X-ray analizi ile Perutz ve arkadaşları tarafından anlaşılmıştır. Son olarak, Bohr ve Krogh 1960'lı yılların başlarında hemoglobin molekülünün işlevini açıklamıştır (Weatherall ve ark. 2001).

2.1.2. Hemoglobin Sentezi

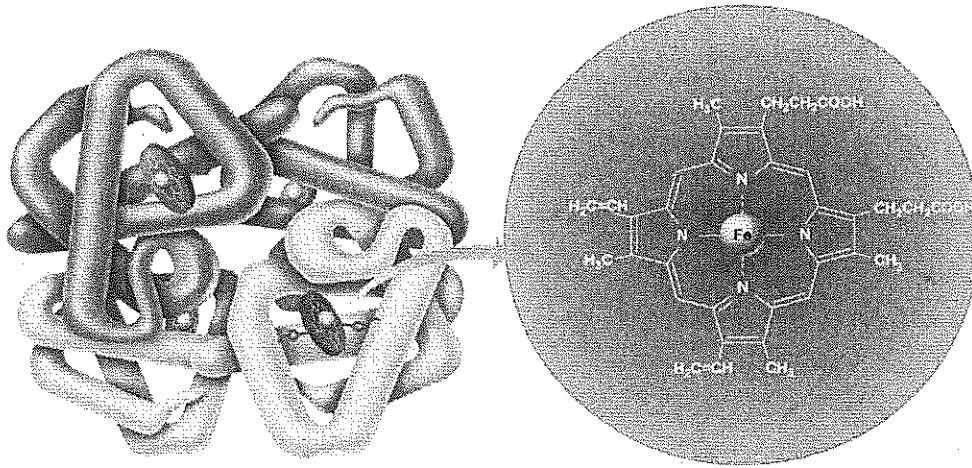
Bazofil eritroblastlar hemoglobin sentezinin başlangıç yeridir, takip eden süreçte normblastlarda sentez hızlanır ve sentez yeterli seviyeye ulaştığında çekirdek hücreden atılır ve retikülositler oluşur. Retikülosit hücreleri birkaç gün içerisinde olgunlaşır. Olgun eritrosit ömrü 120 gündür. Yaşam süreleri dolan eritrositler dalakta makrofajlar tarafından imha edilir (Akay 2001, Nussbaum ve ark. 2007).

2.1.3. Hemoglobinin Yapısı ve İşlevi

Hemoglobin (Hb) O₂'i akciğerlerden alıp dokulara götüren ve dokulardan akciğerlere CO₂ taşıyan bir metalloproteindir (Klinken 2002, Çiğdem 2016). Hb molekülü, hücre kuru ağırlığının %60'ını, kan proteinlerinin 2/3'sini oluşturmaktadır. Erkeklerde Hb ağırlığı 100 mL kanda ortalama 15 gr, kadınlarda ise 13 gramdır (Atlan 2000).

Kırmızı kan hücrelerinin yapısal olarak %30'unu oluşturan ve kana kırmızı rengini veren hemoglobin molekülü, 64.5 kDa moleküler kütleye sahip, maksimum çapı 6.4 nm olan konjuge bir proteindir (Weatherall ve ark. 2001, Güzelgöl 2010).

Globüler bir protein olan Hb, dört subüniteden oluşur. Tetramer yapıdaki hemoglobinin her subünitesi, "hem" denilen prostetik bir grup ve bu gruplara bağlanmış globin denilen polipeptid zincirlerinden oluşmaktadır. Hemoglobin molekülünün dört adet globin zinciri yapının %96'sını oluştururken, geri kalanı bu globin zincirlerine bağlı Hem'lerden oluşur (Yüreğir 1990) (Şekil 2.1).



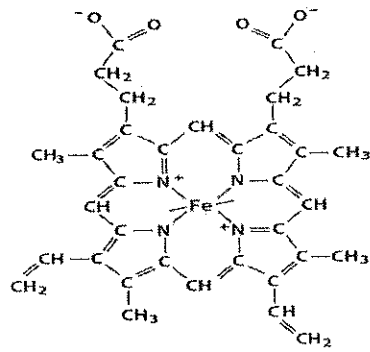
Şekil 2.1. Hemoglobin ve yapısındaki Hem molekülü

<https://wholedude.com/2013/10/26/wholedude-wholedesigner-red-blood-cell/>

Hemoglobin S ile normal hemoglobin karşılaştırıldığında her iki hemoglobin tipi için hem gruplarının aynı olduğu görülmüştür. Hemoglobinler arasındaki fark globinden ortaya çıkmaktadır (Weatherall ve ark. 2001). Hb'nin yapısında bulunan globin zincirlerindeki amino asitlerin cins, sayı ve sırası değişken iken; hem grubu özdeştir (Güzelgöl 2010).

2.1.4. Hem'in Yapısı

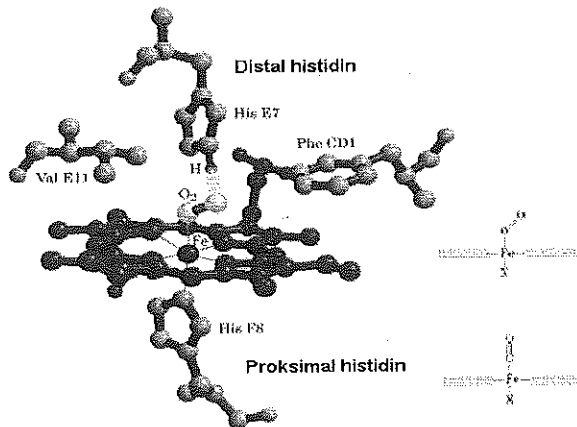
Hem pigmenti, protoporfirin IX halka sistemi ve +2 değerlikli demir atomundan oluşmaktadır. Fe^{+2} molekülü porfirin halkasının azotları ile hem halkasının tam ortasında yer alır. Hem'in Fe^{+2} 'sinin bağ yapmaya hazır iki bağlanma bölgesi daha bulunur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Hem'in ferröz demir (Fe^{+2}) ile oluşturduğu tetrapirel yapısının açık gösterimi

(<https://www.studyblue.com/notes/n/md-heme-study-guide-2012-13-liebman/deck/9712262>)

Bu bağlardan biri globinden gelen histidine bağlanırken, diğeri oksijen bağlamak için hazırdır (Şekil 2.3).

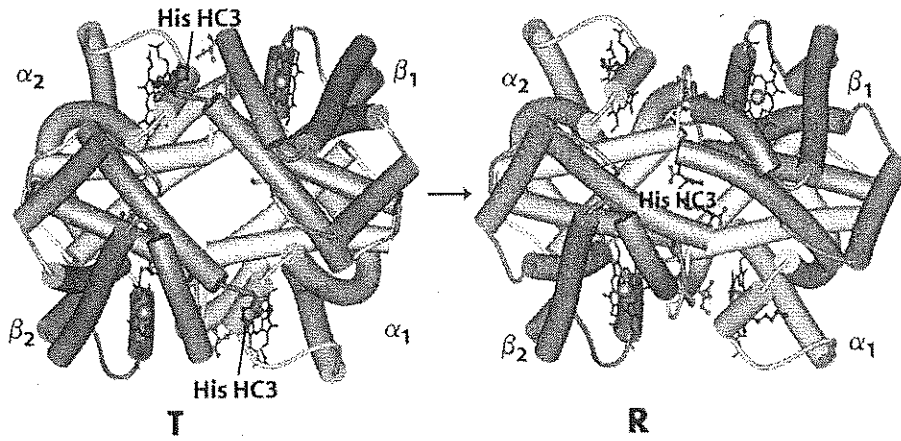


Şekil 2.3. Oksijenin distal histidin ile stabilizasyonu

(<https://slideplayer.com/slide/7753891>)

2.1.5. Hemoglobinin Deoksihemoglobin ve Oksihemoglobin Formları

Hemoglobinin oksijen ile geri dönüşümlü bağlar kurması O_2 molekülünün kanda taşınmasını ve ihtiyaç duyulan doku ve organlarda serbest bırakılmasını sağlar.



Şekil 2.4. Hemoglobinin deoksihemoglobin (T) ve oksihemoglobin (R) formları

(<http://www.slideshare.net/TqraZaheer/lehniger>)

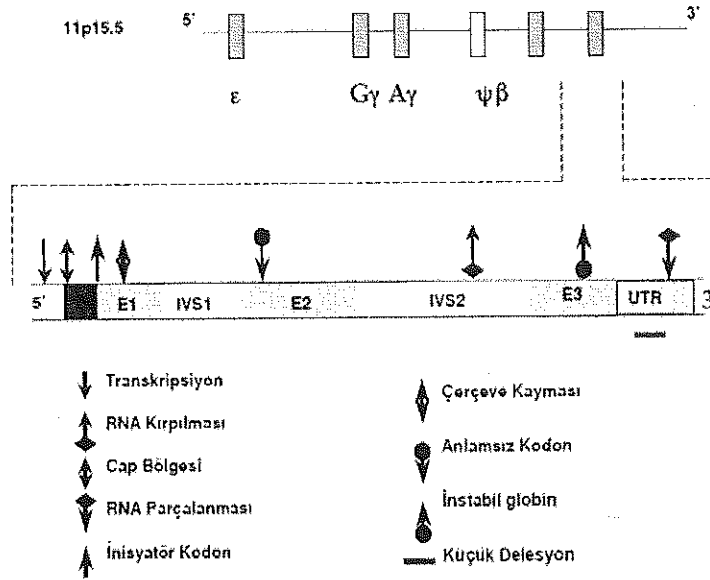
Hemoglobinin deoksi formuna “T” veya taut (gergin) form denilmektedir. T formu oksijene ilginin az olduğu formdur. Hemoglobine bağlanan oksijen, yapıdaki bağlara zarar vererek hidrojen ve iyonik bağların zarar görmesine ve kırılmasına neden olur. Bunun sonucunda “R formu” diğer bir adıyla relaks form oluşur (Şekil 2.4). R formunda hemoglobinin oksijene ilgisi yüksektir (Champe ve ark. 2007).

2.1.6. Hemoglobin Genleri

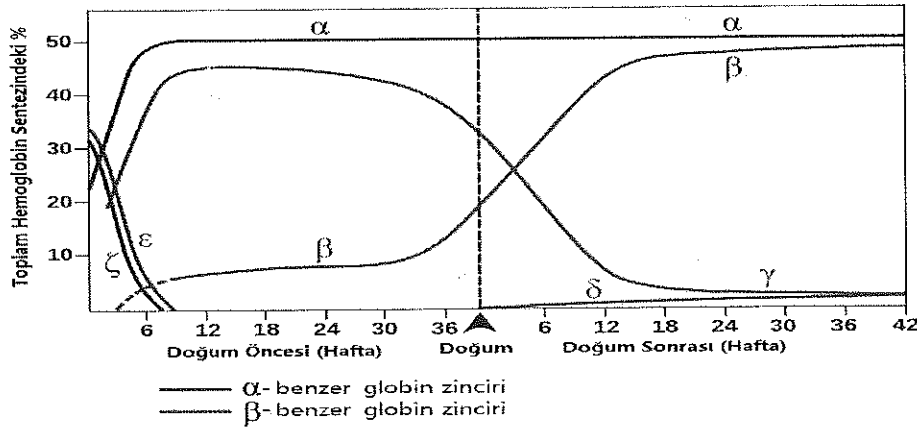
Hemoglobin polipeptid zincirleri α -, β -, γ -, δ -, ϵ - ve ζ - globin genleri tarafından sentezlenmektedir. ζ - ve α -globin genleri 16. kromozomda, ϵ -, γ -, δ - ve β - globin genleri ise 11. Kromozomda yerleşiktir (Şekil 2.5) (Vergin 2008). Oldukça küçük ve yapısal olarak basit bir gen olan β -globin geni, β -globin gen kümesinin bir üyesidir (Basak 2011).

β -globin zincirindeki 146 aminoasidi kodlamak için gerekli bilgiyi içeren 3 ekson, 2 intron ile 5’ ve 3’ yönünde ki düzenleyici bölgeler β -globin gen lokusunu oluşturur. Beta

globin geninden, hemoglobinin β -globin zincirlerine giden yol üzerindeki mutasyonlar β -Talasemiye veya orak hücre anemisine sebep olabilir (Thein 2013).



Şekil 2.5. β -globin gen kümesi; orak hücreli anemi ve β -talasemiye yol açan mutasyon tiplerinin β -globin geni üzerindeki yerleri (Basak 2011)



Şekil 2.6. Doğum öncesi ve sonrası sentezlenen globin zincirleri (Ulutaş 2013)

2.1.7. İnsan Hemogloblinleri

Doğum öncesi ve sonrasında HbA, HbA₂, HbF, Hb Gower I, Hb Gower II ve Hb Portland hemogloblinleri görülür (Clarke ve Higgins 2000).

Mendel kuralları globin genlerinin nesilden nesile nasıl aktarıldığının anlaşılmasını sağlar. Sağlıklı bir yetişkinin hemoglobini $\alpha_2\beta_2$ genlerinden oluşan HbA'dır. Genç yetişkin ve yetişkinlerde bulunabilen HbA₂, $\alpha_2\delta_2$ genlerinden oluşur (Ulusal Tanı Kılavuzu 2016). HbF fetal dönemin hemoglobini ve γ - ve α -genlerinden oluşur ($\alpha_2\gamma_2$) (Şekil 2.6).

2.2. Orak Hücre Anemisi

2.2.1. Tarihçe

Orak hücre geninin Afrika'da binlerce yıldır var olduğu varsayılmaktadır. Fakat, orak hücre anemisi (OHA), medikal literatürde ilk defa 1910 yılında Dr. James Herrick tarafından tanımlanmıştır. Pulmoner semptomlarla başvuran, hemolitik anemili bir hastanın periferik yaymasında, kırmızı kan hücrelerinin orak şeklinde olduğu saptanmıştır (Herrick 1910, Harmening 1997). Kanında orak hücre ile tanımlanan ilk kişi Walter Clement Noel'dir ve 32 yaşında akut göğüs sendromundan hayatını kaybetmiştir. Herrick daha sonra "Şiddetli anemi durumunda tuhaf uzun ve orak şekilli kırmızı kan hücreleri" ("Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia") başlıklı makalesini yayınlamıştır (Herrick 1910, Savitt 1981).

Emmel, 1917 yılında bir OHA hastasının babasında da orak hücrelerinin görülmesi ile, hastalığın genetik bir temeli olabileceğini belirtmiştir (Emmel 1917). Hastalığın otozomal resesif yolla aktarıldığı 1923 yılında ortaya çıkmıştır (Platt ve Dover 1993, Lukens 1993). 1927 yılında Hahn ve Gillepsie OHA'nın patolojik temelini ve Hb molekülü ile ilgisini tanımlamıştır (Herrick 1940, Han ve Gillepsie 1927). Neel, 1949'da orak hücreli aneminin Mendel genetiklerini bildirdi. Aynı yıl, Pauling ve arkadaşları orak hücre anemili hastaların hemoglobin elektroforezinin anormal olduğunu tespit ederek, elektroforetik olarak HbA'dan daha yavaş hareket eden bu anormal proteine HbS veya 'sickle hemoglobine' adını vermişlerdir (Neel 1949).

Anormal hemoglobin molekülü ile karakterize orak hücre hastalığını tanımlayabilmek için Dr. Linus Pauling ve Dr. Harvey Itano, "moleküler hastalık" terimini ilk kullanan kişiler olarak tarihe geçmişlerdir. Orak hücre hastalığı tarihte moleküler düzeyde açıklanan ilk hastalıktır (Pauling ve Harvey 1949). Yetişkin hemoglobininin iki α -globin zinciri ve iki β -globin zincirinden oluştuğu bildirilmiştir (Rhinesmith ve ark. 1957, Rhinesmith ve ark. 1958).

Dr. Vernon Ingram ve Dr. J.A. Hunt tarafından, 1956 yılında bir amino asidi başka biriyle ikame eden bir mutasyonun, orak hücre hastalığında eritrositlerin farklı şeklinin altında yatan neden olduğunu gösterilmiştir. Ingram, normal yetişkin hemoglobini ve orak hücreli hemoglobin arasındaki tek yapısal farkın, β -globin amino asit zincirindeki valin ile glutamik asidin değiştirilmesi olduğunu göstermiştir. Bu ikame, DNA düzeyinde, bu altıncı kodon içinde adeninden timine kadar tek bir baz değişikliğine yani nokta mutasyonuna karşılık gelir (Ingram 1957).

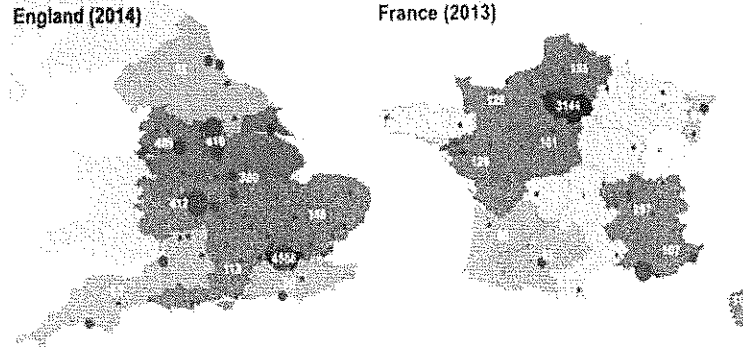
2.2.2. Epidemiyoloji

Orak hücre anemisi, insanlık tarihinde görülme sıklığı en yüksek olan kalıtsal kan hastalıklarından biridir ve çoğunlukla Afrika, Hindistan gibi ülkeleri ve daha çok Arap kökenli insanları etkilemektedir (Weatherall 2011, Inusa ve ark. 2019). OHA'nın sıtma endemitesini bölgelerinde yaygın olduğu gibi, popülasyon dinamiklerindeki değişiklikler, mutasyona uğramış genin Kuzey Amerika ve Avrupa gibi diğer alanlara hareketini de sağlamıştır (Paredes 2019, Inusa ve ark. 2019). Sonuçları çok şaşırtmayan bir araştırmaya göre, Afrika ve Amerikalı orak hücre hastalarında bulunan bazı haplotipler, Afrika kölesi ticareti yoluyla Yeni Dünya'ya zorla göç ettirilen bazı coğrafyalarda gözlemlenebiliyor. Bu bağlamda, Gürcistan'da yaşayan 98 orak hücre hastasının %54'ünde Benin haplotipi, %27'sinde Bantu haplotipi ve %15'inde Senegal haplotipi gözlemlenmiştir (Hattori ve ark. 1986). İyi belgelenmiş başka bir çalışmada, Portekiz'de yaşayan ve soyunun Afrika'dan gelmiş olabileceğini asla düşünmeyen orak hücre hastalarının gen analizlerinde, Batı Afrikalılar ile aynı haplotiplere rastlandığı belirtildi (Gabriel ve Przybylski 2010). Araştırma sonuçlarında, Afrika haplotiplerinin, Portekizli denizciler tarafından 1400 ile 1600'lü yıllar arasında ziyaret edilen coğrafi bölgelere karşılık geldiği belirtildi (Gabriel ve Przybylski 2010).

Malarya'nın sıklıkla görüldüğü Orta Afrika OHA'nın görülme sıklığı en yüksek olan coğrafyalarından biridir (Dover ve Platt 2003). Orak hücre anemili hastaların sıtmaya karşı gösterdikleri direnci kanıtlamak için epidemiyolojik, istatistiksel ve deneysel yöntemlere başvurulmuştur (Allison 2004).

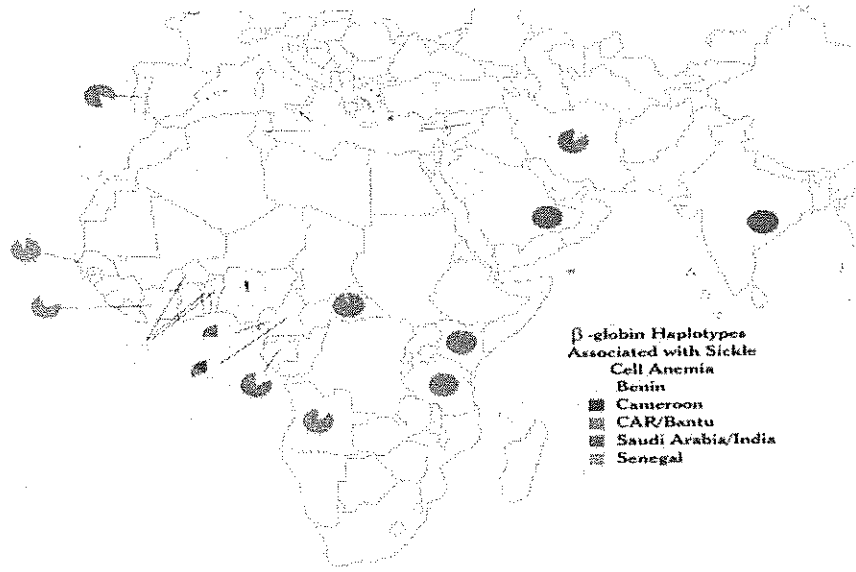
Orak geninin görülme sıklığı Avrupa ülkelerinde değişkendir (Martinez ve ark. 2014, Inusa ve ark. 2019). Orak hücre hastalığının görülme sıklığı gelişmiş ülkelerde kısmen daha

fazladır. Bunun nedeni hastalığın prevalansının yüksek olan ülkelerden gelişmiş ülkelere yapılan göçlerdir (Şekil 2.7) (Lindeu ve ark. 2016, Cela ve ark. 2017, Inusa ve ark. 2019).



Şekil 2.7. Orak hücre hastalarının İngiltere ve Fransa'daki dağılım haritaları (AFDPHE 2013, NHR 2014, Tewari ve ark. 2015)

Orak hemoglobinin, varlığı tanımlanmış olarak 109 yıllık bir öyküsü vardır (Piel ve ark. 2010, Piel ve ark. 2013). Aksoy ve ark. 1950'li yıllarda Çukurova Bölgesinde Eti Türklerinde hemoglobinopatiler üzerine yaptıkları çalışmalar ile literatüre girmişlerdir (1958). Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Hemoglobinopati Konseyi'nin taşıyıcı sıklığı üzerine yaptığı araştırmalar Antakya'da %10,5, Mersin'de 13,6, Antalya'da %2,5, Diyarbakır'da %0,5, Muğla'da %0,5, Adana'da %10,0, oranlarına işaret etmektedir (Arcasoy 2003, Ulusal Tanı Kılavuzu 2011). Türkiye'de orak hücre anemili yaklaşık 1200 hasta yaşamakta ve HbS sıklığı %0,03 olarak belirtilmektedir (Arcasoy 2003). Yapılan tarama çalışmalarına göre, bölgeden bölgeye farklılık gösteren bu oran Çukurova bölgesinde diğer bölgelere kıyasla daha yüksektir (Arpacı ve ark. 1991, Gümrük ve Altay 1995).



Şekil 2.8. Orak hücre haplotiplerinin görülme sıklığı yüksek olan ülkelerdeki coğrafik dağılımı.

Orak hücre hastalığının, birbirinden farklı beş haplotipi bulunmaktadır. Bu β -globin haplotipleri yukarıdaki haritada farklı renklerle gösterilmiştir. Haplotipler, ilk kez keşfedildiği ülkenin adını alır bu nedenle bir ülkede belirtilen haplotipin o ülkenin genetik kökenine sahip olduğu söylenemez. Başka bir deyişle, Benin haplotipi birden fazla ulusta bulunabilirken, bir ulusta farklı haplotiplere sahip olabilir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, farklı ülkelerdeki orak hücreli anemi hastalarının haplotipleri haritada özetlenmiştir. Bu çalışmalarının tamamının aynı sayıda hasta içermediği ve her çalışma için farklı bir yöntem kullanıldığı için, bu veriler göreceli kabul edilmelidir (Nagel ve Ranney 1990, Oner ve ark. 1992, Rahimi ve ark. 2003, Gabriel ve Przybylski 2010).

2.2.3. Genetik

Her iki ebeveynden β -globin geninin mutasyona uğramış bir kopyasını otozomal resesif olarak alan bireyler orak hücre hastası olarak adlandırılır (Neel 1949). Orak hücre hastalığına sebep olan mutasyon homozigot ya da heterozigot genotip gösterebilir. Homozigot mutant genotip HbSS olarak gösterilirken bu genotipe sahip bireylerde hastalığın klinik bulguları görülür (Stapeysnki ve Martin2004). Heterozigot genotipe sahip bireylerde HbAS bulunur ve bu bireyler orak hücre anemisi taşıyıcıları olarak adlandırılır ve bu bireylerde genellikle hastalığın klinik bulgularına rastlanmaz (Gabriel ve Przybylski 2010, Söylemez-Gökyer ve Kayaaltı 2016).

