T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TİP 2 DİABETES MELLİTUS'LU VAKALARDA HEMOGLOBİN A_{1C} DÜZEYİ İLE KEMİK YAPIM VE YIKIM BELİRTEÇLERİNİN İLİŞKİSİ

Dr. Asuman ÖZKAN

Tez Yöneticisi

Doç. Dr. F. Zuhal UMUDUM

Uzmanlık Tezi

ERZURUM - 2006

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TİP 2 DİABETES MELLİTUS'LU VAKALARDA HEMOGLOBİN A_{1C} DÜZEYİ İLE KEMİK YAPIM VE YIKIM BELİRTEÇLERİNİN İLİŞKİSİ

Dr. Asuman ÖZKAN

Tez Yöneticisi

Doç. Dr. F. Zuhal UMUDUM

Uzmanlık Tezi

ERZURUM - 2006

İÇİNDEKİLER

Onay Sayfası…….. İİİ
Teşekkür……..... İV
Özet……. V
Abstract…….. Vİ
Kısaltmalar……. Vİİ
1-GİRİŞ ve AMAÇ…… 1
2. GENEL BİLGİLER……..... 3
2.1. DİABETES MELLİTUS ……... 3
2.2. TİP 2 DİABETES MELLİTUS (TİP 2 DM)……..... 5
2.3. DİABETES MELLİTUSUN TANISI …….. 7
2.4. GLİKEPROTEİNLER…….. 8
2.4.1. Glikehemoglobin(GHb), HbA_{1c} 8
2.5. KEMİK DOKU……... 11
2.5.1 Kemik Matriksi……. 12
2.5.2. Paratiroid Hormon(PTH)……..... 14
2.5.3. Vitamin D……. 15
2.5.4. Kemik Döngüsünün Değerlendirilmesi……. 16
2.5.5. Kemik Yapım Belirteçleri…….. 17
2.5.5.1. Alkalen Fosfataz (EC 3.1.3.1)…… 17
2.5.5.2 Osteokalsin (OK)…… 18
2.5.5.3. Tip I Prokollajenin Karboksiterminal Propeptiti (PICP) Ve Aminoterminal Propeptiti (PINP)……. 19
2.5.6. Kemik Yıkım Belirteçleri……..... **20**
2.5.6.1 Kollajenin Piridinyum Çapraz Bağları……... **21**
2.5.6.2. Çapraz Bağlı Kollajen Telopeptitleri…… 22
2.5.6.3.Tip I Kollajenin Çapraz Bağlı C-telopeptitleri (CrossLaps)…….. 23
2.5.6.4. Tip I Kollajenin Çapraz Bağlı C-Terminal Telopeptit'i (ICTP, CTx-MMP)... 23
2.5.6.5. Tartarat'a Dirençli Asit Fosfataz (TRAP)……. 24
2.5.7 İdeal Bir Kemik Döngüsü Parametresi'nde Aranan Özellikler……... 24
2.5.7.1. Preanalitik Faktörler…….. 25

2.5.8. Kemik Döngüsü Parametrelerinin Klinik Kullanımı……... 26
2.6 .DİYABET VE KEMİK DOKU……. 28
3. BİREYLER VE YÖNTEMLER…….. 31
3.1. Bireyler…… 31
3.2. Numunelerin toplanması……... 32
3.3. Kullanılan Cihazlar…… 32
3.4 Kullanılan Malzemeler……..... 32
3.5. Yöntemler…… 33
3.5.1. HbA_{1c} Analizi……..... 33
3.5.2.Serum K-ALP, Fosfor ve Kalsiyum Analizi…….. 33
3.5.3. İdrar Kreatinin Analizi…….. 35
3.5.4. 25OHD Analizi…….. 35
3.5.5. İdrar Ntx ve Deoksipridinolin Analizi……... 35
3.5.6. iPTH ve Osteokalsin Analizi……. 35
3.5.7. İstatistiksel Analiz……. 35
4.BULGULAR……... 37
5.TARTIŞMA……..... 44
6. SONUÇ ve ÖNERİLER…… **47**
7. KAYNAKLAR……... 48

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Kurulu'nun 25.02.2005/1 tarih ve sayılı toplantısında; "Tip 2 DM'li Vakalarda HbA_{1c} Düzeyi ile Kemik Yapım ve Yıkım Belirteçlerinin ilişkisi" başlıklı konunun Dr. Asuman ÖZKAN'a uzmanlık tezi olarak verilmesine ve tez yönetiminin Doç.Dr. F. Zühal UMUDUM tarafından yürütülmesine karar verildi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 04.03.2005/3 tarih ve sayılı kararı ile ilgili tezin etik kurul onayı alındı ve Temel Tıp Bilimleri Bölümü'nün 11.05.2005/2 tarih ve sayılı kararı ile tez konusu olarak kabul edilmesine karar verildi.

TEŞEKKÜR

İhtisas tezi olarak sunduğum bu çalışmada, benden her türlü desteğini, hoşgörüsünü ve emeğini esirgemeyen tez hocam Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. F. Zuhal UMUDUM hocama, meslek hayatımda her zaman örnek aldığım Biyokimya anabilim dalı başkanı Prof. Dr. E. Bekir BAKAN hocama, ihtisas hayatım süresince, karşılaştığım her türlü sorunda, babacan tavrı ile çözüm sunan Prof. Dr. Nuri BAKAN hocama, yine ihtisasım süresince benden yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Y. Nuri ŞAHİN hocama, Prof. Dr. Leyla YILDIZ hocama, Prof Dr. Fatih AKÇAY hocama, Prof. Dr. Ahmet KIZILTINÇ hocama, Doç. Dr. Hülya AKSOY hocama, Doç Dr. M. Sait KELEŞ hocama ve Yrd. Doç. Dr. A.Kadir YILDIRIM hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda büyük yardımları olan İç hastalıkları ABD Endokrin bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. İlyas ÇAPOĞLU'na ve her zaman bana destek olan, sevgili eşim Prof. Dr. Behzat ÖZKAN'a, beni bu dünyaya getiren ve her türlü maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen biricik annem,Sebahat TOYRANLI ve biricik babam Rıdvan TOYRANLI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

İhtisas sürem boyunca desteklerini ve arkadaşlıklarını benden esirgemeyen Arş. Gör. H. Hakan ALP'e, Arş. Gör. Berna DEMİRCAN'a ve diğer asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ben den ablalığını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı sekreteri Keriman ERDEM'e ve numunelerimin toplanmasında ve saklanmasında her türlü itinayı gösteren Toygun ÜNAL beye ve onun nezninde tüm teknisyen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Asuman ÖZKAN

ÖZET

Özkan A. Tip 2 Diabetes Mellitus'lu vakalarda HbA_{1c} düzeyi ile kemik yapım ve yıkım belirteçlerinin ilişkisi. Biyokimya Uzmanlık Tezi. Erzurum.2006.

Bu çalışmada Tip 2 Diabetes Mellitus (DM)'lu vakalarda metabolik kontrolun kemik yapım ve yıkım belirteçleri üzerine olabilecek muhtemel etkileri prospektif olarak araştırıldı. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Bilim Dalı tarafından izlenen ve yaşları 37 yıl ile 66 yıl (ort±SD 51±7.5) arasında değişen 35 Tip 2 DM'lu vaka (18 kadın, 17 erkek) çalışmaya alındı. Tüm vakalar tanı yaşları, güncel yaşları, izlem süreleri, antropometrik ölçüm değerleri [ağırlık, vücut kitle indeksi (BMI)], tedavi rejimleri (oral antidiyabetik ilaçlar, insulin tedavileri ve diyet tedavileri) varsa komplikasyonlar ve kemik döngüsü belirteçleri [Kemiğe Spesifik Alkalen Fosfataz (K-ALP), Osteokalsin (OK)], İdrar Deoksipridinolin (DPr), idrar N-Telopeptit (NTx) bakımından başlangıçta ve ortalama 4.9±1.2 (3-6 ay) izlem sonunda değerlendirildiler.Vakaların ortalama HbA_{1c} (%mg) düzeyleri başlangıçta %10.6±1.2 iken yaklaşık 5 aylık izlem sonunda %7.7±1.0 mg düzeyine azalma gösterdi (p=0.000). Buna paralel olarak, kemik döngüsü belirteçleri arasında istatistik olarak anlamlı bir azalma saptandı. Başlangıçta kemik yapım parametrelerinden idrar DPr (nmoLDPr/mmoLKr) düzeyi 28.6±11.6 iken, izlem sonunda 17.9±7.1'e azalma gösterdi (p=0.000). İdrar NTx (nmoLBCE/mmoLKr) düzeylerinde 93±13.7 den 67.1±12.8'e azalma saptandı (p=0.000). Aynı süre içerisinde HbA_{1c} düzeyindeki azalmaya paralel olarak kemik yapım paremetrelerinde de azalma saptandı. Ortalama serum K-ALP düzeyleri başlangıçta 129.5 ±37.3 U/L iken izlem sonunda 94.8±35.1 U/L olarak saptandı. Aynı süre içinde ortalama serum OK düzeyleri ise 94.6±16.8 ng/mL den 66.3± 17.3ng/mL'ye azalma gösterdi.

Bu çalışmanın sonuçları DM'ta metabolik bozukluğun kontrol altına alınmasının kemik metabolizmasında düzelmeye katkıda bulunan önemli faktörlerden birisi olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler; Tip 2 Diabetes mellitus, HbA_{1c}, kemik yapımı ve kemik yıkımı

ABSTRACT

Ozkan A. Biochemical markers of bone turnover in patients with Type 2 Diabetes and their correlations with HbA_{1c} levels. Thesis in Department of Biochemistry. Erzurum.2006.

In this study, the probable effects of metabolic control on bone turnover markers in patients with Type 2 Diabetes Mellitus (Type 2 DM) were prospectively carried out. 35 cases with Type 2 DM aged between 37 and 66 years (18 female, 17 male) were included in this study. All cases were evaluated with particular respect to diabetic ages, current ages, follow-up periods, body mass indexes, treatment protocols, complications and bone turnover markers (bone specific alkaline phosphatase (B-ALP), osteocalcine (OC), urine deoxypyridinoline (DPr), urine n-telopetit (NTx) both at the beginning and end of the study (mean 4.9±1.2 months). Mean HbA_{1c} (%mg) concentration of the cases was 10.6±1.6 %, and this rate decreased to the level of 7.7±1.0 % nearly 5 months follow-up period (p=0.000). In parallel with decrease of HbA_{1c} level, the bone turnover markers also were reduced significantly at the same period. While mean concentration of urinary DPr (nmoLDPr/mmoLKr)**,** which is one of the markers of bone resorption, was 28.6±11.6 in the beginning of the study, it decreased to the level of 17.9±7.1 at the end of the follow-up period (p=0.000). Similarly, mean urinary NTx (nmoLBCE/mmoLKr) concentration, that is also marker of bone resorption, showed signifcantly decrease from the level of 93±13.7 to 67.1±12.8 at the same period (p=0.000). On the other hand, the reduce of bone formation parameters was also found in parallel with HbA_{1c} level in posted time-interval. While mean serum B-ALP levels were 129.5 ±37.3 U/L in the beginning of the study, it was reduced to the level of 94.8±35.1U/L at the end of the study. Similarly, serum OC (ng/ml) concentration decreased from 94.6±16.8 ng/mL to 66.3± 17.3ng/mL and significantly was correlated with the HbA_{1c} levels during study period.

We concluded that management of the metabolic disorder in Type 2 Diabetes is the one of the most important contributors for improvement of the bone turnover.

Key words; Type 2 Diabetes Mellitus, HbA_{1c}, bone turnover

KISALTMALAR

ADA : Amerikan Diyabet Derneği

ALP : Alkalen Fosfataz

BCE : Kemik Kollajen Eşdeğeri

BH : Büyüme Hormonu

BMİ : Vücut Kitle İndeksi

cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat

CTx : Tip I Prokollajenin C Terminal Telopeptiti

DCCT : Diyabet Kontrol Komplikasyon Çalışması

DEXA : Dual enerji x-ray absorpsiyometri

DM : Diyabetes Mellitus

DPr : Deoksipridinolin

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

EİA : Enzim İmmün Ölçüm

ELİSA: Enzim Bağlı İmmünosorbent Ölçüm

Gal-HL: Galaktozil- Hidroksilizil

GHb : Glikehemoglobin

GLa : Gamma-karboksiglutamik asit

GLUT-4: Glukoz transport protein-4

GnRH: Gonadotropini serbestleştiren hormon

HbA_{1c} : Hemoglobin A_{1c}

HP : Hidroksiprolin

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HL : Hidroksilizin

HLA : Human lökosit antijen

İGF-I : İnsülin benzeri büyüme faktörü-I

İGF-II: İnsülin benzeri büyüme faktörü-II

iPTH : intakt Paratiroid hormon

İRMA : İmmün radyometrik ölçüm

İCMA : İmmüno kemilüminesans ölçüm

K-ALP: Kemiğe spesifik Alkalen fosfataz

KC : Karaciğer

kDa : Kilodalton

kkal : Kilokalori

KMD : Kemik mineral dansitesi

Kr : Kreatinin

MMP : Metalloproteinaz

MODY: Maturity onset Diabetes of the youngs

NTx : Tip I kollajenin N terminal telopeptidi

OGTT : Oral glukoz tolerans testi

OK : Osteokalsin

Pr : Prodinolin

PTH : Parathormon

PICP : Tip I kollajenin karboksi terminal propeptidi

PINP : Tip I kollajenin amino terminal propeptidi

RİA : Radyo immün ölçüm

TRAP : Tartarat'a dirençli asit fosfataz

UV : Ultraviyole

WHO : Dünya sağlık örgütü

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diyabetes Mellitus (DM), hiperglisemi ile karekterize, karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden, kronik ve progresif bir hastalıktır. İnsülin sekresyonunun mutlak ve rölatif yetersizliği, insülin etkisizliği veya insülin molekülündeki yapısal bozukluklar sonucu oluşan bu hastalık, etyolojisi, genetik ve klinik tablosu ile karakterize bir bozukluktur. DM'nin seyri sırasında vasküler ve nörolojik dokularda komplikasyonların gelişmesinin yanı sıra, iskelet sistemi gibi dokularda da istenmeyen etkiler ortaya çıkabilmektedir (1-3).

Kemik dokusu, metabolik olarak aktif bir dokudur. Normal şartlarda kemik yapım ve yıkımı denge halinde yaşam boyu süren bir olgudur. Kemik yıkımından sorumlu osteoklastlar ve yeni kemik oluşumundan sorumlu osteoblastlar tarafından salınan belirteçlerin ölçümü kemik döngüsünün değerlendirilmesini sağlamaktadır(4-6).

DM ve kemik doku arasındaki ilişkiyi irdeleyen çalışmalara uzun zamandan beri rastlanmaktadır. Albright ve Reifenstein ilk kez 1948 yılında, DM'lilerde KMD'nin daha düşük olduğunu ve bu vakalarda kırık riskinin arttığını bildirmişlerdir (6). Sonraki yıllarda DM'li vakalarda KMD değişikliğine bazı çalışmalarda dikkat çekilmiştir(7-23). Bununla birlikte, bu çalışmalardaki KMD değişimleri, daha çok Tip 1 DM'li olgularda radyografik veya fotonik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (7-13). Yapılan çalışmalarda, Tip 1 DM'li vakaların %50-55'inde osteopeni bildirilmiştir. Eğer, Tip 1 DM ergenlik öncesi dönemde başlamış ve 5 yıldan fazla süreli ise osteopeni daha çok trabeküler kemikte olmak üzere belirgin olarak arttığı bildirilmiştir (12,13).

Diğer yandan, Tip 2 DM'li olgulardaki KMD ilişkisini irdeleyen çalışma sayısı sınırlıdır (7,8,14-23). Bu çalışmalarda DM ve kemik doku arasındaki ilişki kesitsel olarak değerlendirilmiş ve farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bu çalışmaların birinde KMD normal bulunmuş iken (18), bazılarında yüksek (19, 20), bazılarında ise düşük olarak saptanmıştır(14). Bu durum Tip 2 DM'in heterojenitesine ve kullanılan çalışma yöntemlerin farklı oluşuna bağlanmaktadır (14, 23). Bazı kemik yapım ve yıkım belirteçleri ile Tip 2 DM arasındaki ilişkinin kesitsel olarak araştırıldığı bir çalışma post-menapozal Tip 2 DM olgularında yapılmış ve bazı yıkım belirteçlerinin kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır (14). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Tip 1 ve Tip 2 DM' li olgularda kemik dokuya ait biyokimyasal parametrelerin değişimleri

kesitsel olarak araştırılmıştır (23). Bu çalışmada Tip 2 DM'li olgularda ölçülen kemik yapım ve yıkım belirteçleri ile kontrol grubuna ait değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (23). Bununla birlikte, literatür incelendiğinde Tip 2 DM'li olgularda DM'nin kontrol derecesi ile kemik yapım ve yıkım belirteçlerindeki değişimleri prospektif ve izleme dayalı olarak irdeleyen bir çalışma mevcut değildir.

Bu çalışmada, Tip 2 DM'li olgularda DM'nin kontrolünde önemli bir gösterge olan HbA_{1c} düzeyi ile kemik yapım belirteçlerinden K-ALP ve OK; yıkım belirteçlerinden DPr ve NTx paramatrelerinin değişimi izlenerek, Tip 2 DM'li olgularda metabolik kontrol derecesinin kemik döngüsü üzerine etkisi prospektif ve izleme dayalı olarak araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİYABETES MELLİTUS

DM, insulinin salgılanmasında veya etkisinde yetersizlik sonucu gelişen kronik hiperglisemi ile karakterize karbonhidrat, yağ ve protein metabolizma bozukluğudur. DM'nin kontrol derecesine bağlı olarak uzun dönemde mikrovasküler, makrovasküler ve nöropatik komplikasyonların yanında kemik doku gibi diğer dokular üzerinde de olumsuz etkiler oluşabilmektedir (1-3, 24).

DM ile ilgili olarak eskiden yapılan klinik sınıflamada hastalığın başlama yaşı dikkate alınmış ve gençlerde görülene "genç tipi=jüvenil tip", erişkinlerde görülene "Erişkin tip= adult tip" DM adı verilmiştir. Daha sonra terapötik sınıflama geliştirilmiş ve "insülin bağımlı DM=Insülin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM)" ve "insulin bağımsız=Non İnsülin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM)" terminolojisi kullanılmıştır. Zamanla tip 2 DM'li vakaların da insülin gereksinimi göstermesinden dolayı bu terminoloji de yerini etiyolojik sınıflamaya terk etmiştir. Tablo 1'de DM'nin ADA, 1997 kriterlerine göre yeni sınıflandırılması gösterilmiştir (1-3, 24-27).

