



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN ÇOCUKLARDA
SERUM D VİTAMİNİ METABOLİTLERİNİN
LC-MS/MS METODU İLE ANALİTİK ÖLÇÜMÜ**

SEHER YÜKSEL

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ARALIK 2016



**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN ÇOCUKLARDA
SERUM D VİTAMİNİ METABOLİTLERİNİN
LC-MS/MS METODU İLE ANALİTİK ÖLÇÜMÜ**

Seher YÜKSEL

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

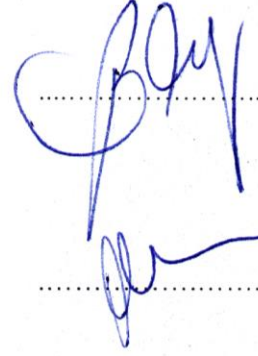
ARALIK 2016

SEHER YÜKSEL tarafından hazırlanan “OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN ÇOCUKLARDA SERUM D VİTAMİNİ METABOLİTLERİNİN LC-MS/MS YÖNTEMİ İLE ANALİTİK ÖLÇÜMÜ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ayşe Banu ÇAYCI SİVRİ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

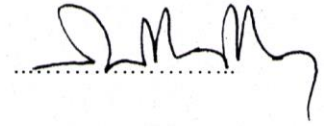
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan : Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Neslihan BUKAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Prof. Dr. Zeliha Günnur DİKMEN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Doç. Dr. Nilüfer BAYRAKTAR

Biyokimya Anabilim Dalı, Başkent Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 19 / 12 / 2016

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Seher YÜKSEL

(19.12.2016)

OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN ÇOCUKLARDA SERUM D VİTAMİNİ
METABOLİTLERİNİN LC-MS/MS METODU İLE ANALİTİK ÖLÇÜMÜ
(Doktora Tezi)

Seher YÜKSEL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Aralık 2016

ÖZET

Steroid yapıda bulunan vitamin D bileşikleri hormon benzeri fonksiyonlara sahip olan metabolitlerdir. Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB), çoğunlukla prenatal kökenli olup erken çocukluk çağında tespit edilen, nörogelişimsel durumlara ait bir grup hastalıktır. Vitamin D, anti-inflamatuar etkileri, mitokondriyi koruması ve T-regülatör hücrelerini artırması gibi rollerinden dolayı otizm risk ve şiddetini azaltabilmektedir. Çalışmamızda OSB olan (Grup I, N=46) ve sağlıklı (Grup II, N=46) çocuklarda, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, metot olarak daha hassas ve güvenilir sonuçlar sağladığından serum vitamin D metabolit (25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 3-epi-25(OH)D₃) düzeylerinin, LC-MS/MS metodu ile analitik olarak ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu araştırmada, rutin şartlarda serum 25(OH)D₃, 25(OH)D₂ düzeylerine bakmanın yanı sıra farklı bir metod ve analitik kolon kullanılarak 3-epi-25(OH)D₃ düzeyleri analiz edilmiştir. Serum kalsiyum, kreatinin ve fosfor düzeyleri spektrofotometrik yöntem ile, PTH seviyeleri elektrokemilüminesans yöntem ile tayin edilmiştir. Bulgulara göre, Grup I ve Grup II parametreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenememiştir (p>0,05). OSB'li çocuklar Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği (ÇODÖ) sonucuna göre kendi aralarında değerlendirildiğinde ağır derecede otizmlili çocukların (Grup Ib), hafif-orta derecede otizmlili çocuklara (Grup Ia) göre düşük serum 25(OH)D₃ düzeylerine sahip olduğu görülmüştür. İki grup karşılaştırıldığında serum 25(OH)D₃ düzeyleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0,05). Serum 25(OH)D₂, 3-epi-25(OH)D₃, kalsiyum, kreatinin, fosfor ve PTH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenememiştir (p>0,05). Sonuç olarak Vitamin D metabolitlerinin daha çok nörogelişimsel sürece etkilerinden dolayı OSB'li bireylerde hastalığın önlenmesi ve takibinde yararlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Bilim Kodu : 1010.1

Anahtar Kelimeler : Otizm, C3 epimer, Vitamin D, Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi

Sayfa Adedi : 134

Danışman : Prof. Dr. Ayşe Banu ÇAYCI SİVRİ

ANALYTICAL MEASUREMENT OF SERUM VITAMIN D METABOLITES BY
LC-MS/MS METHOD IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER
(Ph. D. Thesis)

Seher YUKSEL

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
December 2016

ABSTRACT

Vitamin D compounds are steroidal structures which have hormone-like functions. Autism Spectrum Disorder (ASD) is a group of diseases of the neurodevelopmental condition that is usually detected in early childhood prenatal origin. Vitamin D metabolites might reduce the risk and severity of autism due to the effects such as their anti-inflammatory effects, increasing T-regulatory cells, protecting the mitochondria. In our study, as compared with other methods, due to the fact that it provides more accurate and reliable results, in children with ASD(Group I, N=46) and healthy children (Group II, N=46), serum vitamin D metabolites (25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 3-epi-25(OH)D₃) levels to measure are aimed by LC-MS/MS method. And in this research, as well as serum 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ levels are measured in routine condition, serum 3-epi-25(OH)D₃ levels are analyzed using a different method and an analytical column. While levels of serum calcium, creatinine and phosphorus were determined by spectrophotometric method, levels of parathyroid hormone were determined by electrochemiluminescence method. According to the results, when compared Group I with Group II, there was no statistically significant differences ($p>0,05$). As Childhood Autism Rating Scale (CARS)'s results of children with ASD were evaluated themselves, children with severely ASD (Grup Ib) had lower levels of serum 25(OH)D₃ than children with mildly-moderately ASD (Grup Ia). When the two groups were compared to each other, there were found statistically significant difference in level of serum 25(OH)D₃ ($p<0,05$). Between serum 25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 3-epi-25(OH)D₃, calcium, creatinine, phosphorus and PTH levels, statistically significant differences were not observed ($p>0,05$). As a result, we consider that metabolites of vitamin D may be useful, due to the effects of neurodevelopmental process in preventing and monitoring the disease in individuals with ASD.

Science Code : 1010.1

Key Words : Autism, C3 epimer, Vitamin D, Liquid Chromatography Tandem
Mass Spectrometry

Page Number : 134

Advisor : Prof. Dr. Ayse Banu CAYCI SIVRI

TEŞEKKÜR

Hayatımıza minik dokunuşlar yaparak ona yön veren insanlar, bilgilerini ve desteklerini bizlerden esirgemiş olsalardı, şuan olduğumuz yerde olamazdık şüphesiz. Çok daha fazlasını hakeden değerli insanlara küçük ama gönülden edilmiş bir teşekkürün zamanıdır.

Bugünlere gelmemde önemli yeri olan, bilgisi, azmi ve çalışkanlığı ile herkesi kendisine hayran bırakan, bana her zaman destek olan, yol gösteren, çok sevgili ve saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Ayşe Banu ÇAYCI SİVRİ'ye,

Eğitim hayatıma olan katkılarından dolayı başta bilgisini ve güler yüzünü hiçbir zaman bizlerden esirgemeyen çok değerli Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşe BİLGİHAN'a ve kıymetli tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen çalışkanlığına hayran kaldığım, bilgi ve becerisine çok saygı duyduğum sevgili hocam Doç. Dr. Özlem GÜLBAHAR'a,

Tez çalışmama yapmış olduğu değerli katkılarından dolayı sevgili Prof. Dr. Elvan İŞERİ'ye ve numunelerin toplanmasında desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşım değerli Uzm. Dr. Hüseyin TUNCA'ya,

Laboratuvar çalışmalarına yapmış olduğu değerli katkılarından dolayı Dr. Vugar Ali TÜRKSÖY'a,

Tez çalışmam için finansal açıdan destek olan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Müdürlüğü'ne,

Tanıştığımız ilk günden bu yana güler yüzünü ve yardımlarını esirgemeyen sevgili can arkadaşım Uzm. Kimyager Durmuş AYAN'a ve her daim yanımda olan azimli, güzel arkadaşım Kimyager Sibel SÖYLEMEZ'e,

Hayatım boyunca haklarını ödeyemeyeceğim, varolma sebebim canım annem Zeliha YÜKSEL ve canım babam Şadi YÜKSEL'e,

Herzaman yanımda olan sevgili aileme,

Gazi Üniversitesi'nde eğitimim boyunca tanışma fırsatı yakaladığım tüm değerli arkadaşlarıma ve hocalarıma,

Sonsuz teşekkürlerimle...

Seher YÜKSEL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Vitamin D Metabolizması.....	5
2.1.1. Vitamin D ile kalsiyum, fosfor, kreatinin ve paratiroid hormon arasındaki ilişki.....	6
2.2. Vitamin D Metabolitleri.....	14
2.2.1. Serum 25(OH)D ₃ vitamini/ Serum 25(OH)D ₂ vitamini	14
2.2.2. Serum 3-Epi-25(OH)D ₃ vitamini	15
2.3. Vitamin D'nin Hastalıklarla İlişkisi.....	18
2.4. Otizm Spektrum Bozukluğu	20
2.4.1. Otizm Spektrum Bozukluğu'nun tanımı ve tarihsel gelişimi.....	20
2.4.2. Otizm Spektrum Bozukluğu'nun epidemiyolojisi	23
2.4.3. Otizm Spektrum Bozukluğu'nun etiyolojisi	24
2.5. Otizm Spektrum Bozukluğu ve Vitamin D Metabolitleri Arasındaki İlişki.....	25
2.5.1. Vitamin D'nin beyin üzerine etkileri	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Belirlenmesi	35
3.1.1. Çalışmaya dahil edilme/edilmeme ölçütleri.....	36

	Sayfa
3.2. Veri Toplama Araçları	38
3.2.1. Klinikte uygulanan formlar ve testler	38
3.3. Deneyler	39
3.3.1. Serumların toplanması	39
3.3.2. Kullanılan cihazlar ve kitler	39
3.4. LC-MS/MS Analiz Metodu	39
3.4.1. Serum veya plazmada 25(OH)D ₃ , 25(OH)D ₂ , 3-epi 25 (OH)D ₃ 'ün on-line analizi	41
3.5. Spektrofotometrik Yöntem	55
3.5.1. Kalsiyum düzeyi analizi	55
3.5.2. Fosfor düzeyi analizi	56
3.5.3. Kreatinin düzeyi analizi	57
3.6. Elektrokemilüminesans Yöntem	58
3.6.1. Paratiroid hormon analizi	58
3.7. Verilerin Analizi	60
4. BULGULAR	61
4.1. Grup I, Grup II, Grup Ia ve Grup Ib 25(OH)D ₃ , 25(OH)D ₂ , 3-epi-25(OH)D ₃ , Kalsiyum, Fosfor, Kreatinin ve Paratiroid Hormon Düzeyleri	61
4.2. Kromatografik Bulgular	79
5. TARTIŞMA	87
6. SONUÇ	95
KAYNAKLAR	97
EKLER	115
EK-1. Yerel Etik Kurul Onay Formu	116
EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formları	118
EK-3. Sosyodemografik Veri Formu	125
EK-4. Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği	127
ÖZGEÇMİŞ	131

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Vitamin D ₃ eksikliğinin serum vitamin D ₃ düzeyine göre sınıflandırılması.....	12
Çizelge 2.2. Günlük tavsiye edilen (RDA) vitamin D miktarı	13
Çizelge 2.3. DSM-V Otizm Spektrum Bozuklukları tanı ölçütleri	22
Çizelge 2.4. OSB için güçlü ve şüpheli kanıtlar.....	25
Çizelge 3.1. Hasta ve kontrol gruplarına ait demografik veriler	37
Çizelge 3.2. Kullanılan sarf malzemeleri	42
Çizelge 3.3. Serum 3-epi-25(OH)D ₃ deneyi için analitlerin m/z (kütle/yük) oranları.....	47
Çizelge 3.4. Serum 25(OH)D ₃ /D ₂ deneyi için analitlerin m/z(kütle/yük) oranları	47
Çizelge 3.5. Serum 25(OH)D ₂ /25(OH)D ₃ vitamini tayini için test bilgileri.....	53
Çizelge 3.6. Çocukluk çağındaki bireylerde beklenen serum/plazma kalsiyum düzeyleri	56
Çizelge 3.7. Çocukluk çağındaki bireylerde beklenen serum/plazma fosfor düzeyleri	57
Çizelge 3.8. Çocukluk çağındaki bireylerde beklenen serum/plazma kreatinin düzeyleri	58
Çizelge 4.1. Tüm gruplara ait parametrelerin ortalama $\pm$ standart hata ve p değerleri.....	62
Çizelge 4.2. Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği (ÇODÖ)'ne göre hasta gruplarının ortalama $\pm$ standart hata ve p değerleri.....	63
Çizelge 4.3. Hafif-orta derecede (Grup Ia) Otizm Spektrum Bozukluğu olan hastaların ve Kontrol (Grup II) grubunun ortalama $\pm$ standart hata ve p değerleri.....	64
Çizelge 4.4. Ağır derecede (Grup Ib) Otizm Spektrum Bozukluğu olan hastaların ve Kontrol (Grup II) grubunun ortalama $\pm$ standart hata ve p değerleri .	64
Çizelge 4.5. Grup I ve Grup II parametreleri için ortalama $\pm$ standart hata, ortanca, en düşük ve en yüksek değerleri.....	65
Çizelge 4.6. Grup Ia ve Grup Ib parametreleri için ortalama $\pm$ standart hata, ortanca, en düşük ve en yüksek değerleri.....	66

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.7. OSB ve kontrol grubuna ait 25(OH)D ₃ düzeylerinin yüzde verileri	66
Çizelge 4.8. Grup I parametrelerine ait Spearmans rho korelasyon analiz tablosu.....	71
Çizelge 4.9. Grup II parametrelerine ait Spearmans rho korelasyon analiz tablosu ...	72
Çizelge 4.10. ÇODÖ'ne göre Grup Ia parametrelerine ait pearson korelasyon tablosu	73
Çizelge 4.11. ÇODÖ'ne göre Grup Ib parametrelerine ait pearson korelasyonu	74



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Ergokalsiferol ve kolekalsiferol yapıları	6
Şekil 2.2. Paratiroid bezlerinin yapısı.....	7
Şekil 2.3. Paratiroid hormonun sentezi ve ana etkileri	8
Şekil 2.4. Plazma kalsiyum metabolizması	10
Şekil 2.5. Vitamin D ₃ metabolizması	15
Şekil 2.6. Vitamin D ₃ epimerizasyonu ve metabolik yolları	17
Şekil 2.7. Vitamin D eksikliğinin ana nedenleri ve sonuçları	20
Şekil 2.8. İnsan beynindeki vitamin D ₃ metabolizması	30
Şekil 2.9. Beyindeki vitamin D'nin nükleer hedefleri	32
Şekil 3.1. LC sisteminin yapısı.....	43
Şekil 3.2. Otomatik switching (anahtarlama) valfi ve LC sisteminin yapısı.....	43
Şekil 3.3. APCI iyon kaynağının şematik görünümü	44
Şekil 3.4. HPLC cihazı	45
Şekil 3.5. 3-epi-25(OH)D ₃ için retansiyon zamanları ve akış miktarı.....	46
Şekil 3.6. Serum 25(OH)D ₂ / 25(OH)D ₃ vitamin tayinleri için kalibratör kontrol ve numunelerin hazırlanması.....	51
Şekil 3.7. Serum 3-epi-25(OH)D ₃ vitamin tayini için kontrol, kalibratör ve numunelerin hazırlanması	52
Şekil 3.8. LC-MS/MS yönteminde kullanılan ayarlar	54
Şekil 3.9. Spektrofotometrenin temel yapısı	55
Şekil 3.10. Sandviç ECLIA prensibi	60
Şekil 4.1. Tüm gruplara ait serum 25(OH)D ₃ değerleri için box-plot grafikleri	67
Şekil 4.2. Tüm gruplara ait serum 25(OH)D ₂ değerleri için box-plot grafikleri	67
Şekil 4.3. Tüm gruplara ait serum 3-epi-25(OH)D ₃ değerleri için box-plot grafikleri	68
Şekil 4.4. Tüm gruplara ait serum kalsiyum değerleri için box-plot grafikleri	68

Şekil	Sayfa
Şekil 4.5. Tüm gruplara ait serum kreatinin değerleri box-plot grafikleri	69
Şekil 4.6. Tüm gruplara ait serum fosfor değerleri box-plot grafikleri	69
Şekil 4.7. Tüm gruplara ait PTH değerleri için box-plot grafikleri	70
Şekil 4.8. OSB'li çocuklarda serum 25(OH)D ₃ ve kalsiyum arasındaki korelasyon grafiği	75
Şekil 4.9. OSB'li çocuklarda serum fosfor ve kreatinin arasındaki korelasyon grafiği	75
Şekil 4.10. Kontrol grubunda serum 25(OH)D ₃ ve 3-epi-25(OH)D ₃ düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği	76
Şekil 4.11. Kontrol grubunda serum fosfor ve kalsiyum düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği	76
Şekil 4.12. ÇODÖ'ne göre Grup Ia serum 25(OH)D ₃ ve PTH düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği	77
Şekil 4.13. ÇODÖ'ne göre Grup Ia serum 3-epi-25(OH)D ₃ ve PTH düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği	77
Şekil 4.14. ÇODÖ'ne göre Grup Ia serum 25(OH)D ₃ ve kalsiyum arasındaki korelasyon grafiği	78
Şekil 4.15. ÇODÖ'ne Grup Ib serum fosfor ve kreatinin düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği	78
Şekil 4.16. Serum 25(OH)D ₃ kromatogramı ve kalibrasyon eğrisi	79
Şekil 4.17. Serum 25(OH)D ₂ kromatogramı ve kalibrasyon eğrisi	79
Şekil 4.18. Serum 3-epi-25(OH)D ₃ kromatogramı ve kalibrasyon eğrisi	80
Şekil 4.19. Kalibratör 1'e ait kromatogram (25(OH)D ₃ -25(OH)D ₂)	80
Şekil 4.20. Kalibratör 2'ye ait kromatogram (25(OH)D ₃ -25(OH)D ₂)	81
Şekil 4.21. Kalibratör 3'e ait kromatogram (25(OH)D ₃ -25(OH)D ₂)	81
Şekil 4.22. Normal kontrol kromatogramı (25(OH)D ₃ -25(OH)D ₂)	82
Şekil 4.23. Patolojik kontrol kromatogramı (25(OH)D ₃ -25(OH)D ₂)	82
Şekil 4.24. Hasta çocuğa ait serum 25(OH)D ₃ -25(OH)D ₂ kromatogramı	83
Şekil 4.25. Sağlıklı çocuğa ait serum 25(OH)D ₃ -25(OH)D ₂ kromatogramı	83
Şekil 4.26. Hasta çocuğa ait serum 3-epi-25(OH)D ₃ kromatogramı	84

Şekil	Sayfa
Şekil 4.27. Hasta çocuğa ait serum 3-epi-25(OH)D ₃ kromatogramı.....	84
Şekil 4.28. Sağlıklı çocuğa ait serum 3-epi-25(OH)D ₃ kromatogramı.....	85
Şekil 4.29. Sağlıklı çocuğa ait 3-epi-25(OH)D ₃ kromatogramı.....	85



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. LC-MS/MS cihazı.....	48



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
Ca ²⁺	Kalsiyum İyonu
Da	Dalton
dk	Dakika
g	Santrifüj Kuvvet Birimi
L	Litre
m/z	Kütle/Yük Oranı
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Na	Sodyum
ng	Nanogram
nmol	Nanomol
°C	Celsius Derecesi
P	Fosfor
rpm	Revolutions Per Minute
α	Alfa
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
% R	Yüzde Recovery
1,25(OH)₂D₃	1,25 Dihidroksi Vitamin D ₃ - Kalsitriol
24,25(OH)₂D₃	24,25 Dihidroksi Vitamin D ₃
25(OH)D₂	25 Hidroksi Vitamin D ₂ / Ergokalsiferol
25(OH)D₃	25 Hidroksi Vitamin D ₃ - Kolekalsiferol - Kalsidiol
3-epi-25(OH)D₃	3-epimer 25 Hidroksi Vitamin D ₃
6-OHDA	6-Hidroksi Dopamin
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
AS	Asperger Sendromu
BTA-YGB	Başka Türlü Adlandırılmayan Yaygın Gelişimsel Bozukluk
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
CARS	Childhood Autism Rating Scale
CV	Coefficient of Variation
ÇODÖ	Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği
DBP	Vitamin D Bağlayıcı Protein
DSM	Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Hastalıklar El Kitabı
DSM-IV-TR	Amerikan Psikiyatri Birliği Psikiyatrik Bozukluklar Tanısal ve Sayımsal El Kitabı 4. Baskı düzeltilmiş metni
ESI	Electrospray Ionisation
GDNF	Glial Hücre Kökenli Nörotrofik Faktör
HPLC	High Performance Liquid Chromatography - Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi

Kısaltmalar	Açıklama
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometre/Kütle Spektrometre
LOD	Limit of Detection – Deteksiyon Limiti
LOQ	Limit of Quantitation – Kantitasyon Limiti
MAP Kinaz	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MRM	Multi Reaction Monitoring-Çoklu Reaksiyon İzleme
NGF	Nerve Growth Factor - Sinir Büyüme Faktörü
NT-3	Nörotrofin-3
NT-4	Nörotrofin-4
OSB	Otizm Spektrum Bozukluğu
PFP	Pentaflorofenilpropil
PI-3 Kinaz	Fosfoinozidit 3-Kinaz
PKA	Protein Kinaz A
PLC	Fosfoinozidit Fosfolipaz C
PTH	Paratiroid Hormon
Q	Quadrupole
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SRM	Selected Reaction Monitoring-Seçilmiş Reaksiyon İzleme
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography-Ultra Performans Sıvı Kromatografisi
UV	Ultraviole
VDR	Vitamin D Reseptörü
VDREs	Vitamin D Cevap Elementleri
YGB	Yaygın Gelişimsel Bozukluk

1.GİRİŞ

Vitamin D, yağda çözünen vitaminler arasında yer alan, endojen olarak vücutta sentezlenebilen hormon benzeri etkilere sahip steroid yapılı bileşiklerdir. Vitamin D'nin kemik ve mineral metabolizması üzerine etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, vitamin D reseptörünün vücuttaki birçok dokuda saptanması ile birlikte, vitamin D'nin kemik dışında farklı bölgelerde etki mekanizmaları olabileceği araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan araştırmalarda, vitamin D bileşiklerinin beyin-omurilik sıvısında bulunması ve kan-beyin bariyerini geçebilmesi ile metabolizmada görev alan enzimlerin beyin dokusunda tayin edilmesi vitamin D'nin beyin üzerindeki etkilerini gündeme getirmiştir. Vitamin D ile beyin gelişiminde etkili mekanizmalar üzerinde çalışmalar yapılmakta ve vitamin D eksikliğinin bazı psikiyatrik hastalıklarla ilişkisi araştırılmaktadır. Vitamin D eksikliğinin beyinde anatomik ve hücresel düzeyde farklılıklara neden olduğu tespit edilmiş ve vitamin D'nin beyin gelişiminde olumlu etkilere sahip olduğu çalışmalarla desteklenmiştir. Genel popülasyonda vitamin D eksikliği prevalansı önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir [1]. Vitamin D'nin kanser, kalp-damar hastalığı, multiple skleroz (MS), şeker hastalığı, otizm ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir [2]. Vitamin D normal olarak, güneşten gelen 290-315 nm dalga boyundaki ultraviyole ışınların etkisiyle deride yer alan 7-dehidrokolesterol'ün termal enerji ile vitamin D₃ veya kolekalsiferole dönüştürülmesiyle dolaşıma katılmaktadır [3]. Vitamin D, ağız yoluyla alındığı zaman deride aynı şekilde oluşturulması için vücut bunu metabolize etmektedir. Dolaşıma nasıl ulaşırsa ulaşsın karaciğer vitamin D'nin dolaşımdaki formunu 25-hidroksilaz enzimi yardımı ile 25(OH)D₃'e hidroksile etmektedir [4, 5].