 	HbA ●	HbS ◐
HbA ●	 %25 HbAA ● ●	 %25 HbAS ● ◐
HbS ◐	 %25 HbAS ● ◐	 %25 HbSS ◐ ◐

● HbA aleli
 ◐ HbS aleli

Şekil 2.9. OHA taşıyıcısı ebeveynlerin Mendel genetikleri

OHA taşıyıcısı ebeveynlerin her çocuğu %25 hastalıklı ya da normal doğma oranına, %50 ihtimalle ise taşıyıcı doğma oranına sahiptir (Şekil 2.9).

 	HbA ●	HbS ◐
HbS ◐	 %25 HbAS ● ◐	 %25 HbSS ◐ ◐
HbS ◐	 %25 HbAS ● ◐	 %25 HbSS ◐ ◐

● HbA aleli
 ◐ HbS aleli

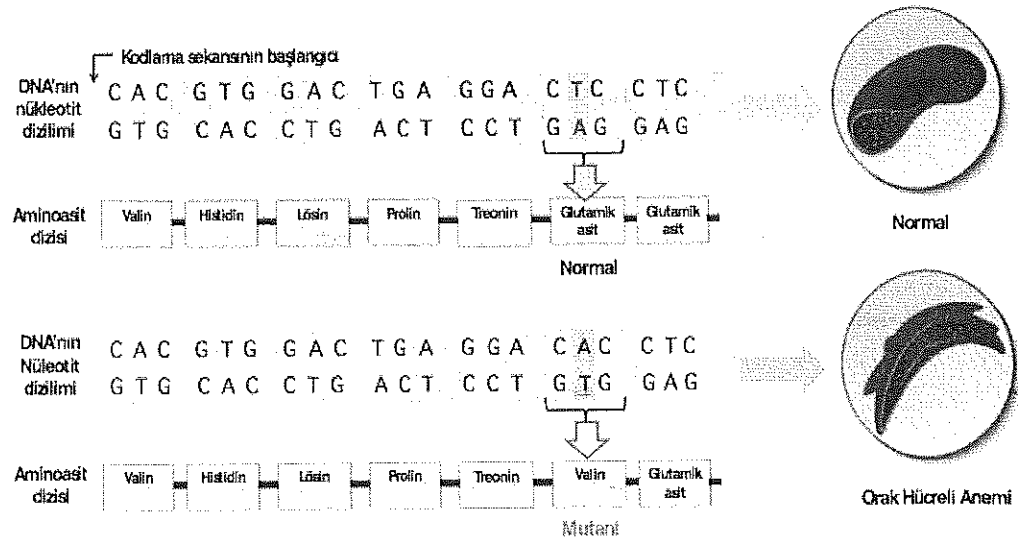
Şekil 2.10. OHA hastası bir ebeveyn ile OHA taşıyıcısı bir ebeveynin Mendel genetikleri

Bir hasta ve bir taşıyıcı ebeveynin OHA hastası bir çocuk doğurma ihtimali %50'dir (Şekil 2.10).

2.2.4. Patofizyoloji

Hemoglobin molekülünün dış yüzeyinde polar özellikte aminoasitler bulunur. Farklı bir aminoasidin varlığına neden olan mutasyonlar hemoglobin molekülünün çözünürlük özelliklerini değiştirir (Yüksel 2014). Hemoglobin S, tek nokta mutasyonu ile Beta-globin

zincirinin 6. pozisyonunda yer alan ve hidrofilik bir aminoasit olan glutamik asidin hidrofobik olan valin aminoasidi ile yer değiştirmesi sonucunda oluşur (Şekil 2.11) (Hockham ve ark. 2015).

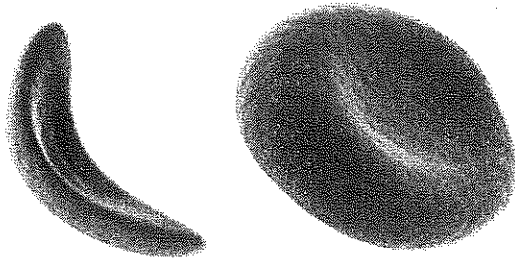


Şekil 2.11. Beta-globin zincirindeki normal aminoasit düzeni ve mutasyona uğramış zincir yapısı

DNA'nın yapısında meydana gelen değişime bağlı olarak farklı amino asit dizilişine sahip globin zinciri tanımlanmıştır (Yüksel 2014, Söylemez-Gökçer ve Kayaaltı 2016).

Bu durum, DNA'da adenin yerine timin bazının gelmesine bağlı olarak gelişir. Yapısında glutamik asit yerine valin ihtiva ettiği için HbS, HbA' ya göre daha az negatif yüklü durumdadır. Valin aminoasidi, β -globin zincirinde yapışkan ve hidrofobik bir temas noktası meydana getirir. HbS'in oksijene olan ilgisi HbA'nın aksine koşullara bağlı olarak değişmez, sabittir. HbS molekülü oksijen bağladığında HbA ile benzer çözünürlük gösterir. Ancak oksijeni bırakan, deoksi HbS molekülünün çözünürlüğü azalır (Ginsburg ve ark. 2005). HbS deoksi hale geldiğinde beta-globin zinciri yüzeyinde bulunan hidrofobik valinin R grubu, diğer bir beta-globin zinciri üzerindeki bir bölge ile hidrofobik bir etkileşime girerek globinde geri dönüşümlü bir polimerizasyona neden olur (Yüksel 2014). Deoksijenasyonun devamı ile agregre olan HbS molekülleri kırmızı kan hücrelerinde iğnemişi ve uzunca fibrillere dönüşür (Ginsburg ve ark. 2005). Doğal şeklini, esnekliğini, kaybeden bu yeni orak şeklindeki hücreler sertleşir ve mekanik kırılabilirlikleri artar (Inusa ve ark. 2019). Eğer ortam erken safhada yeterince oksijenlenirse, oraklaşan eritrositlerin bir kısmı

tekrar eski konformasyonlarına dönebilir. Ancak, bu mutant hücrelerin bir kısmı için, bir süre sonra eritrosit membranlarındaki hasar kalıcı hale gelir ve bu hücreler “Geri dönüşümsüz “Oraklaşmış hücre” veya “ Irreversible sickled cells (ISCs)” olarak adlandırılır (Embury 2000, Wang ve Lukens 1999, Cecil ve ark. 2000). Orak hücre hastalarının ISCs hücre sayıları sabittir ve hastanın ağrılı kriz durumuna göre değişmez (Wang ve Lukens 1999).



Şekil 2.12. Orak hücre ve normal kırmızı kan hücresi

(<http://www.femexer.org/18629/tratamiento-de-celulas-falciformes-endari-ahora-disponible-en-los-estados-unidos/>)

Gerçekleşen polimerizasyonun hızı, oksijensiz ortamın süresi ve dolayısıyla hemoglobinin taut haldeki konformasyonu (T şekli) doğru orantılıdır. Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) noksanlığı, hemoglobinin disosiasyon eğrisini sağa kaydıran pH’ın azalması ve parsiyel oksijen basıncında azalma oraklaşmayı arttıran etkenlerden bazılarıdır. HbF orak hücre oluşumunu engellerken, gebelik oraklaşmayı artırır (Mary 2000, Canatan 2003, Gürdol 2010).

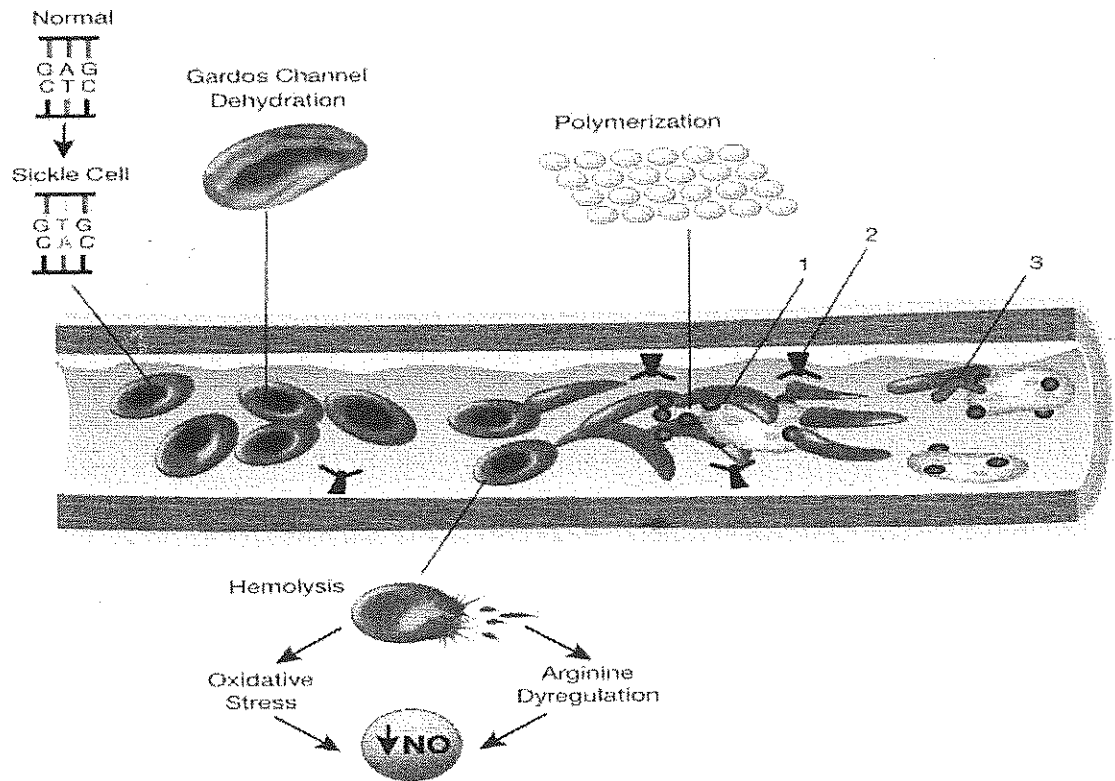
Sert, kırılğan ve yoğunluğu artmış kırmızı kan hücreleri, değişen konformasyonları nedeni ile hareket kabiliyetlerini kaybettikleri için küçük kan damarlarından kolayca geçemezler ve geçmeye çalıştıkları damarlarda sıkışarak tıkanıklığa sebep olurlar. Bu durum kan akışını engelleyerek doku hipoksisine neden olur (Gürdol 2010). Sertleşen kırmızı kan hücreleri erken hemolize uğrar ve artan hemoglobin miktarı ile kan akışını yavaşlatır ve endotelial bütünlüğün bozulmasına neden olur (Inusa ve ark. 2019).

Tek nokta mutasyonu ile başlayıp bir seri olayla devam eden bu süreç, hemolitik anemi ve vazo-oklüsif gibi temel patofizyolojik olayların da başlangıcını oluşturur (Odievre ve ark. 2011, Rees 2010).

2.2.5. OHA'da Gerçekleşen Patofizyolojik Mekanizmalar

2.2.5.1. Vazo-oklüzyon

Vazo-oklüzyon hastalığın anlaşılmasında merkezidir ve bu hastalığın fizyopatolojisinde rol sahibi olan en temel faktördür. Vazo-oklüzyon, doğrudan doku hasarına neden olan lokal hipoksemiye ve enflamasyona neden olabilir fakat, orak hücre anemisi daha karmaşık fizyolojik değişikliklerle karakterizedir. Bugünlerde, orak hücre hastalığının patofizyolojisi sadece vazo-oklüzyon ve hemolitik anemi olarak değil aynı zamanda artmış inflamasyon, hiper pıhtılaşma, oksidatif stres ve kusurlu arginin metabolizması olarak ele alınmaktadır (Gardner 2018, Ballas 2002).



Şekil 2.13. Orak hücreli anemi patofizyolojisinin (kısmen) şematik gösterimi (Gardner 2018)

Adenin bazının Timin bazı ile ikamesi sonucu mutant bir molekül olan HbS meydana gelir. Oksijensiz ortamda HbS polimerizasyona uğrar ve kırmızı kan hücreleri oraklaşır. Deoksijene eritrositlerin geri dönüşümsüz olarak oraklaşmasının ardından, adezyon özellikleri artar. Orak hücrelerin endotel ile etkileşime girmesiyle endotel hasarı ve takibinde vazooklüzyon gerçekleşir. Vazooklüsif durum, kan akışının azalmasına, hemoliz ve devamında inflamatuvar yanıt ve doku hasarına neden olur. Gardos kanalının düzgün çalışmaması oraklaşmış hücreler için dehidrasyona neden olur. Eritrositlerin hemolizi arginin metabolizmasının düzenini bozar ve aynı zamanda oksidatif strese yol açar. Sonuç olarak, multiorgan hasarı meydana gelebilir (Gardner 2018, Ballas 2004)

Vazooklüzyon sırasında orak hücre polimerizasyonu bazı intrinsik ve ekstrinsik mekanizmaları etkiler. Kırmızı kan hücresinin formasyonunun değişmesi, hücre dehidrasyonu, kan viskozitesinde meydana gelen artış ve hücresel kırılabilirlik intrinsik, hemostatik ve vasküler nedenler ekstrinsik mekanizmalara örnektir (Ballas 2002).

Vazooklüzyonda ilk önemli olay endotel adezyonudur. Bu durum kan akışının yavaşlaması, küçük damarların tıkanması ve inflamasyonla devam eder (Odievre ve ark. 2011, Rees 2010). İnflamasyondan kaynaklı oluşan prekapiller tıkanma mikrovasküler vazooklüzyona neden olur. Kan dolaşımı normale döndüğünde (reperfüzyon) doku hasarı gelişmesinin önüne geçilemez. Orak hücre hastalarında gelişen oksidatif stresin nedenlerinden biri de bu iskemi reperfüzyon döngüsüdür (Rees 2010).

2.2.5.2. Dehidratasyon

Orak hücreli anemide orak şeklinin oluşmasına katkıda bulunan en önemli mekanizmalardan biri de dehidratasyondur ve bu sırada gerçekleşen orak şeklindeki eritrositlerin artışı polimerizasyonda da ayırt edilebilir bir artışa neden olur. Anormal membran transport sistemleri artan dehidratasyonun sebeplerindendir (Bize ve ark. 2000).

Eritrositler ihtiyaç halinde K-Cl kotransport (KCC) sistemi sayesinde sıvı dengesini düzenlerler. Bu durumda K, Cl ve sıvı kaybıyla sıvı dengesini düzenleyen K-Cl kotransport sisteminin anormal aktivasyonu hücre içi K^+ konsantrasyonunu azaltarak hücrede dehidratasyon gelişmesine neden olur. Su kaybeden hücrenin yoğunluğu ve hücre içi hemoglobin konsantrasyonu artar, polimerizasyon hızlanır ve ISC oluşumu artar (Bize ve ark. 2000).

2.2.5.2.1 Gardos Kanalı (Kalsiyum İyon-duyarlı potasyum iyon akış kanalı, Calcium-ion-sensitive potassium-ion-efflux channel)

Gardos kanalı adını kendisini ilk olarak tanımlayan Dr. George Gardos'tan almıştır. Potasyum duyarlı Gardos Kanalı, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) miktarının artmasıyla hücre dışına büyük miktarda K^{+} çıkışına neden olur. Orak hücre anemisinde aktivitesinin arttığı bilinen Gardos kanalı dehidratasyon artışına neden olan yollardan biri olarak ISC artışına ve onu takip eden vazo-oklüzyona neden olur (Gardos 1958).

2.2.5.2.2. Eritrosit Membran Yapısında Gerçekleşen Oksidatif Hasar

Orak hücre hemoglobininin fibriller halinde çökmesi, eritrosit membranında oksidatif hasara ve normal membran fosfolipid yapısının bozulmasına ve adezyonun artmasına neden olur. Adezyonu artmış ISC'lerin varlığı kan viskozitesinde artışa ve hastalığın klinik bulgularının oluşmasına neden olur (Bize ve ark. 2000).

Oksidatif stres, hücre metabolizmaları ile açığa çıkan süperoksit ve hidroksil radikali ya da hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin artarak yetersiz antioksidan varlığında oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanabilir (Özcan ve ark. 2015).

Orak hücre anemisinde eritrosit membranındaki oksidatif hasardan kaynaklı serbest radikal türleri, K^{+} geçirgenliğini artış yönünde değiştirir. Artan oksidatif hasar ile daha çok K^{+} hücre dışına çıkarken, aynı oranda Na^{+} hücre içine girer ve deoksijenasyon artar. Artan deoksijenasyonla hücre içi Ca^{+2} beklenenin çok üstünde seyrederek Ca^{+2} 'nin hücre içine bu oranda girişi Gardos kanalı aktivasyonu ile sonuçlanır. Ca^{+2} 'nin hücre dışına çıkmasını sağlayan Ca^{+2} ATPaz enziminin aktivitesi düşer. Hücre için total Ca^{+2} miktarı artar ve böylece hücrenin suya geçirgenliği azalır. Na-K ATPaz pompası hücre içi elektrolit dengesini koruyabilmek için daha çok çalışarak daha çok ATP tüketimine neden olur. Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonunu (MCHC) hücre içi su miktarının azalmasına bağlı olarak artar. Hücre dehidratasyonu intraselüler HbS konsantrasyonunu artırır, bu da hücreyi hızla oraklaştırır (Bize ve ark. 2000).

Hemoglobin biyolojik sistemlerde süperoksit birikiminin önemli bir kaynağıdır. Hemoglobinin yapısındaki +2 değerlikli (ferröz) demir ilaçlar, serbest radikaller veya H_2O_2 gibi endojen ürünlerin etkisi ile oksitlenerek +3 hale (ferrik) döner ve zamanla molekülün

üç boyutlu yapısı bozularak, oksijen taşıyamama olarak bilinen methemoglobin oluşumu artar. Bu durum ferröz formdaki demirin zaten moleküler oksijence zengin olan hemoglobininde, moleküler oksijenin ferröz demiri yükseltgeyerek süperoksit oluşturma ihtimalini arttırmaktadır. Oluşan süperoksit oluşumunu hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri oluşumu takip eder. Aşırı H_2O_2 'ye maruz bırakılan methemoglobinler ile ilgili yapılan çalışmalarda, aşırı hidrojen peroksidin, hemi ayrıştırdığı, demiri bırakmasını uyardığı ve sonunda ayrılan demirin hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek hidroksil ya da diğer radikalleri oluşturduğu gösterilmiştir (Aslan ve ark. 2000).

2.2.5.3. Hemolitik Anemi

Orak hücre hastalığının klinik bulguları küçük kan damarlarının tıkanması nedeniyle oluşan iskemik hasara ve kronik hemolize bağlıdır. Oraklaşan hücrelerin artan kırılabilirliğinden dolayı, damar için hemoliz meydana gelir (Dover ve Platt 2003). İntravasküler hemoliz boyunca Hb'in dolaşıma salınması hastalığın önemli bir mekanizmasını oluşturur. Serbest plazma hemoglobini hidroksil ve süperoksit radikalleri gibi reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir. Nötrofiller de zararlı patojenleri yok etmek için serbest radikalleri üretirler. Fizyolojik şartlarda ROS; hücrede mitokondrial respirasyon, hücrenin stres iletim sistemi ve bakteri fagositosu gibi görevler için gereklidir. Serbest radikaller karaciğerde detoksifikasyon işlemi için kullanılmaktadır. Vücutta oluşan ROS ile antioksidan savunma sistemi denge halindedir. ROS üretiminin artması veya antioksidan savunmanın azalması durumunda biyomoleküllerin yapısal ve fonksiyonel yapılarında değişikliklere yol açar ve oksidatif stres oluşur. Hemolizden dolayı Hem'den serbest Fe'in salınması oksidatif stresin kökenini oluşturur. Nitrik oksit (NO) genelde damar endotelinde üretilir, vazodilatasyon yapar ve trombositleri, nükleer faktör kB (NF kB)-bağımlı adezyon moleküllü, VCAM-1, iCAM-1 ve selektini inhibe eder. İntravasküler hemoliz boyunca Hb'in plazmaya salınması endotelial NO sinyalini baskılar ve bu da endotelial disfonksiyona ve NO direncine yol açar (Rees 2010, Odievre 2011).

Hemoliz mekanizması Arjinaz-1 enziminin plazmaya salınmasının da nedenidir. Plazmadaki arjinini ornitine metabolizma eden enzim olan Arjinaz-1 olduğundan NO substratı gerekli seviyenin altına düşer. Azalan NO ve arjinin hemolitik hastalıklarda görülen hiperkoagülasyonu katalize eder (Rees 2010, Odievre 2011).

2.2.6. Klinik Bulgular

Kan akışkanlığının azalarak zorlaşması orak hücre anemisinin klinik sonuçlarının ilk nedenlerindendir. Azalan kan akışkanlığı, kalınlaşmış eritrosit zarı, hemoglobinin polimerizasyon mekanizması ve hemoglobin düzeyinin hücre içinde artması ile yoğunluk artışına sebep olması diğer nedenler olarak sıralanabilir (Rudy ve ark. 2019).

Normal olarak, kırmızı kan hücreleri esnektir ve kılcıal damarlar gibi düşük kalibreli kapilerlerden geçmek için esneyebilir ve şekillerini gerekli şekilde değiştirebilir. Bununla birlikte, orak şekilli kırmızı kan hücreleri esnekliklerini belirgin şekilde kaybetmiş olup kılcıal yatağı geçebilmek için ihtiyaçları olan şekil değiştirme yeteneklerini kaybetmişlerdir (Aguilar ve ark. 2005). Bu nedenle hücreler, kılcıal damarlarda birikerek damar tıkanıklığına neden olurlar (Rudy ve ark. 2019). Tekrarlayan damar tıkanıklığı, dalak, akciğerler, karaciğer, böbrekler, iskelet ve merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere organların progresif bozulmasına yol açar.

2.2.6.1. Akut Komplikasyonlar

Orak hücre anemisinde görülen akut komplikasyonlar; OHA'nın en yaygın olan komplikasyonu ve genellikle hastalığın ilk habercisi olan **vazooklüzif (ağrılı) kriz**, hemoliz devam ederken, eritrosit yapımının geçici olarak durması ile karakterize **aplastik kriz**, retikülosit, indirekt bilirubin ve laktat dehidrogenaz (LDH) düzeylerinde artış ile karakterize **hemolitik anemi**, penisin istek dışında ağrılı ve sürekli ereksiyonu olarak tanımlanan **priapizm**, göğüs ağrısı, nefes darlığı ve solunumda güçlük ile doğrudan ilişkili **akut göğüs sendromu**, dalakta aşırı kan birikimi ile şekillenen **splenik komplikasyonlar** şeklinde belirtilebilir (Embury 2000, Rees 2010, Kato ve ark. 2018).

2.2.6.2. Kronik Komplikasyonlar

Orak hücreli anemide görülme sıklığı en yüksek olan kronik komplikasyonlardan biri **büyüme ve gelişme geriliğidir**. Bununla birlikte, **gastrointestinal, kardiyovasküler, genitoüriner sistem** gibi birçok sistemi olumsuz etkileyen OHA, çeşitli göz

komplikeasyonlarına, bacak ülserlerine, kemik ve eklem hastalıklarından gebelikte problemlere kadar bir seri kronik komplikeasyona neden olur (Ballas 2002, Rees 2010).

2.2.6.2.1. Omurga, Kemik ve Eklem Hastalıkları

Kemik ve eklem hastalıkları OHA'lı hastalarda yaygın klinik belirtilerden biridir. Orak hücreli anemide görülen kemik hastalıkları akut vazo-oklüzif kemik ağrısı, kemik mikroenfarktları, osteopeni, osteoporoz, osteomyelit, septik ve aseptik artrit, dejeneratif artrit, vertebral kemik deformiteleri, patolojik fraktürler ve osteonekrozdur (Almeida ve Roberts 2005). Orak hücreli anemide kronik hemolitik anemi kemik iliği hiperplazisine yol açar. Kemik iliği boşluklarının yeri kırmızı ilikle dolar ve bu da kemik trabekülasyonunda incelleme düzensizleşme ve kemik korteksinde incellemeyle sonuçlanır (Silva ve ark. 2012).

Orak hücreli anemide görülen kemik hastalıklarının patogenezinde kemik iliği hiperplazisi önemli rol oynar. OHA'lı hastalarda kemik iliğinde meydana gelen hiperplazi ve devamında sürekli tekrar eden kemik enfarktları kemik yapısında ve iskelette değişikliklere neden olur. OHA'da kemik hastalıkları, vazooklüzyonun neden olduğu ve kemik iliği hiperplazisiyle ilişkili olanlar olarak ayrılabilir. Osteopeni ve osteoporoz kemik iliği hiperplazisi ile ilişkilidir. Orak hücreli anemi hastalarında yüksek osteopeni (%30) ve osteoporoz (%50) riski olduğu Elshal MF'nin çalışmasında gösterilmiştir (Elshal ve ark. 2012).