Tablo 1. DM'nin Sınıflandırılması

Tip 1 DM
Tip 1 A (immün)
Tip 1 B (İdiopatik)
Tip 2 DM
İnsülin direnci (rölatif insülin eksikliği)
İnsülin sekresyon bozukluğu
Diğer spesifik tipler
Beta hücre fonksiyonunda genetik bozukluk
İnsülin etkisinde genetik bozukluk
Ekzokrin pankreas hastalıkları
Endokrinopatiler
İlaçlar, kimyasal maddeler
İnfeksiyonlar
Nadir görülen immün aracılı diyabet
Diğer genetik sendromlar
Gestasyonel DM (GDM)

Tip 1 DM, genellikle 30 yaşından önce ortaya çıkmakta ve yaşamın devam ettirilebilmesi için mutlaka insüline bağımlılık gerektirmektedir. Günümüzde genel

populasyondaki %0.5-1'lik görülme oranı ile halen çocuk ve adolesan döneminde astım ve mental retardasyondan sonra en sık karşılaşılan bir metabolik bozukluktur. Tip 1 DM'nin büyük bir bölümü otoimmun temelde gelişmekte olup, genetik ve çevresel faktörler de etiyopatogenezde sorumlu tutulmaktadır. Genetik eğilimi olan bir bireyde çevresel faktörlerin tetiklediği otoimmun bir süreç sonucunda gelişen progresif beta hücre harabiyeti ve bunun sonucunda ortaya çıkan total insülin eksikliği, metabolik dekompansasyondan sorumludur. Tedavide insülin temel rolü oynar. Tedavi edilmezse ketoasidozis, koma ve ölümle sonuçlanır (1-3, 24-28).

Tip 2 DM genellikle 30 yaşından sonra görülmekte ise de her yaşta ortaya çıkabilir. Tüm DM'li populasyonun yaklaşık %80-90'ını Tip 2 DM vakaları oluşturmaktadır. Tip 2 DM'liler için güçlü bir genetik temel mevcuttur. Vakaların yaklaşık %90'ında bu hastalıkla ilgili aile hikâyesi bulunmaktadır. Her nekadar Tip 2 DM'de ketonemi olma ihtimali olsa da, ketozisin olmaması Tip 1 ve Tip 2 DM'nin ayrımında primer özelliktir. Tip 2 DM'si olan hastaların yaklaşık %90'ı obezdir. Obezite android tipte ve viseral bölgededir. İnsidansı yaşla ve obezite ile birlikte artar. Karbohidrat toleransı normal olan obezler de dahil olmak üzere hiperinsülinemi ve insülin direnci bulunan obezlerde diyabet gelişme sıklığı %15 kadardır (1-3, 23, 26). Bununla birlikte, obez olmayan hastalarda da Tip 2 DM gelişebilir; bu durum daha çok yaşlı hastalarda gözlenir. Tablo 2 de Tip 1 ve Tip 2 DM'ye ait genel özellikler gösterilmiştir (24-28, 29).

DM'nin komplikasyonları akut ve kronik komplikasyonlar olarak bilinmektedir. Akut komplikasyonlar, diyabetik ketoasidoz, non-ketotik hiperozmolar koma, laktik asidoz koması ve hipoglisemi koması olarak bilinir. Kronik komplikasyonlar, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak incelenir. Retinopati, nefropati ve nöropati mikrovasküler hastalık sonucu oluşurken, büyük damarların aterosklerozunun hızlanması sonucu makrovasküler hastalık meydana gelir. Makrovasküler hastalık DM'li hastalarda mortalitenin başta gelen sebebi olması nedeniyle özellik arz etmektedir ve DM'li hastalardaki ölümlerin %50'sinin koroner arter hastalığından olduğu bildirilmektedir. Makrovasküler hastalık normal bireylere göre 2-4 kat daha fazla görülmektedir (1-3, 28-30).

Tablo 2. Tip 1 ve Tip 2 Diyabetin Genel Özellikleri

Özellik	Tip 1 DM	Tip 2 DM
Başlangıç yaşı	< 30yaş	> 30yaş
Obezite	Yok	Var (%90)
Ketoasidoz'a eğilim ve mutlak insulin ihtiyacı	Var	Yok
Endojen insülin sekresyonu	Yok	Plazma glukoz düzeyine oranla az ve insülin direnci var
İkizlerde görülme	< %50	> %90
Spesifik HLA-D antijenleri	Var	Yok
Tanıda adacık hücre antikorları	Var	Yok
Adacık hücre patolojisi	İnsülitis Beta hücre kaybı	Çok az amiloid deposu
Kronik dejeneratif komplikasyon (Retinopati-nefropati, periferik vasküler hastalık)	Seyri sırasında var	Başlangıçta var
Sulfanilürelere yanıt	Yok	Başlangıçta var

2.2. TİP 2 DİYABETES MELLİTUS

Tip 2 DM heterojen bir hastalık olup, karaciğer, kas ve yağ dokusunda insülin direnci ve beta hücre fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir (27, 29) İnsülinin periferik dokuları etkileme yeteneğindeki azalma olarak tanımlanan insülin direnci, Tip 2 DM için tipiktir. Beta hücre fonksiyon bozukluğu, insülin direncini kompanse etmek için yeterli insülin üretmede pankreasın yetersizliğidir. Tip 2 DM'nin patogenezinde başlangıçtaki bozukluğun insülin sekresyonundaki bozulma mı; yoksa insülin etkisindeki bozulma mı, yani insülin direnci mi olduğu yıllardır tartışılmaktadır. İnsülin direnci ve insülin sekresyonundaki temel moleküler defektler çevresel ve genetik faktörlerin kombinasyonundan kaynaklanmaktadır (1-3, 28-30).

Tip 2 DM'nin gelişiminde genetik faktörlerin katkısı bilinmektedir. Tip 2 DM'nin anne ve babası DM'li olan obezlerde görülme sıklığı, ailesinde ve kendisinde DM öyküsü bulunmayan obezlere göre 10 kat fazladır. Genetik olarak Tip 2 DM ile ilgili olarak pek çok gen bulunmasına rağmen bugüne kadar yalnızca %5 civarındaki

hastanın genetik kusuru kesin olarak belirlenmiştir. Sınırlı sayıda bilinen genler arasında insülin sekresyonu ve aktivitesi ile vücut ağırlığının düzenlenmesinde görev alan genler yer almaktadır (27).

1- Aday insülin sekresyon genleri: Bu genler arasında beta hücrelerinde eksprese olan amilin, glukagon-benzeri peptid-1 reseptörü, glukokinaz regülator proteini ve adacık-1 proteini gibi genler yer almaktadır. MODY'nin 7p kromozomundaki glukokinaz geni ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Glukozu, pankreas β hücresine girdikten sonra fosforilleyen glukokinaz, bir glukoz algılayıcısı olarak kabul edilmektedir. Glukozla uyarılan insülin salgısının eşiğini yükselten mutasyonlar, göreceli insülin yetmezliği oluşturmaktadır (27).

2- Aday insülin direnci genleri: İnsülin reseptöründe çok sayıda mutasyon olduğu bilinmesine rağmen, nadir tespit edilen bu mutasyonlarda aşırı insülin direnci görülmektedir. GLUT-4 ve glikojen sentazı kodlayan genler ile birlikte diğer potansiyel aday genlerde çok az mutasyon tanımlanmıştır (27).

3- Aday vücut ağırlığı geni: Adipoz dokuda eksprese olan bir genin (ob geni) protein ürünü olan leptinin vücut ağırlığı homeostazını ve enerji dengesini düzenleyen önemli bir sinyal faktörü olduğu düşünülmektedir. Ob geni ile insülin arasında potansiyel etkileşimler tanımlanmıştır. Beslenmenin ob geni ekpresyonu üzerindeki etkiside insülinin önemli bir mediatör olduğu ve bu nedenle obezite ile Tip 2 DM arasında genetik bir ilişki olabileceği öne sürülmüştür (27).

Diyet ve egzersiz gibi çevresel faktörler tip 2 DM nin patogenezinde önemli belirleyicilerdir. Fizik aktivite düzeyi ile Tip 2 DM prevalansı arasında ters bir ilişki mevcuttur. Tip 2 DM riski, günlük her 500 kkal-enerji harcanmasındaki artış için %6 azalır. Egzersizin koruyucu etkisinin mekanizmasının iskelet kası ve yağ dokusunda insüline duyarlılığın artması olduğu düşünülmektedir. Patogenezinde birden çok genetik faktör ile çevresel faktörler birlikte rol oynamaktadır (28).

Tip 2 DM'nin doğal seyrinde patogenetik olarak 3 faz vardır. Başlangıçtaki birinci fazda insülin rezistansının olmasına rağmen henüz plazma glukozu normaldir. Bu dönemde hiperinsülinemi vardır. İkinci fazda insülin rezistansı daha da ilerlemiştir ve insülin seviyesi yüksektir, ancak postprandial hiperglisemi başlamıştır. Üçüncü fazda ise insülin rezistansında değişiklik olmamasına rağmen insülin sekresyonu azalmaktadır ve açlık hiperglisemisi ile aşikâr DM ortaya çıkmaktadır. Tanı konulduğunda açlık

hiperglisemi ile birlikte insülin etkisinde ve sekresyonunda azalma mevcuttur (24, 28). Bugünkü bilgilerimize göre, Tip 2 DM'nin gelişimindeki mekanizmaların hangisinin primer olduğu kesin olarak bilinmemektedir.

Açlık ve postprandial koşuldaki insülin rezistansı nedeniyle oluşan insülin sekresyon artışı, beta hücresince karşılanamadığından hiperglisemi oluşmaktadır. Hiperglisemi, hem insülin rezistansını daha da arttırmakta, hem de glukotoksisite etkisi ile beta hücresini yetersiz hale getirmektedir. Sonuçta patogeneze ilişkin hangi hipotez geçerli olursa olsun Tip 2 DM'ye tanı konulduğunda erken ve geç faz insülin sekresyonu bozulmuş, bazal koşuldaki hepatik glukoz üretimi artmış ve belirgin insülin rezistansı vardır. Tedavi ile glukoz seviyesinin düşürülmesi hem insülin sekresyonunu, hem de insülin etkisini düzeltmekteyse de hiçbir defekt tamamen normale dönememektedir (24, 28).

2.3. DİYABETES MELLİTUS'UN TANISI

DM'nin tanısı hastalar için ömür boyu özellik arz eder. Eğer hastalarda susama hissi, sık idrara çıkma, açıklanamayan zayıflama, şuur bulanıklığı veya koma ve belirlenmiş glukozuri varsa, açlık hiperglisemisini göstermek yoluyla tanı konulabilir.

ADA 1997 yılında açlık kan glukozu sınırının, bozulmuş açlık glukozu için daha aşağıya çekilmesini önermiştir. ADA tarafından ileri sürülen öneriler, 1998 yılında WHO uzmanlar komitesi tarafından da gözden geçirilerek 1999 yılında WHO konsultasyon raporu yayınlanmıştır. Bütün veriler dikkate alınarak ADA 2004 yılında toplanarak DM ve bozulmuş glukoz regulasyonu için tanı kriterlerine son şeklini vermiştir. ADA 2004 kriterlerine göre; aşağıda belirtilen kriterlerden birisi ile DM tanısı konulabilmektedir. Bununla birlikte, daha sonraki bir gün bu 3 kriterden biriyle DM tanısı doğrulanmalıdır (1-3, 25, 29, 31-33).

-DM semptomları (susama, idrar miktarında artma, açıklanamayan kilo kaybı) ile birlikte rastgele ölçülen plazma glukozunun ≥ 200 mg/dL (11.1mmoL/L) olması

-Açlık plazma glukozunun en az 8 saatlik gece açlığını takiben ≥126 mg/dL (7mmoL/L) olması

-Standart 75 gr glukoz yüklemesi sonrası (OGTT) 2.saat değerinin ≥ 200 mg/dL (11.1mmoL/L) olması

Diğer yandan ADA 2004 kriterlerine göre bozulmuş açlık glukozu sınırı 110 mg /dL'den 100 mg /dL sınırına çekilmiştir. Buna göre bozulmuş açlık glukozu aralığı 100-

126 mg/dL (5.6-6.9 mmol/L)olarak belirlenmiştir. OGTT testinde ise 2. saatteki plazma glukoz düzeyinin; <140 mg/dL (7.8mmoL/L)'nin altında olması normal, 140-199 mg/dL (7.8-11.0 mmoL/L)arasında olması ise bozulmuş glukoz toleransı olarak tanımlanmıştır (1-3, 32). 45 yaşında semptomu olmayan her kişide veya artmış risk olanlarda daha genç yaşta açlık glukozu her 3 yılda bir izlenmelidir.

Açlık kan glukozu tanı koyduracak düzeylerde ise OGTT yapmaya gerek yoktur. Hastalar asemptomatik ise veya minimal semptom varsa ve açlık kan glukoz düzeyleri kesin tanı koyduracak seviyelerde değilse DM'yi doğrulamak veya reddetmek için OGTT yapılması ile birlikte, kan glukozu ile sıkı bir şekilde takip edilmesi gerekir. Glukoz ölçümü için venöz kan örneği tercih edilmelidir. Kapiller kandaki glukoz konsantrasyonu venöz kandan alınan örnekten açlıkta 5-10 mg/dL, toklukta 20 mg /dL daha yüksektir. Glukoz ölçümü tam kan örneklerinden yapılacağı zaman bekletilmeden yapılmalıdır. Eritrositler kan glukozunu kullandığından, kan glukoz düzeyi normalden daha düşük olarak çıkar (1-3, 28, 31, 32).

2.4. GLİKEPROTEİNLER

DM tanısı konulduktan ve uygun tedavi başladıktan sonra kan glukoz düzeyinin kontrolü gerekmektedir. Uzun dönem kan glukozunun izlenmesinde ve glisemik kontrolün değerlendirilmesinde glikeprotein konsantrasyonları oldukça yararlı olup, kan glukoz ölçümlerine ek olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunlar glikehemoglobinler; HbA_{1c} ve fruktozamindir. Serum fruktozamin düzeyi 2-3 haftalık glukoz kontrolünü yansıtırken, HbA_{1c} 2-3 aylık bir periyodu içine almaktadır. Bu bakımdan daha çok tercih edilmektedir.

Glikozilasyon, proteinlerin amino grubuna bir glukoz rezidüsünün non enzimatik olarak eklenmesi ile gerçekleşir. Proteinlerin amino grupları glukozun karbonil grubu ile kararsız aldiminleri (schiff bazı) oluşturur. Oluşan bu ürün Amadori reaksiyonu ile kararlı ketoaminlere (fruktozamin, HbA_{1c}) dönüşür (1-3).

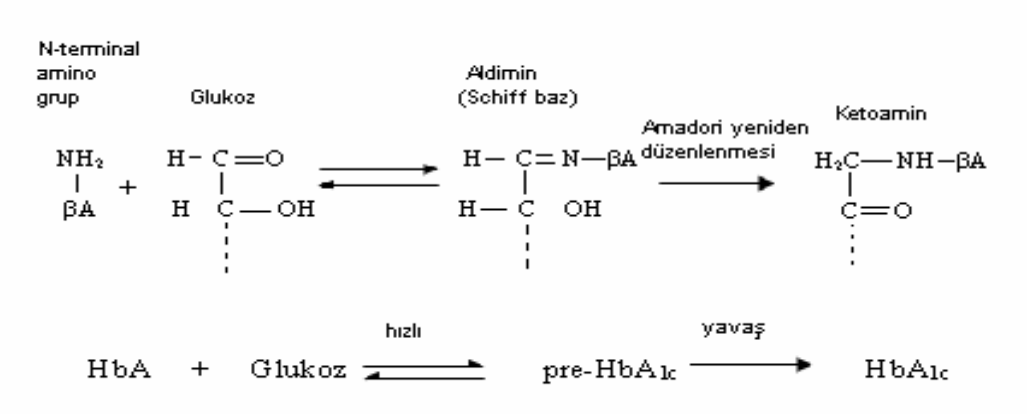
2.4.1. Glikehemoglobinler

Yetişkinlerde total hemoglobinin %97 sini oluşturan HbA (HbA_1) 2 alfa ve 2 beta olmak üzere 4 polipeptit zincirinden oluşur. HbA_1'in kromatografik analizi sonucu ortaya çıkan ve HbA_{1a}, HbA_{1b} ve HbA_{1c} olarak isimlendirilen minor hemoglobinlerden glikehemoglobinler diye söz edilir (Tablo 3). HbA_{1c}; glikeproteinin %80 ini oluşturmaktadır.

Tablo 3. Glikehemoglobinlerin Özellikleri

Hemoglobin Tipi	Özellikleri
HbA_{1a1}	Beta zincirinin N-terminal ucuna Fruktoz 1,6 Bifosfat'ın ekli olduğu HbA_1
HbA_{1a2}	Beta zincirinin N-terminal ucuna Glukoz 6 fosfat'ın ekli olduğu HbA_1
HbA_{1a}	HbA_{1a1} ve HbA_{1a2}'den oluşur
HbA_{1b}	Beta zincirinin N-terminal ucuna pirüvik asidin ekli olduğu HbA
HbA_{1c}	Beta zincirinin N-terminal ucundaki valine glukozun ekli olduğu HbA
Pre-HbA_{1c}	Aldimin (schiff baz): HbA_{1c}'nin sentezindeki kararsız ara ünit
HbA_1	HbA_{1a}, HbA_{1b} ve HbA_{1c} den oluşur
Total glikehemoglobin	HbA_{1c} ve diğer hemoglobinlerden oluşur

HbA_{1c} beta zincirinin N- terminal ucundaki valin aminoasidine glukoz eklenmesi ile kararsız bir schiff bazı (Aldimin, pre-HbA_{1c}) oluşur. Meydana gelen bu shiff bazı parçalanabilir veya Amadori reaksiyonuna girerek kararlı ketoamin, HbA_{1c} oluşturur. (Şekil 1).



Şekil 1. HbA_{1c} Sentezi

Glikasyon, beta zincirinde olduğu gibi, aynı zamanda lizin kalıntıları veya alfa zinciri gibi başka yerlerde de oluşabilir (1-3).

GHb sentezi geri dönüşümsüzdür ve GHb düzeyi eritrositlerin yaşam süresi ve glukoz konsantrasyonuna bağımlıdır. GHb oluşum oranı kandaki glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Ancak plazma glukoz konsantrasyonunun zamana bağlı olarak GHb oluşumuna katkısı değişmektedir. Son dönemlerdeki glukoz değerleri önceki değerlere göre daha fazla katkıda bulunur. Şöyle ki; son bir aydaki plazma glukoz düzeylerinin HbA_{1c} oluşumuna katkısı %50 olmasına rağmen, daha önceki (60-120 gün). günlerdeki plazma glukoz konsantrasyonlarının HbA_{1c} oluşumuna katkısı sadece %25'tir. Kan glukozundaki ani değişiklik başlangıçtaki ilk iki ayda HbA_{1c} düzeyinde hızlı bir değişmeye neden olur (1). Takibeden 1 ay içerisinde kan glukozundaki değişmelerin HbA_{1c} oluşumuna katkısı daha yavaş olmaktadır. HbA_{1c}'nin yarılanma ömrü 35 gündür.