Vitamin D genlerin düzenlenmesi gibi birçok mekanizmada görev almaktadır. DNA tamiri vitamin D'nin bakım ve onarım fonksiyonlarından biridir [6]. Klinik olarak 25(OH)D₃ düzeyleri, vitamin D seviyesinin gösterilmesinde belirteç olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda, altın standart bir yöntem olarak kabul edilen sıvı kromatografisi kütle/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) metodu ile vitamin D düzeyleri, diğer yöntemlere göre daha hassas sonuçlar vermektedir [7]. Çok sayıda meta-analiz ve sistematik çalışmalar, vitamin D'nin kemik ile ilgili olmayan birçok hastalığın, örneğin; kanser, kardiyovasküler hastalıklar, multiple sklerozis, diyabet, otizm ve otoimmün hastalıkların patogenezinde ve önlenmesinde bir rol oynadığını öne sürmektedir [8]. Diğer bir ana metabolit vitamin D₂

bitki orijinlidir ve ağırlıklı olarak gıdalar ve takviyeler aracılığıyla vücuda alınmaktadır [9]. Vitamin D₂ ve D₃ karaciğerde her biri ayrı olarak sırasıyla 25-hidroksi vitamin D₂ (25-OHD₂) ve 25-hidroksivitamin D₃ (25-OHD₃)'e dönüştürülür. 25(OH)D'nin serum konsantrasyonu nispeten uzun yarı ömre sahip olmasından (2-3 hafta) dolayı çoğunlukla bir bireyin vitamin D durumunu değerlendirmek için kullanılır. 25(OH)D ile karşılaştırıldığında aktif form olan 1,25 dihidroksivitamin D (1,25-(OH)₂D)'nin yarı ömrü yalnızca 4-6 saattir. 1,25-(OH)₂D vitamininin normal veya yüksek serum konsantrasyonu, paratiroid hormonun (PTH) salgılanmasına neden olarak 1,25-(OH)₂D'nin renal üretimini indüklemektedir [10]. Serumda 25(OH)D vitamini konsantrasyonun belirlenmesinde, günümüzde mevcut olan dört farklı metod kullanılmaktadır; a) Kompetitif immünoassay, b) Kompetitif protein binding assay (CPBA), c) Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve d) Sıvı kromatografisi- kütle/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) [2]. LC-MS/MS analitik ölçümde, seçicilik, doğruluk ve hassasiyet açısından diğer testlere göre avantajlara sahiptir. Bunun yanı sıra vitamin D ölçümü için klinik laboratuvarların yaklaşık %10'unda LC-MS/MS kullanılmasının nedeni, pahalı donanım ve uzmanlık gerektiren bir teknik olmasıdır. Doğru ve hassas ölçümler, numune ön-muamelesi, kalibrasyon, kromatografik ayırma modu, internal standart seçimi, iyonizasyon modu ve spektrometrik deteksiyon için transisyon(geçiş) seçimi gibi birçok adımın optimizasyonunu gerektirmektedir [11]. Çeşitli iyonizasyon modları arasında elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI), MS analizinde en çok kullanılan tekniklerdir. Vitamin D metabolitlerinin yüksek lipofilik yapısı, düşük iyonizasyon özellikleri ile izobarik ve izomerik bileşiklerin potansiyel müdahalesi LC-MS/MS ölçümünü zor hale getirmektedir.

Yaklaşık olarak 50'nin üzerinde vitamin D metaboliti rapor edilmiştir [12]. 25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 24R,25(OH)₂D₃, 3-epi-25(OH)D₃, 3-epi-1,25(OH)₂D₃, 1,25(OH)₂D₃ vitamin D metabolitlerinden bazılarıdır. Günümüzde yalnızca 25(OH)D ve 1,25(OH)₂D düzeyleri klinik olarak bilgi sağlamaktadır. 3-epi-25(OH)D ve 24R,25(OH)₂D'nin miktar tayinleri klinik araştırmalar için önemli bilgiler sunabileceği düşünülmektedir.

Serum 25(OH)D vitamin ölçümü için kullanılan LC-MS/MS'in artan klinik uygulamaları, ihmal edilen 3-epi-25(OH)D₃'ün ayrımını ve ölçümündeki ilgiyi gündeme getirmiştir. Rutin olarak 25(OH)D₃ tayini için kullanılan LC-MS/MS, 25(OH)D₃'ten 3-epi-25(OH)D₃'ün ayrımını yapamamaktadır. Bununla birlikte, klinik uygulamada

3-epi-25(OH)D₃'ün ayrımı tartışmalı bir konudur. 25(OH)D'nin epimerik formlarının (3-epi 25(OH)D₂ ve 3-epi-25(OH)D₃), özellikle bebek popülasyonlarında total 25(OH)D konsantrasyonunun büyük bir bölümüne katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. C-3 epimerlerinin birincil metabolitlere göre çok daha düşük biyolojik aktiviteye sahip olmasına rağmen spesifik olarak miktar tayini vitamin D durumunun uygun bir klinik değerlendirmesi için gerekli olabilmektedir. Bu epimerler izobarik olduğundan doğru miktar tayini için kromatografik ayırma gereklidir. LC-MS/MS, vitamin D profili oluşturarak, tek bir deneysel ortamda çoklu analit analizinin gerçekleştirilmesi ile ilgili tüm vitamin D metabolitlerinin spesifik belirlenmesine olanak vermektedir [13].

Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, metot olarak daha hassas ve güvenilir sonuçlar sağladığından çalışmamızda Otizm Spektrum Bozukluğu (OSB) olan çocuklarda vitamin D metabolit (25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 3-epi-25(OH)D₃) düzeyleri, LC-MS/MS metodu ölçülmesi ve 3-epi-25(OH)D₃'ün 1-18 yaş aralığındaki çocuklarda kalitatif ve kantitatif olarak tayinini yapmak amaçlanmıştır. Bu araştırmada OSB ve vitamin D metabolitleri arasındaki ilişki araştırılırken, aynı zamanda vitamin D metabolitleri için güncel bir metodunda irdelenmesi hedeflenmektedir.



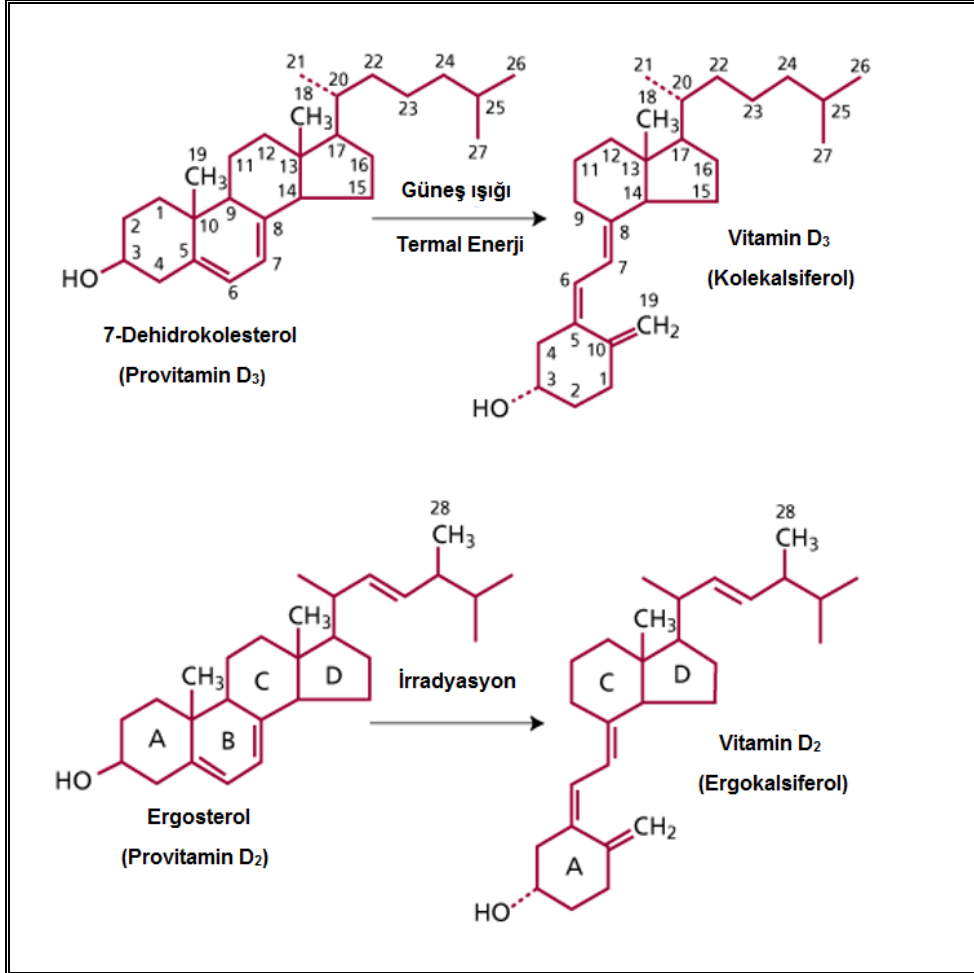
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vitamin D Metabolizması

Vitamin D, yağda çözünen vitaminlerden bir tanesidir ve hormon benzeri fonksiyonlara sahip steroid yapıda bileşiklerdir. Sentezlendiği bölgeden uzakta etkiler gösterebildiğinden dolayı hormon olarak da tanımlanabilmektedir. Vitamin D kaynakları diyetle alınır veya endojen olarak üretilenmektedir. Bitkilerde ergokalsiferol (D_2 vitamini) ve hayvan dokularında bulunan kolekalsiferol (D_3 vitamini) kaynak olarak kullanılmaktadır. Endojen olarak kolesterol sentezinde bir ara metabolit olan 7-dehidrokolesterolden (provitamin D_3) güneş ışığı veya ultraviyole UV ışını etkisiyle deride sentezlenmektedir. Normal şartlarda güneş ışınları aracılığı ile sentez edilen vitamin D miktarı yaklaşık olarak %90-95'tir [14]. Vücutta sentez edilen vitamin düzeyi bazı faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Mevsimler, güneşlenme saati ve süresi, deri pigmentasyonu, hava kirliliği düzeyi, güneş koruyucuları, giyinme tarzı, güneş ışınlarının geliş açısı, yaşanılan bölge gibi faktörler vitamin D sentezinde etkili olmaktadır [15].

Diyetle alınan D_2 vitamini ve deride sentezlenen D_3 vitamini biyolojik olarak inaktiftir ve ardışık iki hidroksilasyon reaksiyonu sonucu aktif vitamin D'ye dönüşürler. Vitamin D dolaşımında bulunan vitamin D bağlayıcı protein (DBP) ile kompleks oluşturarak karaciğere taşınır. Birinci hidroksilasyon basamağı karaciğerde meydana gelmektedir. Reaksiyon mikrozomal bir enzim olan 25-hidroksilaz ile katalize edilir ve plazmada en baskın olan vitamin D'nin başlıca depo formu $25(OH)D_3$ meydana gelir. $25(OH)D_3$, DBP'ne bağlanarak böbreğe taşınır ve ikinci hidroksilasyon basamağı böbrekte gerçekleşir. Burada bulunan mitokondriyal 25-hidroksikolekalsiferol 1α -hidroksilaz enzimi tarafından 1. pozisyonda tekrar hidroksillenmektedir. Sonuçta aktif form olan $1,25(OH)_2D_3$ oluşmaktadır. $1,25(OH)_2D_3$ 'ün meydana gelmesi plazmada bulunan fosfat ve kalsiyum seviyeleri ile ilişkilidir. Düşük plazma fosfat seviyesi 25-hidroksikolekalsiferol 1α -hidroksilaz enzimi üzerinde doğrudan bir etki yaratırken düşük plazma kalsiyum seviyesi PTH hormonu üzerinden dolaylı etki etmektedir [16]. Vitamin D'nin inaktivasyonu, $25(OH)D_3$ ve $1,25(OH)_2D_3$ 'ün boşaltım için 24- ve 23- hidroksile ürünlere dönüşümünü katalizleyen mitokondriyal 24-hidroksilaz enzimi tarafından yan zincir oksidasyonu ile olmaktadır. Sonuç olarak suda çözünen safra metabolitlerine (26,23 lakton ve kalsitroik asit) dönüşür ve safra yoluyla dışkıya atılmaktadır [17]. C3-epimerizasyonu ikinci bir

metabolik yolak aracılığıyla ana vitamin D metabolitlerinin kendi epimerik formlarına dönüştürülür ve C-24 oksidasyon yolu boyunca ileri metabolize olur [18].



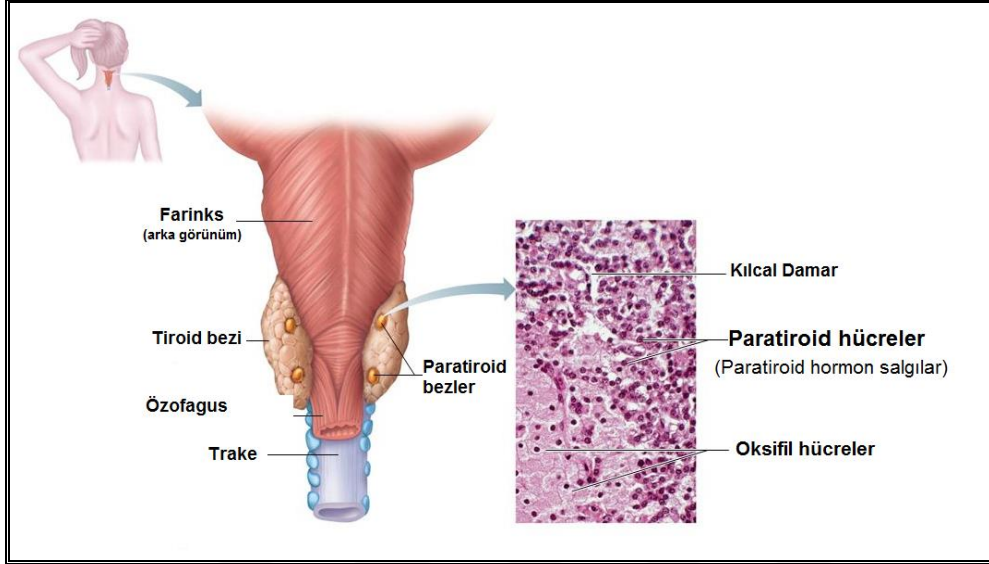
Şekil 2.1. Ergokalsiferol ve kolekalsiferol yapıları

2.1.1. Vitamin D ile kalsiyum, fosfor, kreatinin ve paratiroid hormon arasındaki ilişki

Hormonlar mineral metabolizmasını regüle etmektedir. PTH ve 1,25-dihidroksi vitamin D kemik ve mineral metabolizmasını regüle eden primer hormonlardır. Vitamin D, ince barsaklar, kemikler ve böbrekler üzerinde etki göstererek plazma kalsiyum ve fosfor düzeylerinin en uygun seviyede kalmasını sağlamaktadır.

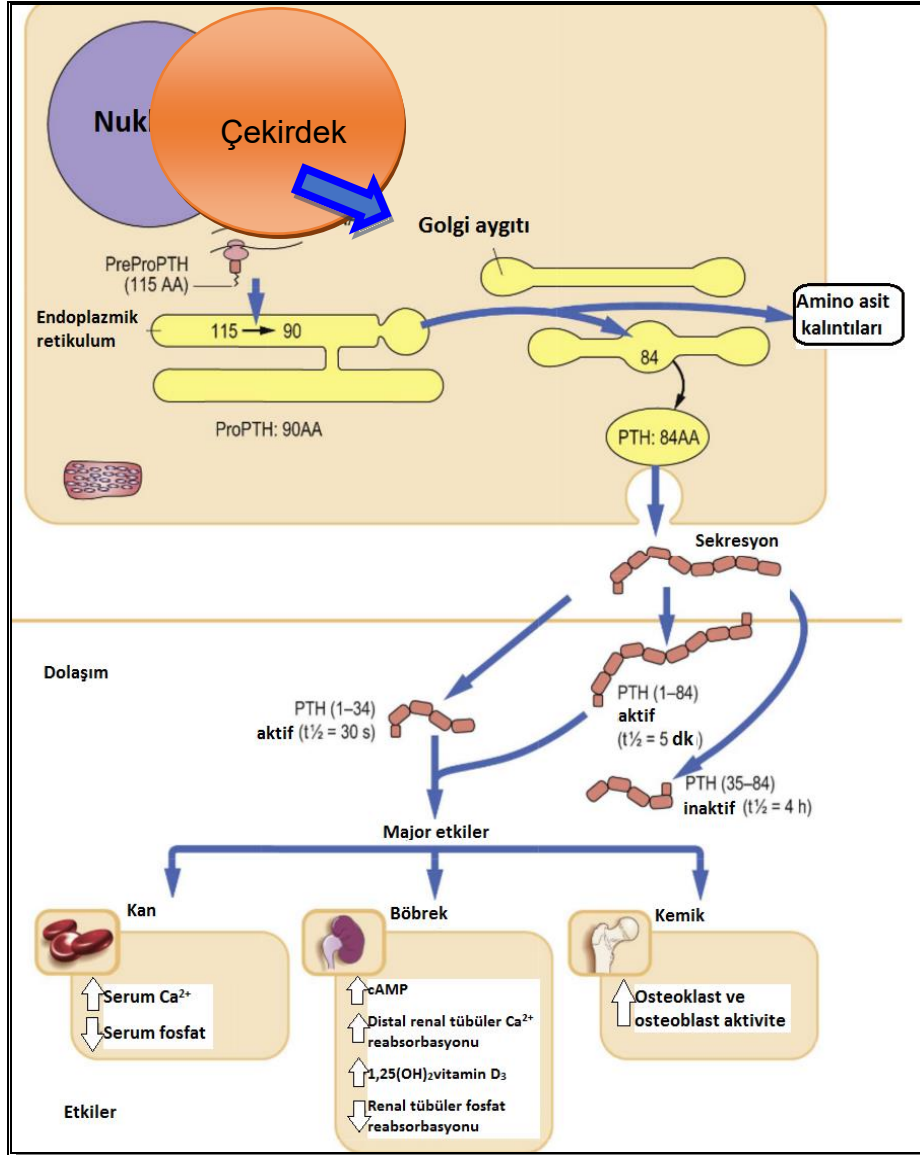
PTH, bilateral olarak yerleşmiş 4 adet paratiroid bez tarafından sentez edilir ve salgılanır. Paratiroid bezler, 2 adet sol ve 2 adet sağ olmak üzere tiroid bez kapsülünün üzerinde veya yanlarında yer almaktadır (Şekil 2. 2.). Bu bezler chief ve oksifil hücrelerden oluşur. Chief

hücreleri PTH'nın sentezi, depolanması ve salgılanmasından sorumludur. PTH, direkt olarak kemik ve böbrek üzerine etki etmektedir.



Şekil 2.2. Paratiroid bezlerinin yapısı

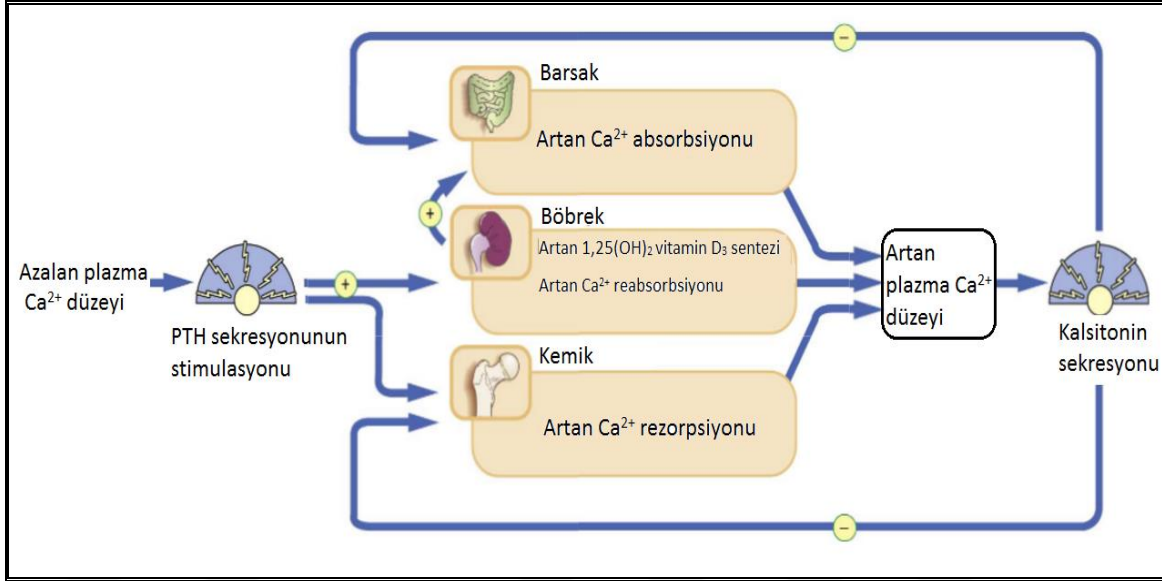
1,25(OH)₂D, PTH sentez ve sekresyonunu etkilemektedir. 1,25(OH)₂D, kronik PTH sentezini baskılamak için paratiroid bezlerdeki vitamin D reseptörleri ile etkileşime girer. PTH direkt olarak kemik ve böbrekler üzerinden hareketi ve 1,25(OH)₂D aracılığıyla barsaklar üzerinde indirekt etki gösterir. Böbreklerde PTH nefronun distal kıvrık tübülünde kalsiyum geri emilimini artırır, proksimal tübül tarafından fosfat geri emilimini azaltır, Na⁺-H⁺ antiporter aktiviteyi inhibe eder, 25-hidroksivitamin D-1α hidroksilazı indükler, kalsiyum ve fosfatın intestinal absorpsiyonunu stimüle eden 1,25(OH)₂D'nin üretimini artırır.