2.3. Vitamin D (25(OH)D)

Orak hücre anemisinin beklenen sonucu olan ve sık görülen 25(OH)D eksikliği 20 ng/mL'den düşük konsantrasyonlar olarak tanımlanır (Vikki ve Kerri 2015). D vitamini eksikliğinin orak hücredeki etkileri kemik hastalıkları gibi diğer komplikeasyonlarla ilişkilendirilebilir (Çiğdem 2016).

Çizelge 2.1. 25(OH)D konsantrasyonlarının yeterlilik düzeyleri

25(OH)D	
0-20 ng/mL	D vitamini eksikliği
21-29 ng/mL	D vitamini hafif eksikliği
30-100 ng/mL	Optimum konsantrasyon

Serum kalsiyum düzeyini fizyolojik sınırlar içinde tutmak D vitaminin en önemli görevidir. Plazma Ca ve P düzeyinde azalma, kemik mineralizasyonda bozulmaya yol açarak çocuklarda rikets, erişkinlerde osteomalaziye sebep olur. D vitamini eksikliği kemik mineral dansitesinde azalmaya neden olarak kırık riskinde artışa yol açar (Outila ve ark. 2001).

Ulusal Osteoporoz Derneği (NOS), kılavuzuna göre D vitamini eksikliği tespit edilen hastalarda (<30ng/mL) tedavi gerekmektedir (Holick ve ark. 2011).

D vitamini, kalsiyum dengesini düzenleyerek kemik fizyolojisinde çok önemli rol oynar. Bu vitamin kemik mineralizasyonunun optimal düzeyde tutulabilmesi için gereklidir. Uzun süreli D vitamini eksikliği kemik mineralizasyonunda azalma ile sonuçlanır ve klinik olarak anormal KMY ve kırık oranında artış ile sonuçlanır (Straube ve ark. 2009, Holick 2007) Birçok çalışmada orak hücreli anemi hastalarında vitamin D eksikliği, kemik hastalıkları ile ilişkili bulunmuştur (Garrido ve ark. 2012)

2.4. Osteoporoz

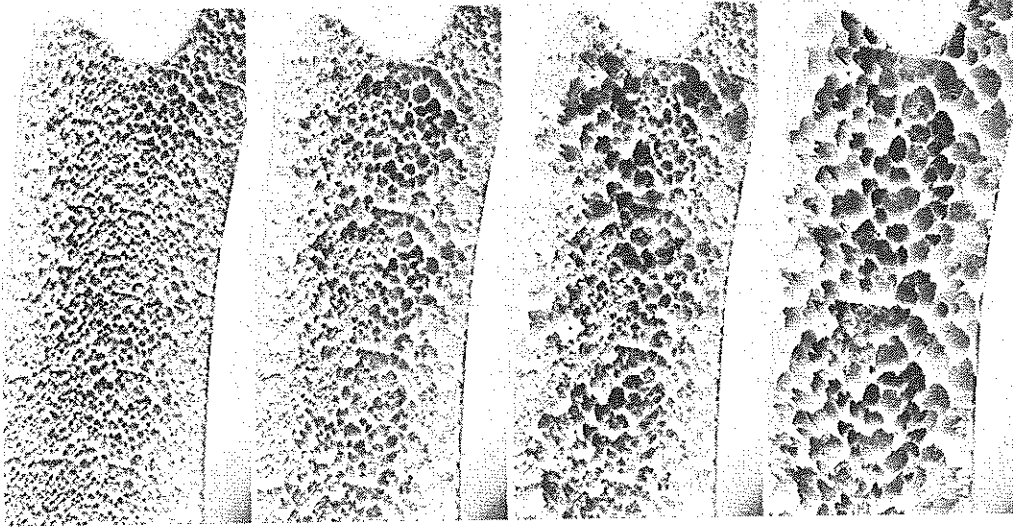
Dünya çapında prevalansı yüksek olan osteoporoz, kemik mikromimarisi bozulması, düşük kemik mineral yoğunluğu ve güç kaybı ile karakterize metabolik bir kemik hastalığıdır (Cooper 2003). Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü'ne göre osteoporoz, artan kırık riskine yatkınlık ve azalmış kemik gücü ile sonuçlanan bir iskelet hastalığı olarak tanımlanmıştır (Hellekson 2002). Osteoporozun en sık görülen şekli yaşlanma ile gelir ve önemli morbidite ve mortaliteye neden olur. Nadiren de olsa monojenik osteoporoz formları genellikle çocuklukta veya genç erişkinlikte sekonder olarak ortaya çıkar ve altta yatan nedene bağlı olarak belirli fenotipik özelliklere ve klinik seyre sahiptir (Riikka ve ark. 2019).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre osteoporoz Amerika, Avrupa ve Japonya'da 75 milyondan fazla insanı etkilemekte ve dünya genelinde her yıl neredeyse 8,9 milyondan fazla kırık vakasıyla karşılaşmaktadır. Bu kırıkların çoğunun ABD ve Avrupa'da meydana geldiği kaydedilmiştir (Pinheiro ve Eis 2010). Brezilya'da kemik kırılımlarının her çeşidini kapsayan %11 ile %24 arasında değişen görülme sıklığı ile 10 milyon insanın bu hastalıktan etkilendiği tahmin edilmektedir (Martini ve ark. 2009). Sağlık Bakanlığı'na göre, Brezilya'da 2007 yılında hastaneye yatışlar için yaklaşık 51,8 milyon harcanmıştır ve her yıl özellikle yaşlı insanlarda kırık tedavisinden kaynaklanan harcamalar artmaktadır (Brasil Ministério da Saúde 2009).

Osteoporoz hastalarında, kemik kütlesi kaybı kırık riskinin artmasına neden olur (Marcucci ve Brandi 2015). Hastalığın kliniğinde görülen en yaygın kırık bölgeleri kalça, omurga ve el bileğidir ve bunların büyük ölçüde sağlık ve ekonomik etkisi vardır. Tüm kırıklar bir dereceye kadar morbidite ile sonuçlanır, ancak kalçadaki kırıklar en kötü senaryolara sebebiyet verebilir (Harvey ve ark. 2010). Osteoporozla ilişkili kırıkların yaygınlığı, kırık tedavilerinin yüksek maliyeti ile ilişkilendirildiğinde, küresel ekonomiye doğrudan veya dolaylı olarak maliyet ekleyecektir. Araştırma verilerine göre bu mali yük, yıllık yaklaşık 34,8 milyar dolarlık büyük maliyetiyle büyük bir halk sağlığı sorunudur ve öngülen demografik değişikliklerle birlikte bu maliyetlerin önümüzdeki 50 yıl boyunca önemli ölçüde artması beklenmektedir. Bu nedenle, önemli bir halk sağlığı sorunu olan osteoporozun önlenmesi, bir kez tespit edildikten sonra tanımlanması ve tedavisi giderek önem kazanmaktadır (Walker 2012, Harvey ve ark. 2010).

Hastalığın merkezinde olan kemik dokusu, temelde **%90 tip I kolajen**, kolajen* olmayan yapısal proteinler ve hücreler gibi organik ve kalsiyum gibi inorganik minerallerden oluşan sert bir bağ dokusudur. Bu içerik, kemiklere kişinin kendi ağırlığına dayanma ve kırılmalara karşı direnç sağlama esnekliği verir. Kemik ayrıca çeşitli sistemik hormonal faktörleri salgılayarak endokrin organ olarak da işlev görür (Florencio-Silva ve ark. 2015, Mäkitie ve ark. 2019). Kolajen yapıdaki maddeler kemiklere sertlik kazandırmakla görevli mineral maddelerin bir arada tutulmasını sağlar, dolayısıyla kolajen yapılarıdaki olası değişimler kemiklerin mekanik özelliklerini etkiler. Bu zincirleme etki kemiklerdeki kırılma hassasiyeti ile doğrudan ilişkilidir (Viguet-Carrin ve ark. 2006). Osteoporoz, kemiklerin hassasiyetinin artmasına ve kırılmaya karşı gösterilen direncin azalmasına neden olur (Kim ve ark. 2013, Guillerminet ve ark. 2010) (Şekil 2.14).

¹ * kemik, lif ve eklemleri oluşturan protein.



Şekil 2.14. Osteoporoz şiddetine göre deforme olan kemik matriksinin kemik kesitlerindeki görünümü
(<https://www.utsa.edu/today/2019/10/story/bone-density.html>)

2.4.1. Kemik Döngüsü ve Kemik Döngüsü Belirteçleri

Kemik insan yaşamı boyunca aktif olarak yenilenme ve yeniden şekillenme geçiren sakin bir dokudur. **Kemik döngüsü**, kemik rezorpsiyon ve kemik oluşum sürecinin birlikte tanımlanmış ifadesidir. Bu döngüde, yaşlı veya hasarlı kemik, sağlıklı ve güçlü kemik dokusunu korumak için aşınır ve yeni kemik ile değiştirir (Mäkitie ve ark. 2019). Kemik döngüsü, eski kemiğin çıkarılması (rezorpsiyon) ve yeni kemiğin yerleşmesi (formasyon) aşamalarından oluşur. Başka bir ifade ile kemik yapım ve yıkım süreçleri kemik döngüsünü oluşturur. Klinikte kullanılan **Tip I prokolajen (PINP) N-terminal propeptit** kemik oluşumu ve **Tip I kolajen C-Telopeptit (CTX)** kemik yıkımı referans belirleyicileridir (Eastell ve Szulc, 2017). Kolajen kemikte yüksek miktarda bulunan bir proteindir ve birbirlerine piridinolin çapraz bağları ile bağlıdır (Ebeling 2001).

İnsan iskeletindeki bir kemiğin kırılması o kemiğin maruz kaldığı mekanik strese ve kemik kuvvetine bağlıdır. Kemik dayanıklılığı yaklaşık olarak %75 ile %90 arasında değişen bir oranla kemik mineral yoğunluğu (KMY) ile ilişkilendirilir (Tüzün ve ark. 2002). Kemik mineral yoğunluğunun, osteoporoz ve kırık riskini tanımladığı düşünülmektedir. Radyolojik bir yöntem olan Dual Enerji X ışını Absorbsiyometrisi (DEXA) osteoporoz tanısında altın standarttır. Genç yetişkinlerde, kemik yoğunluğundaki normal ortalamadan 2,5 standart

sapmadan daha düşük değer osteoporoz tanısı olarak kaydedilmektedir (Mäkitie ve ark. 2019).

Artan kemik döngüsü, kısa zamanda büyük kemik kaybına yol açar ve kırık riskini artırır. İlk defa doktora başvuran bir hastada hastanın kemik kaybı hızı hakkında **Kemik Döngüsü Belirteçleri (KDB)** bilgi vermektedir. DEXA osteoporozun daha geç safhalarında bulgu vermekte ve sık aralıklarla kullanıldığında insan sağlığı açısından sakıncaları bulunmaktadır. Osteoporoz KDB ile erken dönemde tanınabilmektedir (Nelson ve ark. 2003).

Osteoporoz, bir ilaç, hastalık veya eksiklik altta yatan neden olduğunda ikincildir (Walker 2012, Harvey ve ark. 2010). Kemik döngüsü belirteçleri (KDB) birincil osteoporozun teşhisinde kullanılmaz ve tek başına kırılma tahminini iyileştirmez. Kemik döngüsü belirteçleri, osteoporoz tanısı konmuş olan kişilerde tedaviye uyumu değerlendirmek veya olası ikincil osteoporozu belirtmek için faydalı olabilir (Eastell ve Szulc 2017).

Sekonder osteoporozun patogenezi hemen hemen her zaman çok faktörlüdür ve genellikle travmatik bir kırıktan sonra teşhis edilir (Polymeris ve ark. 2013). Orak hücre hastalığı, kas-iskelet sistemi ve özellikle de omurga üzerinde derin etkileri olan yaygın bir kan hastalığıdır; ancak, literatürde OHA ile omurga patolojileri arasındaki ilişkiyi tartışan az sayıda kaynak bulunmaktadır (Rudy ve ark. 2019). Orak hücre hastalığında kemik değişiklikleri kemik iliği hiperplazisi, doku iskemisi ve damar tıkanıklığına bağlı enfarktüs nedeniyle oluşur. Yetişkin orak hücre hastalarında osteopeni ve osteoporoz görülme sıklığı %82'lere varmaktadır (Sarrai ve ark. 2007)

Biyokimyasal bir analiz yöntemi olan kemik döngüsü markerlerinin ölçümü, kemik döngüsünde rol oynayan osteoblast ve osteoklast hücreleri ile ortama verilen kemik metabolizması yan ürünlerin miktarının tayinidir (Kargın ve Fidancı 2002). Bu belirteçlerin, kan ve idrardaki konsantrasyonlarının ölçülmesi kemik yapım-yıkım aşamaları ile ilgili bilgi verirken, osteoklast ve osteoblast gibi kemik hücrelerinin aktivitesini ve sayısını değerlendirilmesini de sağlar (Eastell ve Szulc 2017). Kemik oluşum markerleri serumda ölçülürken, kemik rezorpsiyon markerleri daha çok idrarda ölçülür. Ancak, herhangi bir metabolik kemik hastalığında bu belirteçlerin serum ve idrar ölçümleri paralel sonuçlar vermektedir. Ayrıca, kemik döngüsü belirteçlerinin serumda ölçülmesi kemik yapım/yıkım

süreçleri arasında doğrudan bir karşılaştırmaya olanak sağlamaktadır (Kargın ve Fidancı 2002).

Yaş ve sağlık durumuna değişkenlik gösterecek kemik döngüsü kemik dokusunda kemik yapım/yıkım süreçlerini devam ettirir. Kemik yıkımı sırasında, bundan sorumlu olan osteoklast hücreleri iskeletin farklı bölgelerinde yaşanan az miktarda kemik dokusunu aşındırarak rezorpsiyon oyuklarını oluşturur. Bu süreç, kemik doku bileşenlerinin katabolize edilerek kemik mikro ortamına ve oradan da kan dolaşımına aktarılması ve idrarla kısmen atılması aşamalarını içeren 4-6 haftalık bir süreyi kapsar. Kan ve idrarda bulunan kemik bileşenlerinin veya katabolizma ürünlerinin miktarı kemik emilim aktivitesini yansıtır (Eastell ve Szulc 2017). Osteoklast fonksiyonunun ayırt edici özelliği, osteoklastların kalsifiye kemik matrisini tekrar emmesine izin veren bir rezorpsiyon lakuna oluşturma yeteneğidir. Kemik emilimini bitirdikten sonra osteoklast apoptoz geçirir ve kemik oluşumu başlar (Roodman 1999). Kemik yapımından sorumlu olan osteoblastlar, kemik oluşumunu başlatmak üzere aşındırılan çukurlara ulaşır. Mezenkimal kök hücrelerden gelişen osteoblastlar osteoid üretiminden sorumludur (Manolagas 2000, Aubin 2001). Osteoblastlar, boşluğu kolajen bakımından zengin bir bağ dokusu olan osteoid ile dolduran moleküller salgılar ve bu moleküller dolaşıma salınır. Osteoblastlar tarafından salınan moleküllerin (kemik oluşum belirteçleri) kandaki konsantrasyonları kemik oluşumu aktivitesini yansıtır. Osteoid mineralleşir ve tüm bu kemik oluşumu süreci yaklaşık 4-5 ay sürer (Naylor ve Eastell 2012, Szulc ve Delmas 2008, Eastell ve Szulc 2017).

Çizelge 2.2. Biyokimyasal Kemik Döngüsü Belirteçleri

Kemik Yapım Belirteçleri
PINP
PICP
Kemik alkale fosfat
Osteokalsin
Kemik Yıkım Belirteçleri (Kolajen Kaynaklı)
CTX
NTX
Deoksipridinolin
Pridinolin
Hidroksiprolin

NBHA (2012) ve Uluslararası Osteoporoz Vakfı (IOF 2011) ve Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (IFCC 2011) tarafından referans kemik yapım belirteci olarak **PINP**, referans yıkım belirteci olarak **CTX** önerilir (Eastell ve Szulc 2017).

2.4.2. Kemik Hücreleri ve Metabolik Aktiviteleri

Kemik oluşum mekanizmasından sorumlu olan osteoblastlar, metabolizmadaki görevini (kemik oluşumu) yerine getirdikten sonra, apoptoz geçirir ve astar hücrelerine dönüşür veya kemiğe osteositler halinde gömülür (Manolagas 2000, Aubin 2001).

Küp şeklindeki osteoblast hücreleri tip I kolajen üretme yeteneğine de sahiptir (Kawazoe ve ark. 2004, Eghbali-Fatourehchi ve ark. 2005). Toplam kemik proteininin %90'ını oluşturan tip I kolajen en bol bulunan kemik proteindir. Prokolajen olarak salgılanır ve daha sonra enzimatik olarak N-propeptit ve C-propeptitlerine ayrılır. Tip I kolajen, piridinyum çapraz bağları ile bir arada tutulan çeyrek basamaklı dizide toplanır; **deoksipridinolin (DPD)** ve **piridinolin (PYD)**. DPD ve PYD tip I kolajen temelli olmalarına rağmen ölçüm değerleri CTX ve NTX'e göre daha az hassastır (Okabe ve ark. 2004). Ayrıca, tüm kolajen tiplerinden salınan hidroksiprolin belirteçleri yine CTX ve NTX'e göre daha az spesifiktir (Liesegang 2003).

Osteoblastlar, matriks olgunlaşması sırasında **kemik alkale fosfataz** ve mineralizasyon sırasında **osteokalsin** ekspresyonunu gerçekleştirir. Osteoblast gelişiminin çeşitli aşamalarında farklı belirteçlerin üretimi, dolaşım seviyelerinin neden her zaman paralel değişmediğini açıklamaya yardımcı olabilir (Eastell ve Szulc 2017).

Kemik yıkım mekanizmasından osteoklast hücreleri sorumludur (Roodman 1999). Osteoklastlar, monosit-makrofaj soy hücrelerinden gelişir. Osteoklastlar tamamen emildikten sonra apoptoz geçirirler. Bu hücreler kemiğe bir sızdırmazlık bölgesi ile bağlanır ve salgıladıkları asit kemik minarelini çözer (Lv ve ark. 2015, Eastell ve Szulc 2017). Osteoklastlar düşük pH'larda (örneğin katapsin K ile) aktif olan ve proteinleri parçalayıp serbest bırakan tip I kolajen C-terminal çapraz bağlı CTX ya da tip I kolajen N-terminal NTX gibi telopeptidleri salgırlar. Bu proteinler serum, plazma veya idrarda ölçülebilir (Lv ve ark. 2015, Eastell ve Szulc 2017).

Tartrat dirençli asit fosfataz izoformu **TRAP5b**, osteoklastlar tarafından üretilen enzimlerden bir başkasıdır. İyi karakterize edilen bu belirteç, sadece osteoklastlar tarafından üretilen **TRACP**'nin bir alt kümesidir (Alatalo ve ark. 2003). Kemiğe özgünlüğü yüksek olan bu enzim yüksek oranda osteoklast sayısını yansıtır (Lv ve ark. 2015, Eastell ve Szulc 2017). Ayrıca, **Katapsin K** enzimi bir osteoklast belirteç fragmanı olarak osteoklast hücre sayısı hakkında bilgi verir (Meier ve ark. 2006). Özetle, TRACP enzimi ile bu enzimin bir izoformu olan TRAP5b ve Katapsin K osteoklast hücre sayılarını belirlemek için kullanılan kemik yıkım belirteç fragmanlarıdır (Halleen ve ark. 2000).

Osteositler osteoblastlardan elde edilir. Kemiğe uygulanan mekanik kuvvetleri algılayan bu hücrelerin sayıları oldukça fazladır (Eastell ve Szulc 2017).

2.4.3. Kemik Yapım Markerleri

2.4.3.1. Prokolajen Tip I N-terminal Propeptit (PINP)

PINP fragmanı, N- terminalindeki proteazlarla tip I prokolajen moleküllerinin post-translasyonel bölünmesiyle osteoblastlardan ve fibroblastlardan elde edilir (Garnero ve ark. 2008). PINP'nin serumdaki formu trimerik veya monomeriktir (Brandt ve Krogh 1999). Bu kemik oluşum markeri, osteoblast hücrelerindeki yüksek konsantrasyonu, oda sıcaklığında

kararlı olması, küçük sirkadyen ritim özelliği ve iyi bir test hassasiyeti sağladığı için IOF tarafından referans kemik oluşum markeri olarak belirlenmiştir (Vasikaran 2011).

2.4.3.2. Prokolajen Tip I C-terminal propeptit (PICP)

Prokolajen tip I C-terminal propeptit (PICP) C-terminalindeki proteazlarla tip I prokolajen moleküllerinin bölünmesiyle oluşur (Garnero ve ark. 2008).

2.4.3.3. Kemik Alkalen Fosfataz (BALP)

Kemiğe özgü alkalen fosfataz, osteoblastların plazma zarında membrana bağlı olarak bulunan tetramerik bir enzimdir. Mineralizasyon inhibitörünün enzimatik olarak parçalanmasına ve alkali pH değerlerinde pirofosfatın osteoid oluşumuna önemli katkı sağlar (Stinson ve Hamilton 1994). ALP, klinikte ve araştırma ortamlarında kullanılan ilk kemik döngüsü markeridir. Karaciğer, bağırsak, plasentada ve kemikte birkaç ALP izoformu tanımlanmıştır (Shetty ve ark. 2016).

2.4.3.4. Osteokalsin (OC/OT)

Osteokalsin hidroksiapatit bağlayıcı bir proteindir ve özel olarak yalnızca osteoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından sentezlenir. Kemik GLA proteini olarak adlandırılan OT, kolajen olmayan kemik matrisinin %15'ini oluşturur (Shetty ve ark. 2016).

Osteoblastik aktivitenin sonlarında karşılaşılan kemik oluşum belirtecidir ve kısa yarı ömrü, kararsızlığı ve nispeten yüksek sirkadyen ritmi gibi kısıtları bulunmaktadır (Clemens ve Karsenty 2001, Shetty ve ark. 2016).

2.4.4. Kemik Yıkım Markerleri

2.4.4.1. Tip 1 kolajen karboksiterminal bağlı telopeptit (CTX)

Tip 1 kolajenin CTX fragmanı, katepsin K enziminin aktivitesi tarafından üretilen tip 1 kolajen kemiğinin bozunma ürünleridir. CTX α ve β izomerize formlar halinde bulunur.

Bu izomerize formlar, daha fazla izomerleşerek D ve L formlarını da oluşturur (Garnero ve ark. 2008, Shetty ve ark. 2016).

IOF'nin referans kemik yıkım belirteci olarak belirlediği CTX, diğer dokulardaki tip 1 kolajende bulunmadığı için kemik dokuya spesifiktir. Serum CTX konsantrasyonu, sirkadyen ritim gösterir ve son derece özgül ve hassas bir kemik yıkım belirtecidir (Okabe ve ark. 2001).

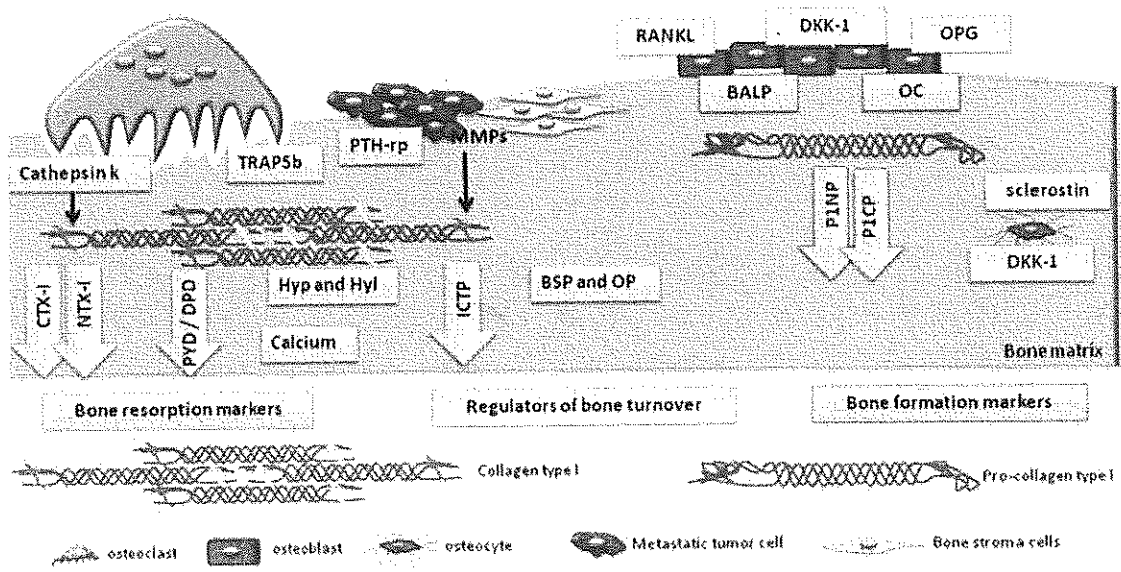
2.4.4.2. Tip 1 kolajen N-terminal bağlı telopeptit (NTX)

NTX, kemik döngüsünün yıkım aşamasında katepsin K enzimi ile N-terminal spesifik bölgesinin bölünmesiyle tip 1 kolajenden üretilir. NTX hem serumda hem de idrarda ölçülebilir. NTX'in idrarda ölçümü CTX'e kıyasla daha az sirkadiyen değişkenlik gösterir ancak 24 saatlik idrar ölçümü gereklidir (Baxter ve ark. 2013).