HbA_{1c}' nin yorumlanması eritrosit ömrünün normal (120 gün) olmasına bağlıdır. Hemolitik hastalık veya eritrosit ömrünü kısaltan hastalıklar GHb düzeyinde önemli ölçüde azalmaya neden olur. Demir eksikliği olan vakalarda yaşlı eritositlerin yüksek oranda olmasından dolayı HbA_{1c} düzeyi normalden yüksek bulunabilir. Yine HbF, HbS, HbC gibi varyant hemoglobinlerin GHb üzerine olan etkileri hemoglobinopati tipine ve analiz metoduna göre değişkenlik gösterir. Bu vakalarda GHb düzeyleri düşük veya yüksek çıkabilir.

GHb oluşum hızı kandaki glukoz konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili olduğundan total kanda ölçülen GHb düzeyleri önceki 6-8 hafta süresindeki toplu glukoz düzeylerini temsil eder. Bu durum serum glukoz kontrolünün değerlendirilmesinde çok önemli yararlar sağlamaktadır. Çünkü GHb düzeyleri egzersiz ve beslenmeden ve gün içi veya günden güne olan glukoz konsantrasyonlarındaki oynamalardan etkilenmez. HbA_{1c}, özellikle DM'li vakalarda uzun dönemde kan glukozunun değerlendirilmesi ve komplikasyonların gelişimindeki riskin belirlenmesinde kullanılan indeks bir parametredir. DCCT HbA_{1c} düzeyi ile DM'deki komplikasyon riski arasında doğrudan bir ilişki olduğunu vurgulamaktadır (1, 25). HbA_{1c} düzeyindeki %10 luk azalma komplikasyon riskinde %45 oranında bir azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenle DM tedavisinde primer temel hedefin normale yakın kan glukoz düzeyi ile birlikte HbA_{1c} düzeyinin en azından %7 mg/dL'nin altında tutulması olmalıdır (1, 24, 25).

HbA_{1c}'nin saptanmasında değişik metodlar kullanılmaktadır. İyon değiştirme kromatografisi, HPLC, izoelektrik fokuslama yöntemleri yük farklılığı tekniği ile affinite kromatografisi ve immunassay yöntemleri ile yapısal farklılıkların saptanması veya fotometri ve spektrofotometri yöntemleri ile kimyasal analize dayalı GHb ayırımı yapılmaktadır. Tüm bu metotların hangisi tercih edilirse edilsin sonuçlar total hemoglobin değerinin yüzdesi olarak belirtilir (1, 28, 30-36).

2.5. KEMİK DOKU

Normal kemik dokusu, minerallerden oluşan inorganik matriks, organik matriks, hücreler ve sudan oluşur. Kemik hücrelerinin iki ana tipi olan osteoklast ve osteoblastlar kemiğin yapım ve yıkımından sorumludur. Osteoblastik ve osteoklastik aktivite kemik bileşiminin devamlılığını sağlayan bir denge oluşturmaktadır. Büyümenin durmasından sonra kemiklerin yeniden sentezi ve yıkımı yaşam boyunca sürekli bir biçimde bir denge halinde devam etmektedir (4, 5). Herhangi bir nedenle kemik yapımı, kemik yıkımını karşılayamaz veya denge yıkım lehine bozulursa kemik dokuda kayıp (osteopeni veya osteoporoz) ortaya çıkmaktadır (4, 5, 37).

Kemik dokusu vücuttaki kalsiyumun %99'unu, fosfatın ise %88'ini bulunduran en büyük mineral deposudur. Kemiğin mineral kısmı kemik kuru ağırlığının yaklaşık %65'ini meydana getirir ve çoğunlukla hidroksiapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) kristalleri tarafından oluşturulur. Bu kristaller kollagen liflerinin içlerinde ve aralarında bulunurlar, iğne veya çubuk şeklinde organize olurlar (37).

Kemik kuru ağırlığının %35'ini organik matriks meydana getirir. Organik matriksin %90'ını kollagen oluştururken, kalan kısım kollagen dışı çeşitli proteinlerden meydana gelir (Tablo 4).

Tablo 4. Kemik Elemanları

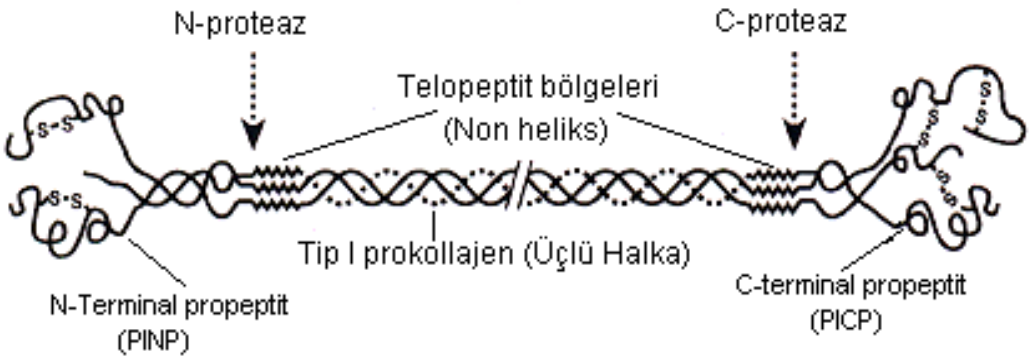
Mineraller	%65	Hidroksiapatit
Matriks	%35	Kollagen (%90), Non-kollagen proteinler: Proteoglikanlar, OK, osteonektin, fibronektin, gamma-karboksile proteinler (gla), glikoproteinler, diğerleri (büyüme faktörleri, sitokinler, kemik yapım proteinleri, lipidler).

2.5.1 Kemik Matriksi

Kemik matriksini oluşturan kollajenin %85-90'ını Tip I kollajen oluşturmakla birlikte, matriks yapısına diğer kollajen tipleri de (Tip III, V, XI, XIII kollajenler) katılmaktadır.

Tip I kollajen, kemik matriksi dışında ligamentler, tendonlar, fasia ve deri'de bulunurken, tip II kollagen kıkırdak dokuda egemendir. Tip III kollagen ise kemik matriksi, tendonlar ve arterlerde bulunmaktadır. Dolayısıyla kollagen yıkım ürünleri hakkında bir değerlendirme yapılırken kollagen tipi ve egemen olduğu doku veya dokular dikkate alınmalıdır (4, 5, 37- 44).

Kollajenin bir halata benzer üç boyutlu karmaşık yapısı kemiğin gerilmeye karşı dayanma gücünü oluşturur (Şekil 2). Tip I kollajen, osteoblastlarca sentezlenir ve iki alfa I ve bir alfa II polipeptit zincirlerinin karakteristik olarak iç içe girmesi sonucunda oluşan trimetrik bir proteindir. Her bir polipeptit zincirinin sentezi, her iki ucunda N (amino) ve C (karboksil) terminal ekstansiyon propeptitleri bulunan tip I prokollagen propeptiti olarak başlar. Sonra bir dizi hücre içi ve hücre dışı post-translasyonel işlem gerçekleşir ve kemik dokunun yapısına giren matür kollajen sentezlenir.

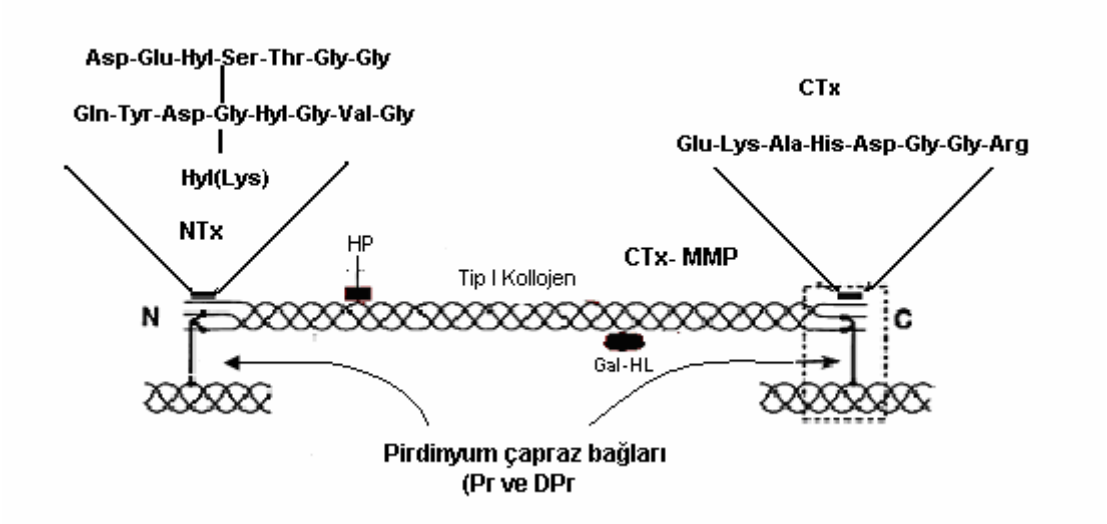


Şekil 2. Tip I prokollajenden kollajen oluşumu ve amino (N) ve karboksi (C) terminal propeptitlerin şematik görünümü

Kollajen sentezinin ilk aşamasında, hücre içindeki prokollagen propeptiti ortamda bulunan çok sayıdaki pirolin ve lizin rezidülerince hidroksilasyona uğrar ve hidroksiprolin (HP) ve hidroksilizin (HL) oluşumu sağlanır. Oluşan hidroksilizin rezidüleri glikozilasyona uğrar ve galaktozil-hidroksilizil (Gal-HL) veya glikozil-galaktozil-hidroksilizil rezidüleri oluşur.

Sonra meydana gelen üç pro-alfa zinciri, bir kollagen fibrili meydan getirmek üzere bir araya gelir. Böylece, hem zincirin kendi içinde ve hem de zincirler arasında disulfür bağlarının oluşması ile polipeptit zincirlerinin oluşturduğu prokollajenin trimetrik yapısı kısmen kararlı hale gelir. Daha sonra hücre dışına salınan tip I prokollagen propeptitinde matur kollajen oluşuncaya dek bir takım değişiklikler olur. Önce, Tip I kollajenin amino terminal (PINP) ve karboksi terminal propeptit (PICP) yapıları peptidazların etkisi ile ayrılır. Tip I prokollajenin amino terminal ve karboksi terminal uçlarında heliks yapısı bulundurmayan yapılar, tip I prokollagenin N-telopeptit ve C-telopeptit bölgeleri olarak adlandırılırlar (Şekil 2).

Hücre dışına salınan ve immatur olan prokollagen fibrillerinin kemiğin gerilmeye karşı dayanma gücüne yeterli katkıyı sağlayabilmesi için, kollajen moleküllerinin intra ve inter moleküler çapraz bağlar ile daha sıkı bağlanarak daha kararlı bir hale dönüşmesi gerekir. Spesifik lizin ve hidroksilizin (HL)'nin yan zincirleri üzerine lizil oksidaz enziminin etkisi ile gerçekleşen bir reaksiyon sonucunda çapraz bağlar oluşur. Farklı prokollajen moleküllerinden üç HL rezidü yan zinciri sıkıca bir araya gelerek bir piridinyum halkasını oluşturur ve sonuçta üç farklı kollajen molekülünü biribirine bağlayan Pr çapraz bağları oluşur (hidroksilizil, Pr). DPr'nin çapraz bağları ise bir lizin yan zinciri ile iki HL'nin yan zincirinin birleşmesi sonucu oluşur (lizilpridinolin). Böylece, ekstraselüler matriksi oluşturan kollajen molekülleri maturasyonunu tamamlayarak stabil hale gelmiş olur ve matur kollajen fibrilleri karakteristik çizgilenme paterni oluşturacak şekilde kayarak yerleşirler. Moleküller arasındaki açıklıklara ise hidroksiapatit kristalleri çöker (4, 5, 37). Şekil 3'te ise hücre dışına salınarak çapraz bağlar ile kararlı hale gelmiş bir kollajenin moleküler yapısı gösterilmiştir.



Şekil 3. Propeptitler ayrıldıktan sonra tip I kollajen molekülleri çapraz bağlar ile daha stabil hale gelirler (pridinyum çapraz bağları ve N ve C-telopeptit (NTx, CTx) bölgeleri.

Kemik matriksinin %10-15'ini ise kollajen dışı proteinler oluşturur (Tablo 7). Bunların önemli bir kısmı osteoblastlar tarafından sentez edilir. Genel olarak işlevleri çok iyi bilinmese de hücre yapışması, kalsiyum bağlanması, kemik döngüsü, kollajen fibril oluşması gibi fonksiyonları vardır (44-55).

Kemik büyümesi, kemik yapımı ve yıkımı kalsiyum, fosfat ve magnezyum metabolizması ve başlıca paratiroid hormon (PTH) ve 1,25 dihidroksi vitamin D ($1,25[OH]_2D$) olmak üzere çeşitli hormonlar tarafından düzenlenir. Ayrıca tiroid hormonları, östrojenler, androjenler, kortizol, insülin, büyüme hormonu, insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I ve IGF-II) gibi birçok hormon ve faktörler kemiğin yıkımı ve yapımında rol oynar (39-42).

2.5.2. Paratiroid Hormon

PTH; 115 aa'lik preprohormon olarak paratiroid bezinde sentezlenir. N-terminal 25 aa'lık kısmı hidrofobiktir. Sentezin tamamlanmasından sonra, hücre içindeyken enzimatik olarak Katepsin B ile yıkılır ve geriye kalan kısım 90 aa'dan oluşan prohormon, proPTH adını alır. ProPTH'nın golgi aparatusuna transportu esnasında, oldukça bazik olan N-terminal hekzapeptit uzantısı ayrılarak 84 aa'dan oluşan ve 9425 kDa moleküler ağırlığında olan aktif PTH (iPTH) meydana gelir. Bu dönüşüm enzimatik olarak 15-20 dakika içerisinde gerçekleşir. PTH dolaşımda iPTH, N-terminal fragman, C-terminal fragman olmak üzere üç şekilde bulunur. Bunlardan sadece iPTH ve N-terminal fragman biyolojik olarak aktiftir.

PTH sekresyonunun başlıca düzenleyicisi serum serbest kalsiyum düzeyidir. Plazma serbest kalsiyumdaki azalma ve serum fosfatındaki artmaya cevap olarak sekrete edilir. Hiperkalsemi PTH sekresyonunu, kalsitriol ise paratiroid bezindeki D vitamini reseptörlerine bağlanarak PTH sentezini baskılar. PTH sekresyonu magnezyum düzeyine bağımlıdır. Ilımlı hipomagnezemi PTH salgısını uyarır. Buna karşılık ciddi hipomagezemi PTH salgısını azaltır. Katekolaminler, β adrenerjik reseptörle bağlanarak PTH sekresyonunu artırır.

PTH membran reseptörüne bağlanarak adenilat siklazı uyarır. Bu da hücre içinde cAMP düzeyi artışına, spesifik hücre içi proteinlerin fosforilasyonu ve sonuçta spesifik genlerin ve enzimlerin aktivasyonuna yol açarak hormonun biyolojik etkisini düzenler. PTH'nın başlıca rolü kalsiyum metabolizması üzerinedir. PTH için hedef doku kemik ve böbrektir.

PTH'nın kemik üzerindeki etkileri farklıdır. Maruz kalma süresi ve PTH konsantrasyonuna bağlı olarak kemik oluşumu veya yıkımını artırabilir. PTH direkt ve indirekt olarak osteoblast veya osteoklastların sayısı ve aktivitesini değiştirerek etkisini gerçekleştirir. Yüksek PTH düzeyleri ve kronik maruziyet osteoklast sayısını artırarak kemiğin organik ve inorganik fazını kapsayan çözünmeyi uyarır. Kemikten kalsiyum ve fosfat çözülümü artar. PTH osteoklastik kollejenaz aktivitesini ve lizozomal hidrolazların salınımını uyarır, bu enzimler kemiğin organik matriksini parçalar, hidroksiprolin ve hidroksilizin üriner atılımılını artırır (4, 5, 39-42).

2.5.3. Vitamin D

D vitaminleri hormon ve benzeri etkileri olan bir grup steroldür. Güneş ışınlarının etkisi ile bitkilerde ergosterolden ergokalsiferol (vitamin D_2) ve hayvansal dokularda 7-dehidrokolesterolden kolekalsiferol (vitamin D_3) oluşmaktadır. Vitamin D olarak alt işaret olmadan yazıldığında iki tür birden kastedilir.

D_2 ve D_3 vitaminleri inaktiftirler ve karaciğer ile böbrekte meydana gelen iki hidroksilasyon ile aktive edilmeleri gerekir. Vitamin D, karaciğerde 25-hidroksilaz ile 25OHD'ye, böbrek ve plasentada ise 1-hidroksilaz ile $1,25(OH)_2D$'ye metabolize olur. 25OHD'nin yarı ömrü 2-3 hafta kadardır. 25OHD, biyolojik olarak daha aktif olan, ancak yarı ömrü yaklaşık 4-6 saat olan $1,25(OH)_2D$'nin depo formu gibidir.

Dolaşımdaki $1,25(OH)_2D$ konsantrasyonları başlıca PTH ve fosfat tarafından düzenlenmektedir. PTH, $1,25(OH)_2D$'nin sentezini artırır. Fosfat kısıtlanması ve

hipofosfatemi de 1,25$(OH)_2$D'nin yapımını artırır. Hipokalsemi PTH salımını uyararak dolaylı olarak 1,25$(OH)_2$D'yi artırır.

Vitamin D, 25OHD ve 1,25$(OH)_2$D dolaşımda vitamin D-bağlayıcı proteinlere (DBP) bağlı halde bulunur. Dolaşımda en fazla bulunan form 25OHD'dir ve konsantrasyonu 1,25$(OH)_2$D'nin yaklaşık 1000 katı kadardır. 25OHD'nin sadece % 0.003'ü ve 1,25$(OH)_2$D'nin ise % 0.4'ü plazmada serbest olarak bulunur.

Vücudaki vitamin D'nin başlıca kaynakları; güneş ışığına maruziyet (UV), karaciğer, böbrekler yolu ile enzimatik sentezi ve vücuda alınan besinler yolu ile sağlanabilimektedir.

1,25$(OH)_2$D duodenumda kalsiyum absorbsiyonunu, ileumda ise fosfat absorbsiyonunu uyararak serum kalsiyum ve fosfat vücuddaki normal düzeylerinin devamlılığını sağlar. 1,25$(OH)_2$D aynı zamanda paratiroid bezleri üzerine dirket etki ile PTH'nın sentezi ve salınımını inhibe eder. Hücresel etkilerini, nükleusta bulunan spesifik vitamin D reseptörlerine bağlanarak gösterir. Reseptörler sadece kalsiyum fosfat metabolizmasının olduğu dokularda değil, aynı zamanda çok çeşitli normal dokular ve tümörlerde de bulunur. Kemikte, kan konsantrasyonu yüksek olduğunda 1,25$(OH)_2$D ve PTH kemik yıkımını artırır, kalsiyum ve fosfat serbestleşmesini sağlar. Vitamin D' nin durumu en iyi 25OHD ölçümü ile saptanır (4, 39-45).