Şekil 2.3. Paratiroid hormonun sentezi ve ana etkileri

Kalsiyum kas hücreleri ve sinir dokuları gibi birçok organın işlevinin düzenlenmesine yardımcı olan yaşamsal bir mineral ve iyondur. Örneğin; serum kalsiyum düzeyinin düşük olması sinir sistemi kontrol kaybına neden olabilir iken, serum kalsiyum düzeyinin çok yüksek olması kalp yetmezliğine neden olabilmektedir. Bundan dolayı, yaşamsal fonksiyonların kaybedilmemesi için, kandaki kalsiyum miktarının sıkı bir şekilde regüle edilmesi gereklidir. Total plazma kalsiyum konsantrasyonu 2,2 ve 2,60 mmol/L (8,8-10,4 mg/dL) arasında sürdürülmektedir. Kalsiyum dolaşımında 3 formda bulunmaktadır. İyonize Ca^{2+} fizyolojik olarak en aktif olanı ve en önemlisidir. (Total kalsiyumun %50'si) Plazma protein konsantrasyonu arttığı durumda (örneğin dehidrasyonda olduğu gibi), protein bağlı kalsiyum ve total serum kalsiyum artışı görülür. Plazma protein konsantrasyonunun

azaldığı durumlarda (örneğin karaciğer hastalığı, nefrotik sendrom veya yetersiz beslenme), protein bağlı kalsiyum konsantrasyonu azalır, total kalsiyumun azalır ancak iyonize kalsiyum referans aralığı içerisinde muhafaza edilir. Kan ve dokular arasısivıda bulunan iyonize kalsiyum ve fosfat seviyelerindeki değişimlere yanıt olarak paratiroid bezlerden PTH salgılanır. Kandaki veya ekstraselüler sıvıdaki serbest kalsiyum konsantrasyonu PTH sentez ve sekresyonunun primer fizyolojik regülatörüdür. PTH, 84 aminoasitten meydana gelen tek zincir peptit hormondur. 9425 Da moleküler ağırlığına sahip intakt PTH sentezlenerek depo edilmektedir. PTH, sentez edildiğinde pre-pro-PTH yapısıdır. Pre ve pro sekansları hücre içerisinde enzimatik olarak ayrılır. PTH₍₁₋₈₄₎, çoğunlukla biyolojik olarak aktif PTH₍₁₋₃₄₎ amino-terminal fragmente ve inaktif PTH₍₃₅₋₈₄₎ karboksi-terminal fragmente metabolize olur. Şekil 2.3.'te paratiroid hormonun sentezi ve ana etkileri görülmektedir [19]. Ekstraselüler iyonize kalsiyumda azalma veya serum fosfat konsantrasyonlarındaki artış PTH'ın sekresyonunu stimüle eder. Serbest kalsiyum paratiroid hücrelerin plazma membranında bulunan kalsiyum-duyarlı reseptör tarafından algılanır. Bu reseptör intraselüler olayları aktive eder. PTH sentez ve sekresyonunun inhibisyonuna neden olur. PTH'ın hücresel etkilerinin çoğu G-protein ve cAMP sinyal yolağı aracılığıyla gerçekleşir. PTH sekresyonu kalsiyum tarafından feedback regülasyonla kontrol edilir. Plazma kalsiyumundaki düşüş tam tersi etkiler gösterir. Kalsiyumdaki artış PTH sekresyonunu azaltır. PTH sekresyonu ve serbest kalsiyum arasında ters bir sigmoidal ilişki görülür. PTH, kemik dokusundan kalsiyum salınmasını uyarır ve aynı zamanda normal olarak idrarla dışarı atılan kalsiyumun geri emilimi için böbrekleri stimüle eder. Önemli bir basamak olan, barsaklardan absorbe edilen kalsiyum düzeyini artırmak için PTH vitamin D₃'ü aktive eder. Bu karmaşık süreç sindirim sistemi boyunca kalsiyum ve fosfat absorpsiyonuna yol açar. PTH agonisti olan kalsitonin (1,25(OH)₂D), kandaki kalsiyum düzeyi arttığı zaman tiroidden salgılanır. 1,25(OH)₂D, kemik dokusunu yıkan osteoklastları inhibe eder ve kalsiyumun geri emilimini durdurmak için böbreklere haber verir. 1,25(OH)₂D çocukluk döneminde kemik büyümesi sırasında salgılanan bir hormondur [20].



Şekil 2.4. Plazma kalsiyum metabolizması

Kalsiyum/fosfor metabolizmasında PTH'nin stimüle ettiği hormonlar sayesinde sıkı bir şekilde renal hidroksilasyon regüle edilir. “Periferale” (renal olmayan) 1- α hidroksilasyon kalsiyum/fosfor regülasyonundan bağımsızdır ve vitamin D reseptör (VDR) eksprese olan çok sayıdaki dokuda gerçekleşmektedir. Vitamin D'nin reseptör düzeyindeki etkisi 1,25(OH) $_2$ D $_3$ vitamini sayesinde gerçekleşir. Bu etki diğer steroid hormonlardaki gibi ya doğrudan (saatler veya günler içinde) nükleer VDR üzerinden gen transkripsiyonunu regüle ederek (genomik etki) veya dakikalar içinde gerçekleşen hücre membranı üzerindeki VDR üzerinden iyonların Ca, klor (Cl) transmembran geçişini değiştirerek veya hücre içi sinyal yolak aktivitelerini (cAMP, PKA, PLC, PI-3 kinaz, MAP kinaz) aktive ederek (non genomik etki) gerçekleşmektedir [21]. Dolaşımdaki aktif vitamin D hücre membranlarından sitoplazmaya geçer ve çekirdeğe ulaşarak burada VDR'ye bağlanır. Aktif vitamin D ve VDR kompleksi, retinoid X reseptörü (RXR)'ne ve sonrasında DNA yapısında yer alan vitamin D cevap elemanı (VDRE) olarak bilinen bölgeye bağlanır. Meydana gelen 1,25(OH) $_2$ D-VDR-RXR-VDRE kompleksinin etkileşimi sonucu hedef gende DNA transkripsiyonu gerçekleşir. Bu aktivitenin kontrolü koaktivatör ve koreseptörler sayesinde kontrol edilir. Diğer yandan aktif vitamin D plazma membran reseptörüne bağlanarak cAMP veya MAP gibi ikinci habercileri aktive ederek ve voltaj bağımlı Ca ve Cl kanallarını açarak vasküler düz kaslar, bağırsaklar, pankreas beta hücreleri ve monositler üzerinde de etkili olmaktadır [22]. VDR transkripsiyon regülasyon faktörleri steroid/tiroid hormon süperfamilyasının bir üyesidir. Kalsitriol bağlayıcı, VDR retinoid X reseptörü ile heterodimerize olur ve daha sonra gen transkripsiyonunu etkilemek

için vitamin D cevap elemanları (VDREs) olarak bilinen özel genomik sekanslara bağlanır [23].

Kanda fosfor hem organik formda (fosfoproteinler, fosfoproteinler vb.) ve inorganik formda (fosfat) bulunmaktadır. İnorganik form, rutin olarak laboratuvarında ölçülmektedir. Baskın olarak iyon formunda (HPO_4^{2-} ve H_2PO_4^-) 4:1 oranında bulunmaktadır. İnorganik fosfatın %15-20'si plazma proteinlerine non-kovalent olarak bağlı haldedir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ öncelikle barsak fosfat emilimi üzerindeki uyarıcı etkisi ile plazma fosfatını düzenler. FGF-23 (Fibroblast Büyüme Faktörü-23) ise öncelikle renal tübüler fosfatın geri emilimini azaltarak regüle eder. İki hormonal sistem etkileşimi gerçekleşir. FGF-23 üretimi, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ tarafından aktive edilir ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sentezi için gerekli olan 1α -hidroksilaz aktivitesini inhibe eder. Renal 1α -hidroksilaz aktivitesinin inhibe olması ve $25(\text{OH})\text{D}$ -24-hidroksilazın aktivitesinin artması ve bundan dolayı $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sentezinin ve barsak fosfat emiliminin azalması ile fosfat seviyesini düşürür [24].

Kreatinin endojen olarak sentezlenmektedir ve yapısında azot içermektedir Proteinlerin parçalanmasıyla birlikte açığa çıkan arjinin, metionin ve glisin aminoasitlerinin böbrek, karaciğer ve pankreasta katabolize olmasıyla kreatin oluşmaktadır. Daha sonra kreatin, kreatinine dönüşmektedir. Plazma kreatinin düzeyleri böbrek hastalıklarını göstermede kullanılmaktadır. $25(\text{OH})\text{D}$ ve oral kolekalsiferole takviyesi kronik böbrek hastalığı olan kişiler arasındaki morbidite ve mortalite ile ilişkilidir. Belirgin vitamin D eksikliği bu hastalarda biyolojik bir belirteç görevi üstlenebilir. Vitamin D_3 takviyesi ve artan serum $25(\text{OH})\text{D}_3$ düzeyleri böbrek hasarlarında yararlı etkilere sahip olabilmektedir [25].

Serum $25(\text{OH})\text{D}_3$ eksikliğinin serum vitamin D_3 düzeyine göre sınıflandırılması Çizelge 2.1'de gösterilmiştir [26].

Çizelge 2.1. Vitamin D₃ eksikliğinin serum vitamin D₃ düzeyine göre sınıflandırılması

25-OH-Vitamin D ₃ (µg/L)	Sınıflandırma
< 5.0	Ciddi düzeyde vitamin D eksikliği (rikets veya osteomalaziye neden olur)
5.0 - 10	Orta düzeyde vitamin D eksikliği
10 - 20	İlımlı vitamin D eksikliği = yetersiz vitamin D
20 - 70	Yeterli vitamin D düzeyi (“normal düzey”)
30 - 70	Osteoporozis tedavisi, böbrek fonksiyonu azalmış veya dializ tedavisinde olan hastalar, kanser ve otoimmün hastalıklardan korunmak için istenen düzey
70 - 100	Güçlü UV ışığa maruz kalınan düzey
> 100	İntoksikasyon başlangıcı

Erişkinlerde 25(OH)D₃ düzeyleri için alt sınır 30 µg/L, 30 µg/L’nin altındaki değerler yetersiz, 10 µg/L’nin altındaki değerler ise eksik olarak belirlenmiştir. Çocuk Endokrin Birliği tarafından çocuklarda 25(OH)D₃ düzeyleri için alt sınır 20 µg/L, 15-20 µg/L arası yetersiz, 15 µg/L altındaki eksiklik, 5 µg/L’nin altında ise ciddi eksiklik olarak önerilmektedir [27].

Vitamin D eksikliği riski taşıyan hastalar için günlük tavsiye edilen vitamin D düzeyleri gösterilmektedir [28]. 1 yaşına kadar vitamin D eksikliği görülen hastalara 2 000 IU/gün vitamin D₂ veya D₃ 6 hafta boyunca ya da haftada bir kez 50 000 IU vitamin D₂ veya D₃ 6 hafta boyunca önerilebilmektedir. 1-18 yaş aralığındaki vitamin D eksikliği olan hastalarda ise 2 000 IU/gün vitamin D₂ veya D₃ en az 6 hafta boyunca ya da haftada bir kez 50 000 IU vitamin D₂ veya D₃ en az 6 hafta boyunca önerilebilmektedir [29].

Çizelge 2.2. Günlük tavsiye edilen (RDA) vitamin D miktarı

Yaş	Erkek	Kadın	Hamile	Emzirme dönemi
0-12 aylık	400 IU (10 µg)	400 IU (10 µg)		
1-13 yaş	600 IU (15 µg)	600 IU (15 µg)		
14-18 yaş	600 IU (15 µg)	600 IU (15 µg)	600 IU (15 µg)	600 IU (15 µg)
19-50 yaş	600 IU (15 µg)	600 IU (15 µg)	600 IU (15 µg)	600 IU (15 µg)
51-70 yaş	600 IU (15 µg)	600 IU (15 µg)		
>70 yaş	800 IU (20 µg)	800 IU (20 µg)		

Vitamin D'nin derideki üretimi azaldığında oral alımla vitamin D eksikliğini gidermenin gerekli olduğu düşünülmektedir. Fakat, vitamin D'nin derideki üretimi dikkat çekici düzeyde hızlı, olağanüstü düzeyde fazladır. Örneğin, açık tenli yetişkinler yaz mevsiminde 20 dk boyunca tüm vücutları minimal düzeyde güneşin ultraviyole ışınlarına maruz kaldığında, yaklaşık 20 000 IU vitamin D miktarı 24 saat içerisinde sistemik dolaşımlarına katılmaktadır. Hamile bir kadın aynı miktarda vitamin D düzeyini sağlayabilmek için 200 bardak süt (100 IU her bardak) veya 50 prenatal multivitamin (400 IU her tablet) alması gerekmektedir [4].

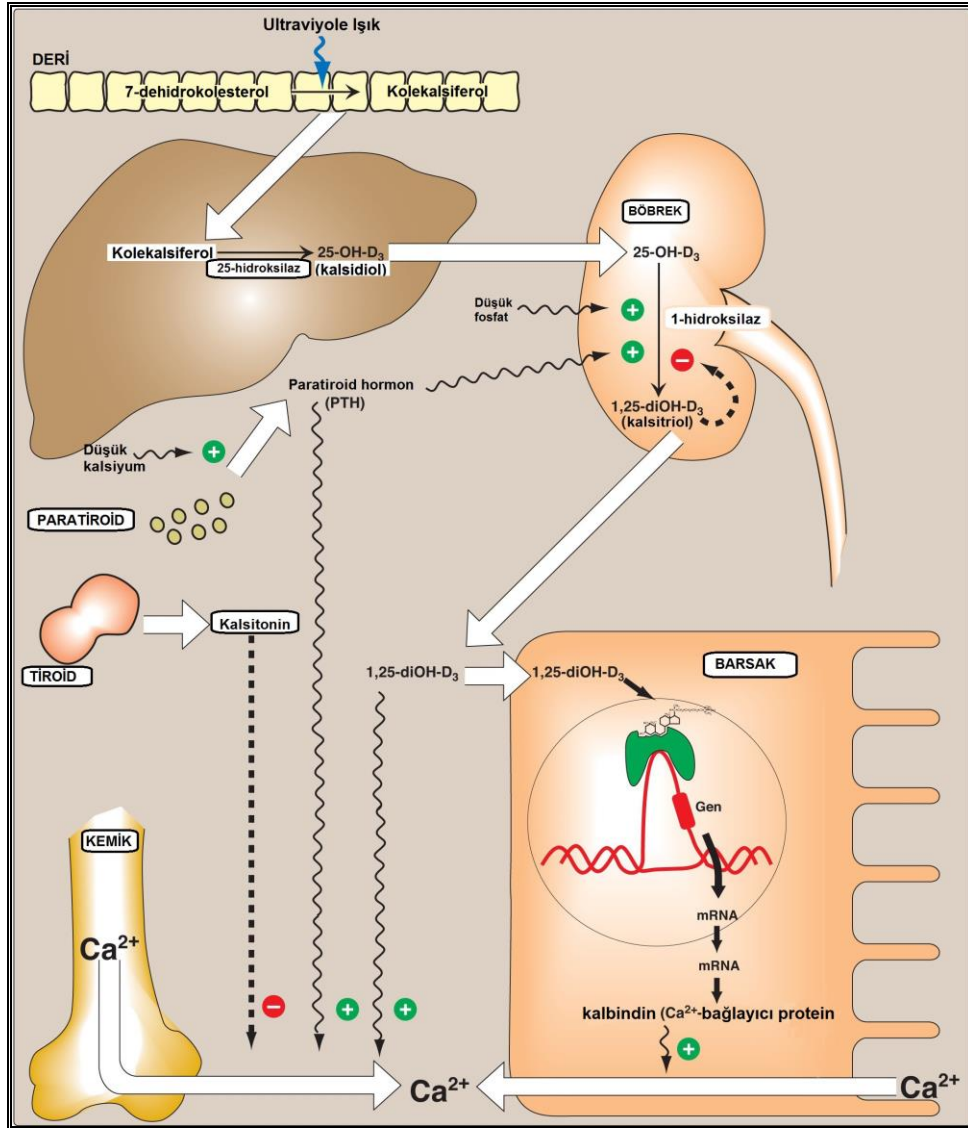
Çocuklarda vitamin D düzeyi referans aralıkları Amerikan Çocuk Endokrin Birliği tarafından belirlenmiştir [30]. Türkiye'de sosyoekonomik düzeyin artması ile gebelik döneminde vitamin D yetersizliğinin sıklığında ve şiddetinde bir azalma olmadığı gösterilmiştir [31]. IOM (Institute of Medicine), 2010 yılında 1-18 yaş arasındaki sağlıklı çocuklar için günlük alınması gereken vitamin D düzeyini 600 IU (15 µg) olarak bildirmesine rağmen, Amerikan Pediatri Akademisi (AAP) bu öneriyi henüz onaylamamıştır. AAP, bebek, çocuk ve adolesanların günlük 400 IU vitamin D alınmasını önermektedir [32].

2.2. Vitamin D Metabolitleri

2.2.1. Serum 25(OH)D₃ vitamini/ Serum 25(OH)D₂ vitamini

Vitamin D ana metabolitlerinden birisi olan 25(OH)D₂ (ergokalsiferol) mayalar tarafından üretilen ergosterolün irradyasyonu (ışınlama) ile üretilmektedir. 25(OH)D₂ vitamini, 22. ve 23. karbon atomları arasındaki çift bağ olması ve 24. karbon atomuna bağlı bir metil grubu ile 25(OH)D₃ vitamininden farklılık göstermektedir.

Vitamin D₃ ve vitamin D₂'nin hidroksillenmiş metabolitleri plazmada spesifik bir globüline olan DBP (vitamin D bağlayıcı protein)'ne bağlanarak transfer edilir. Vitamin D çeşitli gıda maddelerinde bulunmaktadır. Ergokalsiferol (vitamin D₂) şeklinde gıdalara eklenmiş olabilir veya hayvansal ürünlerde kolekalsiferol şeklinde doğal olarak görülür. Diyetteki kolekalsiferol diğer yağlarla ilişkili emilim ile alınır. Şilomikronlar ile karaciğere taşınır. Karaciğerde DBP ile şilomikronlardan serbest kalır ve 25. pozisyondan hidroksillenir. Kalsidiol (25-hidroksikolekalsiferol; 25(OH)D₃) formunu meydana getirir. Kalsidiol vitamin D'nin başlıca karaciğer depo formudur. 25(OH)D₃ böbreklerde 1.pozisyondan tekrar hidroksillenir. Mitokondriyal bir enzim olan 25(OH)D₃ 1- α hidroksilaz (CYP27B1) reaksiyonu katalizler. 1,25(OH)₂D₃ (kalsitriol) en potent vitamin D metabolitidir. Hepatik 25 hidroksilasyonun tersine, renal 1- α hidroksilaz aktivitesi sıkı bir şekilde regüle edilir. Renal 1- α hidroksilaz aktivitesi dolaşımdaki düşük fosfat ve 1,25(OH)₂D₃ konsantrasyonları ve PTH'nın yüksek konsantrasyonları ile artırılır. Vitamin D eksikliği, kalsitonin, büyüme hormonu, prolaktin ve östrojen tarafından stimüle edilir. Diğer taraftan, 1- α hidroksilaz aktivitesi 1,25(OH)₂D₃, hiperkalsemi, yüksek fosfat konsantrasyonu ve hipoparatiroidizm ile feedback olarak inhibe olur. Kemik kökenli hormon FGF-23'ün yüksek konsantrasyonları tarafından baskılanır. 1,25(OH)₂D₃ plazmada DBP'ne bağlı olarak transfer edilir [24].



Şekil 2.5. Vitamin D₃ metabolizması

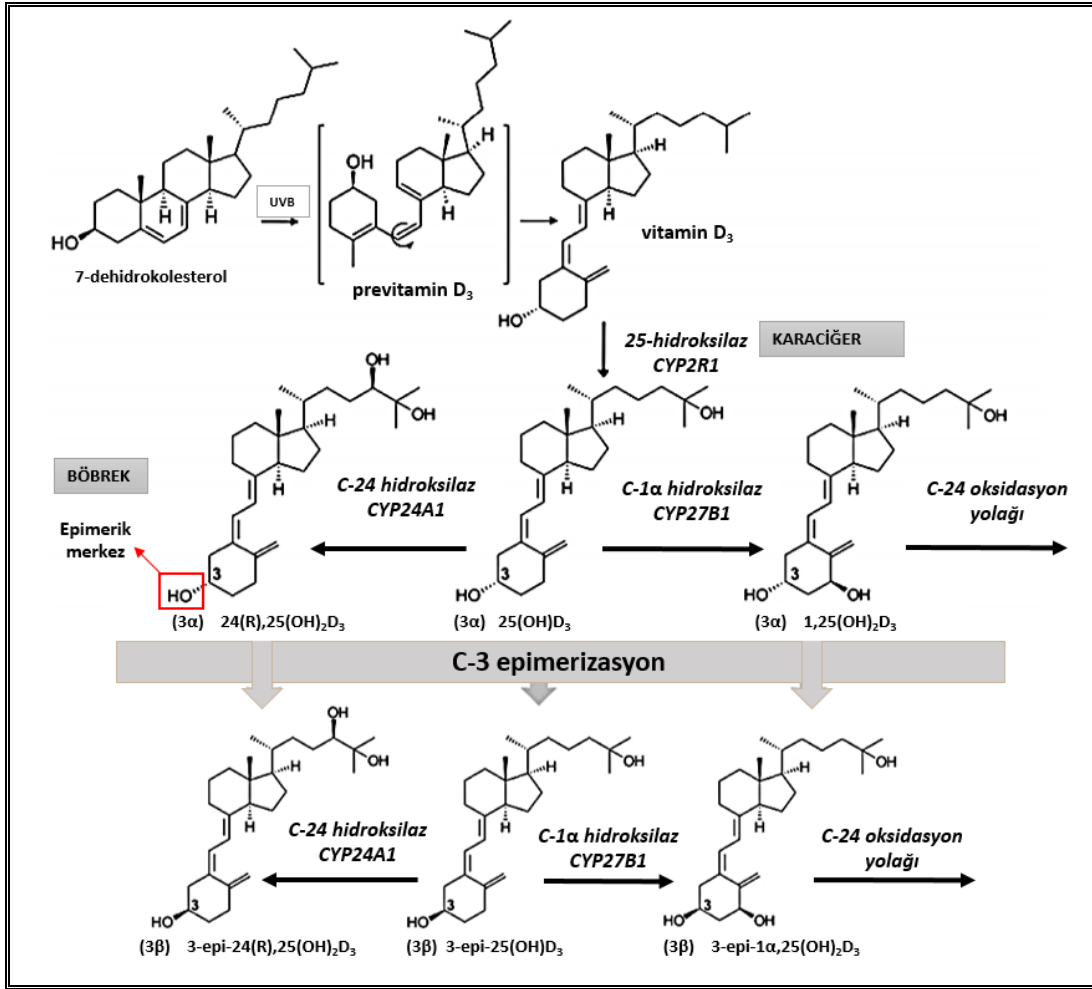
2.2.2. Serum 3-Epi-25(OH)D₃ vitamini

Epimerler yalnızca bir asimetrik karbon atomuna bağlı grupların konfigürasyonu bakımından farklı olan, ayna görüntüsü olmayan izomerlerdir [33]. Son yıllarda, vitamin D₃'ün C-3 epimerinin klinik önemi merak edilmeye başlanmış ve araştırmacılar tarafından analitik olarak ölçümü için metodlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. İnsan serumunun 25(OH)D'nin C-3 epimerini içerebileceği dikkate alınmaktadır. Bu epimerler 25(OH)D vitaminin diastereomerleridir ve kromatografik olarak analitlerinden ayrılabilmekte ve kütle spektrometri yöntemi ile epimerlerin kantitatif olarak miktarı belirlenebilmektedir. Vitamin D yetersizliğine giderek artan klinik ilgi ile birlikte, çok sayıda immünoassay, protein bağlama testleri ve LC-MS/MS metodları 25(OH)D₃'ün miktar tayini için

geliştirilmektedir. Son günlerde özellikle bebek popülasyonlarında, LC-MS/MS metodları ile 25(OH)D₃ konsantrasyonuna önemli ölçüde katkı sağladığı gösterilen 25(OH)D₃'ün bir epimerik formu olan 3-epi-25(OH)D₃ formu gösterilmiştir [13].