2.4.4.3. Piridinolin (PYD) ve Deoksiipridinolin (DPD)

Fibril yapıdaki kolajenlerin hücre dışı olgunlaşması esnasında meydana gelen kovalent yapıda piridinyum bileşikleridir. Osteoklastik aktivite sırasında, bu çapraz bağlı kolajenler Tip 1 kolajenin mekanik stabilizasyon için proteolitik olarak bozulmasıyla döngüye salınır. CTX seviyeleri, yeni sentezlenen kolajenlerin bozunmasından etkilenmez ve bu sayede ölçümleri doğruyu yansıtır (Robins ve ark. 1994).

Piridinolin ve deoksiipridinolinler idrarla atılır ve bağırsaktan emilmezler. Bu özellikleri ve iskelet dokularına kuvvetle özgün olmaları sayesinde, bu belirteçlerin ölçüm değerleri diyetten etkilenmez. Kemik, kıkırdak, ligament ve damarlar piridinolin içerirken, deoksiipridinolin yalnızca kemik ve dentinde bulunur. Piridinyum çapraz bağları (Pridinolin ve deoksiipridinolin) kemik yıkım belirteci olarak iyi göstergelerden ikisi olarak görülmektedir (Robins ve ark. 1994).



Şekil 2.15. Kemik döngüsü yapım/yıkım markerleri (Ferreira ve ark. 2015, Kuo and Chen 2017)

Şekilde mavi renk ile gösterilenler osteoblastik aktivite sırasında yapım hücrelerinin kemik matriksinden salgılanan kemik oluşum belirteçlerini temsil eder. Bunlar; BALP, OT, tip I prokolajen propeptitleri (P1NP ve P1CP)'dir. Turuncu renk ile belirtilenler, Osteoklastik aktivite sırasında yıkım hücrelerinin kemik matriksinden salgılanan kemik emilim belirteçlerini temsil eder. Bunlar; PYD, DPD, CTX-I ve NTX-1, HYP, hidroksilisin (HYL); kemik sialoprotein (BSP); osteopontin (OP); tartrata dirençli asit fosfataz 5b (TRAP 5b); katepsin K (CTSK). Katepsin K ve TRAP5b yıkım hücreleri tarafından kendiliğinden salınır. Yeşil renkli kutucuklar kemik döngüsünün düzenleyicilerini temsil eder. Şekilde belirtilen kemik döngüsü düzenleyicileri NF- κ B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü, osteoprotegerin (OPG), dickkopf-1 (DDK-1) ve sklerostin'dir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Şekli

Bu çalışmanın protokolü, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu onayı ile yapıldı (Karar no: 49 09/02/2017). Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Dahiliye Hematoloji servisine başvuran, homozigot HbSS tanısı konmuş 18 yaş ve üzerindeki 33 orak hücre hastası çalışmaya dahil edildi. Gebe ve emziren kadınlar çalışma dışı bırakıldı. Hasta grubu ile değerlendirilmek üzere, 34 sağlıklı birey seçildi. Kan alınacak orak hücre hastaları ve sağlıklı bireyler çalışma ile ilgili bilgilendirilerek imzalı aydınlatılmış etik onam formları alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Hasta grubu çalışmaya dahil edilirken cinsiyet farkı gözletilmedi, ancak kontrol grubundaki bireylerin cinsiyetleri aynı yaş grubunda bulunan hasta grubu ile uyumlu olarak seçildi.

Sirkadyen ritmin biyokimyasal belirteçlere olan etkisi göz önüne alınarak kan örnekleri yaz mevsiminde, sabah saatlerinden başlanarak öğle saatlerine kadar toplanmaya çalışıldı ve analizler deney gününde öğleden sonra gerçekleştirildi. Kan alma kurallarına uyularak toplanan hasta kanları biyokimya tüplerine alındı. Biyokimya tüplerine alınan venöz kan örnekleri soğutmalı santrifüjde 3500 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Kan örneklerinin serumları ependorf tüplerine porsiyonlandı ve deney günlerinde çalışılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi. Marker analizleri yapılırken her bir ependorf serum örneği oda sıcaklığında bekletilip uygun koşullara getirilerek ELISA yöntemi ile çalışıldı. Immunoassay (EIA) ile serumda Vitamin D düzeyleri spektrofotometrik olarak analiz edildi. Çalışma için gerekli malzemeler BAP komisyonundan temin edilen bütçe ile karşılandı.

3.1.1. Ölçümler ve İzlenecek Parametreler

1. Tip 1 kolajen N-terminal propeptit (P1NP)
2. Tip 1 kolajen C-terminal propeptit (P1CP)
3. Kemik Alkalen Fosfataz (BALP)
4. Osteokalsin (OT)

5. Deoksidipridinolin (DPD)
6. Pridinolin (Pyd)
7. Hidroksiprolin (HYP)
8. Tip 1 kolajen aminoterminal bağılı telopeptit (NTX)
9. Tip 1 kolajen karboksiterminal bağılı telopeptit (CTX)
10. 25(OH)D

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

✓ ELISA	Thermo Scientific/MultiscanGo UV
✓ Etüv	Su OVEN ST 120
✓ Soğutmalı Santrifüj	NUVE NF 800, Nüve NF 1200
✓ Immunoassay	Siemens Advia Centaur Xp
✓ Yıkama cihazı	Thermo Scientific

3.2. ELISA Yöntemi ile Serumda KDB ölçümleri

KDB tayinleri, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD ELISA laboratuvarında yapıldı. Serum KDB ölçümleri, **Sandviç Enzim-Bağımlı İmmünosorbent** yöntemi (Kohl ve Ascoli 2017) ile gerçekleştirildi. Analizler için ticari test kitleri kullanıldı. Çalışma başlamadan önce 2-8°C’de muhafaza edilen ELISA kiti soğutucudan alınarak 30 dk. süre ile oda sıcaklığında bekletildi. Ayrıca, her bir hasta ve sağlıklı birey için porsiyonlanmış ependorflardan 1'er adet -80°C’deki derin dondurucudan alınarak oda sıcaklığında çözülmesi sağlandı.

3.2.1. PINP Analizi

PINP analizi için 96 numunelik bir adet ELISA test kiti kullanıldı (PINP (PC) ELISA Kit Katalog no: 201-12-1351, SunRed Biotechnology Company, Shanghai). Konsantrasyonlar lineer eğri kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi. Analiz aralığı 7-2000ng/mL ve hassasiyet 5,125ng/mL’dir. Presizyon, intra-assay CV<10%, inter-assay CV<12% dir.

3.2.2. PICP Analizi

PICP analizi için 96 numunelik bir adet ELISA test kiti kullanıldı (**PICP (PC)** ELISA Kit Katalog numarası 201-12-1374, SunRed Biotechnology Company, Shanghai). Konsantrasyonlar lineer eğri kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi. Analiz aralığı 7-2000ng/mL ve hassasiyet 6,225ng/mL'dir. Presizyon, intra-assay CV<10%, inter-assay CV<12% dir.

3.2.3. BALP Analizi

ALP analizi için 96 numunelik bir adet ELISA test kiti kullanıldı (**BALP (PC)** ELISA Kit Katalog numarası 201-12-1494, SunRed Biotechnology Company, Shanghai). Konsantrasyonlar lineer eğri kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi. Analiz aralığı 3-900U/L ve hassasiyet 2,844U/L'dir. Presizyon, intra-assay CV<10%, inter-assay CV<12% dir.

3.2.4. Osteokalsin Analizi

OT analizi için 96 numunelik bir adet ELISA test kiti kullanıldı (**OT (PC)** ELISA Kit Katalog numarası 201-12-1556, SunRed Biotechnology Company, Shanghai). Konsantrasyonlar lineer eğri kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi. Analiz aralığı 0,5-150ng/mL ve hassasiyet 0,458ng/mL'dir.

3.2.5. CTX Analizi

CTX analizi için 96 numunelik bir adet ELISA test kiti kullanıldı (**CTX (PC)** ELISA Kit Katalog numarası 201-12-1350, SunRed Biotechnology Company, Shanghai). Konsantrasyonlar lineer eğri kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi. Analiz aralığı 0,5-150ng/mL ve hassasiyet 0,432ng/mL'dir. Presizyon, intra-assay CV<10%, inter-assay CV<12% dir.

3.2.6. PYD (Piridinolin) Analizi

PYD analizi için 96 numunelik bir adet ELISA test kiti kullanıldı (**PYD (PC)** ELISA Kit Katalog numarası 201-12-1909, SunRed Biotechnology Company, Shanghai). Konsantrasyonlar lineer eğri kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi. Analiz aralığı 0,75-200ng/mL ve hassasiyet 0,726ng/mL'dir. Presizyon, intra-assay CV<10%, inter-assay CV<12% dir.

3.2.7. Hyp (Hidroksiprolin) Analizi

Hyp analizi için 96 numunelik bir adet ELISA test kiti kullanıldı (**Hyp (PC)** ELISA Kit Katalog numarası 201-12-1901, SunRed Biotechnology Company, Shanghai). Konsantrasyonlar lineer eğri kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar nmol/mL olarak ifade edildi. Analiz aralığı 0,5-150nmol/mL ve hassasiyet 0,482nmol/mL'dir. Presizyon, intra-assay CV<10%, inter-assay CV<12% dir.

3.3. Spektrofotometrik Yöntem ile 25(OH)D Tayini

Vitamin D konsantrasyonları Siemens Advia Centaur Xp cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçüldü (Dondelinger 2011). Siemens Advia Centaur Xp cihazına özgü ticari kit kullanıldı. Sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi. Analiz aralığı yaz mevsiminde 15,7-60,3 ng/mL, kış mevsiminde 8,8-46,3 ng/mL'dir.

3.4. İstatistiksel Yöntem

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro wilk testi ile test edilmiş, Normal dağılıma sahip özelliklerin 2 bağımsız grupta karşılaştırılmasında Student t testi, normal dağılmayan özelliklerin 2 bağımsız grupta karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Sayısal değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon katsayısı ile test edilmiştir. Tanımlayıcı istatistik olarak sayısal değişkenler için ortalama±standart sapma, kategorik değişkenler için ise sayı ve % değerleri verilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS Windows sürüm 21.0 paket programı kullanılmış ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

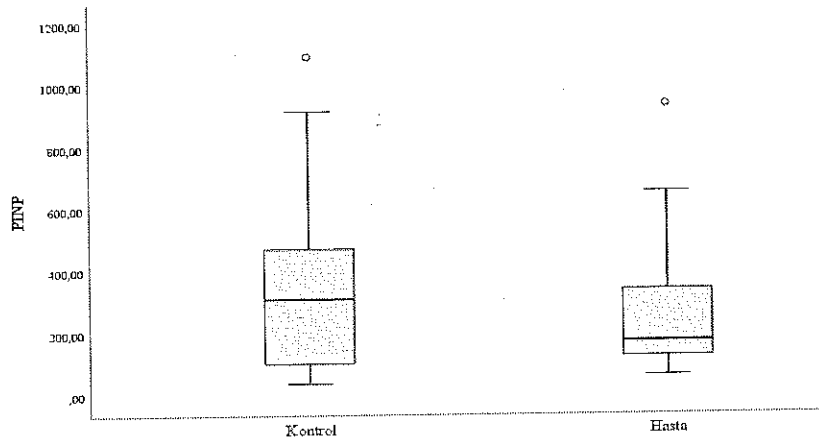
4.1. Grupların Yaş ve Cinsiyet dağılımı

Çizelge 4.1. Grupların yaş dağılımı

Grup	n	YAŞ				p
		Ort ± SS	Medyan	Min-Max		
Kontrol	34	31,6±7,82	32,5	18-47		0,564
Hasta	33	29,94±8	29,0	18-48		

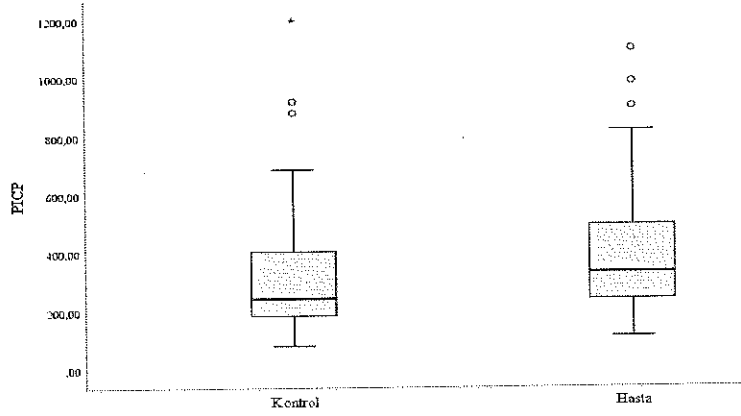
Çalışmamıza yaşları 18 ile 48 arasında değişen 33 orak hücreli anemi ve yaşları 18 ile 47 arasında değişen 34 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu yaş ortalamaları birbirinden farklı değildir (p=0,564). Grupların yaş dağılımı ortalama ± SS şeklinde ifade edilmiştir.

4.2. Yapım Marker Düzeylerinin Gruplara göre Karşılaştırılması



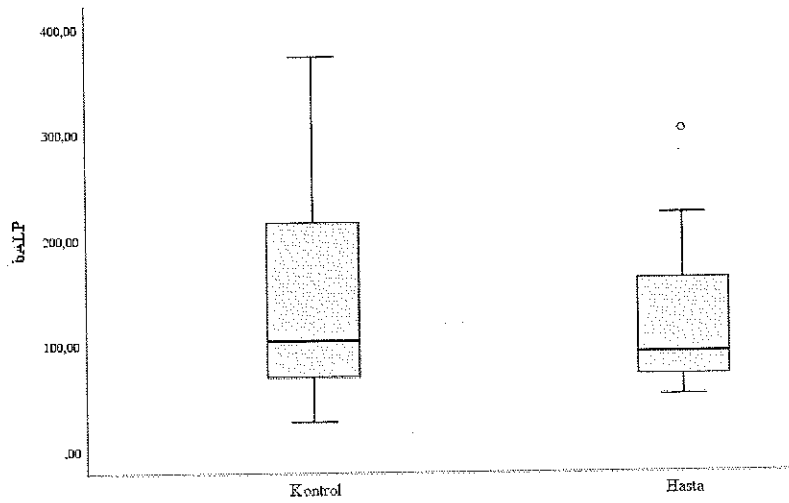
Şekil 4.1. PINP düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı. ○ aşırı bulunmuş değerler

Yukarıda kutu grafiğinde veriler merkezi dağılımlarına göre gösterilmiştir. Kontrol grubunun (n=34) PINP konsantrasyon değerleri 36,36 ile 1093,88 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 309,73 ng/mL olarak belirlenmiştir. Hasta grubunun (n=33) konsantrasyon değerleri 58,64 ile 934,69 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 170 ng/mL olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu kutu grafiğine göre kontrol grubu PINP verileri sola çarpık bir dağılım gösterirken, hasta grubu kutu grafiğinde hastaların PINP verileri sağa çarpık bir dağılım göstermektedir.



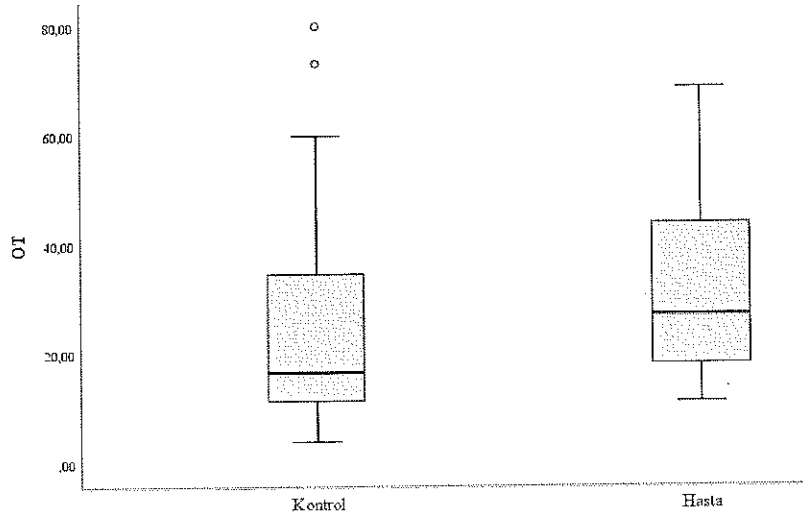
Şekil 4.2. PICP düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı. ○ aşırı bulunmuş değerler, * çok aşırı bulunmuş değerler

Yukarıdaki kutu grafiğinde veriler merkezi dağılımlarına göre gösterilmiştir. Kontrol grubunun (n=34) PICP konsantrasyon değerleri 79,88 ile 1197,79 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 242,33 ng/mL olarak belirlenmiştir. Hasta grubunun (n=33) konsantrasyon değerleri 109,76 ile 1095,94 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 330,38 ng/mL olarak belirlenmiştir. Çizilen kutu grafiklerine göre PICP'nin kontrol ve hasta grubu benzer şekilde sağa çarpık bir dağılım göstermektedir.



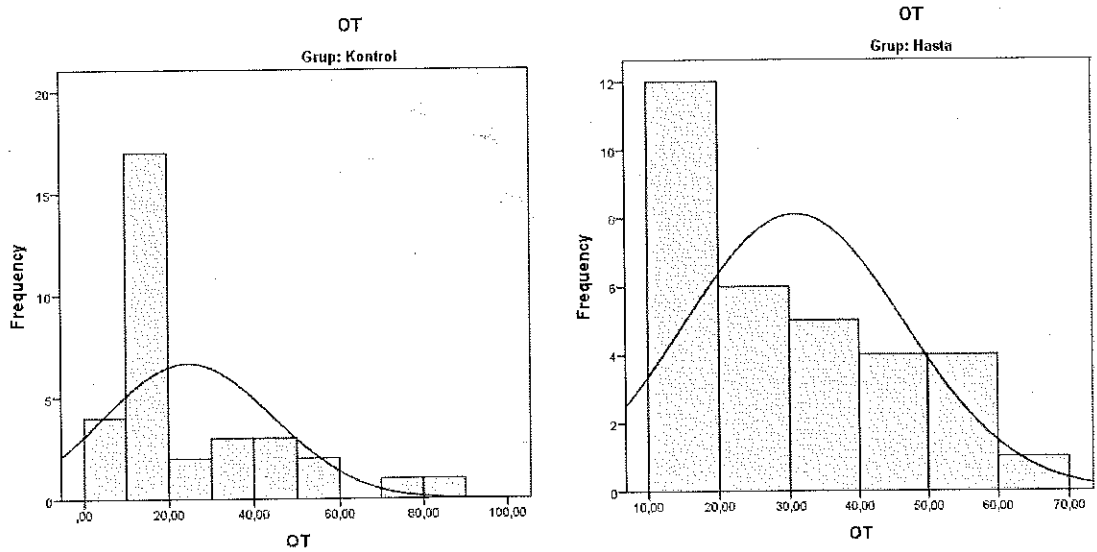
Şekil 4.3. BALP düzeylerinin (U/L) gruplara göre değer dağılımı. ○ aşırı bulunmuş değerler

Yukarıdaki kutu grafiğinde veriler merkezi dağılımlarına göre gösterilmiştir. Kontrol grubunun (n=34) BALP konsantrasyon değerleri 26,63 ile 372,73 U/L arasında değişirken, medyan değeri 103,46 U/L olarak bulunmuştur. Hasta grubunun (n=33) konsantrasyon değerleri 50,88 ile 302,51 U/L arasında değişirken, medyan değeri 91,62 U/L olarak bulunmuştur. Çizilen kutu grafiklerine göre BALP kontrol ve hasta grubu verileri sağa çarpık bir dağılım göstermektedir.



Şekil 4.4. OT düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı. ○ aşırı bulunmuş değerler

Yukarıdaki kutu grafiğinde veriler merkezi dağılımlarına göre gösterilmiştir. Kontrol grubunun (n=34) Osteokalsin konsantrasyon değerleri 3,93 ile 80 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 16,58 ng/mL olarak bulunmuştur. Hasta grubunun (n=33) konsantrasyon değerleri 11,15 ile 68,63 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 27,01 olarak bulunmuştur. Çizilen kutu grafiklerine göre osteokalsin kontrol ve hasta grubu verileri sağa çarpık bir dağılım göstermektedir.



Şekil 4.5. Kontrol ve Hasta grubu OT düzeylerinin frekans dağılımlarına göre gösterilmesi

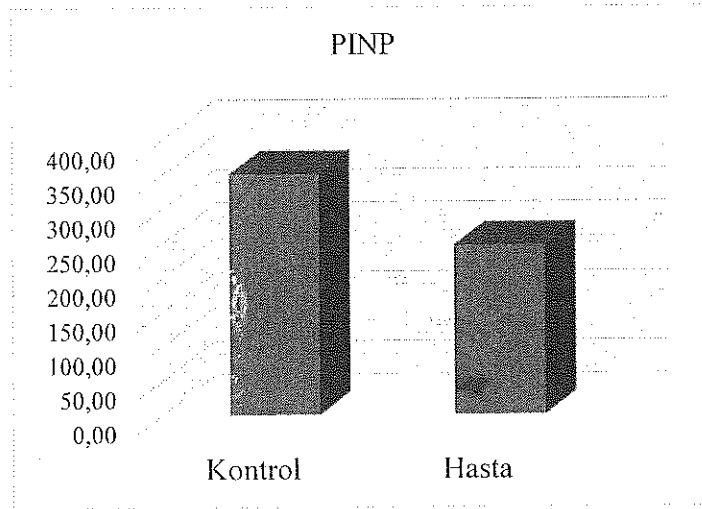
Yukarıdaki histogram grafiklerinde kontrol ve hasta grubu konsantrasyonları frekans dağılımlarına göre gösterilmiştir. Kontrol grubu osteokalsin miktarlarının ortalaması $24,60 \pm 19,82$ ng/mL ve hasta grubu osteokalsin miktarlarının ortalaması $30,90 \pm 15,75$ ng/mL'dir.

Çizelge 4.2. Yapım marker konsantrasyonlarının gruplara göre karşılaştırılması

Kontrol (n=34)				Hasta (n=33)			
	Ort ± SS	Medyan	Min-Max	Ort ± SS	Medyan	Min-Max	p
PINP (ng/mL)	352,90±297,27	309,73	36,36-1093,88	247,60±189,47	170	58,64-934,69	0,345**
PICP (ng/mL)	341,56±254,71	242,33	79,88-1197,79	406,50±246,11	330,38	109,76-1095,94	0,071**
BALP (U/L)	141,75±96,4	103,46	26,63-372,73	116,50±60,81	91,62	50,88-302,51	0,607**
OT (ng/mL)	24,60±19,82	16,58	3,93-80	30,90±15,75	27,01	11,15-68,63	0,016**

** Mann Whitney U test

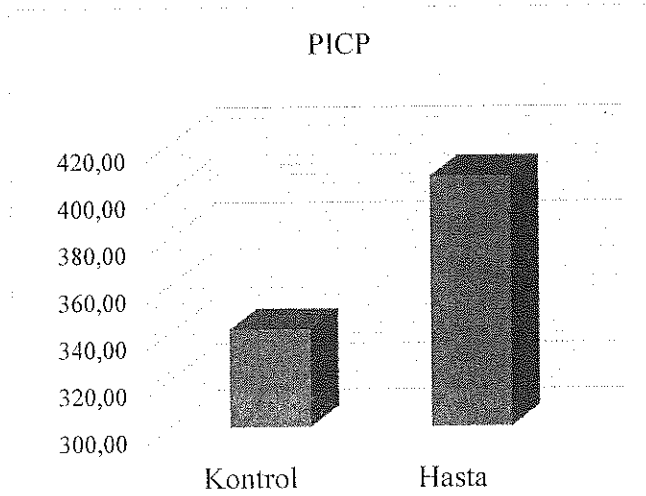
Çizelge 4.2.'de osteoporoz yapım markerleri olan PINP, PICP, BALP ve OT değerleri ortalama ± SS şeklinde ifade edilmiştir. Medyan ve min-max değerleri belirtilmiştir. Bu markerlerin istatistiksel analizleri için "Mann Whitney U" test kullanılmış ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 4.6. Grupların PINP düzeyleri (ng/mL)

Hasta grubunun (n=34) PINP ölçüm sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubu PINP düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla düşük olduğu görülmüş ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,345$).