2.5.4. Kemik Döngüsünün Değerlendirilmesi

Kemik döngüsünün değerlendirilmesinde radioizotop kinetik çalışmalar altın standart olarak kabul edilmektedir. Tetrasiklin ile işaretlenmiş kemik dokunun histomorfometrik incelenmesi ile de kemik metabolizması hakkında dinamik bilgiler sağlanabilir. Fakat, bu girişimler zaman alıcı olup, rutin klinik kullanım için uygun değildir. Bu nedenle, kemik döngüsüne ait bozuklukların saptanmasında daha pratik, invaziv olmayan ve spesifik ölçüm metotları geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunların arasında, özellikle kemik yapım ve yıkımı sırasında dolaşıma salınan ve serum ve/veya idrarda ölçümleri yapılabilen biyokimyasal parametreler özel öneme sahiptirler (4, 5, 54-62).

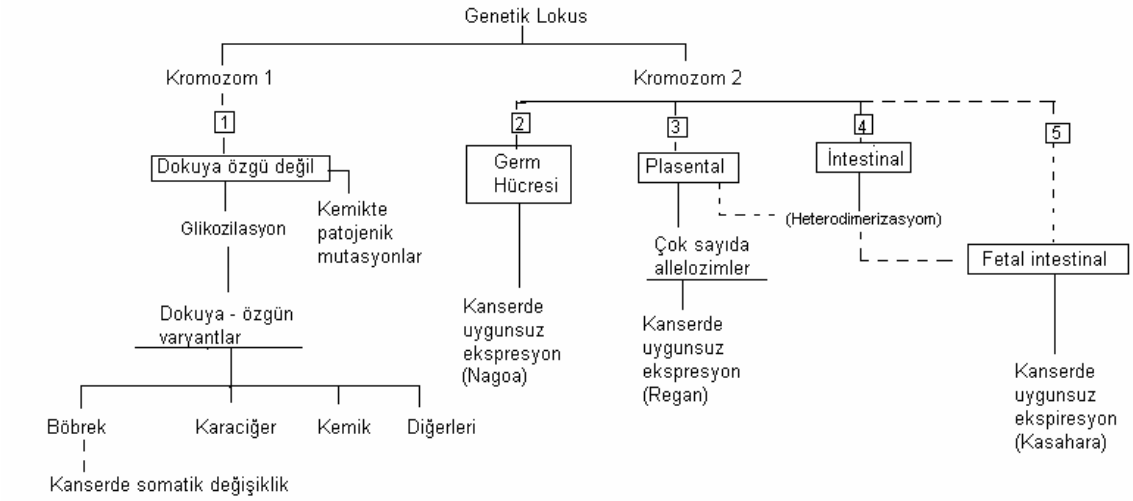
2.5.5. Kemik Yapım Belirteçleri

Tablo 5. Kemik Yapım Parametreleri

Parametre	Doku	Örnek	Özellikler
K-ALP(U/L)	Kemik	Serum	Osteoblastik membran enzimi, Matriks mineralizayonu, Bazı durumlarda karaciğer enzimleri ile %20 çapraz reaksiyon gösterebilir.
OK(ng /mlL)	Kemik,trombosit	Serum	Osteoblastlar tarafından bir matriks proteini olarak yapılır, Dolaşımda farklı immun reaktif formlarda bulunur, Bir kısmı kemik yıkımından köken alabilir.
PICP (U/L)	Kemik, yumuşak doku, deri	Serum	Kollajenin hücre dışındaki final sentez aşamasında salınır. Osteoblast ve fibroblastların spesifik ürünüdür.
PINP (U/L)	Kemik,yumuşak doku, deri	Serum	PICP ile aynı özellikler, Kemik dokunun hücre dışı matriksi ile kısmen birleşiktir.

2.5.5.1. Alkalen Fosfataz (EC 3.1.3.1)

Çok sayıda doğal ve sentetik substratın alkali hidrolizini katalizler. Serum total ALP havuzunda karaciğer, kemik (osteoblastlar), barsak epiteli, böbrek tübülleri, plasenta gibi çeşitli dokulardan kaynaklanan farklı izoenzimleri mevcuttur (4, 5, 54, 55, 61).



Şekil 4 ALP'nin doku dağılımına göre izoenzimleri.

Karaciğer fonksiyonları normal olan erişkinlerde serum total ALP'nin yaklaşık %50'si kemikten kaynaklanırken, çocuk ve adolesanlarda iskelet büyümesinden dolayı dolaşan ALP'nin yaklaşık %90'ını K-ALP izoenzimi oluşturmaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda kemik döngüsünün değerlendirilmesinde total ALP ölçümünden ziyade, K-ALP ölçümü tercih edilmektedir. Yarılanma ömrü (1-2 gün) uzun olup, diurnal varyasyondan önemli ölçüde etkilenmez (4, 5).

Serum K-ALP düzeyleri her iki cinste süt çocukluğu döneminde yüksek olup, daha sonra pubertal döneme kadar büyüme hızı ile orantılı olarak artma gösterir. Pubertal dönemde, kız çocuklarında (11-12 yaş) erkek çocuklara (13-14 yaş) göre iki yıl erken olmak üzere zirve düzeylere ulaşır. Kızlarda menarş sonrası olmak üzere geç pubertal dönemden itibaren azalmaya başlar. Pubertal kızlarda, erişkinlere göre K-ALP 10 kat, total ALP 5 kat daha yüksek bulunmuştur. Erişkin total ALP düzeylerine kızlarda 15, erkeklerde 18 yaşında erişilmektedir (5).

Paget hastalığı, yüksek döngülü osteoporosis, hipertirodizm, hiperparatirodizm, osteomalasi, rikets, renal osteodistrofi, osteolitik metastazlar, akromegali gibi durumlarda serum K-ALP düzeylerinde artma saptanır.

ALP aktivitesi kolorimetrik, elektroforetik, daha çok izoenzim ölçümleri için ise; ısı-inaktivasyonu, üre inhibisyonu, kimyasal inhibisyon ve immunolojik yöntemler kullanılmaktadır (4).

2.5.5.2 Osteokalsin (OK)

OK osteoblastlar, odontoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından sentez edilen ve 49 aminoasitten oluşan, kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. OK yapısında üç adet gammakarboksi glutamik asit (Gla) rezidüsü bulunmaktadır. Vitamin D, OK üretimini artırırken, vitamin K, gamma glutamil karboksilasyonunu artırır. Karboksilasyon, kalsiyum bağlanması için esas olup, karboksilasyonun derecesi aynı zamanda immun reaktiviteyi de belirler. Yetersiz karboksile olan OK formlarının erişkinlerde yüksek kırık riski ile birlikte olduğu bildirilmiştir (4, 5, 54, 55, 61).

OK kemik dokudaki non-kollajen protein matriksin %15'ini oluşturur (Tablo 4). Kemik yapımı sırasında sentezlenen OK'in ancak %10-30'u dolaşıma salınır. Diğer miktar kemik matriksinde kalır. Dolayısıyla, serumda ölçülen OK düzeyi, genellikle osteoblastlarca yeni kemik yapımı için sentezlenen OK düzeyini yansıtır. Yarılanma

ömrü (5-20 dakika) kısa olup, böbrekler tarafından atılır. Bu nedenle, değerlendirme yapılırken böbrek fonksiyonları dikkate alınmalıdır (4, 54, 55, 61).

Serum OK düzeyleri çocuklarda erişkinlere göre, erkeklerde kızlara göre yüksek olup, boy ve büyüme hızı ile korelasyon gösterir. Serum OK düzeyleri her iki cinste pubertal dönemde pre ve post pubertal değerlere göre daha yüksek bulunur. Serum OK düzeyleri sirkadiyen ritmine bağlı olarak sabahları en yüksek düzeylere ulaşır (saat 05.00 ten itibaren) ve genellikle besin alımından etkilenmez. Kemik yapımının göstergesi olarak OK'in sensitivite ve spesifitesi yüksek olmasına rağmen serum ALP düzeyi ile zayıf korelasyon gösterir (4).

Kemik yapımında artış ile seyreden hiperparatiroidizm, paget hastalığı, yüksek döngülü osteoporoz, hipertiroidizm, renal osteodistrofi, kemik kırıkları ve akromegali gibi hastalıklarda serum OK düzeylerinde artma saptanır. Bununla birlikte, hipoparatiroidizm, hipotirodizm, büyüme hormonu eksikliği, östrojen replasman tedavisi, glukokortikoid tedavisi, bifosfonat ve kalsitonin tedavisi ile OK düzeylerinde azalma olur (4, 5).

Bazı durumlarda ise serum OK düzeylerinin yüksek saptanması kemik yapımının bir göstergesi olmayabilir. Bu durumlarda böbrek fonksiyonlarında bozulma, yatak istirahati, aktif vitamin D tedavisi akla getirilmelidir (4, 5, 54, 55, 61).

Serum OK tayininde, radyoimmünoassay (RİA ve İRMA) ve Kemiluminesans immun ölçüm yöntemleri kullanılmaktadır (4).

2.5.5.3. Tip I Prokollajenin Karboksiterminal Propeptidi (PICP) ve Aminoterminal Propeptidi (PINP)

Kemik yapımını değerlendiren testlerden bir diğeri ise serum tip I prokollajen propeptitlerinin değerlendirilmesidir. Tip I kollajenin hücre dışı sentez sonrası modifikasyona spesifik peptidazlar aracılığı ile uğrayarak tip I prokollajenden PINP ve PICP ekstansiyon propeptitleri ayrılırlar. Fakat, tip I kollajen büyük ölçüde kemik dokuda bulunsa da, tendon, gingiva, barsak, kalp kapakcığı, büyük damarlar ve yumuşak doku gibi organlarda da bulunabilmektedir. Bu nedenle, kemik yapımının değerlendirilmesinde serum K-ALP ve OK kadar duyarlı ve özgün değildirler (4). Diğer yandan, PICP ve PINP yeni sentezlenen kollajenin durumu hakkında fikir verir. Her ikisi de karaciğerde metabolize edilir. Bazı araştırıcılar kemik döngüsünün izlenmesinde PINP'nin PICP'ne göre daha spesifik olduğunu savunmakla birlikte, rutin kullanımda

PINP ile ilgili fazla bir deneyimin olmadığı bildirilmektedir. PICP'nin de kemik yapımı ile iyi bir korelasyon gösterdiği, kemik histomorfometrik ve kalsiyum kinetik çalışmaları ile kıyaslanarak gösterilmiştir(4, 5, 61-64). PICP ve PINP'in her ikisi de sirkadyen ritim gösterir. Zirve düzeylere sabahın erken saatlerinde rastlanır ve besin alımından etkilenmezler.

Serum düzeylerinin tayininde RİA ve bir EİA metodu olan ELİSA yöntem gibi yöntemler sık olarak kullanılmaktadır (4, 5, 54, 55, 61-64).

2.5.6. Kemik Yıkım Belirteçleri

Tablo 5'te kemik yıkım parametreleri özet halinde gösterilmiştir. TRAP hariç, kemik yıkım parametrelerinin hemen hepsi kollajen kaynaklıdır. Günümüzde kemik yıkım parametreleri sadece idrarla sınırlı olmayıp serumda da çalışılabilmektedir. Bununla birlikte, söz konusu parametrelerin serumdaki ölçümleri konusunda tecrübe birikimi yeterli değildir. Diğer yandan, idrarda ölçüm yapılacaksa idrarın elde edilmesinde de (24 saatlik idrarın toplanması veya sabah ilk veya iki saatlik idrarın alınması vb.) bir takım pratik olmayan sorunlarla karşılaşılmaktadır.

Sonuçların, vücut ağırlığı, vücut yüzey alanı veya kreatinin'ne göre düzeltilmesi yanılma payını azaltır. İdrardaki ölçümler kreatinin atılımına göre düzeltilecek ise bekletilmiş idrar, beslenme, büyüme ve bazı ilaçların (glukokortikoidler, simetidin, sefalosporinler) kullanılması idrar kreatinin düzeyini etkileyebileceği akılda tutulmalıdır (4, 5, 61-64).

Tablo 6. Kemik yıkım parametreleri

Parametre	**Doku**	**Örnek**	**Özellikler**
Pr çapraz bağları: Total Pr Serbest Pr	Kemik kartilaj, tendon, kan damarları	Serum İdrar	Matur kollajende bulunan indirgenemeyen çapraz bağlardır, En yüksek oranda kartilaj ve kemikte bulunur.
DPr çapraz bağları: Total DPr Serbest DPr	Kemik, dentin	Serum İdrar	Matur kollajende bulunan indirgenemeyen çapraz bağlardır, Kemik doku için çok yüksek oranda spesifite gösterir.
NTx	TipI kollajenin bulunduğu tüm dokular	Serum İdrar	En fazla tip I kollajen'de bulunur. Matur çapraz bağlı kollajen degradasyon ürünlerinden sadece peptit formlarını ölçer.
ICTP, Ctx-MMP	Kemik, Deri	Serum	En fazla tip I kollajen'de bulunur. Yeni sentez edilen kollajen kökenlidir
Tartarat rezistans asit fosfataz	Kemik, Kan hücreleri (Eritrosit, trombosit)	Plazma, Serum	5b formu osteoklastlar için spesifiktir. Osteoklastların fırçamsı yüzeylerinde ve rezorptif yüzey sekresyonlarında bulunur.

2.5.6.1 Kollajenin Piridinyum Çapraz Bağları

Hücre dışına salınan immatur kollajenin daha stabil hale dönüşmesi veya gerilmeye karşı dayanma gücünün artması için kollajen fibrillerinin intra ve inter moleküler çapraz ve kovalent bağlar ile adeta örülmesi gerekmektedir. Kemik matriksini oluşturan kollagen temel olarak iki tip indirgenemeyen pridinyum çapraz bağı bulundurur. Bunlar, DPr ve Pr çapraz bağlarıdır. Kemik dokudaki Pr konsantrasyon'u, DPr'e göre daha yüksek olmakla birlikte, Pr aynı zamanda diğer kollajen içeren bağ dokularında da bulunmaktadır. DPr ise daha çok kemik dokuda egemendir ve kemik doku için daha özgün bir yıkım parametresi olarak kabul edilir.

Herne kadar Pr ve DPr kemik doku dışındaki diğer dokularda bulunsalar da major kaynak iskelet sistemidir ve bugün için kemik yıkımının değerlendirilmesinde en iyi indeksler arasında değerlendirilmektedirler.

Pr ve DPr çapraz bağları kollajenin proteolitik yıkımı sonucunda dolaşıma salınır ve idrarla atılırlar. Çocuklarda serum düzeylerinin %16-18'ini serbest formlar oluştururken, %80'den fazlasını peptit-bağlı formlar oluşturur. İdrarda ise %40'ını

serbest formlar oluştururken, %60'ını peptit-bağlı formlar oluşturmaktadır. Diyetle alımdan etkilenmemeleri, kemik histomorfometrik ve kalsiyum kinetik çalışmaları ile iyi korelasyon göstermeleri pridinyum çapraz bağlarının hidroksipirolin'e olan üstünlükleridir (61-64).

Yapılan çalışmalarda serbest ve bağlı formların biribiri ile iyi korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Kemik döngüsü diurnal varyasyon gösterdiğinden dolayı idrar düzeyleri sabahları en yüksek, akşam geç saatlerde ise en düşük konsantrasyonlarda saptanır. Sonuçlar idrar kreatinine göre düzeltilmelidir (4, 5, 54, 55, 61-64).

Serum ve idrar düzeylerinin saptanmasında HPLC ve direk immun ölçüm yöntemleri sık olarak kullanılmaktadır. Özellikle serbest formların saptanmasında ELİSA, peptit bağlı formların saptanmasında ise HPLC kullanılmaktadır. Herne kadar bazı araştırıcılar tarafından idrarda serbest formların saptanması daha avantajlı bulunmuş ise de bu saptama tüm vakalar için uygulanabilir bulunmamıştır (55, 61-64).

2.5.6.2. **Çapraz Bağlı Kollajen Telopeptitleri**

Bu parametreler başlıca tip I kollajenin çapraz bağlı bölgeleri ile birlikte amino ve karboksiterminal telopeptitleri olmak üzere spesifik moleküler bölgeleri içermektedir. Kemik döngüsü sırasında kollajen yıkımına bağlı olarak farklı özelliklerde küçük çapraz bağlı telopeptit fragmanları (NTx, CTx, ICTP, Crosslaps) dolaşıma salınırlar.

Çapraz bağlı tip I kollajen telopeptitleri ve diğer yıkım ürünlerinin serum ve idrar düzeylerinin saptanmasında RİA, EİA, ELİSA gibi metotlar kullanılmaktadır. Tip I kollajen molekülünün NTx ve CTx, ICTP telopeptitlerinden köken alan peptit fragmanları üzerinde immunreaktif epitoplar bulunur. Bu epitoplar ölçüm metotlarının işleyişinde temel fonksiyonu yerine getirirler. Bugün için NTx ve CTx ilgili epitoplar serum ve idrarda, ICTP ile ilgili olanlar ise sadece serumda saptanabilmektedir (4, 49).
Tip I Kollajenin çapraz bağlı NTx ve Tip I kollajenin N-telopeptit bölgesindeki özel bir peptit sekansı bulunduran matur kollajen zincirleri (alfa 2) ile çapraz bağlı bulunan diğer matur kollajen zincirlerine karşı gelişen antikorun ilgili epitopu tanıması ölçüm metodunun esasını oluşturur. NTx tayininde en sık ELİSA ölçüm yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemle çapraz bağ bulundurmayan PINP gibi prekürsör peptitler ve çapraz bağların serbest formları değerlendirilemez. N-telopeptitler, içerdikleri çapraz bağların özelliğinden dolayı, kemik dokudaki diğer çapraz bağlı peptitlere (C-

telopeptitler) göre kemik doku için daha yüksek özgünlük gösterirler. Yine, DPr çapraz bağlarının üçte ikisi N-telopeptit bölgesinde bulunurken, sadece üçte biri C-telopeptit bölgesinde bulunmaktadır (4, 5, 61-64).

2.5.6.3.Tip I Kollajenin Çapraz Bağlı C-telopeptitleri (CrossLaps)

Günümüzde "Crosslaps" ölçümünde ELİSA ve EİA metotları sık olarak kullanılmaktadır. Tip I kollajenin C-terminal telopeptit (alfa 1 zincir) bölgesindeki çapraz bağlı bir fragmanın monoklonal antikorlar tarafından tanınması ölçüm metodunun esasını oluşturur. Bazı çalışmalarda, bir kemik yıkım parametresi olarak serum "Crosslaps" ölçümü, kemik yıkımının değerlendirilmesinde, "NTx" ve "total pridinyum çapraz bağları" kadar etkin bulunmuştur Yine, genel olarak, idrar toplamanın bilinen zorluklarından dolayı örneklerin serumda çalışılabilmesi bir diğer tercih nedeni olabilir (4, 61, 63).