Epimerler ve izobarlar vitamin D metabolitleri ile aynı moleküler ağırlığa sahip bileşiklerdir ve iyonizasyon sonucunda aynı kütlede yüklü ana ve ürün iyon çiftlerini oluştururlar. Vitamin D metabolitleriyle birlikte, kromatografik olarak üst üste geldiğinden veya internal standart pik yaparak doğru vitamin D düzeyleri için yanlış tahminler vereceğinden dolayı epimerlerin ve izobarların ayrılması önem teşkil etmektedir. 25(OH)D₃ dolaşımında en çok bulunan vitamin D metabolitidir ve 3-epi-25(OH)D₃, 25(OH)D₃'ün en yaygın epimeridir. 25(OH)D'nin epimerleri, 3. karbon atomuna bağlı bir hidroksil grubunun konfigürasyonundaki değişiklikle oluşur (Şekil 2.6.'da kesik çizgilerle gösterilmiştir) [33]. Son yıllarda yayınlanmış çalışmalar özellikle yenidoğan (yaş<1) ve çocukların serum örneklerinde 3-epi-25(OH)D₃ vitamininin önemli konsantrasyonları hakkında bilgiler sunar [33, 34]. 3-epi-25(OH)D₃ PTH salgısını baskılaması özelliği ile 25(OH)D₃'e benzerdir fakat kalsiyum üretimi üzerine etkileri göz ardı edilmektedir [35].

Vitamin D₃'ün standart metabolik yolağa paralel olarak alternatif bir C-3 epimerizasyon yolu ile metabolize olabileceği keşfedilmiştir [36]. C-3 epimerizasyon yolu, A-halkasının C-3 pozisyonundaki hidroksil grubunun alfadan beta oryantasyona dönüştürülmesiyle oluşur. Hem *in vivo* hem *in vitro* çalışmalar, önemli vitamin D₃ ara metabolitlerinin tümünün epimerize olabileceğini ve bu epimerlerin standart yolaktaki hidroksilasyon ve oksidasyon reaksiyonlarından sorumlu aynı enzimler tarafından metabolize edilebildiğini destekler. Bu yolda 3-epi-25(OH)D₃, 3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃ ve 3-epi-24(R),25(OH)₂D₃ üretilir [18]. Daha sonra 3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃ üç farklı polar bileşiğe metabolize olmaktadır.(3-epi-1 α ,24(R),25(OH)₃D₃, 3-epi-24-oxo-1 α ,25(OH)₂D₃ ve 3-epi-24-oxo-1 α ,23(S),25-(OH)₃D₃) [36]. Farmakolojik dozlarda kullanılan 25(OH)D₃ ve 1 α ,25(OH)₂D₃ ile tedavi edilen ratlarda 3-epi-25(OH)D₃ ve 3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃ tespit edilmiştir [18, 35].



Şekil 2.6. Vitamin D₃ epimerizasyonu ve metabolik yolları

Epimerizasyondan sorumlu enzim henüz tanımlanamamasına rağmen aktivitenin tek yönlü olduğu ve C-1 veya C-25 pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının varlığından bağımsız olduğu görülmüştür [37]. Ayrıca sitokrom P450 enzimlerinden (CYP24, CYP27A1 ve CYP27B1) ve 3($\alpha \rightarrow \beta$)hidroksi steroid epimerazdan bağımsızdır [18]. C-3 epimerizasyon yolağı özel hücre türlerinde; çeşitli insan adenokarsinoma hücre hattında, örneğin hareketsiz Caco-2 kolon karsinoma hücreleri gibi, sığır paratiroid hücreleri, rat osteoblastik hücreleri, hepatosit kökenli HepG2 hücreleri ve yenidoğan keratinoidlerinde gözlenmiştir [18, 36, 38-40]. Bu nedenle epimerizasyon, önemli olan tüm vitamin D metabolitleri için ortak bir mekanizmadır. Epimerizasyon ekstrarenal dokularda meydana gelebilmekte ve vitamin D metabolizmasında rol oynayan klasik karaciğer enzim sistemlerinden farklı enzimler kullanıldığını açıklamaktadır. 1 α ,25(OH)₂D₃'ün tersine C-3 epimeri, kalselik ve non-kalselik düzenleyici etkileri tümü olmasa da etkilerin bazılarını sahip olduğu gösterilmiştir. C-3 epimerleri 3-epi-25(OH)D₃ ve 3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃,

25(OH)D₃ ve 1 α ,25(OH)₂D₃ ile karşılaştırıldığında yaklaşık %36-46'sı DBP'ne, %2-3'ü VDR'e bağlanır [18]. VDR bağlanma aşamasında, 3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃, BGLP(osteokalsin) ve CYP24 gen ekspresyonunu indükler, 1 α ,25(OH)₂D₃ ile karşılaştırıldığında yaklaşık %15 düzeyindedir. Benzer şekilde, 3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃'ün bazı anti-proliferatif (çoğalma karşıtı) ve farklılaştırma etkilerine sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak bu etkiler, epimerik olmayan formla karşılaştırıldığında yaklaşık olarak sırasıyla %30 ve %10 seviyelerindedir [18]. İlginç bir şekilde, 3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃ paratiroid hormon salgılanmasını baskılama ve pulmoner alveoler tip II hücrelerinde surfaktan fosfolipid sentezini indüklemeye yeteneğine sahiptir. Bu yeteneği, epimerik olmayan formlarla yaklaşık aynı düzeyde olmaktadır. Bu etkinin olduğu görüldüğünde, VDR-bağlama yeteneğinin eşdeğer düzeyde olmamasına rağmen, 3-epi-1 α ,25(OH)₂D₃, 1 α ,25(OH)₂D₃ ile karşılaştırıldığında epimerik formun daha yüksek metabolik stabiliteye sahip olduğu öne sürülmüştür [37, 39]. Gelecekteki çalışmalar, bu olasılığı araştırmak ve diğer klasik vitamin D etkilerinin dışında PTH ekspresyonunu baskıladığı düşünülen 3-epi vitamin D ile yapılan çalışmaları değerlendirmek için devam edecektir [41].

2.3. Vitamin D'nin Hastalıklarla İlişkisi

Vitamin D'nin fizyolojik rolü kalsiyum ve fosfor homeostasisini ve kemik sağlığını korumaktır. Bunun yanı sıra hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan araştırmalar, vitamin D'nin akut ve kronik hastalıkların geniş bir aralığının patogeneğinde önemli bir rolü olabileceğini öne sürmektedir [42]. Birçok dokuda VDR'nin tespit edilmesi ile vitamin D'nin farklı fonksiyonlara sahip olabileceği ile ilgili yeni fikirler ortaya atılmıştır. Vitamin D eksikliğinin tip 1 diyabet, tip 2 diyabet, polikistik over sendromu, kanser, otizm, demans ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok akut ve kronik hastalığın patogeneğinde etkili olduğu çalışmalarla gösterilmiştir [43-49].

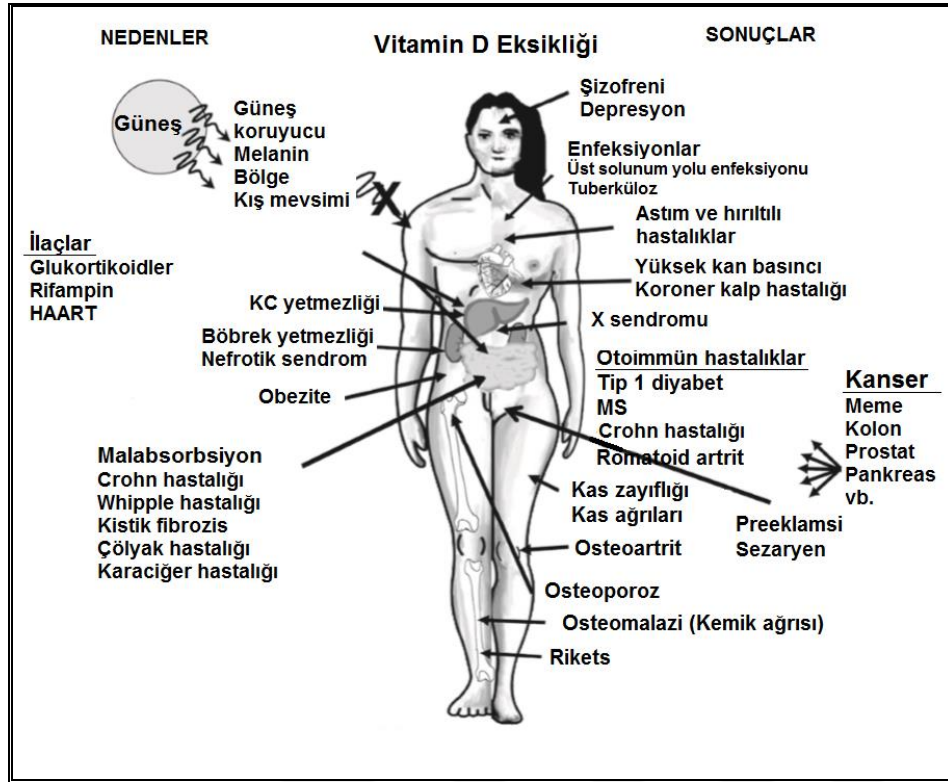
Yükselen PTH düzeyleri vitamin D eksikliğinin bir işaretidir ve bu durum kardiyovasküler hastalıkların başlaması ve ilerlemesine katkıda bulunabilir [50]. Miyokardiyum ve damarsal fibrotik yapılanma, kardiyovasküler hastalıkların ilerlemesinin önemli bir belirleyicisidir ve vitamin D, matriks metalloproteinazlar ve FGF-23'ü baskılaması ile koruyucu bir faktör olarak görülmektedir [51]. Kardiyovasküler hastalıklar, son dönem böbrek yetmezliği (SDYB) olan hastalarda en önemli ölüm nedenlerinden biri olmakla birlikte, vitamin D eksikliği SDBY için bağımsız bir risk faktörü oluşturmaktadır [22].

Çeşitli çalışmalar, polikistik over sendromu (PKOS), *in vitro* fertilizasyonun sonlanması ve endometriozis gibi kadın üreme bozuklukları ve vitamin D arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. PKOS üreme çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluktur. Gözlemsel çalışmalar, düşük vitamin D düzeyinin insülin rezistansı, obezite, adet düzensizliği, hirsutizm ve hiperandrogenizm gibi PKOS semptomlarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir [49].

Erkek infertilitesi ve kadın infertilitesi ile vitamin D arasındaki ilişki pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Vitamin D'nin testosteron düzeylerini artırdığı ve ratlar üzerinde yapılan çalışmada spermatogenezi ve sperm olgunlaşması üzerinde olası bir rolü olduğu gösterilmiştir. *İn vitro* çalışmalar sonucu, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün progesteron, östradiol ve östronun üretimini stimüle ettiği ve granuloza hücrelerinden anti-Müllerian hormon ekspresyonunu regüle ettiği bulunmuştur [52].

Vitamin D ve kanser arasındaki ilişki yapılan ekolojik çalışmalar sayesinde güçlü kanıtlara dayanmaktadır. Bu tür çalışmalar ile 15-20 tür kanser için UVB ışığın doz ile sıklığı ve/veya ölüm oranı arasında anlamlı ters korelasyon bulunmuştur. Mevcut bilgilere dayanılarak, UVB ışığa maruz kalma ve vitamin D'nin birçok kanser türünün insidansının azaltılmasında ve kanser başlangıcından sonra yaşam süresinin artırılmasında önemli rolü olduğu gösterilmektedir [45].

Vitamin D eksikliğinin ana nedenleri ve sonuçları Şekil 2.7.'de gösterilmiştir [53].



Şekil 2.7. Vitamin D eksikliğinin ana nedenleri ve sonuçları

2.4. Otizm Spektrum Bozukluğu

2.4.1. Otizm Spektrum Bozukluğu'nun tanımı ve tarihsel gelişimi

OSB, çocukluk çağına ait nörogelişimsel bozukluklar içerisinde yer alan, belirtileri yaşamın ilk üç yılında görülmeye başlanan, sosyal becerilerde ve dil gelişiminde yetersizliklerin olduğu, sınırlı-tekrar eden davranış bozukluklarının yer aldığı klinik bir tanı grubudur [54]. Otizm ile ilgili ilk çalışmalar 1943 yılında Leo Kanner tarafından gerçekleştirilmiştir. Leo Kanner, infatit otizm şeklinde ifade ettiği 11 olgu sunmuştur. Tanımlanan olgularda, insanlarla ilişki kurma güçlüğü, başka biri tarafından çıkarılan seslerin yinelenmesi (ekolali), zamirlerin tersten söylenmesi, tekrar eden ve amaçsız davranışlar ile değişime direnç belirtileri bildirilmiştir [55].

1970'li yıllara kadar şizofreni ile birlikte aynı grupta olan otizm, 1970'li yıllardan sonra şizofreniden tamamen ayrılmış ve farklı bir kategoride değerlendirilmiştir. 1980'de Amerika Psikiyatri Birliği tarafından ilk kez yayınlanan "Psikiyatri Hatalıkların Tanımlanması ve Sınıflandırılması" DSM-III'te yer almıştır. 1994 yılında yayınlanan

DSM-IV'te "otistik bozukluk" yaygın gelişimsel bozukluklar (YGB) grubunda yer alan beş bozukluktan biri olarak belirlenmiştir. Mayıs 2013 tarihinde DSM-V yayınlanmış ve DSM-V'te bu tanı kategorisinde ciddi değişimler yapılmıştır. 2007 yılından bu yana Amerika Psikiyatri Birliği tarafından oluşturulan Nörogelişimsel Bozukluklar Çalışma Grubu tarafından, YGB grubu ile ilgili tanımlama ve sınıflandırma incelenerek yaygın gelişimsel bozukluk "otizm spektrum bozukluk" olarak değiştirilmiştir [56]. DSM-V'teki OSB'deki "spektrum" kelimesi daha çok farklı sebeplere bağlı olarak gelişen, farklı şiddetlerde seyreden ortak yönleri klinik özellikleri olan tablolara işaret etmektedir [54]. Bu modelde otizm, Asperger bozukluğu, başka türlü adlandırılmayan yaygın gelişimsel bozukluk (YGB-BTA) ve dizentegratif bozukluğu aynı çatı altında "otizm spektrum bozukluğu" olarak adlandırılmıştır [56]. Otizmliler çok farklı özelliklere ve belirtilere sahip olduğundan spektrum bozuklukları olarak düşünülür [57].

DSM-V yayınlandıktan sonra alt kategoriler arasındaki benzerlikler ve farklılıkları ortaya koymak için çalışmalar yapılmıştır. Tsai ve Ghazuiddin hem otizm, hem YGB-BTA, Asperger bozukluğunu karşılaştıran araştırmaları gözden geçirerek alt grupların aynı kategoride tek bir isim altında toplanmasının doğru olmadığını vurgulamışlardır. Otizmin tek bir hastalık antitesi olup olmadığı araştırılmış elde edilen veriler sayesinde alt grupların varlığı tespit edilmiştir. "Çoğul hastalık antitesi" nörokimyasal, genetik, aile çalışmaları ile desteklenmiştir [58]. DSM-V kriterlerine göre tanı ölçütleri Çizelge 2.3.'te gösterilmiştir [54].

Çizelge 2.3. DSM-V Otizm Spektrum Bozuklukları tanı ölçütleri

A. Aşağıda belirtildiği gibi, şimdi ve geçmişte farklı şekillerde toplumsal iletişim ve toplumsal etkileşimde sürekli yetersizliğin olması. 1) Toplumsal-duygusal karşılık vermedeki yetersizlik (ör: olağandışı toplumsal yaklaşımdan karşılıklı diyalog yürütmekte çekilen güçlüğü; ilgilerini, duygularını ve duygulanımını paylaşmadaki yetersizlikten, sosyal etkileşime cevap verememeye kadar olan yetersizlikler). 2) Toplumsal etkileşim için kullanılan sözel olmayan iletişimsel davranışlarda yetersizlik (örnek: zayıf entegre olmuş sözel ve sözel olmayan iletişim, anormal göz kontaktı ve beden dili veya jestleri anlamada ve kullanmada yetersizlik ve yüz ifadesi ve beden diline kadar bariz eksikliklerin varlığı). 3) İlişkileri geliştirmekte, devam ettirmekte ve anlamakta güçlük (ör: farklı toplumsal ortamlara uygun davranamamaktan, hayali oyun paylaşamamaya ve arkadaş edinememeye, arkadaşla ilgi duyamamaya kadar görülen davranışlar). <i>Şuanki şiddeti:</i> Şiddet sosyal iletişimsel alanda yetersizlikler ve kısıtlı, tekrarlayıcı davranışlara göre belirlenir.
B. Aşağıdakilerden en az ikisinin varlığı ile kendini gösteren, şu an veya geçmişte sınırlı, tekrarlayıcı davranışlar, ilgiler ya da etkinlikler. 1) Basmakalıp veya tekrarlayıcı motor hareketler, obje kullanımı veya konuşma (basit motor stereotipiler, oyuncakları dizme veya çevirme, ekolali, idiyosenkritik cümleler). 2) Anı olmakta ısrar, rutine sıkı sıkıya bağlı olma veya rutinleşmiş sözel ve sözel olmayan davranışlar (ufak değişimlerde aşırı stres, geçişlerde zorluk, sert düşünce tarzı, selamlaşma ritüelleri, her gün aynı yolu veya aynı yemeği tercih etme). 3) Konu ve yoğunluk açısından anormal olan sınırlı, sabitleşmiş ilgiler (yaygın olmayan nesnelere anormal aşırı bağlılık, aşırı tekrarlayıcı ve sınırlı ilgiler). 4) Duygusal olarak aşırı ya da az duyarlılık veya çevrenin duygusal boyutlarına aşırı ilgi (acıya/sıcağa aşırı duyarsızlık, belirli ses ve dokunuşlara karşı beklenmeyen tepki, nesneleri aşırı koklama veya onlara aşırı dokunma, ışık ve hareketle görsel olarak çok meşgul olma). <i>Şuanki şiddeti:</i> Şiddet sosyal iletişimsel alanda yetersizlikler ve kısıtlı, tekrarlayıcı davranışlara göre belirlenir.
C. Belirtiler gelişimin erken evrelerinde mevcut olmalı (toplumsal beklentiler sınırı aşındıkaya dek fark edilmemiş veya daha sonra hayatta öğrendiği stratejilerle maskelenmiş olabilir).
D. Belirtiler sosyal, mesleki ve başka önemli alanlarda klinik olarak anlamlı düzeyde bozukluğa yol açmalıdır.
E. Bu bozukluk zihinsel yetersizlik veya gelişimsel gerilik sebebi ile olmamalıdır. Gerçi zihinsel yetersizlik ve OSB sıklıkla bir arada görülür, ancak OSB ve zihinsel yetersizlik tanısı konulması için sosyal iletişimsel düzeyin genel gelişimin altında olması gerekir.
Not: DSM-IV'e göre otistik bozukluk, Asperger bozukluğu ve YGB-BTA tanısı almış olanlara OSB tanısı verilmelidir. Sosyal iletişimsel alanda problem olan ancak OSB tanısı almayanlar sosyal (pragmatik) iletişimsel bozukluk açısından değerlendirilmelidirler. • Zihinsel yetersizliğin eşlik edip etmediğini, • Dil yetersizliğinin eşlik edip etmediğini, • Bilinen bir tıbbi, genetik veya çevresel faktörün eşlik edip etmediğini, • Başka nörogelişimsel, ruhsal veya davranışsal durumların olup olmadığını, • Katatoninin eşlik edip etmediğini belirtiniz.

2.4.2. Otizm Spektrum Bozukluğu'nun epidemiyolojisi

Epidemiyolojik çalışmalar dünya genelinde OSB prevalansının sürekli olarak artış gösterdiğini bildirmektedir. Önceleri nadir bir hastalık olarak ifade edilen otizm, 1990'lı yıllardan sonra farklı ortamlarda farklı yöntemlerle yapılan tüm çalışmalar ile görülme sıklığının %1'in üzerinde olduğu gösterilmiştir. Amerika Birleşik Devletlerinde bulunan Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi (Centre for Disease Control and Prevention) tarafından, 11 bölgede yapılan araştırmalar sonucunda 8 yaşa kadar olan çocuklarda otizm prevalansını 2000 yılında 1/150, 2006 yılında 1/110 olarak, 2012 yılında ise 1/68 olarak rapor etmiştir [59, 60].

Güney Kore'de yapılan geniş kapsamlı bir epidemiyolojik çalışmada 7-12 yaş arası 55 000 çocukta OSB prevalansı %2,64 olarak bulunmuştur [61]. Çevre kirliliği, aşı gibi çevresel risk faktörlerinin otizm prevalansını artırılabilceği tartışılmakla birlikte yalnızca ileri baba yaşının otizmle bağlantısı kurulmuştur [57].

Cinsiyet açısından değerlendirildiğinde OSB, erkeklerde kızlara oranla yaklaşık 4,5 kat daha fazla görülmektedir. Bu oran erkeklerde 1/42, kızlarda 1/189'dur [60]. Fombonne yapmış olduğu çalışmada normal zekalı OSB'lilerde erkek/kız oranı 5,75/1, zeka özürlü grup için ise bu oran 1,9/1 olarak bildirilmiştir [62].

2012 yılında Türkiye İstatistik Kurumu tarafından 0-6 yaş arası çocuklarda yapılan sağlık araştırması sonucu kentte yaşayan erkek çocuklarının %3,1'inde, kız çocuklarının %3,6'sında, kırdaki yaşayan erkek çocukların %2,2'sinde, kız çocuklarının %2,8'inde otizm, zihinsel gecikme, öğrenme güçlüğüne kapsayan rahatsızlıklar görülmüştür [63].

2.4.3. Otizm Spektrum Bozukluğu'nun etiyolojisi

OSB kompleks bir hastalıktır ve bu konu üzerine çalışmalar yapan çoğu bilim insanı OSB'nin tek bir nedeni olmadığına inanmaktadır. OSB için birçok faktörün olduğu artık bilinmektedir. Genetik ve çevresel faktörleri de kapsayan birçok farklı neden olabilir. Çizelge 2.4'te OSB için büyük risk taşıyan çocukların güçlü kanıtları ve şüpheli durumları olan bazı faktörler vurgulanmaktadır. Tek risk faktörünün OSB'ye yol açmadığı ve bireyin kontrolü dışında pek çok risk faktörünün olduğu birçok çalışma ile günümüzde kanıtlanmıştır [60].

Otizmin etiyopatogenezine bakıldığında aile öyküsü, ikiz ve moleküler genetik çalışmaları, genetiğin büyük bir rol oynadığını göstermektedir. OSB'nin tam nedeni bilinmemekle birlikte pek çok faktörün etkili olabileceği düşünülmektedir. Genetik faktörlerin özel bir önem taşımasının yanı sıra çevresel risk faktörleri de bozukluğun oluşmasında büyük rol oynamaktadır. Araştırmacılar, ileri baba yaşı, annenin hamilelik esnasında geçirdiği enfeksiyonlar, cıvaya ve tarım ilaçlarına maruziyet, hava kirliliği, yetersiz beslenme ve vitamin D ile aşı gibi çevresel risk faktörleri üzerinde durmuşlardır [64].

Otizmin nedenleri araştırılırken gen-çevre etkileşiminin son yıllarda önem kazanması, çevresel risk faktörü olarak değerlendirilen vitamin D bileşiklerine olan ilgiyi artırmıştır. Yapılan araştırmalara göre hamilelik dönemi ve erken çocukluk çağında görülen vitamin D eksikliği, OSB'nin etiyopatogenezinde iki farklı role sahiptir. Bunlar genler üzerinde etki ederek veya beyinde direkt etki göstererek meydana gelir [65]. Vitamin D DNA'yı oksidatif strese karşı korur ve DNA hasarının tamirini sağlar. Vitamin D'nin yetersiz olduğu durumlarda DNA hasar tamiri yeterince yapılamaz bunun sonucunda yüksek mutasyonlar gerçekleşebilir. OSB'de *de nova* mutasyonların sık görülmesi olası çevresel risk faktörlerini akla getirmektedir [66].