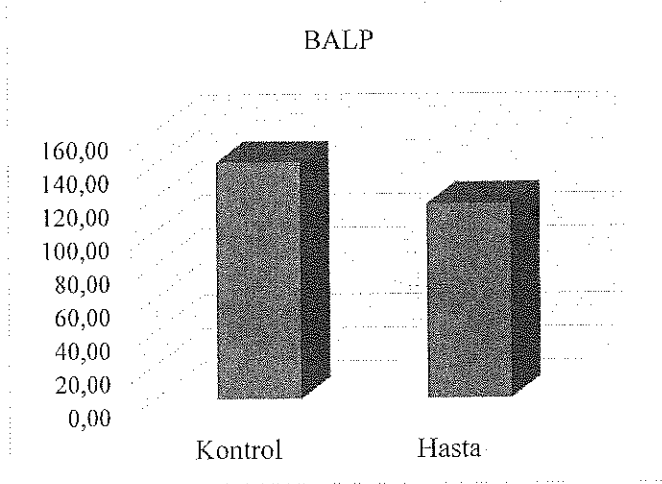
Sonuç olarak, orak hücreli anemi hastalarından oluşan çalışma grubu ($352,90 \pm 297,27$ ng/mL) ile kontrol grubu ($247,60 \pm 189,47$ ng/mL) karşılaştırıldığında PINP düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir fark bulunmamıştır ($p=0,345$).



Şekil 4.7. Grupların PICP düzeyleri (ng/mL)

Hasta grubunun (n=34) PICP ölçüm sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubu PICP düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu görülmüş ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir (p=0,071).

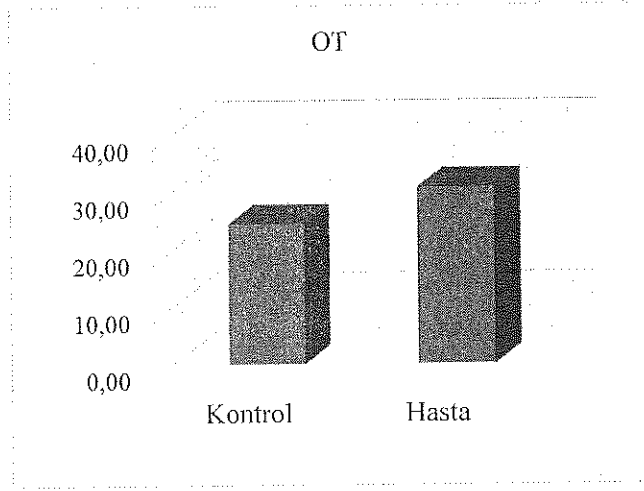
Sonuç olarak, orak hücreli anemi hastalarından oluşan çalışma grubu (406,50±246,11 ng/mL) ile kontrol grubu (341,56±254,71 ng/mL) karşılaştırıldığında PICP düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir fark bulunmamıştır (p=0,071).



Şekil 4.8. Grupların BALP düzeyleri (U/L)

Hasta grubunun (n=34) BALP ölçüm sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubu serum BALP düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla düşük olduğu görülmüş ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir (p=0,607).

Sonuç olarak, orak hücreli anemi hastalarından oluşan çalışma grubu ($116,50 \pm 60,81$ U/L) ile kontrol grubu ($141,75 \pm 96,4$ U/L) karşılaştırıldığında BALP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı sayılan bir fark bulunmamıştır ($p=0,607$).

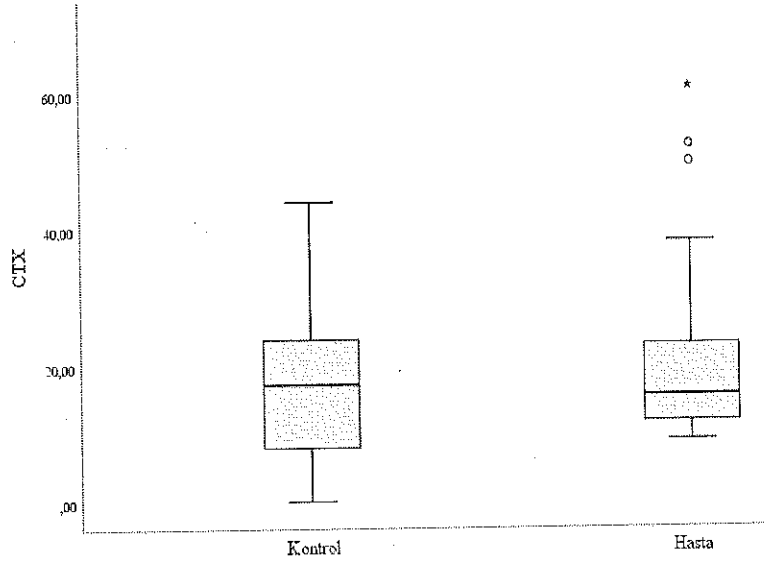


Şekil 4.9. Grupların OT düzeyleri (ng/mL)

Hasta grubunun ($n=34$) OT ölçüm sonuçları kontrol grubu ($n=33$) ile karşılaştırıldığında hasta grubu OT düzeyleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,016$).

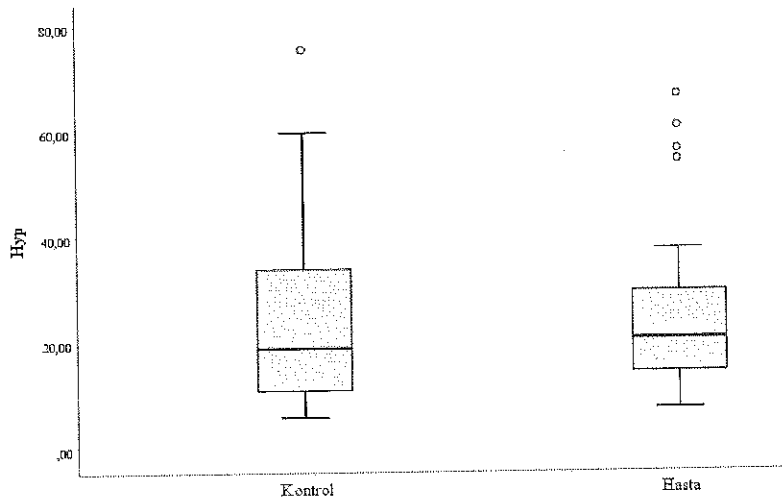
Sonuç olarak, orak hücreli anemi hastalarından oluşan çalışma grubu Osteokalsin düzeyleri ($30,90 \pm 15,75$ ng/mL) kontrol grubuna ($24,60 \pm 19,82$ ng/mL) kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,016$).

4.3. Yıkım Marker Düzeylerinin Gruplara göre Karşılaştırılması



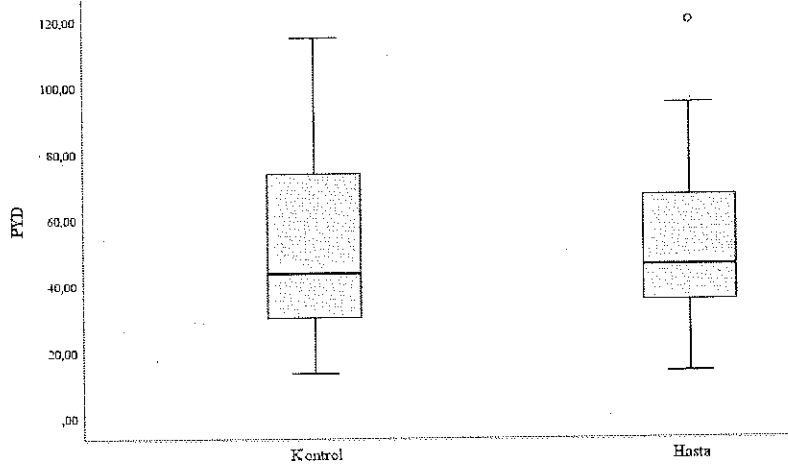
Şekil 4.10. CTX düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı. ○ aşırı bulunmuş değerler, * çok aşırı bulunmuş değerler

Kutu grafiğinde veriler merkezi dağılımlarına göre gösterilmiştir. Kontrol grubunun (n=34) CTX konsantrasyon değerleri 0,17 ile 44,17 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 17,29 ng/mL olarak bulunmuştur. Hasta grubunun (n=33) konsantrasyon değerleri 8,93 ile 60,82 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 15,54 ng/mL olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu kutu grafiğine göre kontrol grubu CTX verileri sola çarpık bir dağılım gösterirken, hasta grubu kutu grafiğinde hastaların CTX verileri sağa çarpık bir dağılım göstermektedir.



Şekil 4.11. Hyp düzeylerinin (nmol/mL) gruplara göre değer dağılımı. ○ aşırı bulunmuş değerler

Kutu grafiğinde veriler merkezi dağılımlarına göre gösterilmiştir. Kontrol grubunun (n=34) Hyp konsantrasyon değerleri 6,12 ile 75,81 nmol/mL arasında değişirken, medyan değeri 19,21 nmol/mL olarak bulunmuştur. Hasta grubunun (n=33) konsantrasyon değerleri 7,57 ile 66,80 nmol/mL arasında değişirken, medyan değeri 20,78 nmol/mL olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu kutu grafiğine göre kontrol grubu Hyp verileri sağa çarpık bir dağılım gösterirken, hasta grubu kutu grafiğinde hastaların Hyp verileri simetriğe çok yakın bir dağılım göstermektedir.



Şekil 4.12. PYD düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı. o aşırı bulunmuş değerler

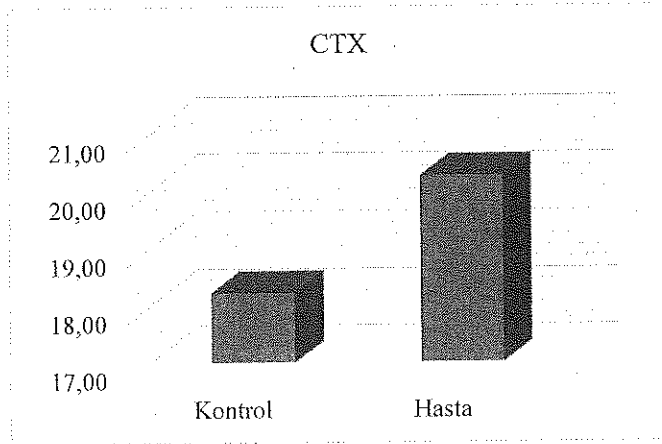
Kutu grafiğinde veriler merkezi dağılımlarına göre gösterilmiştir. Kontrol grubunun (n=34) PYD konsantrasyon değerleri 13,22 ile 114,76 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 45,53 ng/mL olarak bulunmuştur. Hasta grubunun (n=33) konsantrasyon değerleri 13,51 ile 119,86 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 45,82 ng/mL olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu kutu grafiğine göre kontrol grubu PYD verileri ile hastaların PYD verileri sağa çarpık bir dağılım göstermektedir.

Çizelge 4.3. Yıkım marker konsantrasyonlarının gruplara göre karşılaştırılması

Kontrol (n=34)				Hasta (n=33)			
	Ort ± SS	Medyan	Min-Max	Ort ± SS	Medyan	Min-Max	p
CTX ng/mL	18,24±11,45	17,29	0,17-44,17	20,28±13,39	15,54	8,93-60,82	0,763**
Hyp nmol/mL	24,61±17,35	19,21	6,12-75,81	25,46±15,40	20,78	7,57-66,80	0,546**
PYD ng/mL	51,67±30,62	43,53	13,22-114,76	52,65±24,76	45,82	13,51-119,86	0,890*

* Student-t Test, ** Mann Whitney U test

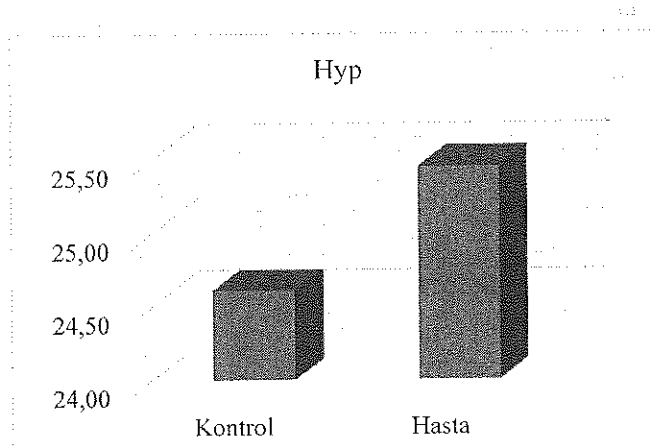
Çizelge 4.3.'te osteoporoz yıkım markerleri olan CTX, Hyp ve PYD değerleri ortalama ± SS şeklinde ifade edilmiştir. Medyan ve min-max değerleri belirtilmiştir. CTX ve Hyp'nin istatistiksel analizleri için "Mann Whitney U test" ve PYD'nin istatistiksel analizi için "Student-t Test" kullanılmış ve p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 4.13. Grupların CTX düzeyleri (ng/mL)

Hasta grubunun (n=34) CTX ölçüm sonuçları kontrol grubu (n=33) ile karşılaştırıldığında hasta grubu CTX düzeyleri kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuş ve aralarındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,763).

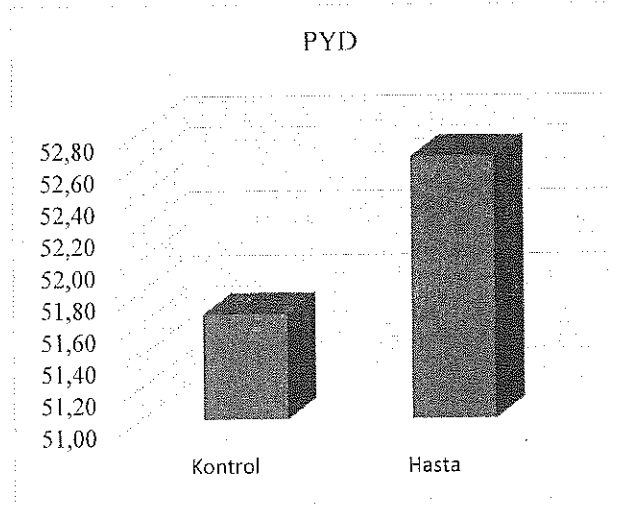
Sonuç olarak, orak hücreli anemi hastalarından oluşan çalışma grubu CTX düzeyleri (20,28±13,39 ng/mL) kontrol grubu (18,24±11,45 ng/mL) ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,763).



Şekil 4.14. Grupların Hyp düzeyleri (nmol/mL)

Hasta grubunun (n=34) Hyp ölçüm sonuçları kontrol grubu (n=33) ile karşılaştırıldığında hasta grubu Hyp düzeyleri kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuş ancak aralarındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,546).

Sonuç olarak, orak hücreli anemi hastalarından oluşan çalışma grubu CTX düzeyleri ($25,46 \pm 15,40$ nmol/mL) kontrol grubu ($24,61 \pm 17,35$ nmol/mL) ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,546$).

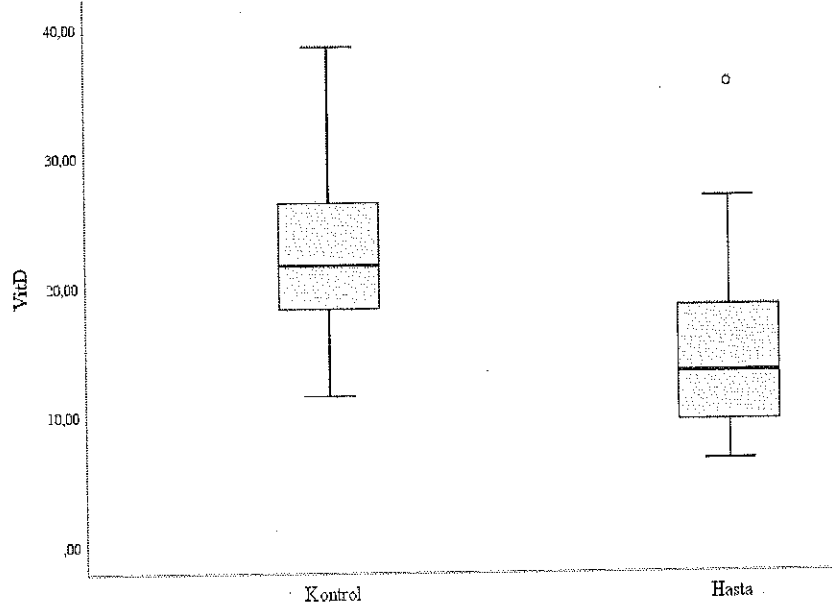


Şekil 4.15. Grupların PYD düzeyleri (ng/mL)

Hasta grubunun ($n=34$) PYD ölçüm sonuçları kontrol grubu ($n=33$) ile karşılaştırıldığında hasta grubu PYD düzeyleri kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuş fakat aralarındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($0,890$).

Sonuç olarak, orak hücreli anemi hastalarından oluşan çalışma grubu PYD düzeyleri ($52,65 \pm 24,76$ ng/mL) kontrol grubu ($51,67 \pm 30,62$ ng/mL) ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,890$).

4.4. Vitamin D Düzeylerinin Gruplara göre Karşılaştırılması



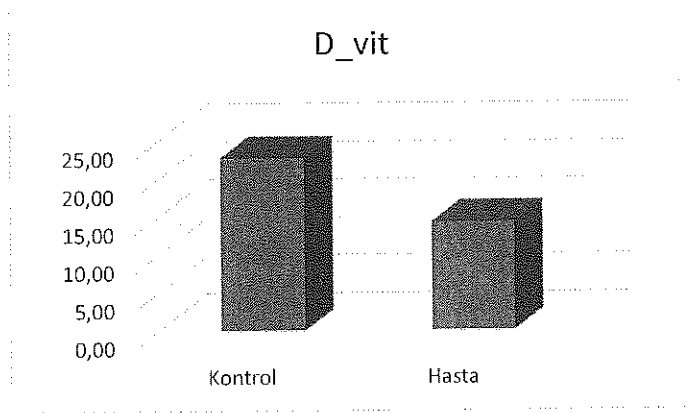
Şekil 4.16. Vitamin D düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre değer dağılımı. ○ aşırı bulunmuş değerler

Kutu grafiğinde veriler merkezi dağılımlarına göre gösterilmiştir. Kontrol grubunun (n=34) 25(OH)D konsantrasyon değerleri 18,00 ile 47,00 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 21,60 ng/mL olarak bulunmuştur. Hasta grubunun (n=33) konsantrasyon değerleri 6,49 ile 35,57 ng/mL arasında değişirken, medyan değeri 13,28 ng/mL olarak belirlenmiştir. Grupların kutu grafiğine göre kontrol grubu ve hasta grubu verileri simetrik dağılıma çok yakın bir dağılım göstermektedir.

Çizelge 4.4. 25(OH)D düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması

Kontrol (n=34)				Hasta (n=33)			
Marker	Ort ± SS	Medyan	Min-Max	Ort ± SS	Medyan	Min-Max	p
VitD (ng/mL)	22,88±6,62	21,60	18,00-47,00	14,37±6,24	13,28	6,49-35,57	0,001**

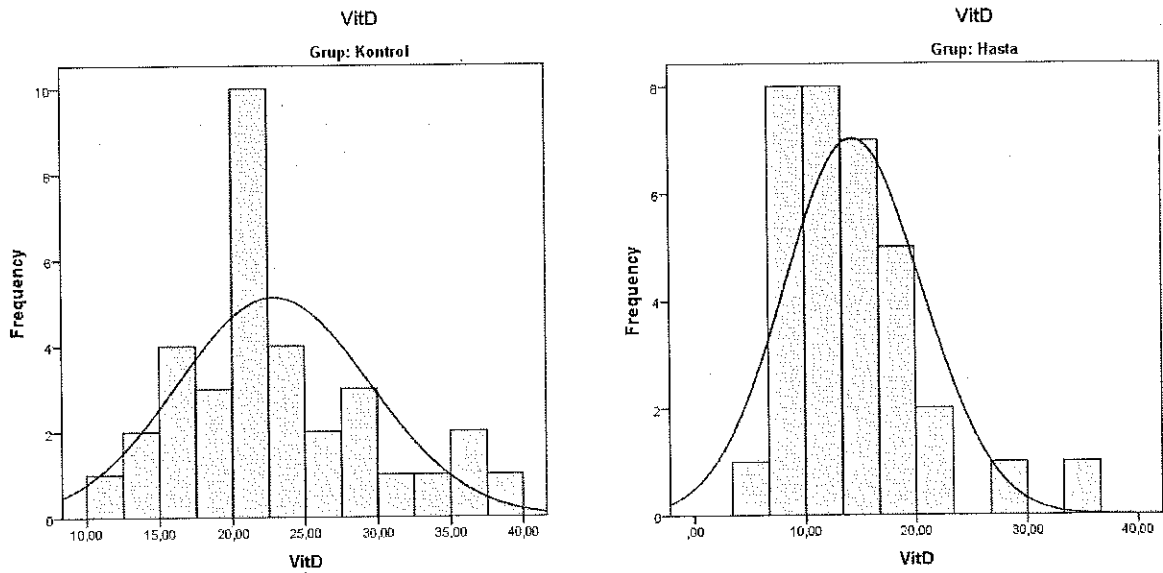
**Mann Whitney U test



Şekil 4.17. Vitamin D düzeylerinin (ng/mL) gruplara göre karşılaştırılması

Hasta grubunun (n=34) 25(OH)D ölçüm sonuçları kontrol grubu (n=33) ile karşılaştırıldığında hasta grubu 25(OH)D düzeyleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,001).

Sonuç olarak, orak hücreli anemilerden oluşan hasta grubunun 25(OH)D düzeyleri (14,37±6,24 ng/mL) kontrol grubuna (22,88±6,62 ng/mL) kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,001).



Şekil 4.18. Kontrol ve Hasta grubu 25(OH)D düzeylerinin frekans dağılımlarına göre gösterilmesi

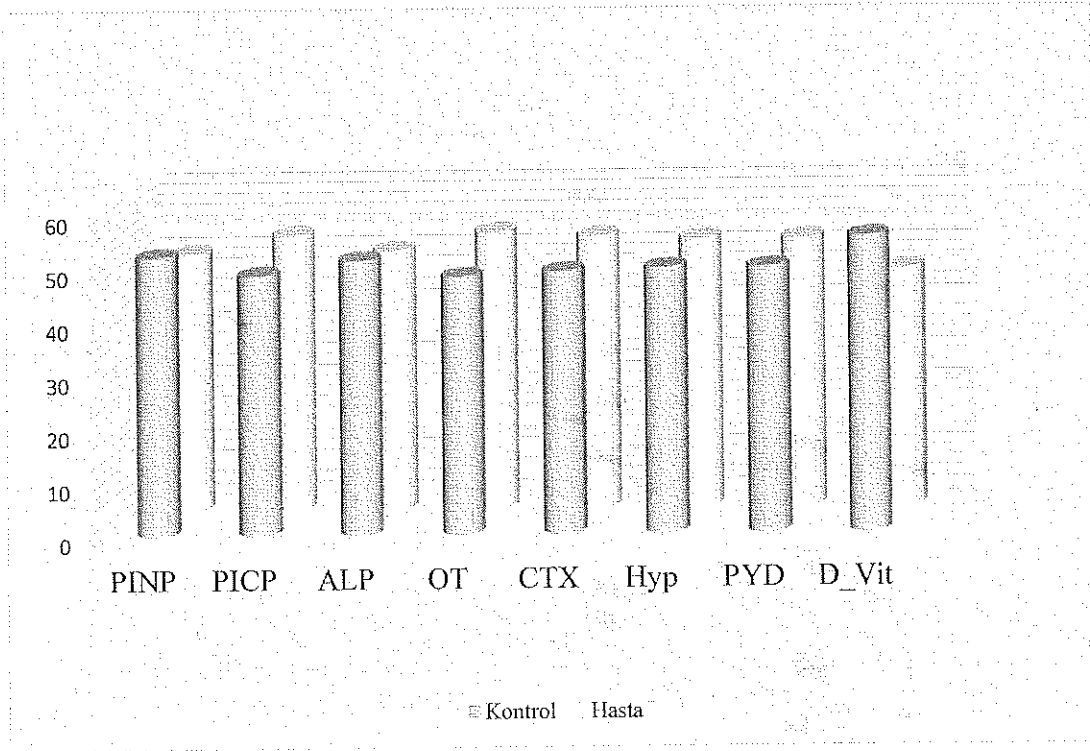
Histogram grafiklerinde kontrol ve hasta grubu konsantrasyonları frekans dağılımlarına göre gösterilmiştir. Kontrol grubu 25(OH)D düzeylerinin ortalaması 22,88±6,62 ng/mL ve hasta grubu düzeyleri ortalaması 14,37±6,24 ng/mL'dir.