2.5.6.4. Tip I Kollajenin Çapraz Bağlı C-Terminal Telopeptit'i (ICTP, CTx-MMP)

Bu parametrenin saptanmasında ilk geliştirilen ölçüm tekniklerinden birisi RİA yöntemidir. Tip I kollajenin çapraz bağlı C-telopeptit bölgesi ile bir metalloproteinaz(MMP) enziminin reaksiyonu sonucunda söz konusu molekül ortaya çıkarıldığından CTx-MMP (eski adı ICTP) olarak adlandırılır. Diğer çapraz bağ ve telopeptitlerden farklı olarak bu parametre, sadece serum örneklerinden çalışılmaktadır. Bu yöntemde kullanılan poliklonal antikorlar Tip I kollajenin C terminal bölgesindeki iki alfa 1 zinciri ile diğer kollajen zincirinin N-terminal bölgesindeki alfa1ve alfa 2 zincirlerini çapraz bağlayan saf Pr telopeptitlerine karşı oluşmaktadır (Şekil 3, 4). Serum ICTP düzeylerinde *bifosfonat* tedavisi ile herhangi bir azalma olmaması, menapozda bir kemik yıkım parametresi olarak diğerleri ile karşılaştırıldığında çok az değişkenlik göstermesi nedeni ile takipteki duyarlılığı istenen ölçüde değildir. Bununla birlikte, metastatik kemik hastalıkları, multipl myeloma, iskelet sistemi veya iskelet sistemi dışı kollajenin hızlı yıkılması durumlarında duyarlı gözükmektedir (4,5, 54, 55).

Gerek pridinyum çapraz bağları gerekse teleopeptit çapraz bağları idrarda stabil bulunmakla birlikte, UV ışığa maruziyet özellikle DPr ve Pr düzeylerinde azalmaya yol açar. Bu nedenle uzun süre güneş ışığına veya laboratuvar ışığına maruz bırakılmamalıdırlar. Özellikle Pr'ler diurnal varyasyon gösterdiğinden dolayı örnekler alınırken bu durum göz önünde bulundurulmalıdır.

Kemik yıkımında artma ile giden osteoporozis, paget hastalığı, metastatik kemik hastalığı, primer ve sekonder hiperparatirodizm gibi durumlarda çapraz bağlı telopeptit düzeylerinde artma ön plandadır. Diğer taraftan, kemik yıkım parametreleri antirezorptif tedavinin takibinde kullanılabilir. Bu tedavi sırasında, en fazla telopeptitlerde azalma saptanırken, total Pr'lerde orta derecede, serbest Pr'lerde ise en az oranda azalma saptanır. Özellikle paget hastalığında *bifosfonat'la* tedavinin takibinde en hassas parametrenin N-telopeptitler olduğu bildirilmektedir (4, 5, 61-63).

2.5.6.5. Tartarat'a Dirençli Asit Fosfataz (TRAP)

En az 5 farklı izoformu bilinen asit fosfataz ailesinin bir üyesidir. Bu izoformlar kemik doku dışında birçok doku tarafından sentezlenmekle birlikte, sadece band 5 formu tartarat tarafından inhibe edilememektedir. Bu dirençli kısmın 5a ve 5b olmak üzere iki formu vardır ve 5b nin osteoklastlar için spesifik olduğu olduğu gösterilmiştir. Besin alımından önemli ölçüde etkilenmemesi, minimal diurnal varyasyon göstermesi, böbrek fonksiyonlarından etkilenmemesi, ölçüm içi değişikliklerinin düşük olması ve serum veya plazmadan ölçülebilir olması bu parametrenin avantajları olarak değerlendirilmektedir. Bu avantajlara rağmen, diğer kemik yıkım parametreleri ile karşılaştırıldığında klinik performansının beklenilen düzeyde bulunmadığı son çalışmalarda bildirilmiştir (61-71).

2.5.7 İdeal Bir Kemik Döngüsü Parametresi'nde Aranan Özellikler

Numune toplanması tekrar ölçümler için uygun ve pratik olmalı ve hasta için rahatsız edici olmamalıdır. Her çalışılan parametre kemik yapımı veya yıkımına özgün olmalıdır. Sonuçlar kemik histomorfometrisi, radioizotop kinetik çalışmaları ve stabil izotoplar gibi, kemik döngüsüne ait standart referans oluşturan yöntemlerle yüksek oranda korelasyon göstermelidir. Kemik kütlesinde saptanan değişikliklerle korelasyon göstermelidir. Yıkım ve yapımı etkileyen hastalıkların tedavilerinin değerlendirilmesinde uygulanabilir olmalıdır. Yukarıdaki özelliklerin hepsini bünyesinde bulunduran ideal bir kemik döngüsü parametresi henüz mevcut olmamakla birlikte analiz öncesinde bazı tedbirler alınarak söz konusu parametrelerden maksimal düzeyde fayda sağlanabilecektir (71-79).

2.5.7.1. Preanalitik Faktörler

Analiz öncesinde kontrol edilebilen ve edilemeyen bir çok faktör biyokimyasal parametre sonuçlarını etkileyebilmektedir (79). Sirkadiyen ritm, diyet, yaş, cins, etnik köken, mevsimler, gebelik, laktasyon, pubertal evre, menstruel siklus, BMİ, fiziksel ve metabolik aktivite, böbrek fonksiyonlarının durumu, son bir yıl içinde kırık olması, kullanılmakta olan ilaçlar (antirezorptifler, antikonvulzanlar, GnRH analogları, oral kontraseptifler), ve bazı hastalıklar (metabolik kemik hastalıklar, diyabet, tiroid hastalıkları, karaciğer hastalıkları, romatoid artrit, osteoartrit) farklı derecelerde analiz sonuçlarını etkileyebilen faktörler olarak bildirilmektedir.

Kırık iyileşmesinin ilk 4 haftasında kemik döngüsü parametrelerinde %25-40 artma saptanır ve bir yıla kadar yüksek kalabilir. Akut egzersizde kollajen yapım ve yıkım ürünleri % 15-40 yükselme göstermekte ve bu nedenle düzenli aktivite sorgulanmalı ve örnekler alınmadan en az 24 saat önce egzersiz kesilmelidir.

Yatak istirahati kemik yıkım göstergelerinde önemli bir artışa neden olur. İkinci gün sonrasında idrarda kemik yıkım parametrelerinde anlamlı artış olur ve 1. hafta sonrasında % 40'lara ulaşır.

Kemik döngü parametrelerinin çoğunun serum ve idrar düzeylerinin diurnal varyasyon gösterdiği, sabah 06.00 (02.00-08.00) saatlerinde zirve düzeylere, akşam 18.00 (13.00-23.00) saatlerinde ise en düşük düzeylere ulaştığı bildirilmektedir. Sonuçlar bir günden diğerine farklılık gösterebilmektedir. Sirkadyen ritmin klinik değerlendirmeleri etkilememesi için örneklerin alınma zamanı sıkı şekilde kontrol edilmelidir (4).

Sabah ilk idrar, sabah ikinci idrar, randomize, 2 saat ve 24 saatlik idrar örnekleri toplanabilir. Hangi şekilde idrar toplanırsa toplansın sonuçların kreatinin atılımına göre düzeltilmesi hata payını azaltacaktır. Açlıkta ölçülen değerler 24 saatlik idrardaki sonuçlarla iyi korelasyon göstermektedir. Diğer yandan, aynı örnek, aynı kit ve metotla farklı laboratuvarlarda farklı sonuçlar bildirilebilmektedir. Laboratuvarlar arası sonuç farklılıkları yüksek olabildiğinden, kemik döngü parametrelerinin değerlendirilmesinde her laboratuvarın kendi standartlarını oluşturması gerektiği vurgulanmaktadır (54, 55, 61-65). Analiz öncesinde sonuca etki edebilecek faktörlerin kontrol altına alınması sonuçların yorumlanmasını kolaylaştıracaktır. Tablo 7 ve 8 de preanalitik kontrol edilebilen faktörler gösterilmiştir.

Tablo 7. Kemik döngüsü parametrelerinin değerlendirilmesinde preanalitik kontrol edilebilen faktörler

Durum	**Önemi**	**Eylem**
Diurnal varyasyon	Çok önemli	Serum örnekleri; 08.00-11.00 arasında alınmalı, İdrar örnekleri; 24 saatlik, sabah ilk veya ikinci idrar.
Açlık durumu	Sadece serum CTx ölçümü için gerekli	Gece boyu açlık sonrası örnek alınmalı
Menstruel siklus	Önemli değil	-
Mevsimler	Bireysel ölçümlerde önemli değil	Çalışmalarda örneklerin yılın aynı döneminde alınması
Egzersiz	Önemli (Kronik ve akut etkileri)	Ölçümden 24 saat öncesinden egzersize ara vermeli.

Tablo 8. Kemik döngüsü parametrelerinin preanalitik biyolojik özellikleri

Parametre	**Tavsiye edilen saklama koşulları**	**Etkilendiği durumlar**
K-ALP(U/L)	Stabil <-20 ^{o}C	KC fonksiyonları.
Osteoklasin(ng/mL)	Unstabil <-80 ^{o}C	Böbrek fonksiyonları, hemoliz.
PICP	Stabil <-20 ^{o}C	KC fonksiyonları.
PINP	Stabil <-20 ^{o}C	KC fonksiyonları.
Hidroksiprolin	Stabil <-20 ^{o}C	KC fonksiyonları, diyet.
Pridinolin	Stabil <-20 ^{o}C	KC fonksiyonları, artrit, UV.
Deoksipridinolin	Stabil <-20 ^{o}C	KC fonksiyonları, UV.
CTx-MMP (ICTP)	Stabil <-20 ^{o}C	KC ve böbrek fonksiyonları.
CTx-I	Stabil <-20 ^{o}C	KC ve böbrek fonksiyonları.
NTx-I	Stabil <-20 ^{o}C	KC fonksiyonları.
TRAP	Unstabil <-80 ^{o}C	Hemoliz ve pıhtılaşma.

2.5.8. Kemik Döngüsü Parametrelerinin Klinik Kullanımı

Ölçüm yöntemlerine dayalı teknik hatalar bir yana bırakılırsa, kemik yapım ve yıkım parametrelerine ait varyasyon katsayılarının %60'lara kadar yükseldiği bildirilmiştir (4, 36). Bu nedenle söz konusu parametreler konusunda karar vermek için tek ölçümle yetinilmemesi en az iki ölçüm yapılarak, bu iki ölçümün ortalamasının alınması gerektiği vurgulanmaktadır. Buna rağmen yapım ve yıkım parametreleri hem kendi aralarında, hem de kendi içlerinde yüksek oranda korelasyon göstermektedirler (36). Uzun süredir klinik araştırmalara konu olan kemik döngüsü parametreleri, son zamanlarda özellikle kemik metabolizmasını etkileyebilen primer ve sekonder

hastalıkların tanı ve tedavilerinin takiplerinde rutin, klinik ve pratikte kullanılmaya başlanmıştır. Tablo 9 da bazı hastalıklara ait kemik döngüsü parametrelerindeki değişimler gösterilmiştir (4,5, 54,55, 63, 78).

Tablo 9. Bazı hastalıklarda kemik döngüsü parametrelerinin değişimi

	DPr	**TRAP**	**K-ALP**	**OK**	**PICP**	**CTx**	**NTx**
Osteoporoz	↑	↑	↑	↑	N	↑	↑
Primer hiperparatirodizm	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Hipoparatiroidizm	↓	-	N	↓	N	↓	↓
Paget hastalığı	↑↑	↑	↑↑	↑	↑	↑↑	↑↑
Hipertiroidizm	↑	↑	↑	↑	N	↑	↑
Renal osteodistrofi	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Kemik metastazları	↑	↑	↑	↑	N	↑	↑
Glukokortikoid fazlalığı	↑	-	↑	↓	↓	↑	↑
Osteogenezis imperfekta	↑	-	↑	↑	↓	N	↑
Osteomalasi	↑	-	↑	→↑	↑	↑	↑
BH eksikliği	↓	-	→↓	→↓	→↓	↓	-
Nutrisyonel rikets	-	-	↑	↓	↑	↑	↑

↑: artma, →: değişkenlik yok, ↓: azalma, -: veri yok.

Günümüzde özellikle kemik kaybı ve kırık riskinin önceden tahmin edilmesi ve antirezorptif tedavi gibi spesifik tedavilerin etkinliğinin değerlendirilmesinde kemik döngüsü parametrelerinden faydalanılmaktadır (59, 60).

Çalışmamızda kullandığımız kemik döngüsü ve diğer parametrelerin referans aralıkları tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Çalışmamızda kullandığımız kemik döngüsü ve diğer parametrelerin referans aralıkları

Parametre	**Referans Aralıklar***
Kalsiyum	8.8-10.8 (mg/dL)
Fosfor	2.5-4.5 (mg/dL)
HbA_{1c}	% 4.5-6.3 (mg)
iPTH	12-65 (pg/mL)
OK	Premenepozal: 11-43 (ng/mL) Postmenepozal: 15-46 (ng/mL) 18-30 yaş: 24-70 (ng/mL) 30-50 yaş: 14-42 (ng/mL) 50 yaş üzeri: 14-60 (ng/mL)
NTx	Premenepozal: 5-65 (nmoL BCE**/mmoLKr) Postmenepozal: 26-124 (nmoLBCE/mmoLKr) Erkek: 3-51 (nmoLBCE/mmoLKr)
K-ALP	Yetişkin: 13-19 (U/L)
25OHvitD	6-55 (ng/mL)
DPr Kr	Kadın: 3-7.4 (nmoLDPr /mmoLKr) Erkek: 2.3-5.4 (nmoLDPr/mmoLKr) Spot idrar: 66-133 (mg/dL)

*Kullandığımız metodlara ait referans aralıkları

**BCE: Kemik kollajen eşdeğeri

2.6. DİYABET VE KEMİK DOKU

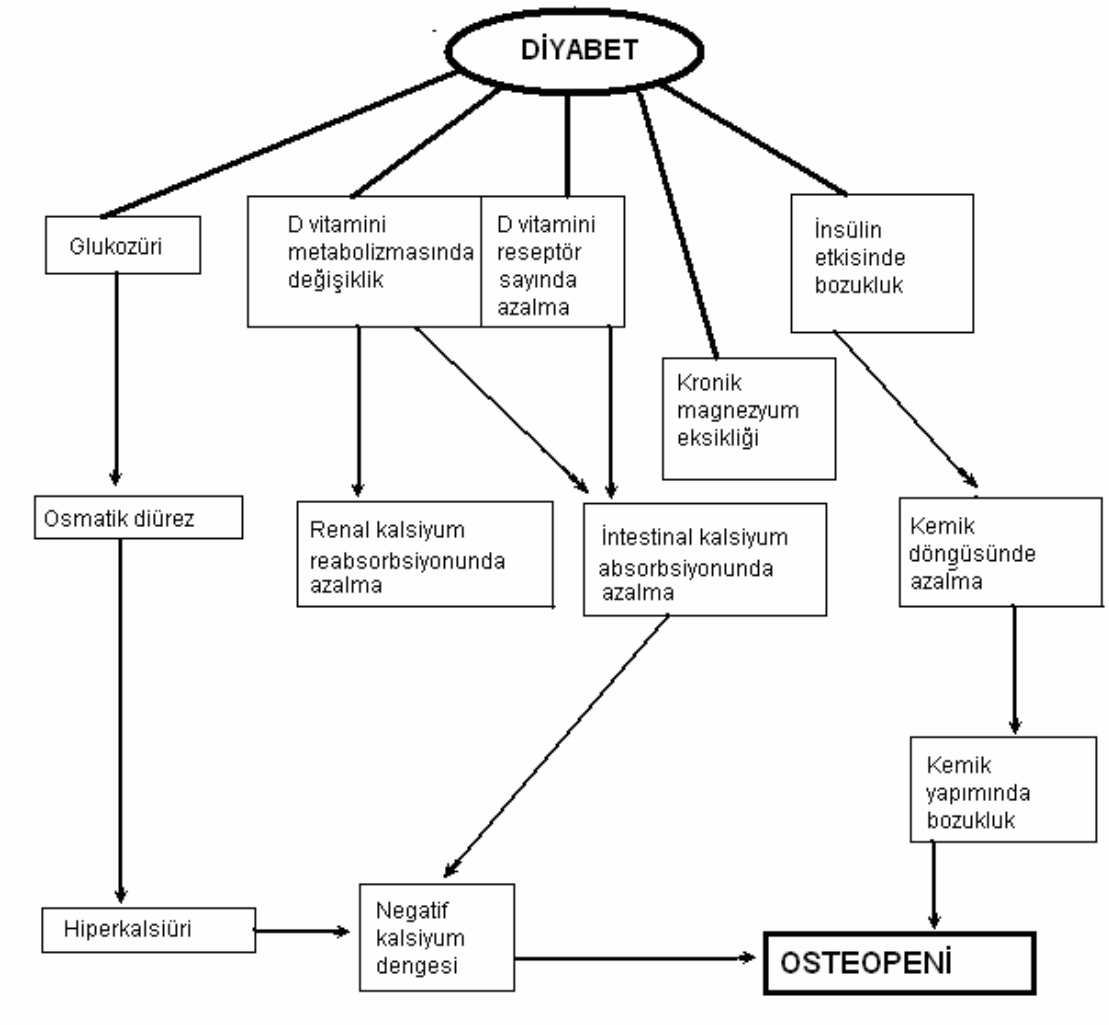
DM'de kemik yapım hızında yavaşlama ve kemik yıkımında azalma ile karakterize düşük döngülü osteopeni yanında, azalmış kemik yapımına artmış veya değişmemiş, yani uygunsuz normal yıkım hızının eşlik ettiği yüksek döngü durumu da söz konusudur (61-64). Tip 1 DM genç yaşlarda, henüz kemik kütlesi oluşma süreci içindeyken ortaya çıktığından düşük kemik kütlesi Tip 1 DM'li hastaların olası bir komplikasyonu gibi görünmektedir (23, 66). İnsülin yapıca kemik yapımında önemli bir düzenleyici olan IGF-1'e benzer. IGF-1'in osteoblastların farklılaşmasını hızlandırdığı ve preosteoblastik hücrelerin replikasyonunu, kemik kollajen sentezini ve matriks birikimini arttırdığı gösterilmiştir (67). İnsülin aynı zamanda proksimal tübülüslerde fosfat geri emilimini arttırır ve 25OHD'yi aktifleştiren 1α hidroksilaz enzimini de uyarır. Bu bulgular insulin eksikliğinde kemik mineralizasyonunun yeterli olamayacağını göstermektedir. İnsülin düzeylerinin azalmasıyla osteopeni insidansı artar (37, 60, 61).

Kemik yapım ve yıkımı arasındaki dengenin bozulmasında, artmış üriner kalsiyum atımı ve azalmış intestinal kalsiyum emilimi sonucu oluşan negatif kalsiyum dengesi, buna PTH sekresyonunun uygunsuz yanıtı ve vitamin D metabolizmasında değişikliğin de rolü olabileceği öne sürülmektedir (41, 43, 44). Tip 1 DM'li hastalarda hiperkalsiüri, hipokalsemi ve hipofosfateminin olduğunu gösteren çalışmaların yanısıra (61-68), DM'li hastalarla kontrol grubu arasında kalsiyum ve fosfor açısından anlamlı fark bulunmayan çalışmalarda vardır. DM'li olgularda kalsiyum emilimi ve atımındaki bozukluklar yanında vitamin D metabolizmasındaki bozukluklara sık rastlanır (30, 69).