Çizelge 2.4. OSB için güçlü ve şüpheli kanıtlar

Güçlü Kanıtlar	Şüpheli Kanıtlar
İkizleri veya OSB'li ikizi olan aile öyküsü [67-69].	Tiroid hastalıkları veya romatoid artrit gibi immün bağışıklıkla ilişkili durumların aile öyküsü [70].
Geç yaşta anne veya baba olunması [71].	Genler, genetik mutasyonlar ve epigenetik süreçler (hamilelikten önce, hamilelik boyunca ve hamilelikten hemen sonra çevresel faktörler ve genler arasındaki kompleks etkileşimleri içerir [72-74].
Tek gen bozuklukları seçimi; fragil X sendromu, Rett sendromu ve tüberoz sklerozis kompleksi [75].	Hamilelikle ilişkili çeşitli faktörler; maternal diyabet ve obezite, hamilelik sırasında bazı ilaçların kullanımı, obstetrik komplikasyonlar, çevresel kirleticilere maruz kalma, kısırlık tedavilerinin kullanılması, enfeksiyon, erken dönem doğum, çok düşük doğum ağırlığı [76-84].

2.5. Otizm Spektrum Bozukluğu ve Vitamin D Metabolitleri Arasındaki İlişki

OSB, dünya çapında giderek artan, genellikle prenatal kökenli, erken çocukluk döneminde tespit edilen, nörogelişimsel durumların bir grubuna ait rahatsızlıktır [85]. Vitamin D eksikliği gelişimsel kökenli otizm ve şizofreni gibi bazı psikiyatrik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Erken yaşam evresinde vitamin D eksikliğinin nöronal farklılaşmaya, aksonal bağlantıya, dopamin ontogenine, beyin gelişimi ve fonksiyonuna etki ettiği bilinmektedir [86]. Vitamin D eksikliğine bağlı raşitik çocukların, görünürde yüksek doz vitamin D tedavisi ile ortadan kalkan çeşitli otistik belirlere sahip olduğu görülmüştür. Vitamin D, anti-inflamatuar etkileri, nöbet eşiğini yükseltmesi, T-regülatör hücrelerini artırması, mitokondriyi koruması ve glutatyonun upregülasyonunu sağlamasından dolayı otizmin risk veya şiddetini azaltabilmektedir. Gebelik ve çocukluk döneminde görülen vitamin D eksikliği giderek büyüyen yaygın bir salgın haline gelmektedir. Aşırı düzeyde vitamin D eksikliği dışında, 25(OH)D düzeylerinin düşük olduğu durumlarda serum kalsitriol düzeyleri genellikle referans aralıkta veya yüksek olmaktadır. Ayrıca, endokrin kalsitriol adaptif hormondur yani kalsiyum eksikliğine yanıt olarak üretilmektedir. Kalsiyum alımı yüksek olduğunda kalsitriol düzeyleri genellikle düşüktür [87]. Çok sayıda literatür, yüksek düzeyde serum 25(OH)D konsantrasyonunun uterusu veya erken yaşam evresinde otizm riskini azaltabileceğini göstermektedir. 2008 yılında, Cannell, vitamin D

sisteminin kantitatif genetiğini içeren otizmin genetik bileşeni için yeni bir teori önermiştir. Geçerliliği ve sıradan olan herhangi bir teorinin toksikolojistler tarafından sıklıkla önemsenmediği otizmin genetik komponentlerini açıklaması gerektiği düşünülmektedir [88].

Farklılıklar, otizmde dikkat çekici düzeyde erkek/kadın cinsiyet oranlarını açıklayabilir [89]. Otizm, kutup bölgeleri, kentsel alanlar, hava kirliliğinin yüksek olduğu ve fazla yağış alan bölgeler gibi UVB penetrasyonunun engellendiği alanlarda daha sık görülmektedir [90]. Bunun yanı sıra, açık tenli bireylere göre, koyu tenli bireylerin otizm olma ihtimali daha yüksektir ve ciddi vitamin D eksikliği koyu tenlilerde son derece yaygındır [91, 92].

Prenatal vitamin D eksikliği artık şizofreni ve otizm gibi nörogelişimsel bozukluklar için bir risk faktörü olduğu öne sürülmektedir [65, 93, 94]. Çeşitli epidemiyolojik bulgular otizmde prenatal vitamin D eksikliğinin indirekt olarak olası bir rolü olduğunu desteklemektedir. Örneğin, az güneş alan bölgelerdeki koyu tenli bireylerde otizm prevalansı yüksektir [95]. Bu deride gerçekleşen vitamin D sentezinin melanin tarafından bozulmasıyla ilişkilidir [96]. İsveç'te doğan Somali kökenli göçmen çocuklar zihinsel engel ve aşırı hiperaktivite ile birlikte çok yüksek oranda ciddi OSB'ye sahiptir [97, 98]. Avrupa'da birçok çalışma ile, koyu tenli göçmenlerin ve kapalı giyinen soluk tenli yerli nüfusla, yüksek risk altındaki Afrikalı kızlar karşılaştırıldığında sürekli düşük 25(OH)D düzeyi bildirilmiştir [99-103].

Dönemsel doğumlara ait bulgular da otizm ve vitamin D arasındaki bir diğer bağlantıyı oluşturmaktadır. Avrupa nüfusunun büyük bir kısmı, yaz ve sonbahar aylarına göre karşılaştırıldığında, kış ve ilkbahar aylarında daha düşük 25(OH)D düzeylerine sahiptir [99, 104]. İsveç, Danimarka, İngiltere ve kuzey-doğu Amerika'da yapılan bir dizi çalışma ile kış ve ilkbahar dönemlerinde dünyaya gelen çocukların çoğunun OSB'ye sahip olduğu gösterilmiştir. En yüksek oranların mart ayında olması hamilelik boyunca annenin düşük vitamin D durumunun bir risk faktörü olabileceğini öne sürmektedir [105-108].

OSB etiyolojisini inceleyen güncel çalışmalarla ilgili olarak, genetik faktörler daha ağır basmakta, ancak çevresel faktörlerin etkileşiminin önemi giderek önem kazanmaktadır [109]. Otoimmünite, öncesi ve sonrası doğumsal enfeksiyonlar, hamilelik boyunca talidomid, valproik asit ve alkole maruz kalma, geç yaşta çocuk sahibi olma gibi durumların hepsi otizm ile ilişkilendirilmiştir [71, 110-116]. Ancak kapsamlı araştırmalara rağmen, çeşitli patojenik mekanizmaların nisbi etkisi halen yeterli düzeyde anlaşılamamıştır. Merkezi sinir sistemi bozukluklarında, etiyolojik bir faktör olarak düşük düzeyde vitamin D durumuna artan bir ilgi söz konusudur. Kalsitriolün beyinde inflamatuvar sitokinlerin üretimini kısıtlayıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmada vitamin D'nin inflamatuvar yanıtı sınırlandırıcı etkisinin olduğu gösterilerek bazı psikiyatrik hastalıklarda örneğin otizm ve şizofrenide anti-inflamatuvar etkilere sahip olabileceği düşünülmüştür [117, 118]. Buna bağlı olarak sitokinler otizm ile ilişkilendirilmiştir. Hormonal olarak, vitamin D'nin aktif formu olan kalsitriol tarafından hedeflenen vitamin D reseptörlerini içeren ilk keşif, bu yöndeki araştırmalar için çok önemli bir adım olmuştur [119]. Stumph ve Privette ilk olarak, yetişkinlerde vitamin D eksikliğinin, depresyon da dahil, bazı psikiyatrik bozuklukların patogeneze katkıda bulunduğunu öne sürmektedir [120]. Daha sonra, McGrath tarafından prenatal vitamin D eksikliğinin beyin gelişimi üzerine olumsuz etkisi olduğu çoğunlukla epidemiyolojik verilere dayanılarak savunulmuştur [121]. Birçok çalışma ile vitamin D'nin nöronal farklılaşma, aksonal bağlantı, dopamin ontogeni ve çok sayıda genin immünolojik modülasyonu ve transkripsiyonel kontrolünü içeren beyin gelişimi ve fonksiyonunda işlevsel bir rolü olduğu gösterilmiştir [86, 122-124].

Prenatal vitamin D eksikliği, şizofreni ve otizm gibi nörogelişimsel bozukluklar için bir risk faktörü olduğu öne sürülmektedir [65, 93, 94]. Çeşitli epidemiyolojik bulgular otizmde prenatal vitamin D eksikliğinin indirekt olarak olası bir rolü olduğunu desteklemektedir. Örneğin, az güneş alan bölgelerdeki koyu tenli bireylerde otizm prevalansı yüksektir [95]. Bu deride gerçekleşen vitamin D sentezinin melanin tarafından bozulmasıyla ilişkilidir [96]. İsveç'te doğan Somali kökenli göçmen çocuklar zihinsel engel ve aşırı hiperaktivite ile birlikte çok yüksek oranda ciddi OSB'ye sahiptir [97, 98]. Avrupa'da birçok çalışma ile, koyu tenli göçmenlerin ve kapalı giyinen soluk tenli yerli nüfusla, yüksek risk altındaki Afrikalı kızlar karşılaştırıldığında sürekli düşük 25(OH)D düzeyi bildirilmiştir [99-103]. Otizmin Afrikalı-Amerikalı çocuklarda, Kafkas çocuklara göre daha sık görülmesi böyle bir ilişki için önemli bir bulgudur [92]. Gelişime bağlı vitamin D

eksikliği burada bir faktör olabilir çünkü cilt pigmenti melaninin, yüksek düzeyleri vitamin D eksikliği için bir risk faktörüdür. Koyu tenli bireyler yüksek oranda UVB radyasyonu absorbe eden melanine sahiptir. Yüksek konsantrasyondaki melanin vitamin D'nin sentezini inhibe etmektedir [125]. Gebelik sürecinde olan koyu tenli kadınların yalnızca %4'ü yeterli vitamin D düzeyine sahip iken açık tenli kadınların %37'si yeterli vitamin D düzeyine sahiptir [126]. Son yıllarda yapılmış bir çalışmada OSB ve sağlıklı çocukları olan İsveçli, göçmen Somalili ve yerli Kafkas annelerin dahil edildiği gruplarda 25(OH)D₃ düzeyleri ölçülmüş, çocuklarda anneye ait 25(OH)D₃ ve OSB arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bu çalışmada 25(OH)D₃ düzeyleri, çocukların süttten kesildikten birkaç yıl sonra annelerinde ölçülmüş, kesin sonuçlar elde edilememiştir [127].

Yiyecek seçme veya “seçici yeme” küçük çocuklarda genellikle gözlenen bir durumdur ve ebeveyn endişesinin sık görülen bir nedenidir. Gelişimsel yetersizliği olan çocuklar özellikle OSB olan çocuklar ile tipik gelişim gösteren çocuklar karşılaştırıldığında yiyecek seçme daha sık rapor edilmiştir [128, 129]. OSB olan çocuklarda seçicilik, rijitlik (sert yaklaşım), seçici yeme ve yemek zamanını reddetme üzerine çok sayıda rapor olmasına rağmen gıda seçiciliğinin standardize bir tanımı eksiktir [130-132]. Bandini ve arkadaşları gıda seçiciliği tanımının uygulanabilir olmasını, tipik gelişim gösteren çocuklar ile OSB olan çocuklarda yemek seçmenin karşılaştırılmasını ve gıda seçiciliği ile beslenme yetersizliği arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçlamışlardır. Araştırmaya göre, vitamin D ve kalsiyumun yetersiz alımı OSB'li çocuklarda, tipik gelişim gösteren çocuklara göre daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Genel olarak, OSB'li çocuklar, tipik gelişim gösteren çocuklarla karşılaştırıldığında yetersiz besin alımının daha fazla olması söz konusudur [133].

2.5.1. Vitamin D'nin beyin üzerine etkileri

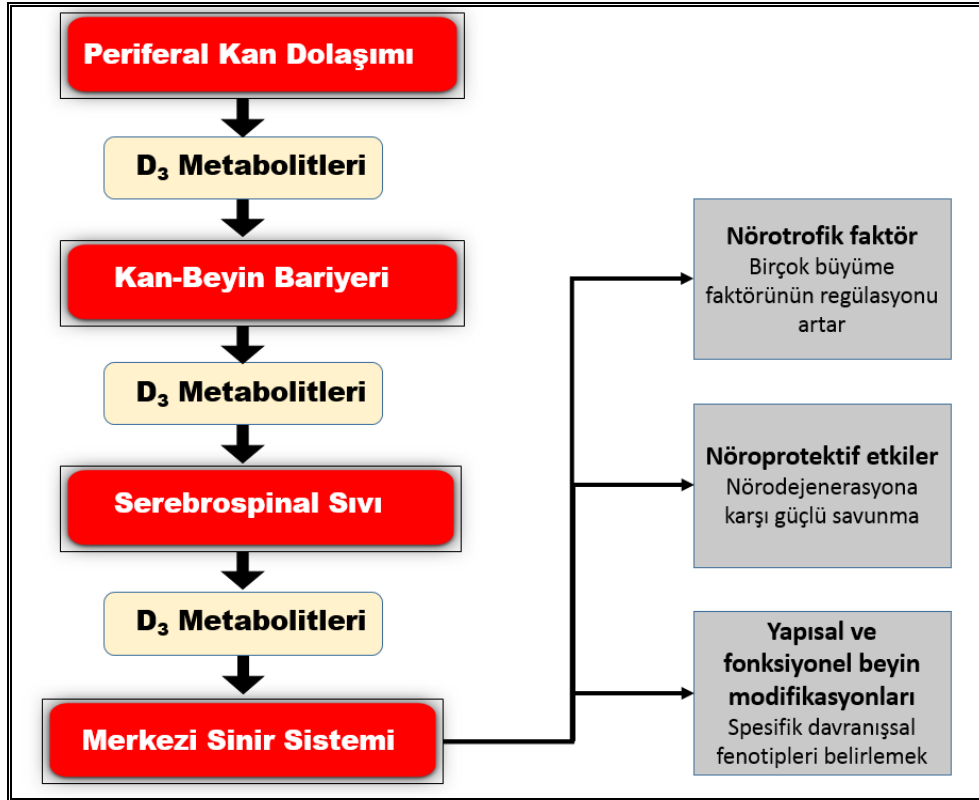
Vitamin D'nin ilk yıllarda kemik metabolizması ve kalsiyum fizyolojisine dahil edilmesinin ardından immün fonksiyon, hücre proliferasyonu ve apoptozisi, beyin gelişimi ile fonksiyonu modüle ettiği ve nöroprotektif özellikler gösterdiği tespit edilmiştir [134, 135]. Hayvan çalışmalarında, vitamin D metabolitlerinin merkezi sinir sistemine (MSS) ulaşmak için kan-beyin bariyerini geçebildiği gösterilmiştir [136]. İnsanlarda, hem MSS'deki vitamin D'nin taşınmasına aracılık eden periferik kan dolaşımında hem de MSS'de muhtemelen vitamin D katabolizma ürünleri varlığının gösterilmesiyle oluşan,

lokal sentezi ve aktivasyonundan türetilmiş vitamin D metabolitleri serebrospinal sıvıda bulunmuştur [137, 138]. Hayvan modellerinde vitamin D, MSS’de nörotrofik bir faktör olarak hareket edebilir, glial hücreden türeyen nörotrofik faktör ve sinir büyüme faktörü (nerve growth factor) gibi çeşitli büyüme faktörlerini upregüle edebilir ve büyüme faktörü beta 2 (TGF- β 2) ile nörotrofin 3-4’e dönüştürebilir [139, 140]. Araştırmacılar, ratların glial hücre kültürlerine 1,25(OH) $_2$ D eklediklerinde NGF mRNA ve proteininin, nörotrofin-3 (NT-3) mRNA seviyesinin arttığını ve nörotrofin-4 (NT-4) seviyesinin azaldığını tespit etmişlerdir [141].

Vitamin D, nükleer steroid transkripsiyon regülatörlerinin üst familyasının bir üyesidir ve birçok gen üzerinden transkripsiyon kontrolünü sağlamaktadır. Tiroid hormonları, vitamin A, androjenler ve glukokortikoidler gibi nörosteroid olarak bilinen çok sayıdaki diğer steroidler ve onların beyin gelişimi ve fonksiyonundaki rolleri iyi tanımlanmıştır. Vitamin D, glukokortikoidlere benzer endokrin fonksiyonlarından dolayı, gelişmekte olan beyni etkileyebileceği ve aynı zamanda beyin gelişimde önemli bir modülatör olabileceği düşünülmektedir [142].

Vitamin D, gen regülasyonunun yanı sıra beyin homeostasisinde ve nörogenezinde son derece önemli bir yere sahiptir [23, 142, 143]. Ayrıca vitamin D’nin inflamasyon, lipid peroksidasyonunun engellenmesi ve apoptozis tarafından indüklenen nörodejenerasyona karşı güçlü bir savunmanın dahil olduğu çeşitli nöroprotektif etkilere sahip olduğu bulunmuştur [143, 144].

Hayvan çalışmaları, vitamin D eksikliğinin yapısal ve fonksiyonel beyin modifikasyonları ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Rat yavrularında gözlenen maternal vitamin D eksikliğinin, beyin morfolojisinde, kök hücre proliferasyonunda, gen ve nörotrofik faktörlerin ekspresyonunda değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Bu etkilerin bazıları yetişkinliğe kadar devam etmektedir. Bu sırada gen ekspresyonunda ve davranışında anormallikler gözlenmektedir. Bu bulgulara dayanarak, vitamin D’nin nöropsikiyatrik bozukluk riskinin azaltılması da dahil olmak üzere beyin gelişimine doğrudan etki eden bir nörosteroid gibi davranabileceği öne sürülmektedir [145]. Rodent modellerinde, vitamin D’deki azalma, korteks, striatum ve lateral ventriküllerde değişen beyin morfolojisi, davranış fenotiplerinin tespitinde mümkün olduğu kadar bulunmaktadır [122, 146]. Şekilde insan beynindeki vitamin D $_3$ ’ün izlediği yol ve etkileri gösterilmiştir [147].

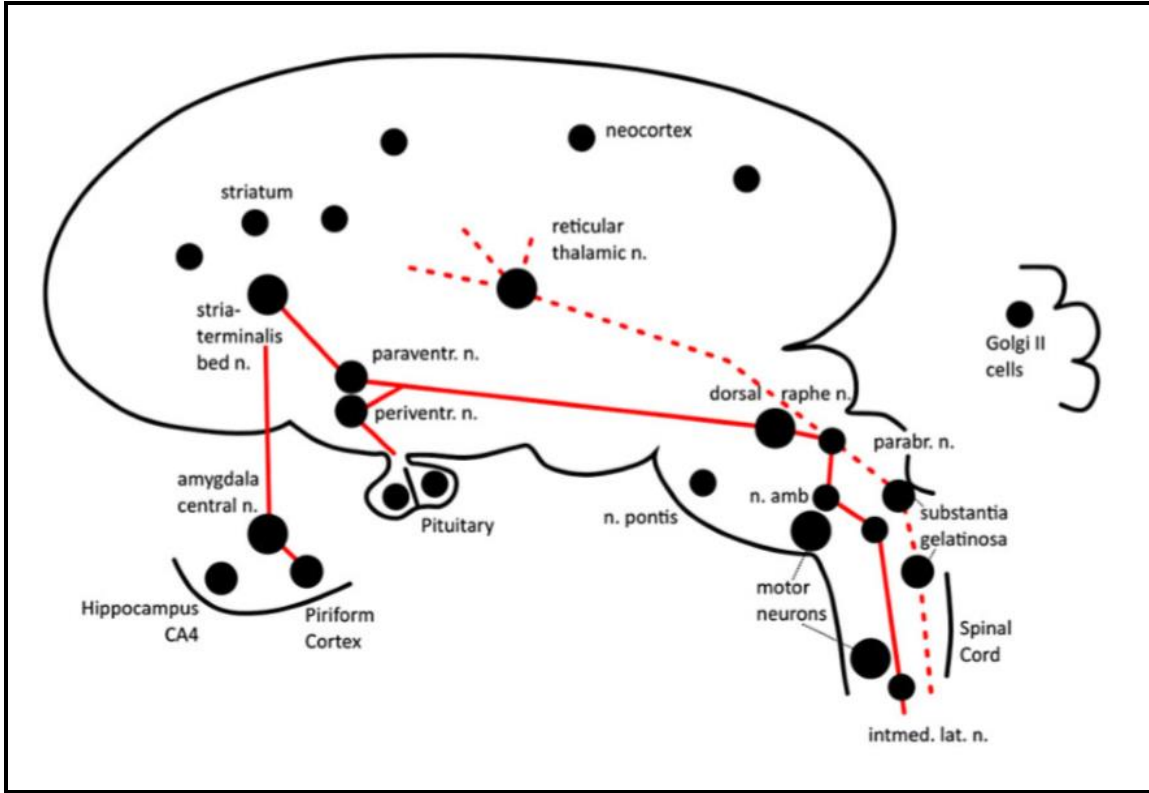


Şekil 2.8. İnsan beynindeki vitamin D₃ metabolizması

Vitamin D₃ reseptörü (VDR), aynı zamanda seks hormonları, glukokortikoidler ve retinoik asidi içeren yüksek ölçüde korunmuş nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir [148]. 1,25(OH)₂D₃ ve nükleer VDR'ler, doğrudan Ca²⁺ homeostazında yer almayan dokularda (örn; pankreatik β hücreleri, spesifik beyin hücreleri, mide bezi, kas, meme bezi, midede bulunan endokrin hücreler ve tavuk embriyosunu çevreleyen korioallantoik membran) bulunması, birçok hücrenin regülasyonu ve diferansiyasyonunda vitamin D'nin bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir. Bu fonksiyonlar, VDR aracılığı ile gerçekleşir. 1,25(OH)₂D₃ tarafından düzenlenen en az 100 protein (birkaç onkogen dahil olmak üzere) bilinmektedir [145]. VDR, rat, hamster ve insan beyinde tanımlanmıştır [119, 149-151]. VDR proteini insan ve rat beyninin pons-orta beyin bölgesi, serebellum, talamus, hipotalamus, bazal ganglia, hippocampus, olfaktör sistem ve temporal, orbital, singulat korteksten eksprese edilmektedir [138, 150]. Kemirgen embriyo beyni incelendiğinde, hücre çoğalmasının azaldığı ve programlı hücre eliminasyonunun arttığı dönemde VDR ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Elde edilen verilerle direkt bir ilişki kurulamamasına rağmen, vitamin D'nin gelişmekte olan beyinde apoptoz ve hücre döngüsünü etkileyebileceği düşünülmüştür [152]. VDR, pleuropotent etkilere sahip nükleer bir reseptördür. VDR'nin gelişmekte olan ve yetişkin beyinde farklı eylemleri

gerçekleştirebilmek için moleküler mekanizmaları mümkün olabilir. Vitamin D'nin, beyin hücrelerini farklılaştırdığı, aksonal büyümeyi regüle ettiği, beyinde direkt olarak kalsiyum sinyalini regüle edebildiğini, beyin kökenli reaktif oksijen türlerinin üretimini module ettiğini ve norötrofik faktörlerin üretimini stimüle ettiği çalışmalarla gösterilmiştir. VDR ve vitamin D metabolizmasında görev alan enzimler fare beyninin hemen tüm bölgelerinde bulunmaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda Vitamin D'nin aktif nöronal glial hücre kültürlerinde, glial hücre kökenli nörotropik faktör (GDNF), nerve growth faktör (NGF) ve nörotropin-3 sentezlendiği gösterilmiştir. Erken bebeklik dönemindeki basit Vitamin D eksikliğinin nörodavranışsal problemlere yol açtığı ve Vitamin D eksikliği olan sıçan yavrularında beyin dokusunun ve ventriküllerin daha büyük olduğu, beyin hücre proliferasyonunda artmanın ve korteks kalınlığında azalmanın olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçların çoğu günümüzde bu vitamin yetersizliği ile ilişkili olan nöropsikiyatrik durumlarla ilişkili olabilir [122].