Çizelge 4.5. Yapım/yıkım markerleri ve 25(OH)D konsantrasyonlarının cinsiyetlere göre karşılaştırılması

	Cinsiyet						P**
	Erkek (n=36)			Kadın (n=31)			
	Ort±SS	Medyan	Min-Max	Ort±SS	Medyan	Min-Max	
PINP (ng/mL)	93,03±289,94	167,65	36,36-1093,88	301,17±198,46	237,06	46,82-899,59	0,230
PICP (ng/mL)	351,74±272,41	254,89	109,76-1197,79	398,60±224,00	356,02	79,88-984,13	0,084
BALP (U/L)	136,06±94,31	90,95	26,63-372,73	123,39±67,04	97,26	28,65±302,51	0,978
OT (ng/mL)	28,31±19,98	19,37	5,06-80,00	27,07±16,02	20,88	3,93±58,64	0,906
CTX (ng/mL)	18,74±12,76	15,14	0,17-60,82	19,81±12,19	17,55	3,13-52,30	0,498
Hyp (nmol/mL)	22,16±14,87	19,17	6,12-75,81	28,10±17,38	21,96	7,51-66,80	0,158
PYD (ng/mL)	47,62±26,15	41,79	13,89-119,86	57,22±28,45	53,68	13,22-114,76	0,109
Vit D (ng/mL)	19,39±6,83	19,03	6,49-35,57	17,87±8,63	18,21	7,13	0,237

**Mann Whitney U test

Çizelge 4.5.'te osteoporoz yapım markerleri olan PINP, PICP, BALP, OT ve yıkım markerleri CTX, Hyp, PYD ile 25(OH)D değerleri cinsiyetlere göre karşılaştırılmış ve ortalama ± SS şeklinde ifade edilmiştir. Medyan ve min-max değerleri belirtilmiştir. Bu markerlerin istatistiksel analizleri için "Mann Whitney U" test kullanılmış ve p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 4.19. Yapım/yıkım markerleri ve VitD konsantrasyonlarının gruplara göre değerlendirilmesi

Çalışmamıza dahil olan tüm parametrelerin değer aralıkları standartlaştırılarak elde edilen değerler doğrultusunda hasta grubu (n=34) ile kontrol grubu karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak, orak hücreli anemi hastalarında kemik yapım/yıkım belirteç konsantrasyonlarının hasta grubunda genel olarak yüksek bulunduğu ve 25(OH)D konsantrasyonunun orak hücre hastalarında kontrol grubuna kıyasla düşük olduğu Şekil 4.19'da sunulan sütun grafiğinden okunabilmektedir (25(OH)D; $p=0,001$). Fakat kemik döngüsü yapım/yıkım parametrelerinin gruplar arasında gösterdiği fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ($p>0,05$), sadece Osteokalsin parametresi için istatistiksel olarak anlamlı bir farktan söz edilebilmektedir (OT; $p=0,016$).

Çizelge 4.6. Tüm parametrelerin kontrol grubunda ki korelasyon değerlendirmesi

		PICP	BALP	OT	CTX	Hyp	PYD	25(OH)D
PINP	r	,523**	,556**	,797**	,679**	,549**	,642**	0,002
	p	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,992
	n	29	28	28	27	28	25	29
PICP	r		,346*	,611**	,667**	,833**	,822**	-0,048
	p		0,05	0,001	0,001	0,001	0,001	0,788
	n		33	33	32	32	29	34
BALP	r			,496**	,513**	,545**	,446*	0,026
	p			0,001	0,001	0,001	0,05	0,884
	n			32	31	31	28	33
OT	r				,864**	,753**	,879**	0,051
	p				0,001	0,001	0,001	0,778
	n				32	31	29	33
CTX	r					,777**	,783**	-0,124
	p					0,001	0,001	0,501
	n					30	29	32
Hyp	r						,854**	0,098
	p						0,001	0,593
	n						29	32
PYD	r							0,107
	p							0,581
	n							29

**Korelasyon 0,01 seviyesinde önemli, * Korelasyon 0,05 seviyesinde önemli

Çizelgeden de anlaşılacağı üzere, korelasyon çizelgesi kontrol grubu örnekleminde parametreler arasındaki doğrusal ilişkiyi, bu ilişkinin gücünü ve yönünü göstermektedir. Veriler normal dağılmadığı için verilerin Spearman Rank korelasyon katsayıları hesaplanmıştır ($r > 0,2$ korelasyon varlığı olarak değerlendirilmiştir).

Sonuç olarak, 25(OH)D hariç tüm parametrelerin birbirleri ile pozitif korelasyon gösterdikleri görülmüştür.

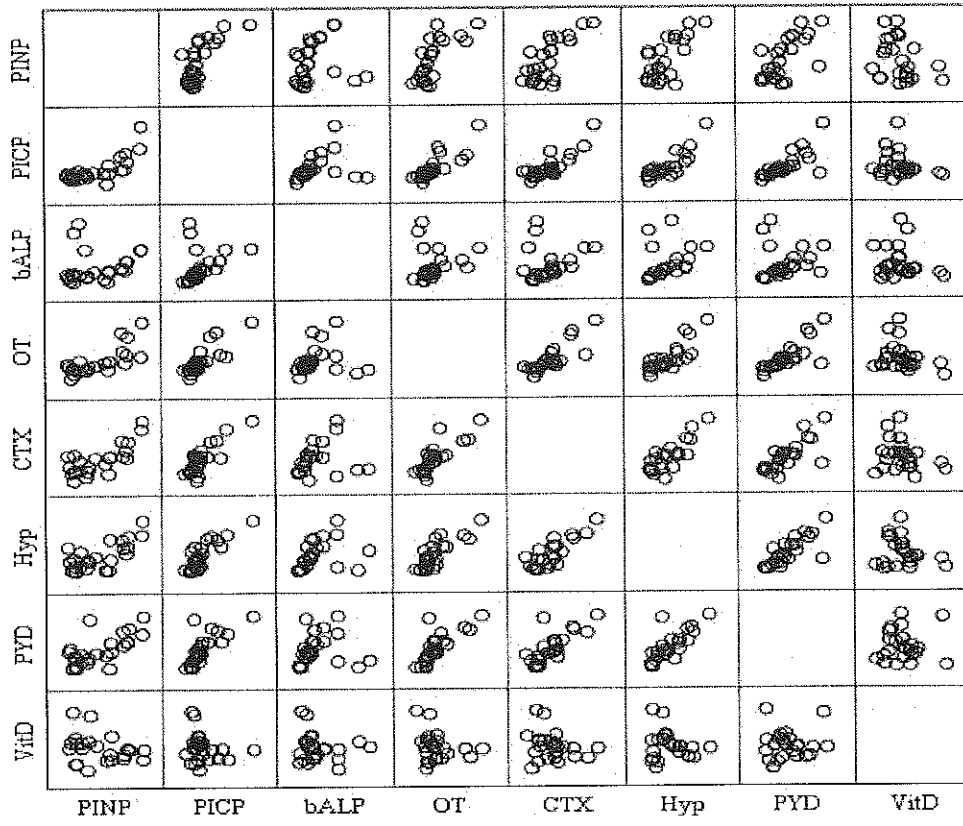
Çizelge 4.7. Tüm parametrelerin hasta grubunda ki korelasyon değerlendirmesi

		PICP	BALP	OT	CTX	Hyp	PYD	25(OH)D
PINP	r	,835**	,631**	,727**	,664**	,716**	,582**	0,164
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,360
	n	32	29	32	32	32	32	33
PICP	r		,661**	,599**	,669**	,763**	,684**	0,071
	p		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,699
	n		28	31	31	31	31	32
BALP	r			,552**	,707**	,641**	,598**	-0,117
	p			0,002	0,000	0,000	0,001	0,546
	n			29	29	29	29	29
OT	r				,673**	,660**	,620**	0,124
	p				0,000	0,000	0,000	0,498
	n				32	31	31	32
CTX	r					,688**	,583**	0,137
	p					0,000	0,001	0,454
	n					31	31	32
Hyp	r						,642**	0,011
	p						0,000	0,954
	n						31	32
PYD	r							-0,302
	p							0,093
	n							32

**Korelasyon 0,01 seviyesinde önemli, * Korelasyon 0,05 seviyesinde önemli

Korelasyon çizelgesi orak hücre hasta grubu örnekleminde parametreler arasındaki ilişkiyi, bu ilişkinin gücünü ve yönünü göstermektedir. Veriler normal dağılmadığı için verilerin Spearman Rank korelasyon katsayıları hesaplanmıştır ($r > 0,2$ korelasyon varlığı olarak değerlendirilmiştir). Korelasyon katsayısı negatif ise değişkenlerden biri artarken diğeri azalmakta anlamına gelirken, pozitif korelasyon değişkenlerden biri artarken diğeri de arttığını gösterir.

Sonuç olarak, 25(OH)D hariç tüm parametrelerin birbirleri ile pozitif korelasyon gösterdikleri görülmüştür.



Şekil 4.20. Tüm parametrelerinin korelasyon katsayılarına göre grafikte gösterilmesi

Çizelgeden de anlaşılacağı üzere, bu korelasyon grafiği aynı değerlendirme grubundaki iki parametrenin birbiri ile oluşturduğu doğrusal pozitif ilişkiyi göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, orak hücre anemili hastalar ve sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinde osteoporoz ile ilişkili biyokimyasal markerler ile çalışmalar yaparak, OHA'nın osteoporoz ile olan ilişkisini bu biyokimyasal belirteçler üzerinden ortaya koymaya çalıştık. Bu bağlamda, kemik döngüsü yapım belirteçleri olan PINP, PİCP, BALP, Osteokalsin ve kemik döngüsü yıkım belirteçleri; CTX, Pridinolin ve Hidroksiprolin serum düzeyleri analiz edilerek, hasta ve sağlıklı bireylerin ölçüm sonuçları birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca hasta ve kontrol grubunda Vitamin D düzeylerine bakılarak tüm sonuçlara göre osteoporoz ihtimali değerlendirilmiştir. Literatürde kemik döngüsü belirteçleri ile çalışmalar mevcut olup, orak hücre hasta grubunda bu çalışmada kullanılan belirteçlerin tamamının aynı kaynaktan Vitamin D ile değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca literatürde PINP ve Hidroksiprolin belirteçlerinin orak hücrede çalışıldığı herhangi bir kaynağa rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın, tüm bu belirteçlerin birarada değerlendirilmesine ve birbiriyle korelasyonuna olanak sağlaması açısından bu konuya biyokimyasal çerçevede ışık tutacak geniş kapsamlı bir kaynak olması hedeflenmiştir.

Orak hücreli anemide kemik tutulumu, akut osteomiyelitten başlayarak osteopeni ve osteoporoz gibi kronik komplikasyonlara kadar ilerleyebilmektedir (Almeida ve Roberts 2005). Bu hastalığın patofizyolojisini oluşturan en temel durum olan vazo-oklüzif krizlerin anlaşılabilmesi için çok sayıda çalışma bulunmaktadır, fakat bugün hala OHA'nın kemik mineral yoğunluğuna etkisi yeterince aydınlatılabilmiş değildir (Pathere ve ark. 2003, Nelson ve ark. 2003). Yapılan birçok araştırma, orak hücre anemili hastalarda osteopatik ve osteoporotik durumların kuvvetle yüksek olduğunu kabul etmektedir (Nelson ve ark. 2003, Lal ve ark. 2005, Miller ve ark. 2006).

Kemik mineral yoğunluğunun (KMY), osteoporoz ve kırık riskini tanımladığı düşünülmektedir. Radyolojik bir yöntem olan Dual Enerji X ışını Absorbsiyometrisi (DEXA) osteoporoz tanısında altın standarttır. Genç yetişkinlerde, kemik yoğunluğundaki normal ortalamadan 2,5 standart sapmadan daha düşük değer osteoporoz tanısı olarak kaydedilmektedir (Mäkitie ve ark. 2019). Yüksek kemik döngüsünün kısa zamanda büyük kemik kaybına yol açması kırık için bağımsız bir risk faktörü oluşturur. İlk defa doktora başvuran bir hastada hastanın kemik kaybı hızı hakkında kemik döngüsü belirteçleri bilgi

vermektedir. DEXA osteoporozun daha geç safhalarında bulgu vermekte ve sık aralıklarla kullanıldığında insan sağlığı açısından sakıncaları bulunmaktadır. Osteoporozun KDB ile erken dönemde tanınabildiğini savunan kaynaklar literatürde mevcuttur (Nelson ve ark. 2003). KMY, kemik oluşumu ve emiliminin yani kemik döngüsünün bir sonucudur ve osteoporoz tedavisi etkinliğinin ortak bir göstergesidir (Ellen ve ark. 2008). Bununla birlikte, testin doğruluğuna göre tedavinin nispeten küçük etkisi nedeniyle, KMY ölçümünü iki yıldan daha kısa aralıklarla tekrarlamak pratik değildir (Delmas ve Seeman 2004). Bizim çalışmamızda, DEXA gibi radyolojik tetkikler kullanılmadı ve dolayısı ile çalışmamıza dahil ettiğimiz orak hücre tanılı hastaların kemik mineral yoğunluğu bilinmemektedir. Bu nedenle, literatürdeki birçok çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda orak hücre hastaları osteopenik veya osteoporotik hasta gruplaması yapılmadan orak hücre hasta grubu olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışma sonucunda orak hücre anemili hastalarda kemik döngüsü yapım belirteçleri PINP ($p=0,345$), PICP ($p=0,071$) ve kemiğe özgü alkalen fosfataz (BALP; $p=0,607$) serum konsantrasyonlarında hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken yapım belirteçlerinden biri olan Osteokalsin hasta grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,016$) (Çizelge 4.2). Ayrıca kemik yıkım belirteçleri olarak değerlendirilen CTX ($p=0,763$), Hidroksiprolin ($p=0,546$) ve Pridinolin ($p=0,890$) serum düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir değişiklik göstermemiştir (Çizelge 4.3). Vitamin D analiz sonuçlarına bakıldığında, hasta grubunda ($14,37 \pm 6,24$ ng/mL) kontrol grubuna ($22,88 \pm 6,62$ ng/mL) kıyasla istatistiksel olarak önemli sayılan daha düşük serum konsantrasyonu (Şekil 4.17, Şekil 4.18) gözlemlenmiştir ($p=0,001$) (Çizelge 4.4).

Bu tez çalışmasında aynı zamanda PINP, PICP, BALP, OT, CTX, Hyp ve PYD gibi kemik döngüsü parametrelerinin hasta ve kontrol grubunda birbirleri ile olan ilişkileri değerlendirilmiştir. Spearman korelasyon test sonuçlarımıza göre yapım markerleri PINP, PICP, BALP ve OT kontrol grubunda kendi aralarında ve yıkım markerleri CTX, Hyp ve PYD ile istatistiksel olarak pozitif yüksek korelasyon göstermektedir (Çizelge 4.6) (Şekil 4.20). Ek olarak, hasta grubunda benzer şekilde yapım belirteçleri kendi aralarında ve yıkım belirteçleri CTX, Hyp ve PYD ile pozitif koreledir (Çizelge 4.7) (Şekil 4.20). 25(OH)D ile çalışmamızda bulunan yapım ve yıkım parametreleri arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır (Çizelge 4.6) (Çizelge 4.7) (Şekil 4.20).

Kemik döngüsü markerlerinin ölçümünde analitik ve preanalitik ölçümlerin değişkenliği düşünüldüğünde, numune toplama ve saklama koşulları yüksek önem arz etmektedir. Analizlerin verimliliğini arttırmak için, alınacak kan örnekleri tüm gece açlıktan sonra sabah saatlerinde ve mümkün ise aynı mevsimde toplanmalıdır. Ölçüm aşamasına gelindiğinde, yapılacak seri analizler günün aynı saatlerinde yapılmalı ve mevsimsel değişim hesaba katılmalıdır (Dawson-Hughes ve ark. 2008). Bu çalışmada mevsimsel değişim göz önünde bulundurularak sağlıklı ve hasta bireylerin örnekleri yaz mevsiminde toplanmış ve ölçüm aşamasında seri analizler mümkün olduğunca aynı saatlere denk gelecek şekilde aynı mevsimde gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı bireylerin kan örneklerinin tamamı tüm gece açlıktan sonra sabah saatlerinde toplanmış, fakat hastalardan alınan kan örneklerinde sabah saatlerinde başlayan ölçümler orak hücre hastalarının durumlarına göre bazen öğle saatlerinde devam etmiştir.

Çevresel, genetik ve epigenetik faktörler kişinin ulaşabileceği maksimum kemik kütlesinin ve kemik kaybı oranının belirlenmesinde önemli bir etkidir (Mitchell ve Yerges-Armstrong 2011). Yapılan araştırmalara göre, KDB'ler farklı etnik kökenlerde serum düzeyleri değişken dağılım göstermekte bu nedenle, farklı toplumlardaki klinik kullanımlarda her belirteç fragmanı için o toplumun etnik kökenine özel referans aralıkları kullanılmalıdır (De Papp ve ark. 2007, Ardawi ve ark. 2010). Bu tez çalışmasında, etnik faktörlerin kemik döngüsü belirteç fragmanlarına etkisi özellikle göz önünde bulundurularak, çalışmaya Antakya yöresinde yaşamakta olan bireyler dahil edilmiş, bu bölgede bulunan Suriye kökenli bireyler çalışma dışı bırakılmıştır.

Literatürde bulunan bir kaynakta, Pubmed (ABD Ulusal Tıp Kütüphanesi) veritabanında kemik oluşumu ve yıkımını tanımak için biyobelirteçlerin kullanılması ve bu belirteçlerin klinik uygulamada uygulanabilirliğinin değerlendirilmesi konusunda geniş kapsamlı bir literatür taraması yapılmış ve son beş yılda indekslenen ve yayınlanan makaleler Cabral ve ark. tarafından değerlendirilmiştir. Cabral ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, yaklaşık 8000 makale incelenerek, 5000 yayın çalışmaya dahil edilmiştir. Sonuç olarak, çalışmaya dahil edilen makalelerin %50'sinde kemik yapım ve yıkım markerlerinin birlikte değerlendirildiği görülmüştür. Elde edilen başka bir veri kemik rezorpsiyonu için en çok atıf yapılan belirtecin, kemik dinamikleri ile en yüksek korelasyonu gösteren C-terminal kolajen telopeptit (CTX) olduğunu ve kemik oluşumunu gözlemlemek için en çok tercih edilen markerin kemiğe özgü alkalen fosfataz (BALP) olduğunu göstermekte ve ayrıca bu

iki parametre arasında gözlemlenen yüksek korelasyona işaret etmektedir (Cabral ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda da osteoporoz ile ilişkili yapım ve yıkım biyobelirteçleri birlikte değerlendirilmiştir. Kemik yapım belirteci olarak BALP ve kemik yıkım belirteci olarak CTX çalışmaya dahil edilmiş ve aralarında Cabral ve arkadaşlarının çalışmalarını destekleyen nitelikte yüksek korelasyon saptanmıştır (Kontrol gr: $n=31$, $r=0,003$; Çalışma gr: $n=29$, $r=0,000$) (Çizelge 4.6) (Çizelge 4.7).

Kadınlarda büyüme evresinin sonu ve iskelet konsolidasyonu sonrasında, genellikle 35 yaşlarında kemik döngüsü belirteçlerinin seviyeleri azalmakta fakat menopoz geçiş döneminde yeniden ve hızla artmaktadır. Menopoz sonrası dönemde bu belirteç konsantrasyonları yüksektir ve yüksek seviyelerde kalması beklenir (Eastell ve ark. 2012, Guañabens ve ark. 2016). Kadınlarda kemik döngüsü belirteçleri referans aralıkları genellikle kemik konsolidasyonunun tamamlandığı ve iskeletin tamamen olgunlaştığı 35 ile 45 yaşları arasında sağlıklı bireyler göz önüne alınarak belirlenir (Eastell ve ark. 2012, Guañabens ve ark. 2016). Sağlıklı kadınlarda, bu dönem henüz perimenopoz evresine ulaşılmamış ve kemik kaybının da az olduğu optimal kemik döngüsü yaşı olarak kabul edilir. (Michensen ve ark. 2013, Jenkins ve ark. 2013, Guañabens ve ark. 2016, Jørgensen ve ark. 2017). Çocuklukta suboptimal pik kemik kitle kazanımı, ileriki yaşlarda osteoporoz gelişimine katkıda bulunabilir (Heaney ve ark. 2000). Çocukları çalışma dışı bıraktığımız, yetişkin kadın ve erkekleri dahil ettiğimiz çalışmamızda kontrol grubu yaş ortalaması ($31,6 \pm 7,82$, 18-47) ile hasta grubu yaş ortalaması ($29,94 \pm 8$, 18-48) arasında önemli bir fark bulunmamaktadır ($p=0,564$) (Çizelge 4.1).

Orak hücre hastalarında osteoporozun kesin nedeni bilinmemekte ve çeşitli hipotezler öne sürülmektedir. Erkeklerde kadınlardan daha büyük kemikler ve dolayısıyla daha büyük kemik kütleleri vardır. Bu nedenle, genç erişkin erkeklerde, bu kemiklerde daha hızlı kemik dönüşümü nedeniyle kadınlardan daha yüksek kemik döngüsü markerleri bulunur (Chaitou ve ark. 2010). Literatürde cinsiyet hormonlarının kemik döngüsü metabolizmalarında etkili olduğunu gösteren bir çalışmada yaş ortalaması 27.83 olan ardışık yüz üç hasta incelenmiş (45E/58K), erkek grubunda hastaların %62,2'sinde, kadın grubunda %67.06'sında düşük kemik kütlesi (osteoporotik/osteopenik) saptanmıştır (Sadat-Ali ve ark. 2008). Erkeklerde testosteron düzeyi farklı gruplar arasında anlamlı değilken, osteopenik ve osteoporotik hastalarda toplam östradiol düzeyleri anlamlı olarak düşük olarak kaydedilmiştir (sırasıyla $p<0.003$ ve $p<0.01$). Kadın hastalarda östradiol ve testosteron

düzeyleri osteoporotik hastalarda osteoporotik olmayan hastalara göre daha düşük bulunmuştur ($p=0.05$ ve $p=0.001$). Literatürdeki bu çalışma, orak hücreli anemilerde osteopeni ve osteoporoz gelişiminde seks steroidlerinin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Sadat-Ali ve ark. 2008). Fakat, bizim çalışmamızda, hasta ve sağlıklı bireylerden oluşan 67 kişilik örnekleme, kadın ve erkekler cinsiyetlerine göre değerlendirildiğinde kemik döngüsü belirteçlerinin serum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,005$, Çizelge 4.5). Bu bağlamda, bizim bulgularımıza göre bir değerlendirme yaparsak, cinsiyet hormonlarının kemik döngüsü belirteçlerinin serum düzeyleri üzerine önemli bir etkisi olmadığı söylenebilir.

Rudy ve ark. 2017 yılının Ocak-Mart ayları arasında NCBI PubMed veritabanında 1950'den inceleme zamanına kadar yayınlanan ve orak hücre-omurga ilişkisinden bahseden tüm kaynakları inceleyerek geniş kapsamlı bir literatür taraması yapmışlardır. Bu taramada, orak hücre ve omurga hastalıkları, orak hücreli anemi, omurga cerrahisi ve mikroinfarktüs anahtar sözcüklerini içeren yayınlar gözden geçirilmiştir. Kapsamı geniş tutulan bu araştırma da sadece makaleler değil, vaka raporları, meta-analiz, biyokimyasal, prospektif ve retrospektif çalışmaların tümü incelenmiştir. Sonuç olarak, taranan tüm güncel kaynaklar orak hücre hastalığının kas ve iskelet sistemini belirgin şekilde etkilediğini göstermektedir. OHA ile omurga patolojisi arasındaki ilişki hakkındaki bilgiler henüz tamamlanmamış olsada, orak hücre hastasının omurgasının vücudundaki diğer kemiklerle aynı hastalık süreçlerinden geçtiği anlaşılmaktadır. Bu hastalık süreçleri, vazo-oklüzif krizler ve mikroinfarkt, osteomiyelit ve osteoporozu içerir (2019).