DM'lilerde kollajen sentezinde azalma ve çapraz bağlanma ile ilişkili kollajenin sağlamlığında da zayıflama söz konusudur (74). Kötü metabolik kontrol, hiperglisemik ortamda anormal glikozilasyona uğramış kollajenin dayanıklılığının azalması ve glukozürinin kalsiyum, fosfor ve magnezyum'un üriner atımlarını arttırması nedeniyle kemiği daha kırılgan hale getirebilir (61, 74-76, 78).

Tip 2 DM'li olgularda yapılan çalışmaların bazılarında KMD yüksek bulunmuş iken, bazılarında normal, bazılarında ise düşük olarak saptanmıştır (14-22). Bazı kemik yapım ve yıkım belirteçleri ile Tip 2 DM arasındaki ilişkinin kesitsel olarak araştırıldığı bir çalışmada yıkım belirteçlerinin kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır (14), yine yakın zamanda yapılan bir kesitsel çalışmada ise, kontrol grubuna göre bir değişikli saptanmamıştır (23). DM ve kemik döngüsü arasındaki ilişkinin kesin bir değerlendirilmesi yapılamamasına rağmen, Şekil 5'de DM'de osteopeninin olası patogenetik mekanizmaları şematik olarak özetlenmiştir.

.



Şekil 5. DM'de osteopeninin olası patogenetik mekanizmaları (30).

3. BİREYLER VE YÖNTEMLER

3.1. Bireyler

Bu tez çalışmasında Tip 2 DM'li vakalarda HbA_{1c} düzeyine (> %8mg) göre belirlenen metabolik bozukluğun kemik yapım (K-ALP, OK) ve yıkım belirteçleri (DPr, NTx) üzerine olabilecek muhtemel etkileri prospektif olarak araştırıldı. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Bilim Dalı tarafından izlenen ve yaşları 37 yıl ile 66 yıl (ort±2SD: 51±7.5) arasında değişen 35 Tip 2 DM'li vaka (18 kadın,17 erkek) çalışmaya alındı. Tip 2 DM tanısı ADA kriterlerine göre konuldu (25). Kemik metabolizmasını etkileyebilecek tirotoksikoz, hipo ve hipertiroidizm, hiperparatiroidizm, cushing sendromu, prolaktinoma, tümor varlığı, ilave sistemik hastalığı olanlar veya kemik metabolizmasını belirgin şekilde etkileyebilecek kronik ilaç kullanımı olan vakalar çalışmaya alınmadı. Vakalar prospektif olarak izlendiğinden dolayı her vakanın izlem sonundaki sonuçları başlangıç değerlerine göre kendi kontrol grubunu oluşturdu. Çalışmaya katılacak vakalar için yerel etik komite onayı alındıktan sonra bilgilendirilmiş onam alınan vakalar çalışmaya dahil edildi.

Tüm vakalar tip 2 DM tanı yaşları, güncel yaşları, izlem süreleri, antropometrik ölçüm değerleri BMİ, tedavi rejimleri (oral antidiyabetik ilaçlar, insülin tedavileri ve diyet tedavileri), varsa komplikasyonlar ve kemik döngü belirteçleri bakımından başlangıçta ve ortalama 3-6 ay (4.9±1.2) izlem sonunda değerlendirildiler. Çalışmaya alınan vakaların hiçbirisinde ilaç veya cerrahi tedavi gerektirecek düzeyde renal, oftalmolojik veya nöropatik düzeyde aşikar bir komplikasyon mevcut değildi. Yine çalışmaya alınan 18 kadın vakanın tümü postmenapozal dönemde çalışmaya dahil edildi. Vakaların metabolik kontrol derecesi HbA_{1c} düzeyine göre yapıldı. ADA'ya göre HbA_{1c} düzeyi < % 7.0–7.5 mg ise 'iyi metabolik kontrol' olarak değerlendirilmektedir (25). Çalışmaya alınan tüm vakalar, başlangıçtaki HbA_{1c} düzeyleri % 8 mg'in üzerinde olan, orta veya kötü metabolik kontrollu vakalar olup, düzenli kontrollere gelmeyen veya tedavilere uyum göstermeyen vakalar idi. Bu vakalar bir uzman endokrinolog ve ekibi tarafından değerlendirildiler. İlaç tedavileri (insulin tedavileri, oral antidiyabetikler), diyet rejimleri ve aktivite durumları konusunda yoğun bir eğitimden

geçirildiler. Vakaların önerilen tedavi rejimlerine uyup uymadığı telefon ile sık aralıklar ile denetlenmeye çalışıldı.

3.2. Numunelerin toplanması

Diürnal ritm göz önüne alınarak vakaların başlangıç ve izlem sonundaki açlık kan örnekleri sabah saat 08.00-09.00 arasında, idrar örnekleri sabah ikinci idrar örneğinden alındı. Toplanan kan örnekleri serumu ayrılarak idrar örnekleriyle birlikte (–80°C)'de çalışma gününe kadar saklandı.

Vakaların başlangıçta ve izlem sonunda HbA_{1c} düzeyleri, kemik yıkım belirteçleri olarak; idrar NTx ve DPr düzeyleri, kemik yapım belirteçleri olarak; serum OK ve K-ALP düzeyleri ölçüldü. Ayrıca, hem osteoporoza neden olabilecek diğer hastalıkların dışlanması, hem de diyabetik osteopati patogenezine olası katkılarının araştırılması için; serum kalsiyum, fosfor, 25OHD, iPTH düzeyleri ölçüldü. Tüm tetkikler aynı anda iki kez ölçüldü ve her iki ölçümün ortalaması değer olarak kaydedildi.

3.3. Kullanılan Cihazlar

Santrifüj	Heraeus İnsturment, Germany
Karıştırıcı	Vortex-Genie, model K550, Germany
Derin dondurucu	Sanyoultra low
Otoanalizör	Roche modüler E170, Germany
Otoanalizör	Olympus AU2700, Germany
Otoanalizör	Immulite 2000, Germany
ELİSA cihazı	BIO-TEK ELISA assay, USA
Gama counter	DPC(GAMMA-C12), USA Biosurce.

3.4 Kullanılan Malzemeler

HbA_{1c} Kiti	DDS.
	Lot no(5H071-5I091).
NTx Kiti	Osteomark, NTx Urine, USA.
	Lot no: (06035427).
Kalsiyum kiti	Olympus, Calcium Arsenazo III
	Lot no: (3926).
Fosfor kiti	Olympus, inorganic phosphorous
	Lot no:(3833).

Magnezyum Kiti	Olympus, Magnesium Lot no: (4106).
ALP Kiti	Olympus, ALP Lot no(4485).
iPTH Kiti	Olympus, iPTH, Roche Lot no: (174509-03).
Kreatinin Kiti	Olympus, Creatinine Lot no: (4455).
DPr Kiti	DPC, CA- USA Lot no: (L2KPD2209).
OK Kiti	Roche, Germany Lot no: (00172510).
25OHD Kiti,	Belgium ve Orion Diagnostica, UniQ PINP RIA, Espoo, Finland.

3.5. Yöntemler

3.5.1. HbA_{1c} Analizi

HbA_{1c} düzeyleri HPLC yöntemi ile çalışıldı. HPLC ölçümünün pirensibi katyon değişim kromatografisidir. Hasta örneğinden hazırlanan bir hemolizat katyon değiştirici reçineyle bir arada bulunan kolona enjekte edilir. İyonik gücü artıran fosfat tampon 415 ve 690 nm'de absorbe olan hemoglobinlerin aşamalı süzülmesi için kullanılır.

Bunun için hasta kanı EDTA'lı tüplere alındı, hafifçe alt üst edildikten sonra 30 dakika bekletildi ve başka bir işlem yapılmadan ölçüm için cihaza yüklendi. Aşağıdaki kromatografi şartlarında ölçüm yapıldı.

Basınç: 78±10 bar

Kolon sıcaklığı: 25˚C

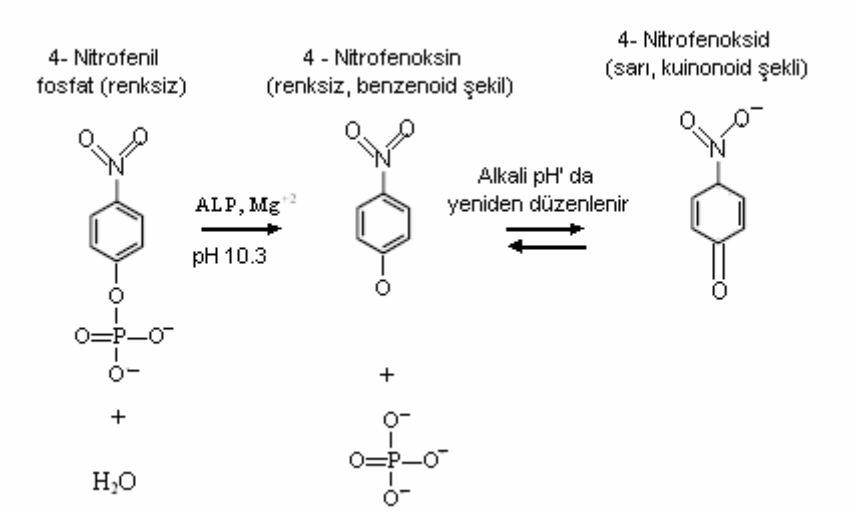
Pompa akış hızı: 1.0 ml/dakika

Dedektör: UV, 415 nm dalga boyu

3.5.2.Serum K-ALP, Fosfor ve Kalsiyum Analizi

Serum K-ALP ölçümü, total ALP ölçümü yapıldıktan sonra aynı serumda ısı-inaktivasyon analiziyle gerçekleştirildi. 56˚C'de karaciğer izoenzimi, kemik izoenzimine göre daha dayanıklıdır. 56˚C'de 10 dakika inkübasyon sonrasında, ölçülen karaciğer izoenzimi total ALP den çıkarıldığında K-ALP bulunur.

Önce standardize kolorimetrik yöntemle otoanalizörde total ALP ölçümü yapıldı. Total ALP için standart kolorimetrik yöntem aşağıdaki reaksiyona göre renkli kompleks oluşumuna dayanır (4).



Şekil 6. ALP'nin alkali ortamda 4-Nitrofenil fosfat ile reaksiyonu

ALP enziminin etkisi ile 4-Nitrofenoksid oluşum hızı, 37˚C'de 415 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Daha sonra aynı serum benmaride 56˚C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı, bu işleme tabi tutulan serum örneği hızlı bir şekilde soğutularak aynı otoanalizörde kolorimetrik yöntem ile serumdaki ısıya dayanıklı KC'e ait ALP tespit edilerek, işlem öncesinde elde ettiğimiz total ALP'den KC'e ait ALP çıkarılarak, K-ALP değeri bulundu.

İnorganik fosfor düzeyi amonyum fosfomolibdat kompleksi oluşturmak için amonyum molibdat ile fosfat iyonlarının reaksiyonunu temel alarak oluşan renksiz amonyum fosfomolibdat kompleksi 340 nm dalga boyunda fotometrik olarak, Olympus AU2700 otoanalizöründe ölçüldü.

Serum kalsiyum'u; arsenazo III reaktifi kullanılarak ve kalsiyum asidik pH da (yaklaşık 6) arsenazo III molekülüne bağlanarak elde edilen renkli bileşik 650 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak Olympus AU2700 otoanalizöründe tespit edildi.

3.5.3. İdrar Kreatinin Analizi

Numune olarak hastalardan sabah 2.idrar sörneği kullanıldı. Numuneler bekletilmeden otoanalizöre yüklenerek idrar kreatinin ölçümleri yapıldı.

İdrar kreatinin düzeyinin tayininde Jaffe yöntemi esas alındı, bu yöntemde kreatinin pikrat iyonu ile alkali ortamda reaksiyona girdirilerek turuncu kırmızı bir kompleks oluşturulup 520 nm dalga boyunda kolorimetrik yöntem ile Olympus AU2700 otoanalizöründe tespit edildi.

3.5.4. 25OHD Analizi

Hastalardan alınan kan örnekleri kuru tüplere alındı 30 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 4500 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum, şekilli elemanlardan ayrılarak ependorf tüplere alındı ve analiz gününe kadar -80 ^{0}C'de saklandı.

25OHD düzeyi ölçümünde örnek önce, kolon kromotografisi ile proteinsizleştirilip asetonitril ile saflaştırıldı. Daha sonra 25OH-VitD_3-RIA-CT Orion Diagnostica kiti kullanılarak radyoimmünometrik yöntem ile ölçüm yapıldı.

3.5.5. İdrar Ntx ve DPr Analizi

Bu iki analiz için spot idrar kullanıldı. Spot idrarlar alındıktan sonra bekletilmeden analizin yapılacağı güne kadar (-80˚C) de saklandı.

İdrar Ntx düzeyi; Ntx fraksiyonuna karşı geliştirilen monoklonal antikor kullanarak N telopeptitlerin ölçümünü yapan ELİSA yöntemi ile ölçüldü.

DPr düzeyleri ise IMMULITE 2000 otoanalizöründe kemilüminesans, immünölçüm yöntemi ile ölçüldü. Sonuçlar DPr / Kr olarak hesaplandı.

Kr x 0.088 = Y sonucu elde edilerek, otoanalizörde ölçülen Dpr sonucu, Y sonucuna bölünerek nmol DPr / mmol Kr cinsinden bulundu.

3.5.6. iPTH ve OK Analizi

Serum iPTH ve OK düzeyleri elektrokemilüminesans immün ölçüm (ECLİA) yöntemi ile Roche Modular Analytics E170 otoanalizöründe ölçüldü.

3.5.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler Windows tabanlı SPSS 11.5 programından faydalınalarak yapıldı. Sonuçlar, ortalama ± 2SD olarak verildi. Vakaların tedavi öncesi ve sonrası değerlerinin kıyaslamalarında normal dağılım gösterdiklerinden dolayı bir

parametrik test olan "paired t" testi kullanıldı. Korelasyon analizi için ise "pearson korelasyon" testi kullanıldı.

4.BULGULAR

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Bilim Dalı tarafından izlenen ve yaşları 37 yıl ile 66 yıl arasında değişen toplam 35 Tip 2 DM'li vaka çalışmaya alındı. Vakaların 18'i (%51.4) kadın, 17'si (%49.6) erkek idi. Erkeklerde yaşlar 41 yıl-66 yıl arasında, kadınlarda 37 yıl ile 66 yıl arasında değişmekte idi. Çalışmaya alınan 18 kadın vakanın tümü postmenapozal dönemde idi. Tüm vakaların diyabet yaşları ortalama (4.9±3.5) yıl idi (Tablo11).

Tablo 11. Vakaların demografik ve fiziksel özellikleri

	Kadın	**Erkek**	**Toplam**
Vaka sayısı	18	17	35
Yaş (Yıl)	50.8±7.8*	51.8±7.4	51±7.5
Diyabet süresi (Yıl)	5.4±4.2	4.4±2.6	4.9±3.5
Vücut ağırlığı (kg)	73.2±14.1	83.1±12.4	78.0±14.0
BMİ (kg/m^2)	31.3±5.4	28.1±3.4	29.8±4.8

*ortalama ±2SD

Vakaların başlangıçta tam fizik muayeneleri yapıldı, serum ve idrar örnekleri alındıktan sonra izleme alındılar. Tüm vakaların ortalama izlem süreleri 3-6 ay (4.9±1.2) idi.

Çalışmaya katılan tüm vakaların başlangıçta ve izlem sonrasında klinik ve laboratuvar bulguları ve istatistik olarak anlamlılık dereceleri Tablo 12'de gösterilmiştir**.**

Tablo 12. Vakaların başlangıçta ve izlem sonrasında klinik ve laboratuvar bulguları (n=35)

Parametre	**Başlangıç**		**İzlem sonrası**			
	Ort.	±2SD	Ort.	±2SD	**t**	**p**
Vücut ağırlığı (kg)	78.0	14.0	77.0	14.4	1.374	0.178
BMİ (kg/m^2)	29.8	4.8	29.3	4.6	1.349	0.503
Hb A_{1c}(%mg)	10.6	1.2	7.7	1.0	19.672	0.000
DPr (nmoLDPr /mmoLKr)	28.6	11.6	17.9	7.1	9.369	0.000
NTx (nmoLBCE/mmoLKr)	93.6	13.7	67.1	12.8	16.892	0.000
K-ALP (U/L)	129.5	37.3	94.8	35.1	9.646	0.000
OK (ng/mL)	94.6	16.8	66.3	17.3	17.209	0.000
iPTH (pg/mL)	83.4	18.1	68.8	17.4	10.259	0.371
25OHD (ng/mL)	26.2	13.4	24.9	11.7	0.569	0.416
Kalsiyum (mg/dL)	9.2	0.5	8.9	0.5	3.893	0.000
Fosfor (mg/dL)	3.5	0.4	3.4	0.5	1.374	0.178

Tablo 12'de görüldüğü gibi yaklaşık 5 aylık takip süresinde BMİ 'de anlamlı derecede bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Vakaların ortalama HbA_{1c} düzeyleri başlangıçta %10.6±1.2 iken yaklaşık 5 aylık izlem sonunda %7.7±1.0 düzeyine azalma gösterdi ($p=0.000$). Başlangıçta kemik yıkım parametrelerinden idrar DPr düzeyi 28.6±11.6 nmoL DPr /mmoL/Kr iken, izlem sonunda 17.9±7.1'nmoLDPr /mmoL/Kr düzeyine azalma gösterdi ($p=0.000$). İdrar NTx düzeyleri başlangıçta 93±13.7 nmoLBCE/mmoLKr iken izlem sonunda 67.1±12.8'nmoLBCE/mmoLKr'e azalma gösterdi ($p=0.000$). Ortalama serum 25OHD düzeyleri arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.416$). Aynı şekilde, her ne kadar başlangıçtaki iPTH düzeyi yüksek bulunmuş olsa da izlem sonundaki iPTH düzeyleri arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0.371$).

Serum kalsiyum düzeylerinde izlem sonunda anlamlı (p=0.000). Bir azalma tespit edilirken fosforda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.

Tablo 13 ve 14'de erkek ve kadınlarda başlangıçta ve izlem sonundaki HbA_{1c} düzeyleri ve kemik turnover belirteçlerinin değişimi ve istatistik anlamlılık dereceleri gösterilmiştir.