Beyinde bulunan vitamin D'nin nükleer hedefleri Şekil 2.9.'da gösterilmektedir. [³H]1,25(OH)₂-kolekalsiferol enjeksiyonu ile rat ve farelerin beyinlerinden otoradyogram verilerinden elde edilen vitamin D'nin steroid hormonu için nükleer hedefleri olarak tanımlanan beyinde yer alan bölgeler gösterilmiştir. Önemli bağlantı sistemleri içeren kemirgen beyninde kalsitriolün nükleer bağlantısı geniş bir dağılım göstermektedir. Kırmızı kesikli çizgiler, spinal ganglion, substantia gelatinosa, parabrakial çekirdek ve retiküler talamik çekirdek üzerinden hedef nöronlarla duyuşal etki göstermektedir. Kırmızı düz çizgiler, interomediolateral kolon, nükleus retikularis lateralis magnoselülaris, nükleus ambiguus, parabrakial çekirdek, dorsal raphe nükleus, hipotalamik periventriküler ve paraventriküler parvoselüler nükleus, stria terminalisin kırmızı çekirdeği, amigdala ve piriform korteksin merkezi çekirdeğinde hedef nöronlar ile otonomik-nöroendokrin etki göstermektedir. Kranial motor sinir nükleus, spinal kordda motor horn nükleus, nükleus pontis ve beyincikte golgi II hücrelerinde hedef nöronlar ile motor; allokorteks ve neokorteks, amigdala, striatum ve beyin kökünde vitamin D hedef nöronlarının dahil olduğu ve mental sistem üzerinden etki göstermektedir [153].



Şekil 2.9. Beyindeki vitamin D'nin nükleer hedefleri

Kalsitriol, vitamin D reseptörü aracılığı ile nükleer etkisini kullanır. VDR'nin keşfi beyin ve spinal kord boyunca modüle olan sinir sistemi fonksiyonunda bu hormonun önemini pekiştirir. Yetişkin ratlar ve hamsterlarla yapılan çalışmalar MSS'de VDR'lerin dağılımının detaylı bir topografyasını sağlamıştır, daha sonra insanlarda da benzer bir şekilde gösterilmiştir [119, 138, 153, 154]. VDR ekspresyonu hem nöronlarda hem de glial hücrelerde (mikroglia, astrositler ve oligodendrositler) belirlenmiştir. Farklı MSS bölgelerinde (i) korteks [temporal (işitsel, koku, entorinal), frontal (prefrontal, orbitofrontal, primer motor), parietal, singulat]; (ii) derin gri madde (thalamus, bazal ganglia, hipotalamus, hipokampus, amigdala); (iii) serebellum (granüler ve Purkinje hücre tabakaları); (iv) beyin kökü nükleusu; (v) spinal kord (anterior boynuz hücreleri); ve (vi) ventriküler sistem (koroid pleksus ependim hücreleri) VDR'leri Schwann hücrelerinin çekirdeklerinde ve peripheral nöronlarda rapor edilmiştir [150, 155-157].

1,25(OH)₂D₃'ün, beyinde gelişmekte olan nöronların sağkalımı ve göçünde önemli olan nörotrofik faktörleri regüle ettiği gösterilmiştir [158, 159]. Beyin gelişiminin regülasyonu komplekstir. 1,25(OH)₂D₃ beyin gelişiminde iki önemli molekülü regüle eder; glial kökenli nörotrofik faktör (GDNF) ve sinir büyüme faktörü (NGF). 1,25(OH)₂D₃ beyinde ve C6

glioma hücrelerinde bir artışa neden olur [160, 161]. GDNF, dopamin nöron gelişimi, sağkalımı ve fonksiyonunun önemli bir modulatörüdür [162, 163]. Örneğin ratlarda, özellikle dopamin reseptörlerini öldüren nörotoksin 6-hidroksidopamin (6-OHDA) uygulanması, 1,25(OH)₂D₃'nin ön muamelesi GDNF düzeylerini artırır, dopamin hücre fonksiyonunu artırır [164]. İndüklenen dopamin hücre ölümünün düzeyini azaltır [164, 165]. İkinci olarak, 1,25(OH)₂D₃, NGF sinyalinin potent bir regülatörüdür [166]. Yapılan çalışmalar 1,25(OH)₂D₃ ile ön muamelenin kortikal, hippocampal ve mezenkefalik nöronların kültürlerinde glutamat aracılı hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir [167]. NGF düzeyi bazı psikiyatrik hastalıklarda farklılık göstermektedir. NGF, beyinde gerçekleşen programlanmış hücre ölümünde önemli bir faktör olan pan-nörotrofin reseptör p75NTR'yi bağlama yeteneğine sahiptir. Vitamin D'nin glioma hücrelerinde p75NTR ekspresyonunu pozitif yönde artırdığı ve buna bağlı olarak vitamin D'nin NGF aracılığıyla nöronların yaşam sürelerini düzenleyebileceği düşünülmüştür [168]. Bu nöroprotektif etkiler L-tipi kalsiyum kanal ekspresyonunda azalmaya eşlik eder ve VDR düzeylerini artırır. Taniura ve çalışma arkadaşları ratlarda OSB ve diğer nörogelişimsel bozukluklarla ilişkilendirilen serebellum bölgesinde VDRE'nin aktivitesinin çok yükseldiğini bulmuşlardır [169, 170].

Gebelik esnasında optimal vitamin D₃ seviyeleri tam anlaşılamamasına rağmen, doğum öncesi gelişim sırasında düşük vitamin D₃ seviyeleri yaygındır [171]. Amerika Birleşik Devletleri'nde çocuk doğurma yaşı 20-39 aralığında olan kadınların %12'sinin serum 25(OH)D₃ vitamin düzeylerinin, vitamin D₃ eksikliği için tanımlanmış eşiğin (15 g/ml) altında olduğu rapor edilmiştir [172]. Ayrıca bazı kanıtlar, gebelik sırasındaki muhtemel fetal beyin gelişimini etkilediği kadar maternal immün sistem durumunu da etkileyen, maternal vitamin D eksikliğinin OSB için bir risk faktörü olduğunu göstermektedir [173]. Hamile kadınlarda, vitamin D eksikliği de yavrularda diğer nörogelişimsel bozukluklar ile ilişkili olabilmektedir. OSB için olası bir risk faktörünü temsil eden, dil bozukluğunu içeren, özellikle bu bozukluk için olmasa bile nörogelişimsel durumların geniş bir aralığı ile ilişkilendirilmiştir [174].

Kordon kanında tayin edilen 25(OH)D vitamini düzeyi maternal vitamin D düzeyi ile yakından ilişkilidir [175, 176]. Anne sütünde bulunan vitamin D ile anne kanında bulunan vitamin D düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında yetersiz maternal vitamin D düzeyinin yenidoğan ve erken bebeklik dönemi vitamin D yetersizliği bakımından önemli bir risk faktörü olduğu görülmektedir [177].

Kemirgenlerde vitamin D sinyalinin bazı yönlerinin genetik ablasyonu veya maternal diyetin manipölasyonu üzerinden gelişmekte olan beyinde vitamin D etkisi büyük ölçüde incelenmiştir. Özellikle hamile kadınlarda, vitamin D toksisitesi çok az görülürken, yetersiz vitamin D düzeyi nispeten ortak görülmüştür [178-180]. Ek olarak, fetus tamamen maternal vitamin D depolarına bağlıdır. Çalışmalar maternal serum ve yenidoğan kordon kanındaki 25(OH)D₃ vitamin seviyeleri karşılaştırıldığında güçlü bir pozitif korelasyon olduğunu göstermektedir [126, 181-183].

Yapılan bir çalışmada 25(OH)D₃'ün beyin gelişimi sırasında rolü olup olmadığı araştırılmıştır. Araştırmacılar vitamin D₃ eksikliği olan anne ratlardan dünyaya gelen yavru ratların doğumda beyinlerinde büyük değişikliklerin olduğunu göstermiştir. Korteksin uzun fakat geniş olmadığını, lateral ventriküllerin genişlediğini, korteksin orantılı olarak daha ince ve beyin boyunca daha fazla hücre proliferasyonunun olduğunu bulmuşlardır [122].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ile birlikte yürütülmüştür. Polikliniğe başvuran ve yapılan değerlendirmede OSB olduğundan şüphelenilen tüm olgular daha kapsamlı olarak değerlendirmeye alınmış, çocuk psikiyatrisi uzmanı tarafından DSM-V tanı ölçütleri esas alınarak klinik muayeneleri yapılmıştır.

Kontrol grubu hastalarını da Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Anabilim Dalı'nın Sağlam Çocuk Polikliniğine gelen OSB tanısı olmayan ve dışlama kriterlerine uygun benzer yaş ve cinsiyette 46 gönüllü çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden tüm ailelerden yazılı onam alınmıştır. Bu çalışma için T.C Sağlık Bakanlığı Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna başvuru yapılmış ve etik onay alınmıştır (EK-1/Ek-1(devam)). Çalışmanın finansal kaynağı Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 01/2015-46 proje kodu ile desteklenmiştir (EK.5 / EK-5(devam)).

3.1. Çalışmaya Alınacak Hastaların Belirlenmesi

Gazi Üniversitesi Hastanesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı Polikliniğine başvuruda bulunan, DSM-V tanı kriterlerine göre OSB tanısı almış ve işleme kriterlerini sağlayan her iki cinsten 0-18 yaş aralığındaki 46 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu hastaları olarak Çocuk Cerrahisi polikliniğinde kabızlık nedeniyle takipli dışlama kriterlerinden hiçbirine sahip olmayan her iki cinsten 0-18 yaş aralığındaki 46 çocuk çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınması planlanan OSB hastalarının araştırmaya katılımı için Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı Anabilim Dalında yardımcı araştırmacı doktor tarafından velilere araştırma hakkında ayrıntılı bilgi verilip olurunun alınması sağlanmıştır.

3.1.1. Çalışmaya dahil edilme/edilmeme ölçütleri

Hasta Grubunun Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

- DSM-5 tanı kriterlerine göre OSB tanısı konmuş 0-18 yaş arasındaki kız ve erkek olgular
- Nörolojik hastalığı olmayan olgular (serebral palsi, tuberoz skleroz v.b.)
- Metabolik hastalığı olmayan olgular (fenilketonüri v.b.)
- Allerjik, inflamatuvar ve otoimmün hastalık tanısı almamış olan olgular
- Vitamin D ve Ca preparatı kullanmayanlar çalışmaya dahil edilmiştir.

Hasta Grubunun Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri

- Gönüllü olmamak
- Nörolojik hastalığı olan olgular (serebral palsi, tuberoz skleroz v.b.)
- Metabolik hastalığı olan olgular (fenilketonüri v.b.)
- Allerjik, inflamatuvar ve otoimmün hastalık tanısı almış olan olgular
- Rutin ilaç kullanımı (antikonvülzan, kortikosteroid, diüretikler) olanlar
- Vitamin D ve Ca preparatı kullananlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Kontrol Grubunun Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

- DSM-5 tanı kriterlerine göre herhangi bir psikiyatrik rahatsızlığı bulunmayan 0-18 yaş arasındaki kız ve erkek çocuklar
- Çalışmaya katılmaya gönüllü olmak
- Nörolojik hastalığı olmayan çocuklar (serebral palsi, tuberoz skleroz vb)
- Metabolik hastalığı olmayan çocuklar (fenilketonüri vb)
- Allerjik, inflamatuvar ve otoimmün hastalık tanısı almamış olan çocuklar
- Vitamin D ve Ca preparatı kullanmayanlar çalışmaya dahil edilmiştir.

Kontrol Grubunun Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri

- Gönüllü olmamak
- DSM-5 tanı kriterlerine göre herhangi bir psikiyatrik rahatsızlığı bulunan çocuklar

- Nörolojik hastalığı olan olgular (serebral palsi, tuberoz skleroz vb)
- Metabolik hastalığı olan olgular (fenilketonüri vb)
- Allerjik, inflamatuvar ve otoimmün hastalık tanısı almış olan olgular
- Rutin ilaç kullanımı (antikonvülzan, antipsikotik, kortikosteroid, diüretikler) olanlar
- Vitamin D ve Ca preparatı kullananlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Çizelge 3.1. Hasta ve kontrol gruplarına ait demografik veriler

	Otizm Spektrum Bozukluğu (Grup I)	Kontrol (Grup II)
Hasta sayısı (N)	46	46
Cinsiyet		
Kız	9 (%19,6)	17 (%37,0)
Erkek	37 (%80,4)	29 (%63,0)
Yaş, (Ay)	47	47
M (Aralık-Ay)	(25-132)	(25-72)
<u>ÇODÖ tipi</u>		
Otizm yok	-	46
Hafif-orta derecede otizm	24	-
Ağır derecede otizm	22	-

*M=Medyan; aralık=minimum ve maksimum değerler.

3.2. Veri Toplama Araçları

3.2.1. Klinikte uygulanan formlar ve testler

Sosyodemografik ve klinik veri formu

Çocuk ve anne-babalara ait sosyodemografik özellikleri sorgulanmak amacıyla araştırmacılar tarafından hazırlanmıştır. Çalışmaya alınan tüm katılımcılar için bu form doldurulmuştur.

Çocukluk Otizm Derecelendirme Ölçeği (ÇODÖ)(CARS: Childhood Autism Rating Scale)

ÇODÖ, Schopler ve arkadaşları tarafından 1971’de geliştirilen otizm tanısının yapılabilmesi ve diğer gelişimsel bozuklukların ayırt edilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır [184]. 1996 yılında bu ölçek Sucuoğlu ve arkadaşları tarafından Türkçe’ye uyarlanmıştır [185]. Ölçek aile ile görüşme ve çocuğun gözlenmesi sonucunda elde edilen bilgiler temel alınarak doldurulmaktadır. Ölçek ayrı birer alt ölçek görünümünde olan 15 maddeden oluşmakta, ölçeğin doldurulmasıyla otizm belirtileri ile ilgili bir derecelendirme yapılabilir. Ölçekte yer alan maddeler, kişilerle ilişki, taklit, duygusal tepkiler, vücudun kullanımı, değişikliğe tepki, görsel tepkiler, dinlenme tepkileri, tat, koku ve dokunmanın kullanılması, korku/sinirlilik, sözel iletişim, sözel olmayan iletişim, zihinsel etkinlikler ve genel izlenimler başlığı altında toplanmakta ve her madde 1 ile 4 arasında yarım derecelik puanlama ile derecelendirilmektedir. Burada çocuğun yaşına göre normal olarak değerlendirilen davranışları için 1, normalden en çok sapan davranışları içinse 4 puan verilmektedir. ÇODÖ’den en düşük 15, en yüksek 60 puan alınmaktadır. Bu ölçeğe göre 15-29,5 arasında puan alanların otizm olmadığı, 30-36,5 arasında puan alan çocuklarda hafif-orta derecede otizm, 37-60 puan arasında alanlarda ise ağır derecede otizm bulunduğu kabul edilmektedir (EK-4).

3.3. Deneyler

3.3.1. Serumların toplanması

Kontrol grubu olan sağlıklı çocuklardan ve otizm tanısı alan hasta çocuklardan muayenelerini takiben analiz için kan örnekleri antikoagülan içermeyen düz tüpe alınmıştır. Kan alındıktan sonra numuneler oda sıcaklığında 15-30 dk bekletilmiş ve 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Ayrılan serum örnekleri ependorflara konularak çalışma gününe kadar - 80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.2. Kullanılan cihazlar ve kitler

Vitamin D metabolitleri olan serum 25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 3-epi-25(OH)D₃ düzeyleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı bünyesinde bulunan LC-MS/MS cihazında analitik olarak tayin edilmiştir. Testler TSQ Quantum Access MAX Mass Spectrometer-Dionex Ultimate 3000 LC Systems (Thermo Fisher Scientific (Bremen) GmbH Management System) cihazında çalışılmıştır. Serum 25(OH)D₃ / 25(OH)D₂ analizlerinin her biri için 125 test olmak üzere çalışma kiti (Clinmass® Complete Kit for 25(OH)D₃/25(OH)D₂/3-epi-25(OH)D₃ (RECEIPE Chemicals + Instrument GmbH, Germany)), SPE kolon ve analitik kolon (C18), ayrıca 3-epi-25(OH)D₃ analizi için bu metabolite özel 3-epi analitik kolon (C18) alınmıştır. Serum 3-epi-25(OH)D₃ düzeyleri için yeni metod geliştirilmiş ve metod validasyonu yapılmıştır.

Kalsiyum, fosfor ve kreatinin düzeyleri spektrofotometrik yöntem ile, paratiroid hormon elektrokemilüminesans yöntem ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında çalışılmıştır. Serum kalsiyum, fosfor ve kreatinin düzeyleri Roche HITACHI Cobas 6000 c 501 ve paratiroid hormon düzeyleri Roche HITACHI Cobas 6000 e 602 modülünde analiz edilmiştir.

3.4. LC-MS/MS Analiz Metodu

Çok sayıda analitik teknikler vitamin D metabolitlerinin miktarının belirlenmesi için geliştirilmiştir. Örneğin, analitik teknikler arasında protein bağlanma deneyleri, enzim bağlı immüno testler (ELİSAs), radioimmüno test (RIAs), kemilüminesans testler, gaz kromatografi-kütle spektrometri (GC-MS), Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-

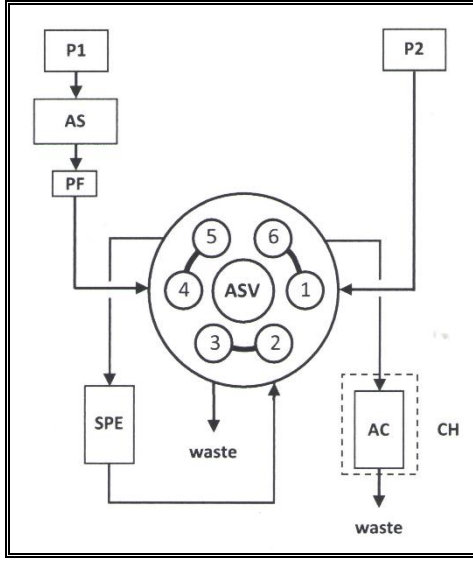
MS/MS) yer almaktadır. Günümüzde, LC-MS/MS insan numunelerinde vitamin D durumunun tayini için en umut verici tekniktir ve çoğunlukla “altın standart” olarak ifade edilmektedir. Kütle spektrometri yöntemi, bilinmeyen bileşiklerin tanımlanması, organik ve inorganik moleküllerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi ve her tipte bilinen bileşiğin iyonlarına ayrıştıktan sonra, hem kalitatif (yapısal) hem de kantitatif (moleküler kütle veya konsantrasyon) olarak tayinini yapabilen yüksek duyarlılık ve özgüllükte kullanılan analitik bir tekniktir. Kütle spektrometre temel olarak belirli fazdaki (bizim örneğimizde sıvı fazındaki) iyonların ağırlığının ölçümünü esas alır. İlgili molekül ilk olarak kütle spektrometrenin iyonizasyon kaynağına girer, burada pozitif veya negatif yüklere (bizim örneğimizde pozitif yüklere) iyonize olur. Kütle spektrometre doğrudan moleküler kütleyi ölçmek yerine molekülleri kütle/yük oranına (m/z) göre ayırıştırır ve ölçümünü yapar. Kompleks biyolojik yapıların analizinde, ilk basamakta kromatografik olarak (analitik kolonla) ayrılma bulunmaktadır. LC-MS/MS’te her analit için bir retansiyon (alınkonma) zamanı ve m/z değeri bulunmaktadır. İlk separasyon (seçim) aşamasından sonra ayrılan bileşiklerin iki aşamalı MS analizi ile özgüllük artmaktadır. İkinci separasyon aşamasında (birinci MS aşamasında seçilen ana iyonlar) çarpışma sonucu fragmentasyonlarına ayrılması, üçüncü separasyon aşamasında (ikinci MS aşamasında ana iyonların parçalanması ile elde edilen) fragment iyonların (ürün iyon) karakterize edilmesi ile özgüllük sağlanmaktadır. MRM (Multiple Reaction Monitoring-Çoklu reaksiyon izleme) molekül yapılarının kantitasyonunu yüksek duyarlılık ve özgüllükte yapan bir tandem MS yöntemidir. MRM yöntemi ile kantitasyonu yapılacak analizlere özgü ve daha önceden m/z değeri tanımlanan ana iyon ve fragment iyon ikilisi izlenebilmektedir. MRM sayesinde tek bir LC-MS/MS deneyi sırasında birden çok analitin ölçümü mümkün olmaktadır. MRM aynı zamanda SRM (Selected Reaction Monitoring- Seçili reaksiyon izleme) işleminin bir ya da daha fazla öncül iyonun (precursor ion) çoklu ürün iyonlarına uygulanmasıdır. Analiz süresince yalnızca istenilen belirli m/z aralıklarına odaklanılır. İyonlar buradan kütle analizörüne geçerek kütle/yük (m/z) oranlarına göre dedektörün farklı bölgelerine ulaşırlar. Dedektör ile etkileşen iyonlar, kullanılabilir sinyaller oluşturur. Meydana gelen bu sinyaller bilgisayar sistemi tarafından kaydedilir. Elektronik ortamda m/z oranlarına göre ilgili molekülden alınan sinyalleri, nispi sıklıklarını gösteren kütle spektrumu olarak grafiksel olarak düzenleyip verir [186].