Çalışmamızda, osteoklastik aktivitenin göstergelerinden biri olarak seçtiğimiz PINP analiz sonuçları incelendiğinde, hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,345 > 0,05$) (Çizelge 4.2). Kemik oluşum markerleri, osteoblast fonksiyonu ile ilişkili enzimler veya diğer proteinler olabilir veya tip 1 kolajen oluşumunu yansıtabilir. Kemik oluşumu sırasında, prokolajen N- ve C- terminal uçlarında klivaj edilir. Böylece, PINP yeni kemik oluşumu oranını yansıtır. Bu kemik oluşum belirteci, osteoblast hücrelerindeki yüksek konsantrasyonu, oda sıcaklığında kararlı olması, küçük sirkadyen ritim özelliği ve iyi bir test hassasiyeti sağladığı için IOF tarafından referans kemik oluşumu markeri olarak belirlenmiştir (Vasikaran 2011). Buna rağmen, literatürde yetişkin orak hücre hastalarında PINP düzeylerini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. PINP diğer belirteçler ile referans aralıkları yayınlarında değerlendirilmesine karşın, yapım

belirteci olarak yetişkin orak hücreli anemili hastaların kemik döngüsüne katkısını gösteren güncel bir yayına rastlanmamıştır. Örneğin, bir IDS testi kullanılarak ölçülen PINP'nin, İspanyol, Danimarka, Alman ve Avustralya popülasyonlarında premenopozal kadınlar için benzer referans değerleri verdiği birçok yayın tarafından desteklenmektedir (Michensen ve ark. 2013, Jenkins ve ark. 2013, Guañabens ve ark. 2016, Jørgensen ve ark. 2017). PINP ile vücut kitle indeksi (VKİ) arasındaki korelasyonu gösteren bir çalışmaya göre vücut kitle indeksi kemik döngüsü belirteçlerinin konsantrasyonunu etkileyen faktörlerden biridir. Çalışmalar PINP ve osteokalsin gibi kemik oluşum belirteçlerinin ve CTX-I gibi kemik emilim belirteçlerinin normal BMI'li kişilerle karşılaştırıldığında obez olan kişilerde daha düşük olduğunu göstermiştir (Evans 2015, Cohen ve ark. 2013).

Ortalama yaşları $29,8 \pm 9,5$ arasında değişen 56 yetişkin orak hücre hastasının dahil edildiği bir çalışmada hastalar önce serum 25(OH)D düzeylerine göre çok düşük (25(OH)D ≤ 6 ng/mL, n=26, grup 1) ve düşük (25(OH)D > 6 ng/mL, grup 2) olmak üzere iki gruba ayrılmış ve daha sonra grup 1 ve grup 2, PICP ve BALP düzeyleri açısından değerlendirilmiştir. Arlet ve arkadaşlarının yaptıkları bu prospektif çalışmada serum PICP ve BALP düzeyleri daha düşük 25(OH)D düzeyine sahip olan grup 1'de 2.gruba kıyasla yüksek bulunmuştur. Orak hücre grubunu sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu ile karşılaştırarak yaptığımız çalışmada biz, PICP serum düzeylerinin gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farkı olmadığını gördük ($p=0,071$) (Şekil 4.2) (Şekil 4.7). PICP düzeyi hasta grubunda ($406,5 \pm 246,11$) kontrol grubuna kıyasla az farkla ($341,56 \pm 254,71$) yüksek bulunurken, bu sonuç istatistiksel modelde anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.2) (Şekil 4.19). Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla, orak hücre hastalarında gözlemlediğimiz düşük 25(OH)D seviyeleri ($p=0,001$) (Çizelge 4<, Arlet ve arkadaşlarının çalışmasını destekler niteliktedir.

Literatürde orak hücre hasta grubunda kemiğe özgü alkalen fosfataz (BALP) belirteç fragmanının hasta grubunda anlamlı derecede yüksek bulunduğu çalışmalar mevcuttur. Buna örnek olacak bir çalışmada orak hücre hastalığı olan 20 hastada ve 20 sağlıklı kontrol grubunda serum BALP ile aynı grupta serum total ALP aktivitesi karşılaştırılmıştır (Bolarin 2001). Belirtilen çalışmada, hasta grubunda serum BALP kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p < 0,05$) çıkarken, total alkalen fosfataz aktivitesi, anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p > 0,005$) (Bolarin 2001). Bizim tez sonuçlarımıza göre, BALP konsantrasyonu hasta ve kontrol grubunda (Şekil 4.3) (Şekil 4.8) anlamlı bir fark

göstermemiştir ($p=0,607$) (Çizelge 4.2). Çalışmamızda kemiğe özgü ALP değeri (BALP) analiz edilmiş fakat total ALP bakılmamıştır.

Mohammed ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada orak hücreli hastalardan oluşan hasta grubunda ($n=20$) total ALP kontrole göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (1991). Ayrıca bu çalışmada, total ALP ile idrar hidroksiprolin arasında bir korelasyon kaydedilmiştir ($r=0,73$). Aynı çalışma orak hücreli anemilerde hem ALP hem de hidroksiprolinin yaşla birlikte arttığını göstermektedir (Mohammed ve ark. 1991). Bizim çalışmamızda sadece serum örneklerinde analizler yapılmış olup, serum hidroksiprolin (Şekil 4.11) (Şekil 4.14) konsantrasyonu hasta ($25,46\pm15,40$) ve kontrol ($24,61\pm17,35$) gruplarında karşılaştırılmış fakat istatistiksel olarak değerli olacak bir fark bulunamamıştır ($p=0,546$) (Çizelge 4.2).

Hemoglobin molekülünün yapısında bulunan globin zincirlerinin sentezlenememesi ya da yetersiz sentezlenmesi sonucunda talasemiler meydana gelir. Orak hücre anemisinin talasemiler ile birleşik türevleri de bulunur (Lukens 2004, Mary 2000, Embury 2000). Bizim çalışmamızda, orak hücre anemisinin klinik belirtilerini gösteren ve hasta grubuna dahil edilmiş 3 hasta birey HbS/Hb β genotipi ile orak hücre anemisinin talasemi ile birleşik türevine sahiptir. Literatürde HbS/ β -talasemi çift heterozigotluğu olan hastaların osteoporoz ile ilişkisini belirten çok fazla kaynak bulunmamaktadır. Bu ilişkiyi aydınlatmaya çalışan literatürdeki bir çalışmada, KDB ile KMY birlikte ele alınmıştır (Voskaridou ve ark. 2006). Bu çalışmada, 52 HbS/Hb β hastası (23E/29K; ort yaş: 40) KMY değerlerinin WHO kriterine göre ($T < -1$) sınıflandırılması sonucunda gruplara ayrılmış ve 17 hastada (8E/9K) osteopeni veya osteoporoz bulunduğu tespit edilmiştir. Hali hazırda osteoporoz tanısı olan hastalardan oluşan bu hasta grubu, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılarak BALP, PICP, CTX ve Osteokalsin üzerinden değerlendirilmiştir. Sonuç olarak HbS/ β -talasemi hastalarında, KMY durumlarından bağımsız olarak, osteopeni/osteoporoz hasta grubunda kontrol gruplarına kıyasla serum BALP ($p<0,0001$), PICP ($p<0,001$) düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. CTX düzeyleri hasta grubunda ($0,91$ ng/mL) kontrol grubuna ($0,60$ ng/mL) göre daha yüksek bulunmuştur ($p=0,04$). Osteokalsin osteopeni/osteoporoz grubu ($10,93$ ng/mL) ve kontrol grubunda ($12,57$ ng/mL) istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p=0,28$) (Voskaridou ve ark. 2006). Osteoporoz hem orak hücre hastalığı hem de talasemi majörünün iyi bilinen bir komplikasyonudur, ancak literatürde HbS/ β -talasemide kemik hastalığının patofizyolojisi hakkında sınırlı bilgiye ulaşılabilmektedir. Bizim çalışmamızda, Voskaridou ve

arkadaşlarının bulgularından farklı olarak osteokalsin (Şekil 4.4) (Şekil 4.5) (Şekil 4.9) hasta grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuş ($p=0,016$), ek olarak BALP ($p=0,607$, Şekil 4.8), PICP ($p=0,071$, Şekil 4.7), CTX ($p=0,763$, Şekil 4.13) parametreleri hasta ve kontrol grupları serum düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.2).

Gaziantep Üniversitesi'nde hemoglobinopatiler üzerine yapılan benzer bir araştırmada talasemi majör hasta grubunda yapım belirteci olarak BALP ve Osteokalsin, yıkım belirteci olarak pridinyum çapraz bağları (pridinolin ve deoksidridinolin) değerlendirilmiştir (Eren ve Yılmaz 2005). Belirtilen sonuçlara göre BALP ve Osteokalsin parametreleri gruplar arasında anlamlı bir değişiklik göstermezken, pridinolin hasta grubunda önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,001$) (Eren ve Yılmaz 2005). Bizim orak hücre hasta grubu üzerinde çalışarak elde edilen verilerimiz bu sonuçlardan farklı olarak osteokalsin belirtecinin hasta grubunda anlamlı şekilde arttığını göstermektedir ($p<0,005$) (Çizelge 4.2). Ayrıca gruplarımız arasındaki pridinolin seviyelerinde anlamlı bir fark kaydedilmemiştir ($p=0,109$) (Çizelge 4.3). Ancak BALP sonuçlarımız hasta ve kontrol grubunda önemli bir fark göstermeyerek Eren ve Yılmaz'ın çalışmasını desteklemektedir ($p=0,607$). Çalışmamızda, deoksidridinolin belirteci de çalışılmış fakat sonuç elde edilemediğinden deoksidridinolin ile ilgili bir yorum yapılamamıştır.

Osteokalsin, hızlı kemik döngüsü ile artan ve kemik metabolizması hakkında veri veren spesifik ve güvenilir bir markördür (Sen ve ark. 2000). Osteokalsin ve BALP'in orak hücreli hemoglobinopatileri olan 20 hasta ve 20 sağlıklı bireyde kemik döngüsü göstergesi olarak değerlendirildiği başka bir çalışmada serum BALP hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($P<0.05$) (Azinge ve Bolarin 2006). Bahsedilen çalışmada serum osteokalsin düzeyi, kontrol grubu ile anlamlı bir fark göstermemiştir. Ayrıca, Azinge ve Bolarin'in bu çalışmasında hasta grubunda serum osteokalsin ve BALP düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon gözlemlenmemiştir (2006). Bizim bu çalışma ile farklı sonuçları olan BALP verilemize göre, BALP serum konsantrasyon düzeyi, hasta ve kontrol grubunda anlamlı bir fark göstermemiştir ($p=0,607$, Şekil 4.8) (Çizelge 4.2). Azinge ve Bolarin'in çalışmasını desteklemeyen bir diğer verimiz, bizim çalışmamızda yapım belirteci olarak değerlendirilen osteokalsinin hasta grubunda anlamlı şekilde yüksek bulunmasıdır ($p<0,005$) (Çizelge 4.2). Ayrıca korelasyon verilerimize göre, yine Azinge ve Bolarin'in çalışmasından

farklı olarak hasta grubunda BALP ve osteokalsin parametreleri birbirleri ile pozitif yüksek korelasyon göstermektedir (Çizelge 4.7) (Şekil 4.20).

Bolarin ve Azinge'nin yaptığı başka bir çalışmada serum osteokalsin düzeyi 20 orak hücre hastasından oluşan hasta grubu ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda birbirinden farklı bulunmamıştır ($p<0,9$) (2010). Fakat bu sonucun, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada idrar da NTX ve DPD bakılmış ve bu parametrelerin serum düzeyleri hasta grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Bu çalışmada şaşırtıcı olan kemik komplikasyonlarının klinik kanıtı olan 5 hastada idrar NTx ve U-DPD'nin ortalama serum konsantrasyon değerleri anlamlı olarak yüksek olmasına rağmen, bu deneklerden ikisinin konsantrasyon değeri normal (kontrol grubu ile benzer) ortalama değere sahiptir (Bolarin ve Azinge 2010) Bizim çalışmamızda NTX ve DPD serumda ölçülmüş ancak analiz sonucunda doğruluğu kanıtlanabilir bir veri elde edilememiştir.

Ortalama yaşı 24.64 ± 4.26 (34K/26E) olan 60 hastalı orak hücre örneklem grubu ile yapılan başka bir çalışmada serum BALP ($p=0,021$), Osteokalsin ($P=0,001$) ve CTX ($P=0,0017$) düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubu serum düzeylerinde anlamlı derecede artış gözlemlendiği belirtilmiştir. Ayrıca belirtilen çalışmada, kemik yıkım parametresi olarak değerlendirilen serum NTX seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Elshal ve ark. 2012). Bizim çalışmamızda Elshal ve arkadaşlarının çalışmasını destekler nitelikte olan veri, hasta grubunda anlamlı derecede yüksek bulunan serum osteokalsin düzeyidir ($p=0,016$, Şekil 4.9) (Şekil 4.19) (Çizelge 4.2).

Literatürdeki başka bir çalışmada OHA'lı 14 yetişkinde yapım belirteci olarak osteokalsin, yıkım belirteci olarak CTX ve ayrıca 25(OH)D ölçülmüştür. Adewoye ve arkadaşlarının bu çalışmasında hali hazırda 25(OH)D eksikliği olan OHA hastalarına 12 ay süre ile Vitamin D tedavisi uygulanmıştır. Çalışmaya dahil edilen OHA hastalarının tedavi öncesi ortalama serum 25(OH)D seviyesi 11.6 ± 4 ng/mL, CTX düzeyi 0.87 ± 0.5 ng/mL ve osteokalsin seviyesi 12.3 ± 3.7 ng/mL olarak kaydedilmiştir. Tedaviden sonra çalı grubu 25(OH)D düzeyinin arttığı gözlemlenmiştir (38.8 ± 13.9 ng/mL) ($P < 0.001$). Ancak serum CTX ($p=0,5$) ve osteokalsin ($p=0,1$) seviyelerinin tedavi öncesi ve sonrası gruplarında farklı olmadığı belirtilmiştir (Adewoye ve ark. 2008). Adewoye ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada tedavi ile artan 25(OH)D serum düzeyi, yapım belirteci olarak incelenen Osteokalsin ve yıkım belirteci olarak incelenen CTX düzeylerini etkilemediğinden bu

markerler ile 25(OH)D arasında herhangi bir korelasyon olmadığı söylenebilir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde orak hücre hasta grubunda düşük D vitamini kaydedilmesinin yanısıra Osteokalsin ve CTX parametreleri ile 25(OH)D arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır (Çizelge 4.7) (Şekil 4.20).

Kırmızı kan hücrelerinin orak şekli birçok organ sisteminde, özellikle kas-iskelet sisteminde gelişen anormalliklere yol açar. Mortaliteye bir etkisi olmayan kas-iskelet sistemi komplikasyonlarının, morbiditeye katkısı büyüktür. Hem omurgada hem de başka bir yerdeki kemik içeriği, OHA'nın görülme sıklığı yüksek olan klinik sonuçlarından biridir ve hem akut hem de kronik patolojiyi içerir. OHA'daki akut kemik olayları ağırlı vazo-oklüzif krizler, osteomyelit, stres kırıkları, orbital kompresyon sendromu, diş problemleri, vertebral kollaps ve kemik iliği nekrozu olarak belirtilebilir. Hastalığın kronik kemik problemleri arasında avasküler nekroz, kronik artrit, osteopeni ve osteoporoz bulunur (Vanderhave ve ark. 2018, Almeida ve ark. 2005). Bu problemlerin her biri orak hücre anemili hastaların omurgalarında lokalize halde bulunabilir (Rudy ve ark. 2019).

D vitamini eksikliği başlı başına önemli bir küresel sağlık sorunudur. D vitamini kalsiyumun normal emilimi ve kalsiyum homeostazını korumak için gereklidir (Kaza ve Moulton 2014). Vitamin D eksikliği orak hücre hastalığında oldukça yaygındır ve popülasyonların %96'sı bu eksiklik ile savaştaktadır. En önemli görevi serumdaki kalsiyum seviyesini fizyolojik sınırlar içinde tutmak olan D vitamininin eksikliği, OHA'nın osteoporoz gibi birçok kemik komplikasyonuna katkıda bulunabilir (Aljama ve ark. 2018). Literatürde orak hücreli anemi hastalarında görülen vitamin D eksikliğinin kemik hastalıkları ile yüksek oranda ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Arlet ve ark. 2013, Adams-Graves ve ark. 2014). Bu çalışmalardan birinde (Aljama ve ark. 2018), Sağlık Bakanlığı (SB) ikinci basamak hastanesine başvuran 640 orak hücre hastası konuyla ilgili değerlendirilmiş ve bu hastaların %82' sinde (n=523) 25(OH)D seviyesi ortalamanın altında (<30ng/mL) bulunmuş ve %67' sinde ise Vitamin D eksikliği (<20ng/mL) tespit edilmiştir. Aljama ve arkadaşlarının yaptıkları bu çalışmada aynı zamanda serum 25(OH)D düzeyleri cinsiyetlere göre karşılaştırılmış ve 25(OH)D düzeyleri arasında cinsiyet hormonlarından kaynaklı herhangi bir fark bulunmadığı belirtilmiştir (Aljama ve ark. 2018). Bizim çalışmamızda da 25(OH)D düzeylerinde cinsiyetler arası farklılık olmadığı sonucuna varılmış olup (p=0,237, Çizelge 4.5), bu doğrultuda çalışmamız Aljama ve arkadaşlarının çalışmasını desteklemektedir.

Tayo ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada (2014), ABD'de orak hücre anemisi olan hastaların sağlıklı olanlara kıyasla daha düşük 25(OH)D seviyelerine sahip olduğu kaydedildi. OHA hastalarında ortalama 25(OH)D seviyeleri, Jamaika'da (45.4 ± 16.7 nmol/L'ye karşı 72.2 ± 17.8 nmol/L) ($p < 0,005$) veya Batı Afrika'da (46.5 ± 12.8 nmol/L'ye karşı 75.9 ± 17.2 nmol/L) ($p < 0,005$) sağlıklı bireylerden oluşan kontrol gruplarına göre daha düşük olduğu belirtildi (Tayo ve ark. 2014). Bizim tez çalışmamızın 25(OH)D bulguları, belirtilen çalışmaları destekler niteliktedir. Vitamin D konsantrasyonları (Şekil 4.16) (Şekil 4.17) (Şekil 4.18) hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p = 0,001$) (Çizelge 4.4). Bu veriler osteoporoz patofizyolojisinde beklenen düşük serum 25(OH)D seviyeleri ile ilişkilendirilebilir.

6. SONUÇ

Kemik metabolizma hastalıkları orak hücreli anemi hastalarında oldukça sık olduğundan bu hastalar osteoporoz açısından yüksek risk altındadırlar.

Biyokimyasal kemik metabolizması belirteçlerinin yararlılığını değerlendirirsek, osteokalsin, kemik döngüsünün hassas bir belirteci olarak düşünülebilir ve özellikle kemik komplikasyonları olan orak hücre hastalarını tanımlamak için değerli biyokimyasal bir belirteç olarak yararlı olabilir. Kemik yapım belirteci olan Osteokalsinin hasta grubunda ($30,90 \pm 15,75$ ng/mL) kontrol grubuna ($24,60 \pm 19,82$ ng/mL) kıyasla yüksek bulunması ($p=0,016$), osteokalsin sonucuna göre değerlendirildiğinde osteblastik aktivitenin arttığına işaret eder (Çizelge 4.2) (Şekil 4.9) (Şekil 4.19). Bu durum orak hücre hastalarında kemik döngüsünün artmış olduğunu düşündürebilir.

İstatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da hasta grubundaki yıkım markerleri konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla yüksek ölçülmüştür. Osteblastik aktiviteyi destekleyecek osteoklastik aktivitenin yeni başladığını ve ölçüm için anlamlı orana ulaşmadığını düşünmek yanlış olmayacaktır. Elbette bu sonuçların tek başına osteoporoz tanısı için yeterliliğinden bahsedilememekte ve radyolojik yöntemler ile elde edilen KMY bilgisi gerekmektedir.

Hasta grubunda ($14,37 \pm 6,24$ ng/mL) kontrol grubuna ($22,88 \pm 6,62$ ng/mL) kıyasla anlamlı derecede ($p=0,001$) düşük çıkan Vitamin D düzeyinin osteoporoz patolojisinde büyük yer kapladığı da göz önünde bulundurulmalı ve hasta bu klinik doğrultusunda izlenmeye başlamalıdır (Çizelge 4.4) (Şekil 4.17) (Şekil 4.19).

Başka bir görüş ile, artmış osteokalsin iskemi bölgelerinde olası osteoklast eksikliğinden dolayı telafi edici olabilen artmış osteoblast fonksiyonunu işaret etmiş olabilir. Sonuçta, bulgularımız hipotezimizi destekler nitelikte olsada, orak hücre anemisinin kemik metabolizmalarına olan etkisini anlamak için biyokimyasal belirteçlerin daha fazla araştırılması gerektiğini göstermektedir. Bu analizlerin duyarlılığı ve özgüllüğü, daha büyük bir örneklem büyüklüğü ile daha fazla araştırılmalıdır. Hastalardan daha dikkatli bir klinik öykü alınarak ve standart koşullar altında örneklerin toplanmasıyla optimize edilen yeni çalışmalar faydalı olacaktır.

Kısıtlığımız ise, bütçe yetersizliği nedeniyle DEXA gibi radyolojik tetkikler kullanılamamış, sadece biyokimyasal belirteçlerin kemik oluşum ve rezorbsiyonun göstergesi olarak kemik hastalıklarının tanısında nerede yer aldıkları araştırılmıştır. Bu bağlamda, çalışmamıza dahil ettiğimiz orak hücre tanılı hastaların kemik mineral yoğunluğu bilinmemektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Acıpayam C, İlhan G. Orak Hücreli Anemi'de Kemik Yoğunluk Anomelileri ve İlişkili Faktörler, Hatay Antakya Devlet Hastanesi, Hematoloji Kliniği, Hatay, Türkiye, 2015.
2. Acıpayam C, Kaya S, Oktay G, İlhan G. How does Vaso-Occlusive Crisis Alter Hematological Parameters in Sickle Cell Anemia, *Mustafa Kemal Üniv. Tıp Derg.* Cilt 4, sayı 15, 2013.
3. Adams-Graves P, Daniels AB, Womack CR, Freire AX. Bone mineral density patterns in vitamin D deficient African American men with sickle cell disease. *The American journal of the medical sciences.* 2014; 347(4): 262-6.
4. Adewoye AH, Chen TC, Steinberg MH, McMahon L, Mathieu J. ve ark. Sick cell bone disease: Response to vitamin D and calcium. *Am. J. Hematol.* 83: 271-274, 2008.
5. Aguilar C, Vichinsky E, Neumayr L. Bone and joint disease in sickle cell disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2005;19: 929-941.
6. Aksoy M, Lekin EW, Maurant AE, Lehman H. Blood groups, hemoglobins and thalassemia in Southern Turkey and Eti Turks. *Brit Med J*, 1958, s. 2: 937.
7. Alatalo SL, Peng Z, Janckila AJ, Kaija H, Vihko P ve ark. 2003. A novel immunoassay for the determination of tartrate-resistant acid phosphatase 5b from rat serum. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18: 134-139.
8. Aljama A, Khalifah M, Dabbous IA, Alqudaihi G. Vitamin D deficiency in sickle cell disease patients in the Eastern Province of Saudi Arabia. *Ann Saudi Med.* 2018, Mar-Apr; 38(2): 130-136.
9. Almeida A, Roberts I. (2005). Bone involvement in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 129, 482-490.
10. Apak H. Hemoglobinopatiler ve Talasemiler. *İÜ. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Anemiler Sempozyumu*, 19-20 Nisan 2001, İstanbul, s. 149-162.
11. Arcasoy A. Dünya'da ve Türkiye'de Talasemi ve Hemoglobinopatiler. Hemoglobinopati ve Talasemi Önlem Tanı-Tedavi, *Ulusal Hemoglobinopati Konseyi Sağlık Bakanlığı*, 2003, 2: 11-19.
12. Ardawi MS, Maimani AA, Bahksh TA, Rouzi AA, Qari MH ve ark. Reference intervals of biochemical bone turnover markers for Saudi Arabian women: A cross-sectional study. *Bone* 2010; 47: 804-14.
13. Arlet JB, Courbebaisse M, Chatellier G, Eladari D, Souberbielle JC ve ark. Relationship between vitamin D deficiency and bone fragility in sickle cell disease: a cohort study of 56 adults. 2013 Jan; 52(1): 206-11.
14. Arpacı A, Aksoy K, Dikmen N. Çukurova'da orak hücre anemisi ve talasemi taraması. XXII. *Ulusal Hematoloji Kongresi*, İstanbul, 1991, s.115.
15. Aslan M, Ryan TM, Townes TM, Coward L, Kirk MC ve ark. Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem.* 2003, 278(6): 4194-204.
16. Aubin JE. 2001. Regulation of osteoblast formation and function. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 2: 81-94.
17. Azinge EC, Bolarin DM. Osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in sickle cell haemoglobinopathies. *Niger J Physiol Sci.* 2006 Jun-Dec; 21(1-2): 21-5.
18. Ballas SK. (2002). Sick cell red cell microrheology and sickle blood rheology. *Microcirculation*. 2004 Mar; 11(2): 209-25.
19. Barden EM, Zemel BS, Kawchak DA et al. Total and resting energy expenditure in children with sickle cell disease. *J Pediatr.* 2000; 136: 73-79.
20. Basak AN. Beta Talasemi'de moleküler tanı ve yöntemleri. Talasemi ve Hemoglobinopatiler. Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, 2011.
21. Baxter I, Rogers A, Eastell R, Peel N. Evaluation of urinary N-telopeptide of type I collagen measurements in the management of osteoporosis in clinical practice. *Osteoporos Int* 2013; 24:941-7.
22. Bize I, Guvenc B, Buchbinder G, Brugnara C. Stimulation of human erythrocyte K-Cl cotransport and protein phosphatase type 2A by n-ethylmaleimide: role of intracellular Mg⁺⁺. *J Membr Biol.* 2000; 177(2):159-68.
23. Bolarin DM, Azinge EC. Osteocalcin and specific markers of bone resorption in sickle cell disease. *Acta Physiol Hung.* 2010 Sep; 97(3): 290-6.
24. Bolarin DM. Bone-specific alkaline phosphatase protein, total alkaline phosphatase activity and lactate dehydrogenase in sera of patients with sickle cell disease. *Haematologia (Budap).* 2001;31(1):51-56.