Tablo 13. Erkeklerde başlangıçta ve izlem sonrasında HbA_{1c} değerleri ile kemik yapım ve yıkım parametrelerinin değişimi (n=17)

Parametre	**Başlangıç**		**İzlem sonrası**			
	Ort.	±2SD	Ort.	±2SD	**t**	**p**
Ağırlık (kg)	83.1	12.4	82.5	13.4	0.723	0.480
BMİ (kg /m^2)	28.1	3.4	27.9	3.6	0.850	0.408
HbA_{1c} (%mg)	10.6	1.3	7.6	0.9	16.046	0.000
DPr (nmoLDPr/ mmoLKr)	31.5	11.2	19.8	7.0	8.590	0.000
NTx(nmoLBCE /mmoLKr)	93.4	13.8	66.5	14.3	12.940	0.000
K-ALP (U/L)	134.6	39.5	101.5	38.9	12.110	0.000
OK (ng/mL)	99.4	15.5	71.2	15.8	10.560	0.000
iPTH (pg/mL)	85.1	16.5	69.5	16.2	8.699	0.178
25OHD (ng/mL)	29.3	14.9	28.3	15.0	0.292	0.774
Kalsiyum (mg/dL)	9.2	0.5	8.8	0.5	3.576	0.003
Fosfor (mg/dL)	3.5	0.3	3.4	0.6	0.209	0.837

Tablo 13'de görüldüğü üzere erkeklerde başlangıçtaki değerlere göre izlem sonrasında vücut ağırlığı ve BMİ'larında azalma saptandı fakat istatiksel olarak anlamlı değildi(p>0.05). Erkeklerde başlangıçtaki ortalama HbA_{1c} düzeyi 10.6±1.3 %mg iken izlem sonrasında %7.6±0.9 %mg düzeyine azalma gösterdi (p=0.000). Yine, erkeklerde başlangıçtaki verilerle karşılaştırıldığında izlem sonrasında hem kemik yapım parametreleri (K-ALP, OK) hemde kemik yıkım parametreleri (DPr, NTx) düzeylerinde

azalma saptandı (p=0.000). Bununla birlikte, başlangıçta ve izlem sonrasında serum 25OHD ve iPTH düzeylerinde istatistik olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı(p>0.05).

Tablo 14. Kadınlarda başlangıçta ve izlem sonrasında HbA_{1c} değerleri ile kemik yapım ve yıkım parametrelerinin değişimi (n=18)

Parametre	**Başlangıç**		**İzlem sonrası**			
	Ort.	±2SD	Ort.	±2SD	**t**	**p**
Ağırlık (kg)	73.2	14.1	71.7	13.7	1.153	0.265
BMİ (kg/m^2)	31.3	5.4	30.7	5.1	1.089	0.291
HbA_{1c} (%mg)	10.6	1.2	7.9	1.1	12.458	0.000
DPr (nmoLDPr/mmoLKr)	48.2	11.6	25.8	18.9	5.352	0.000
NTx(nmoLBCE/mmoLKr)	93.7	14.0	67.8	11.6	10.927	0.000
K-ALP (U/L)	124.7	35.5	88.5	30.8	5.500	0.000
OK (ng/mL)	90.1	17.1	61.6	17.8	13.873	0.000
iPTH (pg/mL)	81.8	19.8	68.2	18.9	6.221	0.147
25OHD (ng/mL)	23.2	11.4	21.6	6.4	0.499	0.625
Kalsiyum (mg/dL)	9.3	0.4	9.0	0.6	2.138	0.047
Fosfor (mg/dL)	3.5	0.5	3.3	0.5	2.143	0.047

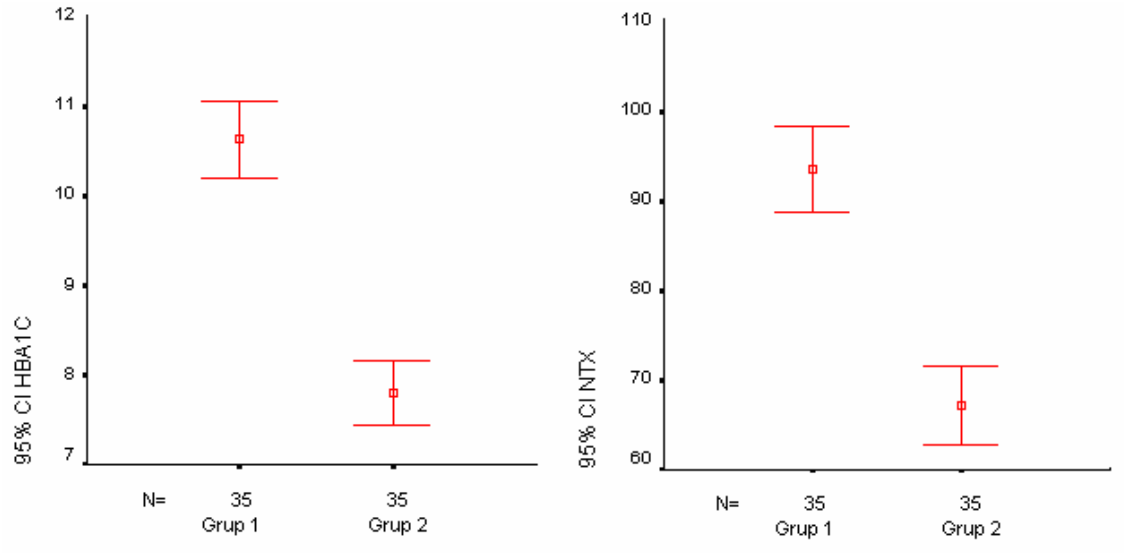
Tablo 14'de görüldüğü gibi, tüm vakalarda ve erkek vakalarda olduğu gibi kadın vakalarda da HbA_{1c} ve kemik yapım ve yıkım parametreleri düzeylerinde izlem sonunda başlangıçtaki değerlere göre istatistik olarak anlamlı derecede azalma saptandı (p=0.000).

Yine genel olarak tüm vakalarda ve erkek vakalarda olduğu gibi kadın vakalarda da başlangıç ve izlem sonrası 250HD düzeyleri arasında istatistik olarak farklılık saptanmadı.

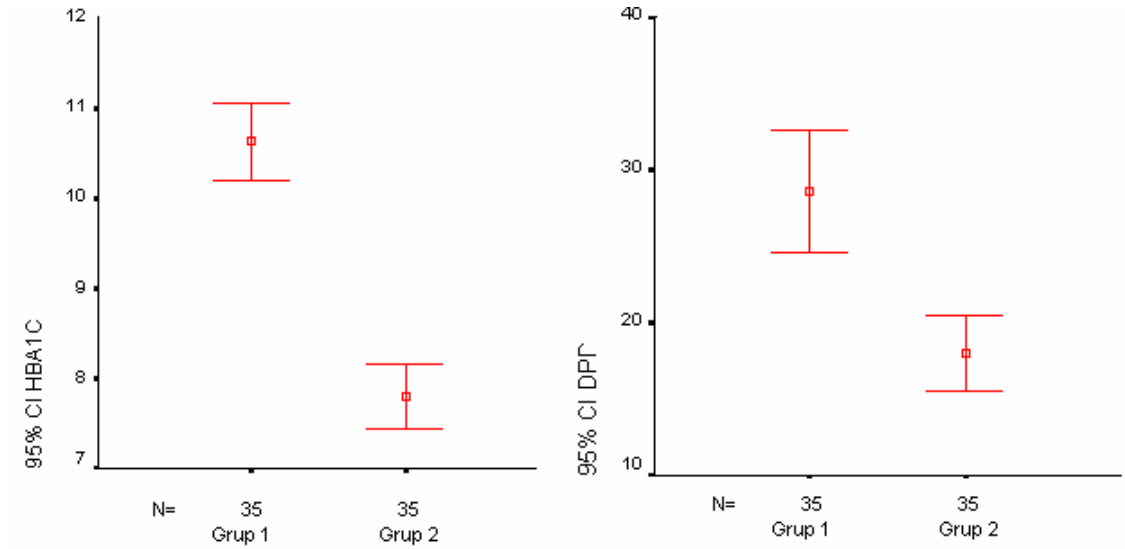
Tablo 15. Tüm vakaların başlangıçta ve izlem sonunda ölçülen bazı parametrelere ait farkların (Δ) korelasyon katsayıları

		ΔHbA_{1c}	ΔiPTH	ΔK-ALP	ΔOK	ΔNTx	Δ25OHD
ΔiPTH	r	0.081					
ΔK-ALP	r	0.477**	0.027				
Δ0K	r	0.637**	-0.130	0.373*			
ΔNTx	r	0.560**	0.103	0.388*	0.525**		
Δ25OHD	r	-0.201	-0.523*	0.006	-0.177	-0.376*	
ΔDPr	r	0.374*	-0.105	0.484**	0.278	0.197	-0.042*

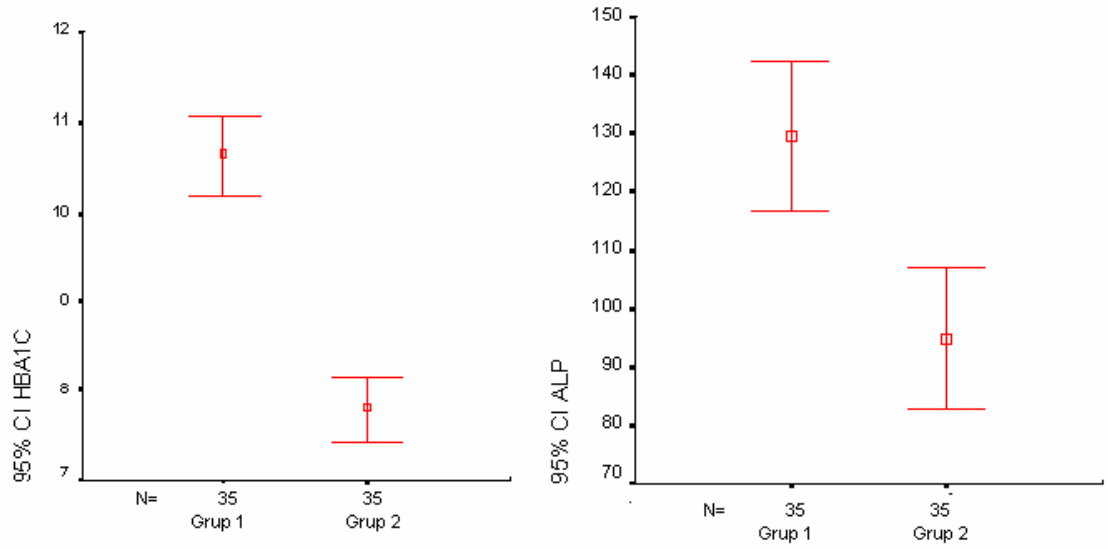
Tablo 15 de tüm vakalarda başlangıçta ve izlem sonunda ölçülen parametrelere ait hesaplanan farkların (Δdeğerleri) kendi aralarındaki korelasyonları gösterilmiştir. Tablo 14'te görüldüğü üzere diyabetik vakalarda metabolik kontrolun en önemli ve pratik göstergesi olan ΔHbA_{1c} ile kemik yapım paramatreleri (ΔK-ALP, ΔOK) ve yıkım parametreleri (ΔDPr, ΔNTx) arasında pozitif korelasyon saptandı. Yine, Δ25OHD ile ΔiPTH, ΔNTx, ΔDpr arasında negatif korelasyon saptandı. Şekil 7-8 de HbA_{1c} ve kemik yıkım parametrelerinden NTx ve DPr takip öncesi ve sonrası dağılımları grafik halinde gösterilmiştir. Şekil 9-10 da ise kemik yapım parametrelerinden K-ALP ile OK'nin takip öncesi ve sonrası dağlımları gösterilmiştir.



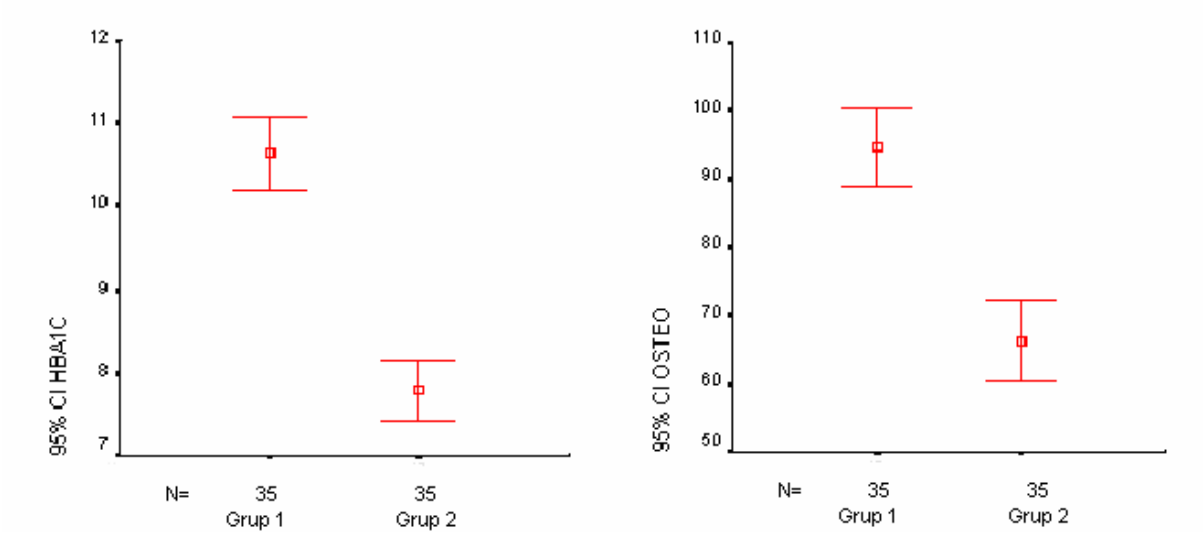
Şekil 7. HbA_{1c} ve NTx'in takip öncesi ve sonrası dağılımları



Şekil 8 HbA_{1c} ve DPr'nin takip öncesi ve sonrası dağılımları



Şekil 9 HbA_{1c} ve ALP'nin takip öncesi ve sonrası dağılımları



Şekil 10 HbA_{1c} ve OK'nın takip öncesi ve sonrası dağılımları

5. TARTIŞMA

Diyabet ve kemik doku arasındaki ilişkiyi irdeleyen çalışmalara uzun zamandan beri rastlanmaktadır. Albright ve Reifenstein ilk kez 1948 yılında, DM'li hastalarda KMD'nin daha düşük olduğunu ve bu vakalarda kırık riskinin arttığını bildirmişlerdir (6). Sonraki yıllarda DM'li vakalarda KMD değişikliğine bir çok çalışmada dikkat çekilmiştir. Bununla birlikte, bu araştırmalardaki KMD değişimleri, daha çok Tip 1 DM'li olgularda radyografik veya fotonik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (7-11). Yapılan çalışmalarda, Tip 1 DM'li vakaların %50-55'inde osteopeni bildirilmiştir. Eğer, Tip 1 DM ergenlik öncesi dönemde başlamış ve 5 yıldan fazla sürmüş ise osteopeni daha çok trabeküler kemikte olmak üzere belirgin olarak artmaktadır (12, 13). Bu vakalardaki osteopeniden temel olarak insülin eksikliği ve onun osteoblastik aktivitesinin yetersizliği sorumlu tutulmaktadır (30).

Diğer yandan, tip 2 DM'li olgulardaki KMD ilişkisini irdeleyen çalışma sayısı sınırlıdır (7, 8,14-22, 23). Bu çalışmalarda DM ve kemik doku arasındaki ilişki diyabetik olmayan kişilerle tip 2 DM'liler arasında değerlendirilmiş ve farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bu araştırmaların bazılarında KMD'si normal tespit edilmiş iken (18), bazılarında yüksek (19, 20), bazılarında ise düşük olarak saptanmıştır (14). Bununla birlikte literatür incelendiğinde Tip 2 DM ile kemik yapım ve yıkım belirteçleri arasındaki ilişikiyi değerlendiren çalışma sayısı ise oldukca sınırlıdır. Levin ME. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tip 2 DM'lilerde kemik yapım ve yıkım belirteçlerinde kontrol grubuna göre azalma tesbit edilmiştir (23). Bu konuda yapılmış olan en geniş çalışma İsaia ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (14). Post menapozal Tip 2 DM'li kadınlarda gerçekleştirilen bu çalışmada bazı yıkım belirteçlerinin (hidroksiprolin, Tip 1 kollagenin karboksi terminal telopeptiti) kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır (14). Aynı çalışmada Tip 2 DM'li vakalarda KMD, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Söz konusu çalışmada tip 2 DM'li vakalardaki KMD'de azalma olmamasının bu vakalardaki hiperinsulinemi'nin anabolik etkisine veya osteoblastik aktiviteyi arttırmasına bağlı olabileceği düşüncesine dayandırılmıştır. Rakic V. ve arkadaşlarının yapığı diğer bir kesitsel çalışmada Tip 2 DM'lilerde kemik yapım(K-ALP, OK) ve yıkım(Tip 1 kollagenin karboksi terminal telopeptiti) belirteçlerinde kontrol grubuna göre bir değişiklik olmadığı tesbit edilmiştir. Buna

karşılık kadın vakalarda kontrol grubuna göre KMD'de artış, erkek vakalarda ise bir değişiklilik olmadığı rapor edilmiştir (23) .Bununla birlikte bu çalışmalar kesitsel çalışmalar olup diyabetin kontrol derecesi ile kemik döngüsü arasındaki ilişkiye önemli ölçüde açıklık getiren çalışmalar değildirler. Literatür incelendiğinde Tip 1 ve Tip 2 DM'li olgularda DM'nin kontrol derecesi ile kemik yapım ve yıkım belirteçlerindeki değişimleri prospektif ve izleme dayalı olarak irdeleyen bir çalışma mevcut değildir.

Çalışmamızda Tip 2 DM'li olgularda DM'in kontrolünde önemli bir gösterge olan HbA_{1c} düzeyindeki düzelme ile bazı kemik yapım ve yıkım belirteçlerinin değişimi ortalama (4.9±1.2) ay süre ile izlenerek değerlendirildi (Tablo 12). Vakalarımızın ortalama yaşları (51±7.5)yıl idi. Vakaların DM yaşları ise ortalama (4.9±3.5) yıl idi. Vakalarımızı seçerken kadın ve erkek sayısını eşit tutmaya, kadın ve erkek hastaların başlangıç klinik ve laboratuvar bulgularının homojen olmasına özen gösterdik. Kadın ve erkek hasta sayımızın istatistik olarak değerlendirmeye yetecek sayıda olmaması sebebi ile çalışmamızı cinsiyete bağlı olarak ele alamadık. Vakalarımızın başlangıçta ortalama HbA_{1c} , K-ALP, OK, Dpr ve NTx düzeyleri kaydedildikten tedavi bakımından yaklaşık 5 aylık sıkı bir izleme alındılar. İzlem sonrasında vakalarımızın metabolik kontrollerinde düzelmeye paralel olarak (HbA_{1c} düzeyindeki azalma) kemik yıkım ve yapım parametrelerinde azalma saptandı. Bu azalma tüm vakalar için serum vitamin D ve serum iPTH düzeylerinden bağımsız olarak gerçekleşti. Bu durum kemik döngüsündeki iyileşmenin vitamin D bağımlı faktörlerden ziyade DM'nin iyi kontrolu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (30).

Yine çalışmamızda tüm vakalar izlem öncesi ve sonrasındaki HbA_{1c} düzeylerinin farkları (ΔHbA_{1c}) ile kemik yapım parametrelerinin farkları(ΔK-ALP, ΔOK) ve yıkım parametrelerinin farkları (ΔDPr, ΔNTx) bakımından karşılaştırıldığında; her birisi ayrı ayrı olmak üzere aralarında pozitif korelasyon saptandı.