3.4.1. Serum veya plazmada 25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 3-epi 25 (OH)D₃'ün on-line analizi

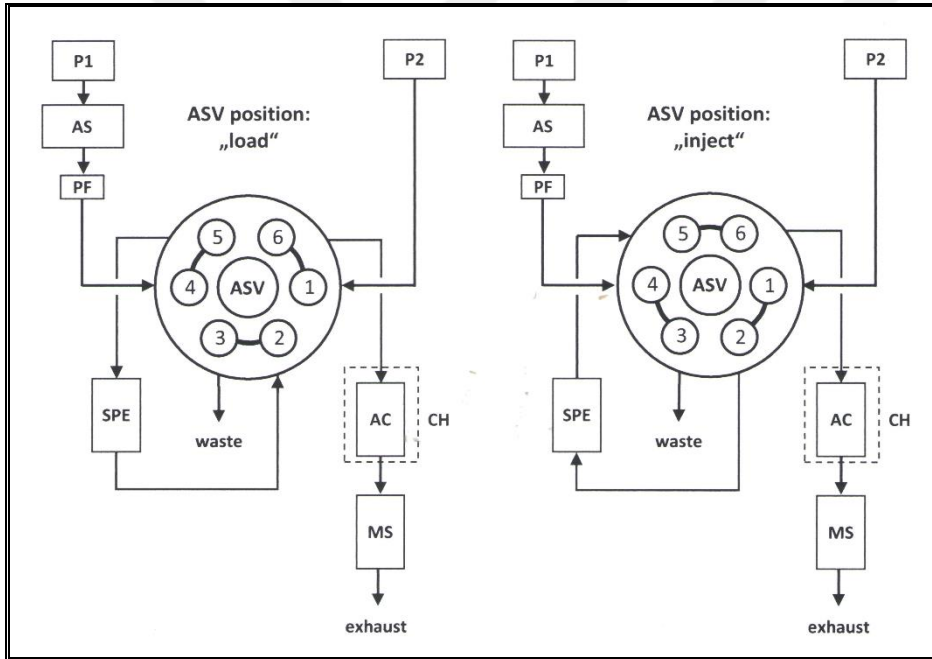
Bu analitik metod ile serum veya plazmadan 25(OH)D₃, 25(OH)D₂ belirlenir. Bu analiz tandem kütle spektrometrisi ile birlikte on-line SPE-HPLC (LC-MS/MS) ile gerçekleştirilir. Geleneksel HPLC yöntemi örnek enjeksiyonu öncesinde manuel olarak gerçekleştirilen numune hazırlığı gerektirir. Saniyeler içindeki kromatografik ayrılma sonucunda, HPLC sistemi içerisindeki analitik kolonda, analitler APCI (atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon) tarafından iyonize edilir ve tandem kütle spektrometre (MS/MS) tarafından tayin edilir. APCI içinde örnek bileşenleri buharlaştırılır ve iyonize edilir. Daha sonra bir çarpışma hücresi (collision cell) ile bağlantılı iki kuadropolden oluşan kütle spektrometresine geçer. Bu metotta analitlerin ölçümü MRM (multiple reaction monitoring-çoklu reaksiyon takip işlemi) modunda gerçekleştirilir. Bu modda sadece kütle/yük (m/z) oranı tanımlı seçilen iyonlar (precursor iyon olarak bilinir) birinci kuadropolden geçerken seçilerek izole edilir ve daha sonrasında çarpışma hücresine transfer edilir. Burada iyonlar uygun voltaj ayarlarında bir soy gaz (argon veya nitrojen, bizim örneğimizde argon) etkisiyle parçalanır. Oluşan fragmanlar (yavru iyon veya ürün iyonlar olarak bilinir), yalnızca belirli bir m/z oranına sahip olanları son kuadropolde tespit için izole edilir. Böylece MRM modundaki ölçümler ilgilenilen bileşik için karakteristik kütle geçişlerine dayalı analit tanımlama ile yüksek selektivite (seçicilik) ve sensitivite (hassasiyet) ile belirlenmesini ve miktar tayinini sağlar. Bu yöntem, bir izotop etiketli internal (iç) standart kullanımı ile kompleks biyolojik matrislerde sağlam ve güvenilir bir tayin gerçekleştirir. Internal standart hedef analit ile kimyasal özellikleri, kromatografik olarak ayrılma özelliği, iyonizasyon özelliği ve fragment iyon dağılımı aynı olan maddedir, başka bir ifade ile internal standartlar analizi istenen bileşiklere çok benzer bileşiklerdir. Internal standart sayesinde, yüksek kesinlik elde edilir çünkü bu metod ile numune enjeksiyonu, akış hızı ve kolon şartlarındaki değişmelerle oluşan belirsizlikler en aza indirilmektedir. Her bir analit için (25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃) iki geçiş (nicelik, nitelik) kullanılır. Analizin süresi 3 dk'dır. C-3 epimer konsantrasyonlarının belirlenmesinde daha yüksek ayrışma gerçekleştirmek için alternatif bir analitik kolon kullanılır. Analizin süresi 4 dk'dır. Thermo Scientific LC-MS sistemleri için Thermo Scientific Xcalibur™ yazılımı kullanılmıştır. Windows tabanlı Xcalibur™ yazılımı, metod kurulması, veri elde edilmesi, veri işlenmesi ve verinin rapor edilmesini sağlamaktadır.

Çizelge 3.2. Kullanılan sarf malzemeleri

Kullanılan Sarf Malzemeleri	
Autosampler Washing Solution	ClinMass [®] RECIPE Chemicals/1000 mL
SPE-Buffer	ClinMass [®] RECIPE Chemicals/1000 mL
Mobil Faz	ClinMass [®] RECIPE Chemicals/700 mL
IS Internal Standart (d₆-25(OH)D₃)	ClinMass [®] RECIPE Chemicals/30 mL
Serum Kalibratör Set, Liyofilize	ClinCal [®] 4-level Serum Calibrator
Optimizasyon Mix 3-epi 25-(OH)D₃	ClinMass [®] RECIPE Chemicals/1 mL
P Presipitant	ClinMass [®] RECIPE Chemicals/15 mL
Analitik Kolon	ClinMass [®] RECIPE Chemicals
Analitik Kolon 3-epi-25(OH)D₃	ClinMass [®] RECIPE Chemicals
SPE-Kolon	ClinMass [®] RECIPE Chemicals
Serum Kontroller, Level I, II, I+II	ClinChek [®] Serum Controls
Vial	2 mL - (12x32 mm) 400 adet/aar. marka
İnsert	2 mL - (5,8x31,5mm) / 400 adet / aar. marka
Ependorf	Labosel
Otomatik Pipet	Socorex 10-100 µL / Socorex 20-200 µL / Isotherm 0,5-10 µL / BRAND HandyStep [®] S Tekrarlamalı Pipet
Pipet uçları	0,1-10 µL + 200 µL
Santrifüj Cihazı	Nüve NF 048
Vorteks karıştırıcı	DragonLab MX-F VT 1.1
Buzdolabı (+4 °C) / (-20 °C)	Kleo / Arçelik No Frost
Metanol	Methanol gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv [®] Reag. Ph Eur.(Merck Millipore, Germany)



Şekil 3.1. LC sisteminin yapısı



Şekil 3.2. Otomatik switching (anahtarlama) valfi ve LC sisteminin yapısı

Şekil 3.2’de LC sisteminin konfigürasyonu gösterilmektedir. P1: izokratik HPLC pompası (SPE-buffer); P2: izokratik HPLC pompası (Mobil faz); AS: autosampler; PF: inline-filter; ASV: otomatik switching valve (yüksek basınçlı anahtarlama valfi, 6 giriş/3 kanallı); SPE: SPE kolon; AC: analitik kolon; CH:kolon ısıtıcı; MS:kütle kütle spektrometre.

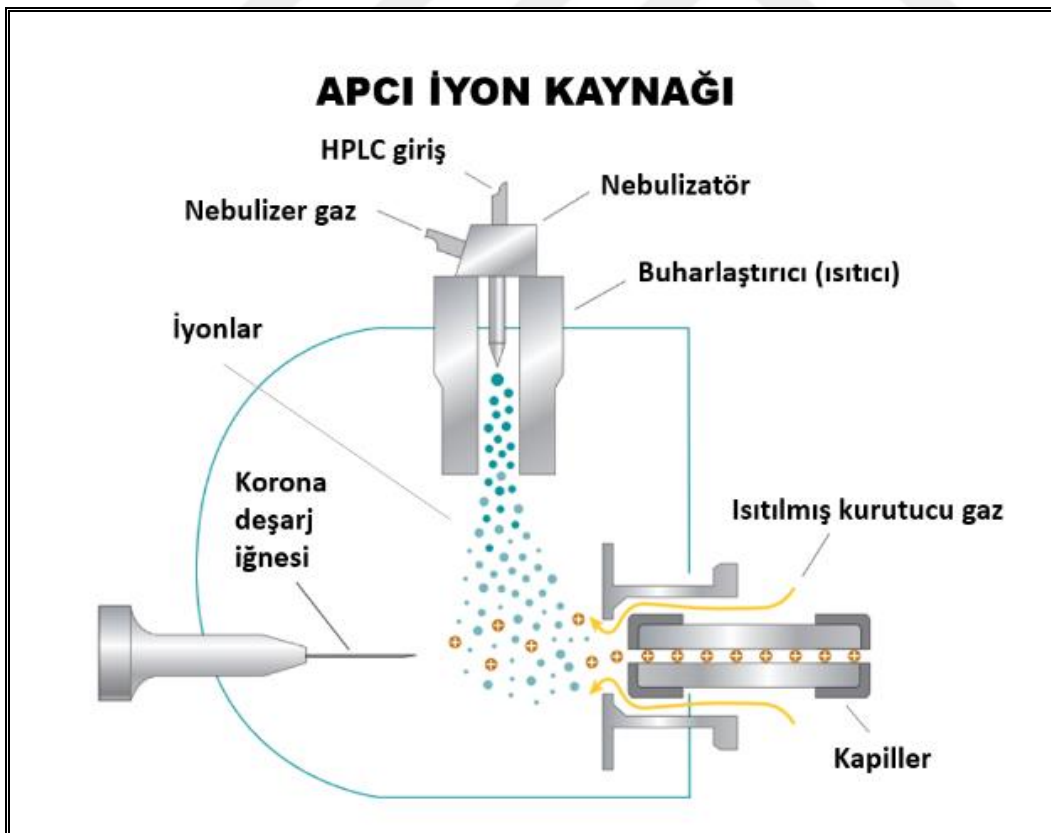
ASV “yükleme” pozisyonu: switching aralığı 0,00-0,75 dk’dır. Numune LC sisteme enjekte edilir ve numune matrisinden seçici olarak analitleri ayıklayan SPE kolona transfer

edilir. Matris bileşenleri SPE-kolon boyunca yıkanır ve böylece atığa akıtılır. Aynı anda, analitik kolon önceki enjeksiyon döngüsünden tekrar denge durumuna gelir.

ASV “enjeksiyon” pozisyonu: switching aralığı 0,75-2,20 dk’dır. Otomatik switching valfi enjeksiyon pozisyonuna geçer. Ekstre analitler geriakış moduyla mobil faz ile SPE kolondan taşınır. Kromatografik olarak ayrıldığı analitik kolona transfer edilir.

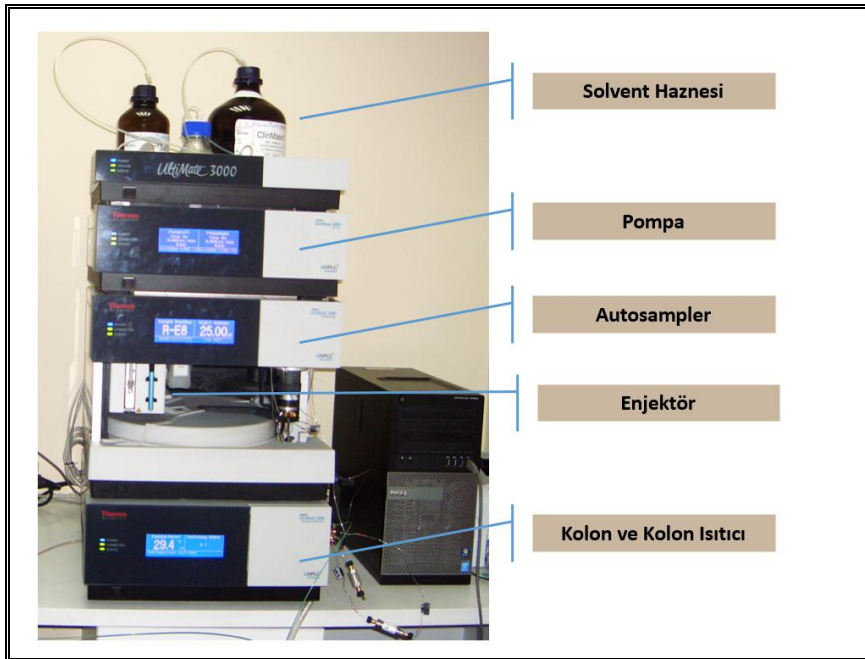
ASV “yükleme” pozisyonu: switching aralığı 2,20-3,00 dk’dır. Otomatik switching valfi yüklem konumuna geri döner. Her iki kolon (SPE-kolon ve analitik kolon) bir sonraki enjeksiyon için tekrar dengelenir.

Kromatografik olarak ayırma işlemi LC cihazı ile gerçekleştirilmiştir.(Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 LC ünitesi, analitik kolon ve SPE kolon kullanılmıştır. Analitlerin tespiti için MRM modu kullanılmıştır. Her bir analit için bir MRM geçişi ve internal standart izlenimi yapılmıştır.

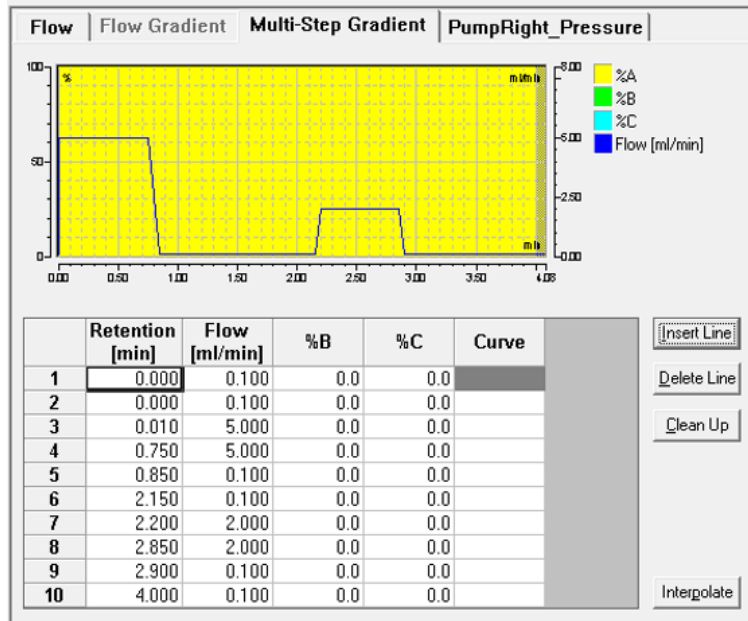


Şekil 3.3. APCI iyon kaynağının şematik görünümü

APCI’de, LC elüenti ısıtılmış bir buharlaştırıcı (ısıtıcı) boyunca püskürtülür. Isı genellikle 250°C - 400°C arasında olmaktadır. Ortaya çıkan gaz fazındaki çözücü moleküller bir korona iğnesinden boşalan elektronlar ile iyonize edilir. Çözücü iyonlar analite yüklenmek için transfer edilir. Böylece normalde yüklü olmayan moleküller kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile uyarılarak yüklü iyonize moleküller haline dönüşürler. Sonraki aşamada iyonize moleküller bir delik boyunca geçer. İyonizasyon gaz fazında olduğundan analitlerin termal olarak kararlı ve uçucu olması gerekir.



Şekil 3.4. HPLC cihazı



Şekil 3.5. 3-epi-25(OH)D₃ için retansiyon zamanları ve akış miktarı

Çizelge 3.3. Serum 3-epi-25(OH)D₃ deneyi için analitlerin m/z (kütle/yük) oranları

ANALİT	Ana iyon m/z	Ürün iyon m/z	SRM Collision Enerji (V)	Retansiyon Zamanı (dk)
25(OH)D ₃	383,365	211,225 257,325	28 12	3.50
25(OH)D ₂	395,375	209,175 269,200	25 18	3.50
3-epi-25(OH)D ₃	383,366	257,325	12	3.50
d ₆ -25(OH)D ₃ internal standart	389,375	211,225 263,350	29 17	3.50

Çizelge 3.4. Serum 25(OH)D₃/D₂ deneyi için analitlerin m/z(kütle/yük) oranları

ANALİT	Ana iyon m/z	Ürün iyon m/z	SRM Collision Enerji (V)	Retansiyon Zamanı (dk)
25(OH)D ₃	383,365	211,225 257,325	28 12	2.50
25(OH)D ₂	395,375	209,175 269,200	25 18	2.50
d ₆ -25(OH)D ₃ internal standart	389,375	211,225 263,350	29 17	2.50



Resim 3.1. LC-MS/MS cihazı

Resmin açıklaması: A. LC-MS/MS cihazı B.Korona iğnesi C.Enjektör D.Autosampler'a yerleştirilen tray(tepsi)

Deneyin Yapılışı

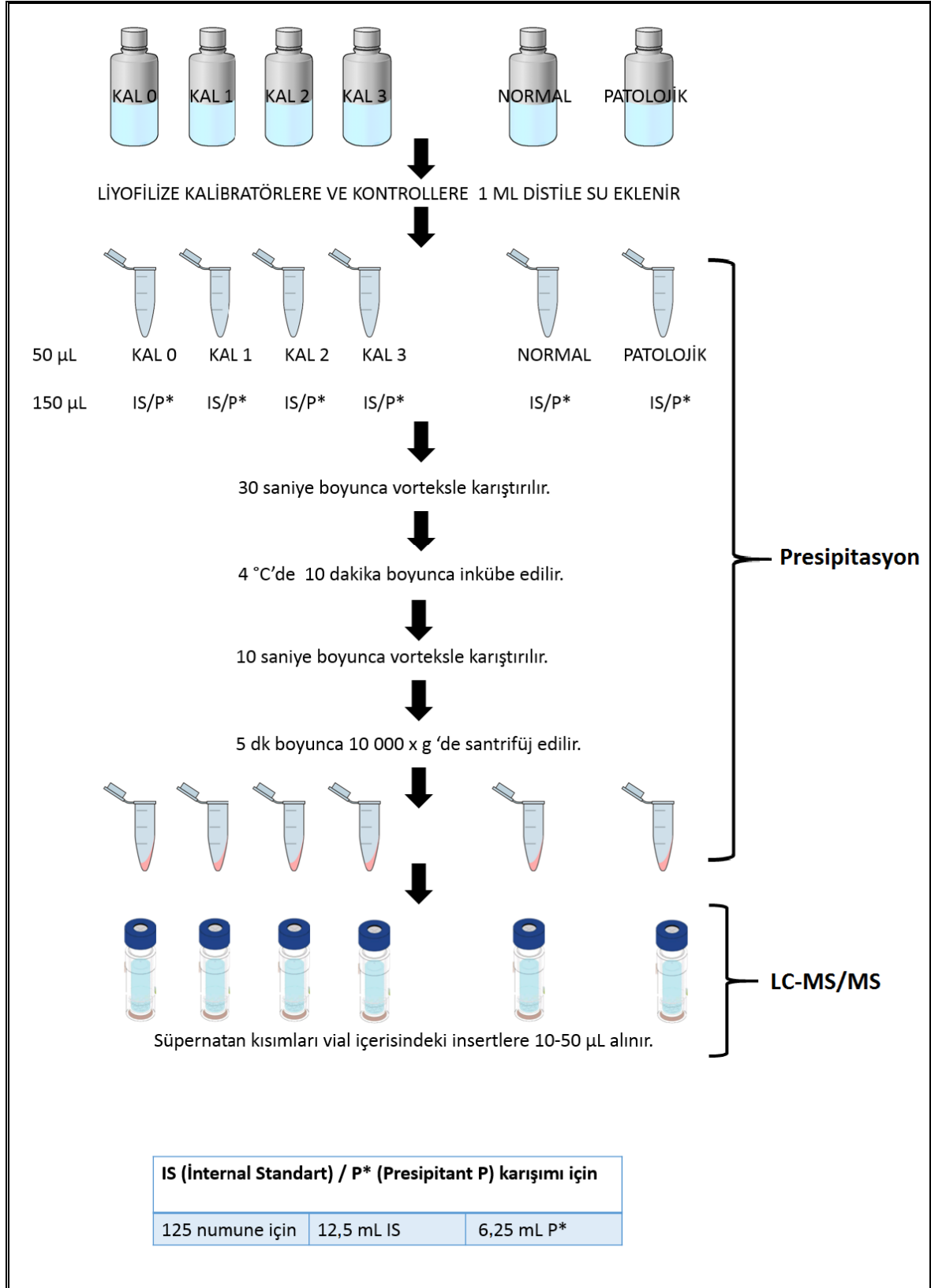
Serum 25(OH)D₃ ve 25(OH)D₂ vitaminlerinin analitik tayini

25(OH)D₃ ve 25(OH)D₂ tayini için gerçekleştirilen ön işlemler Şekil 3.6.'da gösterilmektedir. Kalibratörler, kontroller ve numuneler LC-MS/MS cihazına yüklenmeden önce bazı ön hazırlıklardan geçmektedir. Liyofilize halde bulunan kalibratörlere ve kontrollere 1 mL distile su eklenir ve homojen hale gelene kadar vorteks yardımı ile karıştırılır. Daha sonraki aşamaya geçmek için internal standart ve presipitant karışımı hazırlanır. İnternal standart ve presipitant hazır halde bulunmaktadır. 125 örnek çalışmak için 12,5 mL internal standart ile 6,25 mL presipitant hazır hale getirilir. Her bir kalibratör ve kontrolden 50 µL yeni ependorflara alınarak üzerine 150 µL internal standart/presipitant(IS/P*) karışımı eklenir. Aynı işlem numuneler için de uygulanır. 50 µL numune üzerine 150 µL IS/P* karışımı eklenir. 30 saniye boyunca her bir örnek vorteksle karıştırılır. Buzdolabında 4 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edilir. Daha sonra 10 saniye boyunca vorteksle karıştırılır ve örnekler 10 000xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Ayrılan süpernatant kısımları 2 mL'lik vialler içerisine yerleştirilen insertlere 10-50 µL olacak şekilde alınır. Numune tepsisine (tray) yerleştirilen örnekler çalışılmak üzere LC-MS/MS cihazına yüklenir.