25. Brandt J, Krogh TN, Jensen CH, Frederiksen JK, Teisner B. Thermal instability of the trimeric structure of the N-terminal propeptide of human procollagen type I in relation to assay technology. *Clin Chem* 1999; 45:47-53.
26. Bull World Health Organization. 1976; 54(2): 129-139.
27. Cabral HWS, Andolphi BFG, Ferreira BVC, Alves DCF, Morelato RL ve ark. The use of biomarkers in clinical osteoporosis. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2016, vol.62, n.4, pp.368-376.
28. Canatan D. Orak Hücre Anemisi. XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, 7. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. İstanbul-Türkiye, 2003: 93-99.
29. Cecil RLF, Goldman L, Bennett JC. Cecil textbook of medicine: W.B. Saunders; 2000.
30. Cela E, Bellón JM, de la Cruz M, Beléndez C, Berrueto R. ve ark. National registry of hemoglobinopathies in Spain (REPHem). *Pediatr. Blood Cancer* 2017, 64, e26322.
31. Chaitou A, Boutroy S, Vilaythiou N, et al. Association between bone turnover rate and bone microarchitecture in men: the STRAMBO study. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 2313-23.
32. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott Biyokimya. 3.Baskı, Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti., İstanbul, 2007 s. 25-35.
33. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: *Clin Chem* 2000, 46(8B):1284-1290.
34. Clemens TL, Karsenty G. The osteoblast: An insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res* 2001; 26:677-80.
35. Cohen A, Dempster DW, Recker RR, et all. Abdominal fat is associated with lower bone formation and inferior bone quality in healthy premenopausal women: a transiliac bone biopsy study. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 2562-72.
36. Colombatti R, Martella M, Cattaneo L, Viola G, Cappellari A. ve ark. Results of a multicenter universal newborn screening program for sickle cell disease in Italy: *A call to action. Pediatr. Blood Cancer* 2019, 66, e27657.
37. Cooper C. 2003. Epidemiology of osteoporosis. In: The American Society for Bone and Mineral Research's Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. New York: Lippincott Raven. p. 307-314.
38. Çiğdem ÇH. Orak Hücre Hastalarında 25 Hidroksi Vitamin D Eksikliği, Avasküler Nekroz ve Kronik Böbrek Yetmezliği. Tıpta Uzmanlık Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, 2016.
39. Dawson-Hughes B, Lindsay R, Khosla S, Melton LJ, Tosteson AN. ve ark. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. Washington DC: National Osteoporosis Foundation; 2008.
40. De Papp AE, Bone HG, Caulfield MP, Kagan R, Buinewicz A. ve ark. A cross-sectional study of bone turnover markers in healthy premenopausal women. *Bone* 2007; 40:1222-30.
41. Delmas PD, Seeman E. Changes in bone mineral density explain little of the reduction in vertebral or nonvertebral fracture risk with anti-resorptive therapy. *Bone* 2004;34: 599-604.
42. Dondelinger RM. Spectrophotometers. *Biomed Instrum Technol.* 2011 Mar-Apr;45(2):139-43.
43. Dover G, Platt O. Sickle cell disease. In: Nathan D, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT (eds). Hematology of Infancy and Childhood (sixth edition). WB Saunders Company, Philadelphia, 2003, 790-841.
44. Eastell R, Baumann M, Hoyle N, Wicczorek L(Ed). Potential candidates for bone turnover markers N-telopeptide crosslinks of type I collagen (NTX), Bone markers 2001, MartinDunitz Ltd.London, 27-48
45. Eastell R, Garnero P, Audebert C, Cahall DL. Reference intervals of bone turnover markers in healthy premenopausal women: results from a cross-sectional European study. *Bone* 2012; 50: 1141-47.
46. Eastell R, Hannon RA. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proc Nutr Soc.* 2008; 67(2):157-62.
47. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL ve ark. 2005. Circulating osteoblastlineage cells in humans. *New England Journal of Medicine* 352:1959-1966.
48. Ellen B. Fung, Deborah A. Kawchak, Babette S. Zemel et all. Markers of Bone Turnover Are Associated With Growth and Development in Young Subjects With Sickle Cell Anemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2008 Mar; 50(3): 620-623.
49. Elshal MF, Bernawi AE, Al-Ghamdy MA, Jalal JA. The association of bone mineral density and parathyroid hormone with serum magnesium in adult patients with sickle-cell anaemia. *Archives of medical science: AMS.* 2012; 8(2):270.
50. Embury SH. Sickle Cell Anemia and associated hemoglobinopathies. In Goldman L, Bennet JC, Edds. Cecil Textbook of Medicine. 21.st Edition, Philadelphiya, WB Saunders Company 2000, s. 893-905.
51. Emmel VE. A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle shaped red blood corpuscles. *Archives of Internal Medicine* 1917, 20: 586-98.

52. Eren E, Yilmaz N. Biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in patients with beta-thalassaemia major. *Int J Clin Pract*. 2005 Jan; 59(1):46-51.
53. Evans AL, Paggiosi MA, Eastell R, Walsh JS. Bone density, microstructure and strength in obese and normal weight men and women in younger and older adulthood. *J Bone Miner Res* 2015; 30: 920-28.
54. Ferreira A, Alho I, Casimiro S, Costa L. Bone remodeling markers and bone metastases: from cancer research to clinical implications. *Bone Key Reports*. 2015;4.
55. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int*. (2015) 2015:421746.
56. Fung EB, Kawchak DA, Zemel BS, Rovner AJ, Ohene-Frempong K ve ark. Markers of bone turnover are associated with growth and development in young subjects with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2008; 50(3):620-3.
57. Gabriel A, Przybylski J. (2010) Sickle-cell anemia: A Look at Global Haplotype Distribution. *Nature Education* 3(3):2.
58. Gardner RV. Sickle Cell Disease: Advances in Treatment. *Ochsner J*. 2018, 18, 377-389.
59. Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochimica et biophysica acta*. 1958; 30(3):653-4).
60. Garnero P, Vergnaud P, Hoyle N. Evaluation of a fully automated serum assay for total N-terminal propeptide of type I collagen in postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem* 2008; 54:188-96.
61. Garrido C, Cela E, Beléndez C, Mata C, Huerta J. Status of vitamin D in children with sickle cell disease living in Madrid, Spain. *European journal of pediatrics*. 2012; 171(12):1793-8.
62. Ginsburg D, Nathan DG, Oski FA, Orkin SH, Look TA. (Nathan and Oski's Hematology and infancy and childhood-2 vol. Set: WB Saunders) (Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. Robbins and Cotran) pathologic basis of disease: Elsevier Saunders; 2005.
63. Guañabens N, Filella X, Monegal A, et al. Reference intervals for bone turnover markers in Spanish premenopausal women. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: 293-303.
64. Guillerminet F, Beaupied H, Fabien-Soulé V, Tomé D, Benhamou CL ve ark. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An in vitro and in vivo study. Elsevier, *Bone* 46; 2010. p. 827-34.
65. Gümrük F, Altay Ç. Orak hücre anemisi. *Katkı* 1995; 16: 327-45.
66. Gürdol F. Oksijen bağlayan proteinler: Hemoglobin ve miyogloblin. In: Gürdol F, Ademoğlu E, editors. *Biyokimya 2ed: Nobel Tıp Kitapevleri*; 2010. P. 111-26.
67. Güzelgöl F. Alfa Talasemi Mutasyonlarının DNA Dizi Analizi ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010.
68. Hahn EV, Gillepsie EB. Sickle cell anemia. Report of a case greatly improved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. *Archives of Internal Medicine*, 1927, s. 39: 233-54.
69. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Chen GS, Janckila AJ ve ark. 2000. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* 15:1337-1345.
70. Hannon R, Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2000;11 Suppl 6: S30-44.
71. Harmening DM. Hemoglobinopathies In: Harmening DM(Editor): Clinical hematology and Fundamentals of hemostasis. 3rd. Edition, Philadelphia, USA, 1997, s. 173-192.
72. Harvey N, Dennison E, Cooper C, Osteoporosis: impact on health and economics, *Nature Reviews Rheumatology*, 2010.
73. Hattori Y, et al. Haplotypes of beta S chromosomes among patients with sickle-cell anemia from Georgia. *Hemoglobin* 10, 623-642 (1986).
74. Heaney RP, Abrams S, Dawson-Hughes B, et al. Peak bone mass. *Osteoporosis Int*. 2000; 11:985-1009.
75. Hemoglobinopati tanı rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı, TR Halk Sağlığı Kurumu, 2016. 13.11.2019.
76. Herrick JB. Peculiar, elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch. Intern. Med*. 6, 517-521 (1910).
77. Hockham C, Piel FB, Gupta S, Penman BS. Understanding the contrasting spatial haplotype patterns of malarial protective β -globin polymorphisms. *Infect Genet Evol* 2015; 36:174-83. 4.
78. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA ve ark. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011; 96(7):1911-30.
79. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007; (357): 266-81.
80. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: The chemical difference between normal and sickle-cell haemoglobin. *Nature* 180, 326-328 (1957).

81. Inusa B, Hsu LL, Kohli N, Patel A, Ominu-Evbota K ve ark. Sickel Cell Disease; Genetics, Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatment, *Int. J. Neonatal Screen*. 2019; 5, 20.
82. Jenkins N, Black M, Paul E, Pasco JA, Kotowicz MA ve ark. Age-related reference intervals for bone turnover markers from an Australian reference population. *Bone* 2013; 55: 271–76.
83. Jørgensen NR, Møllehave LT, Hansen YBL, Quardon N, Lylloff L ve ark. Comparison of two automated assays of BTM (CTX and P1NP) and reference intervals in a Danish population. *Osteoporos Int* 2017; 28: 2103–13.
84. Kargin F, Fidancı UR. Kemik Metabolizmasının İzlenmesinde Biyokimyasal Belirteçler ve Klinik Önemi, Ankara, 2002.
85. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007; 21(1):37-47.
86. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K ve ark. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Mar 15; 4:18010.
87. Kawazoe Y, Shiba T, Nakamura R, Mizuno A, Tsutsumi K. 2004. Induction of calcification in MC3T3-E1 cells by inorganic polyphosphate. *Journal of Dentistry Research* 83:613-618.
88. Kaza PL, Moulton T. Severe vitamin D deficiency in a patient with sickle cell disease: a case study with literature review. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014 May;36(4):293-6.
89. Kim HK, Kim MG, Leem KH. Osteogenic Activity of Collagen Peptide via ERK/MAPK Pathway Mediated Boosting of Collagen Synthesis and Its Therapeutic Efficacy in Osteoporotic Bone by Back-Scattered Electron Imaging and Microarchitecture Analysis. *Molecules*, 18; 2013. p. 15474-89.
90. Kohl TO, Ascoli CA. Indirect immunometric ELISA. *Cold Spring Harb Protoc*, 2017.
91. Kuo TR, Chen CH. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives, *Kuo and Chen Biomarker Research* (2017) 5:18.
92. Lal A, Fung EB, Pakbaz Z, Hackney-Stephens E, Vinchinsky EP. (2005) Bone mineral density in children with sickle cell disease. *Pediatric Blood and Cancer*, 47, 901–906.
93. Lukens JN. Abnormal hemoglobins: general principles. Wintrobe's Clinical Hematology 2th ed. 2004. p. 1247-62.
94. Lukens JN. Hemoglobinopathies S, C, D, E and O and associated diseases. In: Lee GR Bithel TC, Foerster J Eds. Wintrobe's Clinical Hematology. 9th ed, Philadelphia, Lea and Febiger, 1993, s. 1061-1101.
95. Mäkitie RE, Costantini A, Kämpe A, Alm JJ et al. Outi Mäkitie, New Insights Into Monogenic Causes of Osteoporosis, 2019.
96. Manolagas SC. 2000. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Review* 21:115-137.
97. Martinez PA. Angastiniotis, M.; Eleftheriou, A.; Gulbis, B.; Pereira, M.D.; Petrova-Benedict, R.; Corrons, J.L. Haemoglobinopathies in Europe: Health & migration policy perspectives. *Orphanet J. Rare Dis*. 2014, 9, 97.
98. Martini LA, Moura EC, Santos LC, Malta DC, Pinheiro MM. Prevalência de diagnóstico auto-referido de osteoporose. *Rev Saúde Pública*. 2009; 43(supl. 2):107-16.
99. Mary EE. Hereditary Hemolytic Anemias. In: Tintinalli JE, Kelen GD, Stapczynski JS Eds. Emergency Medicine, A Comprehensive Study Guide. 5 th Ed, North Carolina: McGraw Hill Companies Inc, 2000: 1382-1387.
100. Meier C, Meinhardt U, Greenfield JR, De Winter J, Nguyen TV ve ark. 2006. Serum cathepsin K concentrations reflect osteoclastic activity in women with postmenopausal osteoporosis and patients with Paget's disease. *Clinical Laboratory* 52:1-10.
101. Michelsen J, Wallaschofski H, Friedrich N, et al. Reference intervals for serum concentrations of three bone turnover markers for men and women. *Bone* 2013; 57: 399–404.
102. Miller, RG., Segal, JB., Ashar, BH., Leung, S, Ahmed, S. ve ark. (2006). High prevalence and correlates of low bone mineral density in young adults with sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, 81, 236–241.
103. Mitchell BD, Yerges-Armstrong LM. The genetics of bone loss: Challenges and prospects. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:1258-68.
104. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization Bulletin of the World health Organization* 2008; 86:480-487.
105. Mohammed SM, Suleiman SA, Addae SK, Annobil SH, Adzaku FK. Urinary hydroxyproline and serum alkaline phosphatase in sickle cell disease. *Clin Chim Acta*. 1991 Dec 16;203(2-3): 285-94.
106. Naylor K, Eastell R. Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 379–89.
107. Neel, JV. The inheritance of sickle-cell anemia. *Science* 110, 64–66 (1949)

108. Nelson DA, Rizvi S, Bhattacharyya T, Ortega J, Lachant N ve ark. (2003) Trabecular and integral bone density in adults with sickle cell disease. *Journal of Clinical Densitometry*, 6, 125–129.
109. Nussbaum R, McInnes, RR, Willard F. (2007). Thompson&Thompson Genetics in Medicine, 7th ed., Saunders. Philadelphia. 323-345. (Akay T. (2001). Genel Histoloji, 5. Baskı, Palme Yayıncılık, 82-87.
110. Odievre MH, Verger E, Silva-Pinto AC, Elion J. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *The Indian journal of medical research*. 2011; 134:532-7.
111. Okabe R, Inaba M, Nakatsuka K, Miki T, Naka H ve ark. 2004. Significance of serum CrossLaps as a predictor of changes in bone mineral density during estrogen replacement therapy; comparison with serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen and urinary deoxypyridinoline. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 22:127-131.
112. Okabe R, Nakatsuka K, Inaba M, Moriguchi A, Nishizawa Y. Clinical evaluation of the elecys - Crosslaps serum assay, a new assay for degradation products of type I collagen C-Telopeptides. *Clinical Chemistry* 2001; 47:1410-1414.
113. Orak Hücre Anemisinde Tanı ve Tedavi Kılavuzu, Türk Hematoloji Derneği, 2011.
114. Outila TA, Kärkkäinen MU, Lamberg-Allardt CJ. Vitamin D status affects serum parathyroid hormone concentrations during winter in female adolescents: associations with forearm bone mineral density—The American journal of clinical nutrition. 2001;74(2):206-10.
115. Örmeci AÇ. Tip 2 diyabetik hastalarda pioglitazon tedavisinin kemik yıkım-yepim markerları üzerine etkilerinin irdelenmesi, Uzmanlık tezi, 2008.
116. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2015. 6(3):331-336.
117. Paredes MB, Sulen ME. Sickle Cell Anemia: A review on the most severe form of Sickle Cell Disease, Bionatura Conference Series Vol 2. No 1. 2019.
118. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949; 110:543-48.
119. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW ve ark. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis, *Nat Commun*. 2010 Nov 2; 1:104.
120. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW ve ark. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates, *Lancet*. 2013 Jan 12;381(9861):142-51.
121. Pinheiro MM, Eis SR. Epidemiologia de fraturas pela osteoporose no Brasil: o que temos e o que precisamos. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2010; 54(2):164-70.
122. Platt OS, Dover GJ. Sickle cell disease. In: Nathan DG, Oski FA Eds. Hematology of Infancy and Childhood. 4th ed, Philadelphia, WB Saunders Company, 1993, s. 732-787.
123. Polymeris A, Michalakis K, Sarantopoulou V. Secondary osteoporosis- an endocrinological approach focusing on underlying mechanisms. *Endocr Regul*. 2013; 47:137-48.
124. Qvist P, Christgau S, Pedersen BJ, Schlemmer A, Christiansen C. Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): Effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone* 2002; 31:57-61.
125. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle- cell disease. *Lancet* 2010; 376(9757):2018-31.
126. Richard RE. The management of sickle cell pain. *Curr Pain Headache Rep*. 2009, 13(4):295-7.
127. Robins SP, Woitge H, Hesley R, Ju J, Seyedin S ve ark. Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J Bone Miner Res* 1994; 9: 1463-9.
128. Roodman GD. 1999. Cell biology of the osteoclast. *Experimental Hematology* 27:1229-1241.
129. Rudy HL, Yang D, Nam AD, Cho W. Review of Sickle Cell Disease and Spinal Pathology. *Global Spine Journal* 2019, Vol. 9(7) 761-766.
130. Sadat-Ali M, Al-Elq A, Sultan O, Al-Turki H. Secondary osteoporosis due to sickle cell anemia: do sex steroids play a role? *Indian J Med Sci*. 2008 May;62(5):193-8.
131. Sarrai M, Duroseau H, D'Augustine J, Moktan S, Bellevue R. Bone mass density in adults with sickle cell disease. The Comprehensive Sickle Cell/Thalassemia Program and the Department of Medicine, New York Methodist Hospital, Brooklyn, NY, USA. *Br J Haematol*. 2007 Feb;136(4):666-72.
132. Shetty S, Kapoor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis, India, 2016.
133. Silva Junior GBd, Daher EDF, Rocha FACd. Osteoarticular involvement in sickle cell disease. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2012; 34(2):156-64.
134. Söylemez-Gökkyer D, Kayaaltı Z. Türkiye’de Orak Hücreli Anemi Dağılımı, Patofizyolojisi ve Demir Toksisitesi. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2016; 20:92-9.

135. Stinson RA, Hamilton BA. Human liver plasma membranes contain an enzyme activity that removes membrane anchor from alkaline phosphatase and converts it to a plasma-like form. *Clin Biochem* 1994; 27:49-55.
136. Straube S, Moore AR, Derry S, McQuay HJ. Vitamin D and chronic pain. *Pain*. 2009; 141(1-2):10-3.
137. Szulc P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover: potential used in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2008; 19: 1683-704.
138. Tanakol R, Fiziopatolojik Etmenler. In Osteoporozda Kemik Kalitesi Gökçe Kutsal Y. Ed. Ankara, Güneş Kitabevi Ltd., 2004, s. 3-70.
139. Tayo BO, Akingbola TS, Salako BL, McKenzie CA, Reid M ve ark. Vitamin D levels are low in adult patients with sickle cell disease in Jamaica and West Africa. *BMC Hematology* 2014, 14:12.
140. Tewari S, Brousse V, Piel FB, Menzel S, Rees DC. Environmental determinants of severity in sickle cell disease, *Haematologica* 2015; 100(9).
141. Tüzün F, Akarırnak Ü, Dinç A. Osteoporozun Epidemiyolojisi. In Kemik ve Eklemde kadında Osteoporoz Tüzün F, Akarırnak Ü, Dinç A. Eds. İstanbul, Aventis Pharma, 2002, s. 14-24
142. Ulutaş KT. Orak Hücre Anemili Hastalarda Ferritin-A, enflamatuvar Marker ve Oksidatif Stress ilişkisinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay, 2013.
143. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P ve ark. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: A need for international reference standards. *Osteoporos Int* 2011; 22:391-420.
144. Vergin C. Anormal Hemogloblinler. 5. Uluslararası Talasemi Yazokulu. Antalya-Türkiye, 20-24 Ekim 2008:47-54.
145. Viguet-Carrin S, Garnero P. and Delmas PD. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis International*, Vol. 17, Iss. 3, 319-336.
146. Vikki GN, Kerri AN. Prevalence of Vitamin D Deficiency in Sickle Cell Disease: A Systematic Review. *Plos one*. 2015;10(3).
147. Voskaridou E, Stoupa E, Antoniadou L, Pre metis E, Konstantopoulos K ve ark. Osteoporosis and osteosclerosis in sickle cell/beta-thalassemia: the role of the RANKL/osteoprotegerin axis. *Haematologica*. 2006; 91(6): 813-6.
148. Wang W, Lukens JN. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: Lee RG, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, Eds. Wintrobe's Clinical Hematology. 10th Ed, Middle East Edition, Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1999, 1347-1397.
149. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8 th Ed. USA: International Edition, 2001.
150. Yüksel, R. Homozigot Hbss Erişkin Orak Hücre Anemili Hastalarda Serum pedf Düzeyleri ile Hscrep arasındaki ilişkinin incelenmesi. Uzmanlık tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay, 2014; 3s.
151. http://www.nhr.nhs.uk/docs/annualreport/NHR_AnnualReport_2014.pdf Erişim 10.09.2019.
152. <http://www.oytunerbas.com.tr/tip-fizyoloji-ders-notu/49/> Erişim 17.11.2019.
153. <https://wholodude.com/2013/10/26/wholodude-wholodesigner-red-blood-cell/> Erişim 21.10.2019.
154. <https://wholodude.com/2013/10/26/wholodude-wholodesigner-red-blood-cell/> Erişim 13.11.2019.
155. <https://www.sc101.org/learn> Erişim 13.12.2019.
156. <https://www.studyblue.com/notes/n/md-heme-study-guide-2012-13-liebman/deck/9712262> Erişim 30.10.2019.
157. www.afdphe.org/sites/default/files/bilan_activite_2013.pdf Erişim 06.12.2019.
158. <https://www.utsa.edu/today/2019/10/story/bone-density.html> Erişim 30.12.2019.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Adana'da doğdu. 2006 yılında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında Erasmus Hayat Boyu Öğrenme Programı ile İtalya'da Ferrara Üniversitesi Kimya Bölümü'nde bir dönem eğitim gördü. 2012 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra dört yıl İzmir ve İstanbul'da özel sektörde çalıştı. 2016 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Aynı yıl, Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Yönetim ve Organizasyon Bölümü, Sağlık Kurumları İşletmeciliği Önlisans Programında öğrenimine başladı. 2017 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Pedagojik Formasyon Eğitimini alarak Kimya Öğretmeni olmaya hak kazandı. 2018 yılında Sağlık Kurumları İşletmeciliği Bölümü'nden mezun oldu ve yine aynı yıl Anadolu Üniversitesi İnsan Kaynakları Yönetimi Önlisans Programına başladı ve halen devam etmekte.