Bundan önceki kesitsel çalışmalarda belirtilen Tip 2 DM nin kemik yıkımını artırdığı bulgularını; çalışmamızdaki HbA_{1c} düzeyindeki azalmaya paralelel olarak kemik yapım ve yıkım belirteçlerindeki azalma destekler nitelikteydi. Bulgularımızdan hareket ederek DM'nin kontrolünün kemik metabolizmasını iyileştirici yönde etkilediğini söyleyebiliriz. Ancak çalışmamızda KMD'nin değerlendirilmesinde kullanılan radyografik yöntemlerden faydalanamadığımızdan HbA_{1c} düzeyindeki

azalma ile kemik metabolizmasında düzelme arasındaki ilişki net olarak değerlendirilememiştir.

Çalışmamızda diyabette metabolik düzelmeye paralel olarak kalsiyum, fosfat, 25OHD ve iPTH düzeylerinde anlamlı bir değişmenin olmamasına karşın kemik yıkım belirteçlerinden NTx ve DPr'in azalmış olması, kemik döngüsünün değerlendirlmesinde kalsiyum ve fosfat minerallerinin söz konusu parametreler kadar duyarlı olmadığını düşündürmektedir. Metabolik kontrolü kötü olan DM'lilerde anormal glikozilasyona bağlı olarak kollajenin dayanıklılığının azaldığı ve çapraz bağların bozulduğu rapor edilmiştir (30). Bulgularımızda NTx ve DPr'nin kalsiyum ve fosfat metabolizmasından bağımsız olarak azalmış olması bu çalışmanın sonuçları ile uyum içindedir (30).

Çalışmamızın sonuçları DM'de metabolik bozukluğun kontrol altına alınmasının, kemik döngüsünde azalma veya kemik metabolizmasında düzelmeye katkıda bulunan önemli faktörlerden birisi olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte çalışmamızın sonuçlarını karşılaştırabileceğimiz benzer metodolojiyi kullanan çalışma sayısının kısıtlı olmasından dolayı bulgularımızın detaylı olarak irdelenmesi mümkün olmamıştır. Bu konuda daha geniş ölçekli ve daha uzun süreli prospektif ve izleme dayalı çalışmaların yapılması konuya netlik kazandıracağı kanaatindeyiz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Tip 2 DM'li vakalarda HbA_{1c} düzeyine (>%8 mg) göre belirlenen metabolik bozukluğun kemik yapım (K-ALP, OK) ve yıkım belirteçleri (DPr, NTx) üzerine etkileri prospektif ve izleme dayalı olarak araştırıldı. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Bilim Dalı tarafından izlenen ve yaşları 37 yıl ile 66 yıl (ort±SD 51±7.5) arasında değişen 35 Tip 2 DM'li vaka (18 kadın,17 erkek) çalışmaya alındı. Vakaların başlangıçta ve izlem sonunda (4.9±1.2 (3-6 ay) HbA_{1c} düzeyleri, kemik yıkım belirteçleri olarak; idrar Ntx ve DPr düzeyleri, kemik yapım belirteçleri olarak; OK ve K-ALP düzeyleri ölçüldü. Ayrıca, hem osteoporoza neden olabilecek diğer hastalıkların dışlanması, hem de diabetik osteopati patogenezine olası katkılarının araştırılması için; serum kalsiyum, fosfor, 25OHD, iPTH düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar aşağıda olduğu şekilde özetlendi:

- Vakaların ortalama HbA_{1c} (%mg) düzeyleri başlangıçta %10.6±1.6 iken izlem sonunda %7.7±1.0 mg düzeyine azalma gösterdi (p=0.000).
- Başlangıçta kemik yapım parametrelerinden idrar DPr (nmoLDPr/mmoLKr) düzeyi 28.6±11.6 iken, izlem sonunda 17.9±7.1'e azalma gösterdi (p=0.000).
- İdrar NTx (nmoLBCE/mmoLKr) düzeylerinde 93±13.7 den 67.1±12.8'e azalma saptandı (p=0.000).
- Ortalama serum K-ALP düzeyleri başlangıçta 129.5 ±37.3 U/L iken izlem sonunda 948±35.1U/L olarak saptandı.
- Aynı süre içinde ortalama serum OK düzeyleri ise 94.6±16.8 ng/mL den 66.3± 17.3ng/mL'ye azalma gösterdi.
- Aynı sürede ortalama serum 25OHD (ng/mL) ve iPTH(pg/mL) düzeyleri arasında istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.416,p=0.371).

Bu çalışmanın sonuçları DM'ta metabolik bozukluğun kontrol altına alınmasının kemik döngüsünde azalma veya kemik metabolizmasında düzelmeye katkıda bulunan önemli faktörlerden birisi olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, Tip 2 DM'si olan vakalarda metabolik bozukluğun derecesine göre kemik metabolizmasının etkilenme düzeyinin saptanması için geniş ölçekli ve izleme dayalı yeni prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Sacks DB, Path FR.C. Carbohydrates. In Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006:837-902.
2. Harris RA. Carbohydrate Metabolism I: Major Metabolic Pathways and Their Control In Devlin T.M. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, New York: Wiley-Liss, 2002: 598-664.
3. Harris RA, Crabb D. W. Metabolic Interrelationships. In Devlin TM. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, New York: Wiley-Liss, 2002: 862-902.
4. Endres DB, Rude RK. Mineral and Bone Metabolism. In Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Philadelphia: Elsevıer Saunders, 2006: 1891-1965.
5. Onat T. Kemik ve Diş Biyokimyası. in Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 625-629.
6. Albright F, Reifenstein EC. Parathyroid Glands and Metabolic Disease: Selected Studies. Baltimore: Williams and Wilkins: 1948.
7. Levine ME, Boisseau VC, Avioli LV. Effect of Diabetes Mellitus on Bone Mass in Juvenile and Adult Onset Diabetes. N Engl J Med 1976; 294: 241-245.
8. Ishida H, Seino Y, Matsukura S, Ikeda M, Yavata M, Yamashita G, Ishizuka S. Imura H. Diabetic Osteopenia and Circulating Levels of Vitamin D Metabolites in Type 2 (Noninsulin-Dependent) Diabetes Metabolism. 1985; 34: 797-801.
9. Selby PL. Osteopenia and Diabetes. Diabet Med; 1988; 5:423-428.
10. .Isaia G, Bodrato L, Carlavatto V, Mussetta M, Salamano G, Molinatti G.M. Osteoporosis in Type 2 Diabetes. Acta Diabetol. 1987;24: 305-310.
11. .Nuti R, Righi G. Bone Mineral Content Value in Diabetes Mellitus. Radiol Med. 1980; 66: 756-758.
12. Santiago JV, McAlister WH, Ratzan SK, Bussman Y, Haymond M, Shackelford W, Weldon WW. Decreased Cortical Thickness and Osteopenia in Children with Diabetes Mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 1977; 45: 845-848.

13. Rosenbloom AL, Lezotte DC, Weber FT. Skeletal and Joint Manifestations of Childhood Diabetes. Pediatr Clin North Am. 1984;31:569-589.
14. Isaia GC, Ardissone P, Stefano MD, Ferrari D, Martina V, Porta M, Tagliabue M, Molinatti GM. Bone Metabolism in Type Two Diabetes Mellitus. Acta Diabetol.1999; 36:35-38.
15. Hui SL, Epstein S, Johnston CC. A Prospective Study of Bone Mass in Patients with Type 1 Diabetes. J Clin Endocrinol Metab. 1985; 60: 74-80.
16. McNair P, Madsbad S. Bone Mineral Loss in Insulin Treated Diabetes Mellitus Studies on Pathogenesis. Acta Endocrinol; 1979: 90: 463-472.
17. McNair P, Madsbad S, Christiansen C. Bone Loss in Diabetics Effect of Metabolic State. Diabetologia. 1979; 17:283-287.
18. .Meema HE, Meema S. The relationship of Diabetes Mellitus and Body Weight to Osteoporosis in Elderly Patients. Canad Med Assoc J. 1967; 96: 132-139.
19. De Leeuw I, Abs R. Bone Mass and Bone Density in Maturity Type Diabetes Measured by The 1251 Photon Absorption Technique. Diabetes. 1977; 26: 1130-1135.
20. Mc Nair P, Hyldstrup L, Anderson T, Transbol I. Why is BMC Increased in Morbidly Obese Subjects? Calcif. Tissue Int. 1986; 39:A 137.
21. Van Daele PL.A, Stolk RD, Burger H, Algra D, Groble D.E, Hofman A, Birkenhager JC, Pols HAP. Bone Density in Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. Ann İntern Med 1995; 122: 409-414.
22. Cummings SR, Black DM, Nevit MC. Bone Density at Various Sites for Prediction of Hip Fractures. Lancet 1993; 341: 72-75.
23. Rakic V, Davis WA, Chubb SAP, İslam FMA, Prince RL, Davis TME. Diyabette Kemik Mineral Yoğunluğu ve Belirleyicileri: Fremantle Diyabet Çalışması. Diabetologia (Türkçe) Haziran 2006;49: 35-43.
24. Başkal N. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması. İçinde; Koloğlu. Endokrinoloji Temel ve Klinik; Prof Dr. Gürbüz Erdoğan (Editör)., MN Medikal and Nobel. Ankara. 2005: 342-348.
25. American Diabetes Association. Report of The Expert Comittee on The Diagnosis Classification of DM. Diabetes Care, 2000; 23(Supl); 4-9.

26. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of DM. D Care (sup11). 2004;27: 5 S10.
27. Alper G. Diyabet in Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006:280-290.
28. Çapoğlu İ. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Kliniğinde 1990-1999 Yılları Arasında Yatan Diyabetik Hastaların Demografik, Klinik ve Ekonomik Özelliklerinin Değerlendirilmesi. Yan dal Uzmanlık Tezi, Erzurum: 2001.
29. Metabolic Homeostasis. İn Bhagavan NV. Medical Biochemistry, Orlando, Florida: Harcourt Academic Pres, 2002: 485-519.
30. Karagüzel G. Tip 1 Diyabetli Çocuklarda Kemik Mineral Yoğunluğu Ve Kemik Döngü Belirteçleri. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Antalya: 2001.
31. DeFronzo R.A. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. in: DeFronzo RA (eds). Current Management of Diabetes Mellitus. Mosby Year Book Inc. 1998;1-4
32. Aslan M. Diabetes Mellitus'ta Tanı ve Laboratuvar. Koloğlu S. (ed). Endokrinoloji Temel ve Klinik. Medikal Network. 2. Baskı. Ankara, 2005:349-356.
33. The Expert Committee on The Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Fallow Up Report on The Diagnosis of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 2003;26 11; 3160-3167.
34. William G, Pickup JC. Handbook of Diabetes. 2 th ed. Blackwell Science. 1999;1-210
35. Kamel AN. Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisi. Aral Y, Ünüvar N (ed). Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıklarında Temel Tedavi. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.,1998; 275-299
36. Çorakcı A. Diabetes Mellitus Tedavisi. Koloğlu S. (ed). Endokrinoloji Temel ve Klinik. Medikal Network. 2. Baskı. Ankara,2005;384-450.
37. Chau DL, Edelman SV, Chandran M. Osteoporosis and diabetes. Curr Diabet Reports 2003; 3:37-42.

38. Mathiassen B, Nielsen S, Johansen JS, Hartwell D, Ditzel J, Rodbro P, et al. Long term bone loss in insulin-dependent diabetes mellitus. J Int Med 1990;227: 325-7.
39. Johansson AG, Lindh E, Blum WF, Kollerup G, Sorenson OH, Ljunghall S. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor1 in men with idiopathic osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:44-8.
40. Sözen T. Osteoporoz Tedavisi. içinde: Bayraktar M, Sözen T, Bilir N (eds) Osteoporoz. Saydam Matbaası, Ankara, 1995;127-51.
41. Roe TF, Mora S, Costin G, Kaufman F, Carlson ME, Gilsanz V. Vertebral Bone Density inInsulin-Dependent Diabetic Children. Metabolism 1991; 40:967-71.
42. Carnevale V, Romagnoli E, D'Erasmo E. Skeletal Involvement inPatients with DiabetesMellitus. Diabet Metab Res Rev 2004; 20:196-204.
43. Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, Lutterman JA, Smals AG. Osteopenia in Insulin Dependent Diabetes Mellitus: Prevalence and Aspects of Pathophysiology. J Endocrinol Invest 2000; 23:295-303.
44. Wu K, Schubeck KE, Frost HM, Villanueva A. Haversian Bone Formation Rates Determined by a New Method in a Mastodon, and in Human Diabetes Mellitus and Osteoporosis. Calcif. Tissue Res 1970; 6:204-19.
45. Spencer EM, Khalil M, Tobiassen O. Experimental Diabetes in The Rat Causes an Insulin-Reversible Decrease in Renal 25-Hydroxyvitamin D3,1α-Hydroxilase activity. Endocrinology 1980; 107: 300-5.
46. Seino Y, Ishida H. Diabetic Osteopenia: Pathophsiology and Clinic Aspects. Diabetes / Metabolism Rev 1995; 11: 21-35.
47. Moyer-Mileur LJ, Dixon SB, Quick JL, Askew EW, Murray MA. Bone Mineral Acquisition in Adolescents with Type 1 Diabetes. J Pediatr 2004; 145:662-9.
48. Lunt H, Florkowski CM, Cook HB, Whitehead MR. Bone Mineral Density, Type 1 Diabetes, and Coeliac Disease. Diabetes Care 2001; 24:791-92.
49. Sosa M, Dominguez M, Navarro MC, Segarra MC,Hernandez D, de Paplos P, et al. Bone Mineral Metabolism is Normal in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. J Diabetes Complicat 1996;10:201-5.

50. Van der Sluis IM. Children's Bone Health. Ridderprint BV Ridderkerk, Rotterdam, 2002:10-20.
51. Rosenbloom AL, Silverstein JH. Connective Tissue and Joint Disease in Diabetes Mellitus. Endocrinol Metab Clin North Am 1996; 25:473-4.
52. Valerio G, del Puente A, Espito-del Puento A, Buono P, Mozzillo E, Franzese A. The Lumbar Bone Mineral Density is aaffected by Long-Term Poor Metabolic Control in Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. Horm Res 2002; 58:266-72.
53. Fatemi S, Ryzen E, Flores J, Endres DB, Rude RK. Effect of Experimental Human Magnesium Depletion on Parathyroid Hormone Secretion and 1,25-dihidroxyvitamin D Metabolism. J Clin Endocrinol Metab 1991; 73:1067-72.
54. Özkan B. Kemik döngüsü parametrelerinin değerlendirilmesi. Çocuk ve Adolesanlarda Endokrin Testler. Yordam N, Alikaşifoğlu A, Bideci A. Pediatrik Endokrinoloji ve Oksoloji Derneği Yayınları, II. Güneş Kitabevi., Ankara, 2006: 269-288.
55. Biberoglu S. Osteoporoz Patogenezi: Kutsal YG. Osteoporoz. Roche, İstanbul: 1998; 33-55.
56. Root AW, Diamond FB. Calcium Metabolism (Normal Homeostasis). in: Sperling M. (ed). Pediatric Endocrinology. Philadelphia: Saunders. 2002: 65-96.
57. Calvo MS, Eyre DE, Gundberg CM. Molecular Basis and Clinical Application of Biological Markers of Bone Turnover. Endocrine Reviews 1996, 17 (4): 333-356.
58. Murray RK, Keeley FW. The Extracellular Matrix in Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's İllustrated Biochemistry, USA: The McGraw-Hill Companies, 2003: 535-555.
59. Rosen HN, Rosenblatt M. Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. www.uptodate.com. Vol. 9, No:1, Nov 10, 2000.
60. . Rosen HN, Rosenblatt M. Bone Physiology and Biochemical Markers of Bone Turnover. www.uptodate.com. Mar 8, 1999.
61. Seibel MJ. Biochemical Markers of Bone Remodeling. Endocrinology Metab. Clin .N. Am 2003, 32:83-113.

62. Inge M, Van der Sluis. Children's Bone Health (Thesis Erasmus University Roterdam, Netherland). Rotterdam: Ridderprint B.V. Ridderkerk, 2002:10-19.
63. Seibel MJ, Molecular Markers of Bone Turnover: Biochemical, Technical and Analytical Aspects. Osteoporos Int 2000: (suppl). 6: 18-29.
64. Bikle DD. Biochemical Markers in The Assessment of Bone Disease. Am J Med 1997, 103: 427-436.
65. Hartman C, Hochberg Z, Shamir Z. Osteoporosis in Pediatrics. IMAJ, 2003:509-515.
66. Szulc P, Seman E, Delmas PD. Biochemical Measurements of Bone Turnover in Children and Adolescent. Osteoporosis Int. 2000, 11:281-294.
67. Hanley DA. Biochemical markers of bone turnover. In: Hendersson J, Goltzman D (ed). The Primer Osteoporosis. Cambridge: Cambridge University Press, 2000:239-252.
68. Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C. Bone Markers in Clinical Practice. Current Opinion in Rheumatology 1999, 11:1-14.
69. Raisz LG. Normal Skeletal Development and Regulation of Bone Formation and Resorption. www.uptodate.com. Oct 6, 2000
70. Taylor AK, Lueken SA, Libanati C, Baylink DJ. Biochemical Markers of Bone Turnover for The Clinical Assessment of Bone Metabolism. Rheum Dis Clin North Am ,1994; 20: 589-593.
71. Mineral Metabolism. in Bhagavan NV. Medical Biochemistry. Orlando,Florida: Harcourt Academic Pres, 2002: 893-900.
72. Chaney SG. Principles of Nutrition II: Micronutrients. İn Devlin TM. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, New York: Wiley-Liss, 2002: 1138-1168.
73. Güner G. EkstrasellülerMmatriks Yapısı ve Metabolizma Bozuklukları. İçinde Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 6161-624.
74. Granner DK. The Diversity of Endocrine System in Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's İllustrated Biochemistry, USA: The McGraw-Hill Companies, 2003: 434-455.

75. Tobium H, Kanzaki S, Hida S, et al. Serum bone alkaline phosphatase isoenzyme in normal children and children with growth hormone deficiency: a potential marker for bone formation and response to growth hormone therapy JCEM 1997, 82: 2056-61.

76. Crofton PM, Evans N, Taylor MRH, Holand CV. Serum Crosslaps: Pediatric Reference Intervals From Birth to 19 Years of Age. Clinical Chemistry 2002, 48: 671-.

77. Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Hadari AA, Eastell R, Blumsohn A. Clinical Performance of Immunreactive Tartrate-Resistant Acid phophatase Isoform 5b as a Marker of Bone Resorption. Bone 2004, 34:187-194.

78. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. The Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis. Osteoporos Int 2000, suppl.6: 2-17.

79. Hannon R and Eastell R. Prenalytical Variability of Biochemical Markers of Bone Turnover. Osteoporos Int 2000, suppl.6: 30-44.