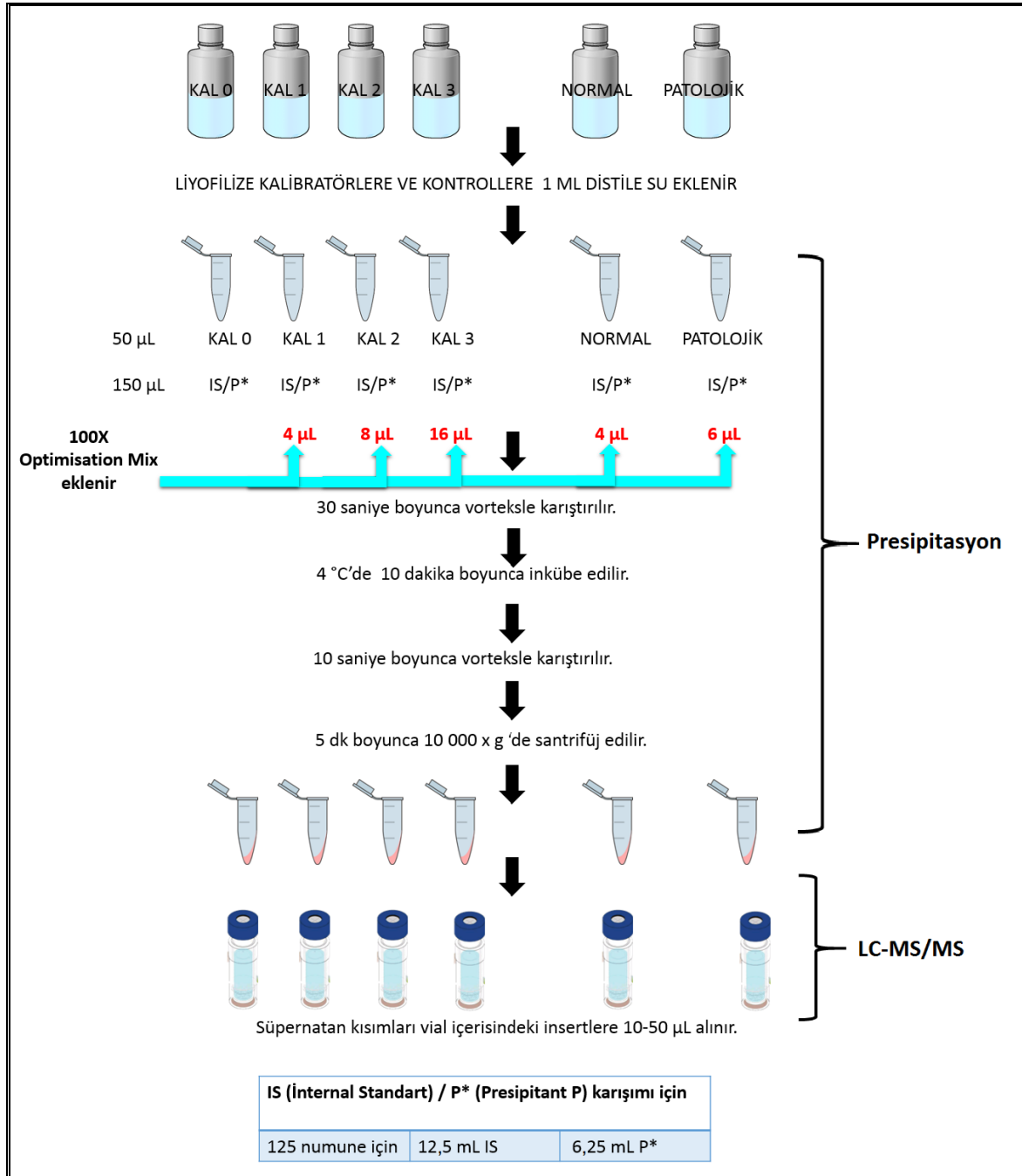
Serum 3-epi-25(OH)D₃ vitaminin analitik tayini

Serum 3-epi-25(OH)D₃ vitamini tayini için gerçekleştirilen ön işlemler Şekil 3.7.'de gösterilmektedir. 25(OH)D₃ ve 25(OH)D₂ vitamin tayine benzer şekilde kalibratörler, kontroller ve numuneler LC-MS/MS cihazına yüklenmeden önce bazı ön hazırlıklardan geçmektedir. Liyofilize halde bulunan kalibratörlere ve kontrollere 1 mL distile su eklenir ve homojen hale gelene kadar vorteks yardımı ile karıştırılır. Daha sonraki aşamaya geçmek için internal standart ve presipitant karışımı hazırlanır. İnternal standart ve presipitant hazır halde bulunmaktadır. 125 örnek çalışmak için 12,5 mL internal standart ile 6,25 mL presipitant hazır hale getirilir. 3-epi-25(OH)D₃ Optimization mix çözeltisi hazırlanma prosedürüne kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklanır. Daha sonra bu çözelti derin dondurucudan çıkarılarak dışarıda 15 dakika bekletilir ve karıştırılarak ara stok (100X hazırlanır). 3-epi-25(OH)D₃ Optimization mix çözeltisinden belirli oranlarda alınarak ve standart addition (ekleme) metodu kullanılarak kalibratörler (KAL1, KAL2 ve

KAL3), kontroller (NORMAL ve PATOLOJİK) sırasıyla 4 µL, 8 µL, 16 µL, 4 µL ve 6 µL hazırlanmıştır. Her bir kalibratör ve kontrolden 50 µL yeni ependorflara alınarak üzerine 150 µL internal standart/presipitant(IS/P*) karışımı eklenir. Aynı işlem numuneler için de uygulanır. 50 µL numune üzerine 150 µL IS/P* karışımı eklenir. Ardından 30 saniye boyunca her bir örnek vorteksle karıştırılır. Buzdolabında 4 °C’de 10 dakika boyunca inkübe edilir. Daha sonra 10 saniye boyunca vorteksle karıştırılır ve örnekler 10 000xg’de 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Ayrılan süpernatant kısımları 2 mL’lik vialler içerisine yerleştirilen insertlere 10-50 µL olacak şekilde alınır. Tray’e yerleştirilen örnekler çalışılmak üzere LC-MS/MS cihazına yüklenir. LC-MS/MS cihazında kurulan yöntemin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği Optimizasyon Mix 3-epi 25-(OH)D₃ çözeltisi ile valide edilmiştir (% CV: 4,8).



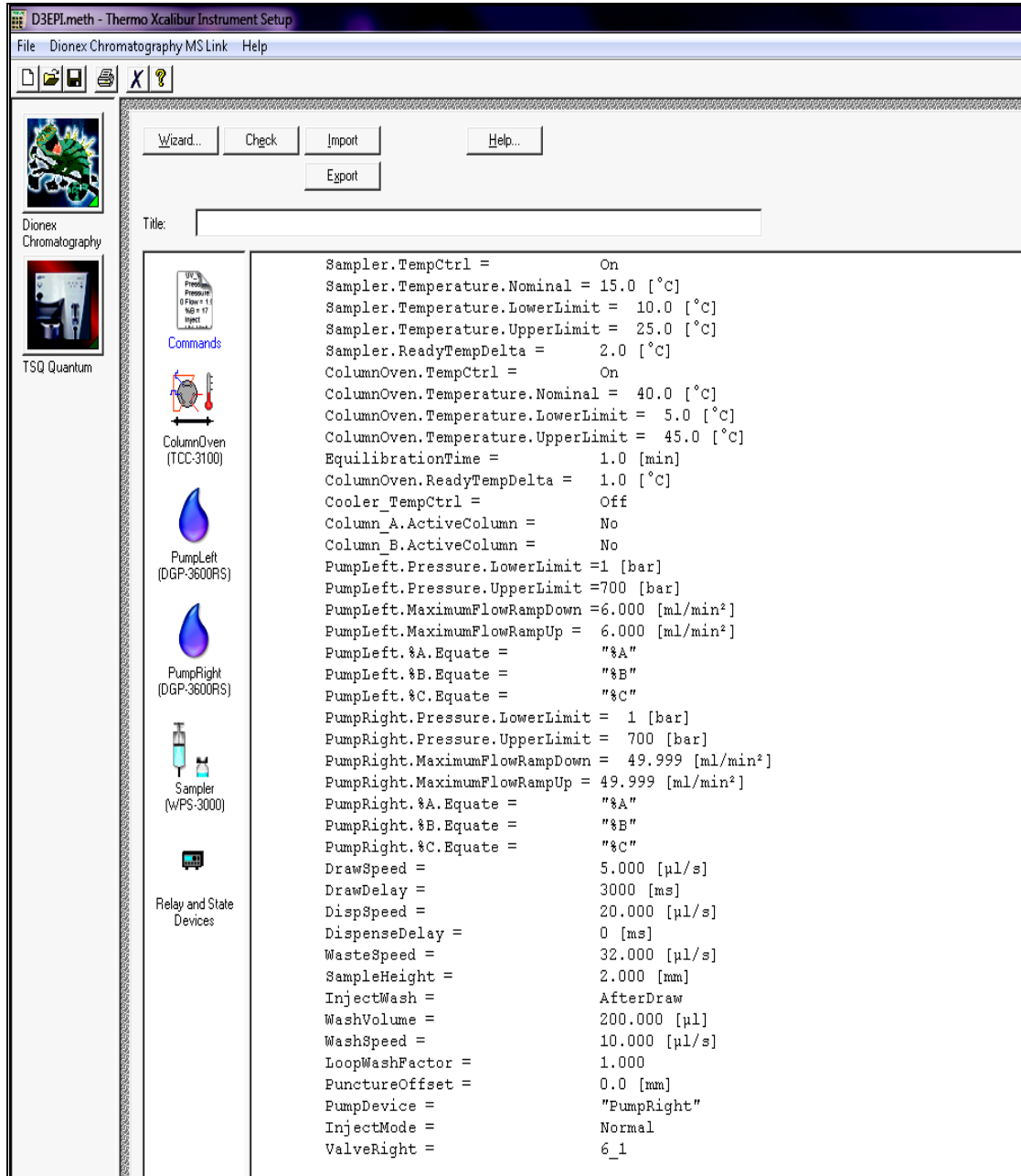
Şekil 3.6. Serum 25(OH)D₂ / 25(OH)D₃ vitamin tayinleri için kalibratör kontrol ve numunelerin hazırlanması



Şekil 3.7. Serum 3-epi-25(OH)D₃ vitamin tayini için kontrol, kalibratör ve numunelerin hazırlanması

Çizelge 3.5. Serum 25(OH)D₂/25(OH)D₃ vitamini tayini için test bilgileri

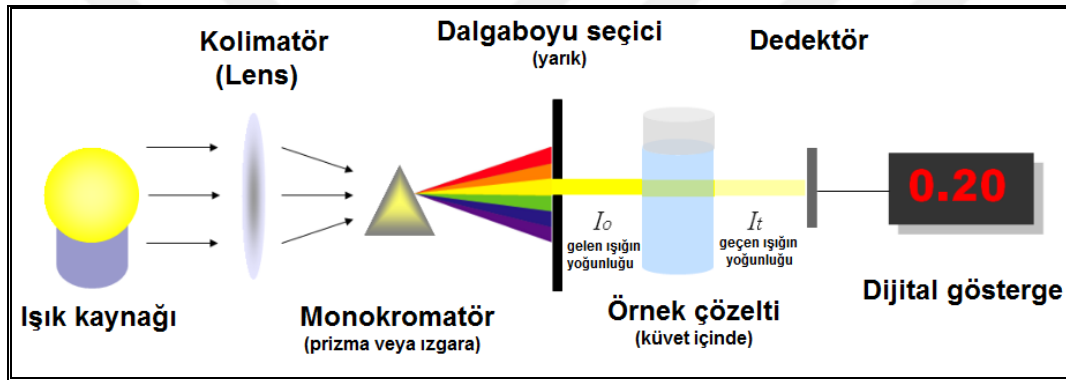
LC-MS/MS Parametreleri	
Linearity	1,4 - 250 µg/L (25-OH-Vit D ₂) 2,3 - 250 µg/L (25-OH-Vit D ₃)
Recovery	% 92 - 103
LLOD (Lower limit of detection) En düşük tespit limiti	0,4 µg/L (25-OH-Vit D ₂) 0,7 µg/L (25-OH-Vit D ₃)
LLOQ (Lower limit of quantification) En düşük kantitasyon limiti	1,4 µg/L (25-OH-Vit D ₂) 2,3 µg/L (25-OH-Vit D ₃)
Intraassay precision (gün içi tekrarlanabilirlik)	% 6,8 (25-OH-Vit D ₂) % 4,7 (25-OH-Vit D ₃)
Interassay precision (günler arası tekrarlanabilirlik)	% 7,6 (25-OH-Vit D ₂) % 6,6 (25-OH-Vit D ₃)
LC-Parametreleri	
Pompa 1	SPE-buffer (0,1 – 5,0 mL/dk)
Pompa 2	Mobil faz (0,5 mL/dk)
Enjeksiyon hacmi	10 - 50 µL
Enjeksiyon aralığı	3 dk (4 dk)
Switching valve	Automatic switching valve, 6-port/3-channel
Kolon ısıtıcı	40 °C
MS-Parametreleri	
İyon kaynağı	Heated Nebulizer(ısıtılmalı nebulizator) (APCI), pozitif
MS/MS-Mode	MRM



Şekil 3.8. LC-MS/MS yönteminde kullanılan ayarlar

3.5. Spektrofotometrik Yöntem

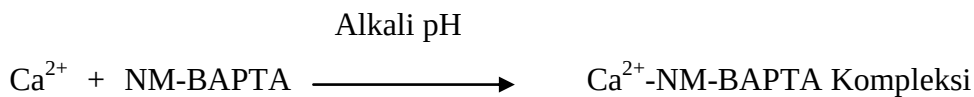
Birçok molekül belirli bir dalga boyundaki ışığı absorbe etmektedir. Işık absorbansının spektrofotometreyle ölçümü moleküllerin saptanması, tanımlanması ve çözelti içerisindeki derişimlerinin ölçümünde kullanılır. Şekil 3.9.'da spektrofotometrenin başlıca komponentleri gösterilmiştir Bir ışık kaynağı, ışığı geniş bir spektrum boyunca yayar ve daha sonra monokromatör belli bir dalga boyundaki ışığı seçerek iletir. Monokromatik ışık bir küvetin uzunluğu boyunca örnek içerisinde geçer ve absorblayan maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak ışık absorblanır. Geçen ışık dedektör tarafından okunur.

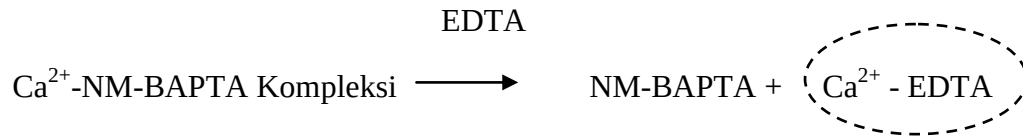


Şekil 3.9. Spektrofotometrenin temel yapısı

3.5.1. Kalsiyum düzeyi analizi

Total kalsiyum düzeyi spektrofotometrik yöntem kullanılarak kolorimetrik metodla tayin edilmiştir. Test prensibi, kalsiyum iyonları alkalın koşullarda 5-nitro-5'-metil-BAPTA(NM-BAPTA) ile reaksiyona girerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks ikinci adımda EDTA ile reaksiyona girer.





Absorbanstaki değişim kalsiyum konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçölür.

Çocukluk çağındaki bireylerde beklenen serum/plazma kalsiyum düzeyleri Çizelge 3.6.'da verilmiştir [187]. Total kalsiyum düzeyi için ölçüm aralęı serumda 0,20-5,0 mmol/L (0,8-20,1 mg/dL)'dir. Alt saptama sınırı 0,20 mmol/L (0,8 mg/dL)'dir.

Çizelge 3.6. Çocukluk çağındaki bireylerde beklenen serum/plazma kalsiyum düzeyleri

YAŞ	SERUM/PLAZMA DÜZEYLERİ mmol/L (mg/dL)
0-10 gün	1,90-2,60 (7,6-10,4)
10 gün- 2 yaşı	2,25-2,75 (9,0-11,0)
2-12 yaşı	2,20-2,70 (8,8-10,8)
12-18 yaşı	2,10-2,55 (8,4-10,2)

3.5.2. Fosfor düzeyi analizi

Serum fosfor ve kalsiyum düzeyleri arasında ters bir ilişki söz konusudur. Bir değer artış gösterirken diğer değer azalmaktadır. Fosfor en önemli minerallerden biridir ve vitamin D kontrolünde barsaklardan emilmektedir. PTH'n etkisi ile kemikten resorpsiyonu ve idrarla atılımı gerçekleşir. Vitamin D eksikliğinde test sonuçları düşük çıkabilmektedir. Serum fosfor düzeyleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak kolometrik metot ile tayin edilmektedir. İnorganik fosfat, sülfürik asit varlığında amonyum molibdat ile amonyum fosfomolibdat kompleksi meydana getirir. Oluşan fosfomolibdatın konsantrasyonu, inorganik fosfat konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçölür. Çocukluk çağındaki bireylerde beklenen serum/plazma fosfor düzeyleri Çizelge 3.7.'de gösterilmiştir [188].

Çizelge 3.7. Çocukluk çağındaki bireylerde beklenen serum/plazma fosfor düzeyleri

YAŞ	ERKEK Serum/Plazma Düzeyleri mmol/L (mg/dL)	KIZ Serum/Plazma Düzeyleri mmol/L (mg/dL)
1-30 gün	1,25-2,25 (3,9-6,9)	1,40-2,50 (4,3-7,7)
1-12 ay	1,15-2,15 (3,5-6,6)	1,20-2,10 (3,7-6,5)
1-3 yaş	1,00-1,95 (3,1-6,0)	1,10-1,95 (3,4-6,0)
4-6 yaş	1,05-1,80 (3,3-5,6)	1,05-1,80 (3,2-5,5)
7-9 yaş	0,95-1,75 (3,0-5,4)	1,00-1,80 (3,1-5,5)
10-12 yaş	1,05-1,85 (3,2-5,7)	1,05-1,70 (3,3-5,3)
13-15 yaş	0,95-1,65 (2,9-5,1)	0,90-1,55 (2,8-4,8)
16-18 yaş	0,85-1,60 (2,7-4,9)	0,80-1,55 (2,5-4,8)

3.5.3. Kreatinin düzeyi analizi

Kreatinin düzeyleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak Jaffe metodu ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan Roche HITACHI Cobas 6000 c 501 modulünde tayin edilmiştir. Çocukluk çağındaki bireylerde beklenen serum/plazma kreatinin düzeyleri tablo 'de verilmiştir. Çocukluk çağındaki bireylerde beklenen serum/plazma kreatinin düzeyleri Çizelge 3.8.'de gösterilmiştir [189].

Çizelge 3.8. Çocukluk çağındaki bireylerde beklenen serum/plazma kreatinin düzeyleri

YAŞ	SERUM/PLAZMA DÜZEYLERİ μmol/L (mg/dL)
Yenidoğan (premature)	25-91 (0,29-1,04)
Yenidoğan (tam süreli)	21-75 (0,24-0,85)
2-12 ay	15-37 (0,17-0,42)
1- < 3 yaş	21-36 (0,24-0,41)
3- < 5 yaş	27-42 (0,31-0,47)
5- < 7 yaş	28-52 (0,32-0,59)
7- < 9 yaş	35-53 (0,40-0,60)
9- < 11 yaş	34-65 (0,39-0,73)
11- < 13 yaş	46-70 (0,53-0,79)
13- < 15yaş	50-77 (0,57-0,87)

3.6. Elektrokemilüminesans Yöntem

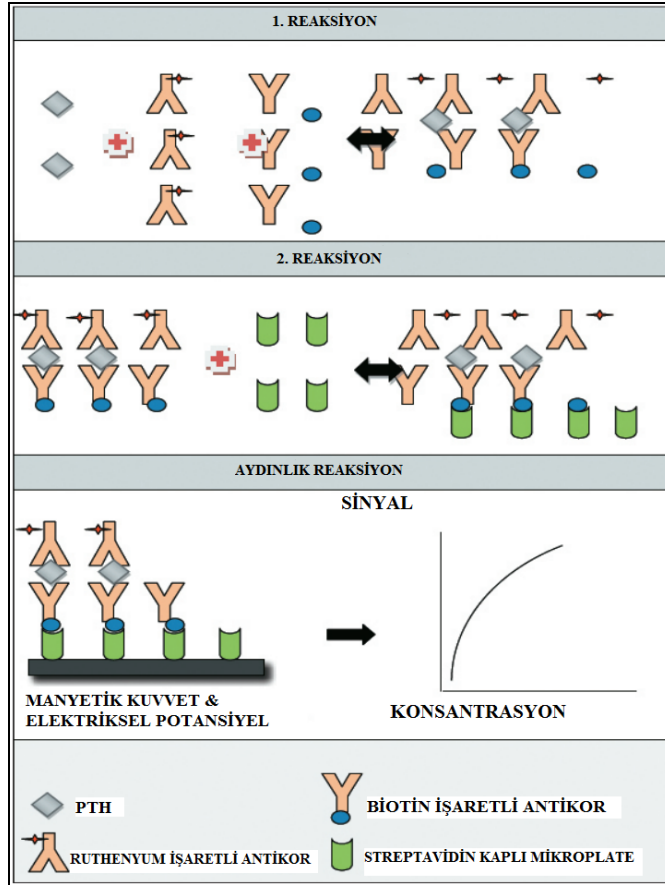
3.6.1. Paratiroid hormon analizi

İnsan serum ve plazmasında bozulmamış paratiroid hormonunun *in vitro* kantitatif tayini için elektrokemilüminans immünolojik testi “ECLIA” (electrochemiluminescence immunoassay), Elecsys ve Cobas e immünolojik test analizörü kullanılmıştır. Bozulmamış PTH tayini için ELECSys testi, biotinlenmiş monoklonal antikorun N-terminal fragmanı (1-37) ile rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş monoklonal antikorun C-terminal fragmanı (38-84) ile reaksiyona girdiği bir sandviç test prensibiyle çalışmaktadır.

Sandviç test prensibinde;

- 1. İnkübasyonda 50 µL numune, biotinlenmiş monoklonal PTH'ye özgü antikor ve rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş monoklonal PTH'ye özgü antikor bir sandviç kompleksi oluşturur.
- 2. İnkübasyonda streptavidin kaplı mikropartiküller eklendikten sonra biyotin ile streptavidin etkileşimi aracılığıyla kompleks katı faza bağlanmış hale gelir.
- Reaksiyon karışımı mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücresi içine aspire edilir. Bağlanmamış maddeler ProCell/ProCell M ile uzaklaştırılır. Elektrot üzerine voltaj uygulanması kemilüminesans emisyonunu indükler, bu da bir fotoçoğaltıcı ile ölçülür.
- Sonuçlar 2 noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkodu aracılığıyla edinilen bir ana eğri ile tayin edilir.

Beklenen serum/plazma intakt paratiroid hormon düzeyleri 15-65 pg/mL (1,6-6,9 pmol/L) [174]. Alt saptama sınırı 1,20 pg/mL (0,127 pmol/L)'dir. Sandviç ECLIA prensibi Şekil 3.10.'da gösterilmiştir [190].



Şekil 3.10. Sandviç ECLIA prensibi

3.7. Verilerin Analizi

Hasta ve kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmaların yanı sıra OSB’li çocuklar ÇODÖ’ye göre hafif-orta ve ağır derecede otizmlili çocuklar şeklinde gruplandırılarak kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırma yapılmıştır. Araştırma verileri “SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL)” kullanılarak değerlendirildi. Dağılım histogramlarında, Skewnes-Kurtosis (çarpıklık-basıklık) incelenmiştir. Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri uygulanarak verilerin normal dağılım gösterip göstermediği tespit edilmiştir. Normal dağılım için “parametrik”, normal olmayan dağılım için “non-parametrik” test uygulanmıştır. Parametrik test koşulunu sağlayanlar için paired samples T-testi ve Pearson korelasyonu uygulanırken, non-parametrik test koşulunu sağlayanlar için Mann-Whitney U testi ve Spearmans rho korelasyonu yapılmıştır. Alfa anlamlılık seviyesi 0,05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada 0-18 yaş aralığında bulunan OSB olan ve sağlıklı kontrol grubunda yer alan çocukların serumlarında 25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 3-epi-25(OH)D₃, kalsiyum, fosfor, kreatinin ve paratiroid hormon düzeylerine bakılmıştır. OSB olan grubun ve kontrol grubunun parametre sonuçları arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. OSB olan hastalar Grup I, sağlıklı kontrol Grup II olarak belirlenmiştir. Grup I hastaları, kendi içinde ÇODÖ'ne göre iki gruba ayrılmıştır. Hafif-orta derecede otizmlili grup Grup Ia, ağır derecede otizmlili grup Grup Ib olarak belirlenmiştir.

4.1. Grup I, Grup II, Grup Ia ve Grup Ib 25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 3-epi-25(OH)D₃, Kalsiyum, Fosfor, Kreatinin ve Paratiroid Hormon Düzeyleri

Çizelge 4.1'de OSB olan ve sağlıklı çocuklara ait ortalama sonuçları, standart hata ve p değerleri gösterilmektedir. Grup I ve Grup II için elde edilen parametre sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Bu çalışmada OSB'li hastaların (Grup I) ortalama serum 25(OH)D₃ seviyeleri $20,42 \pm 1,21$ µg/L, sağlıklı çocukların (Grup II) ortalama serum 25(OH)D₃ seviyeleri $22,63 \pm 0,88$ µg/L olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre Grup II'e ait serum 25(OH)D₃ düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür. Paired samples T test ile grupların karşılaştırılması sonucu Grup I ve Grup II arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çalışmamızda Grup I ortalama serum 25(OH)D₂ seviyeleri $1,24 \pm 0,08$ µg/L, Grup II ortalama serum 25(OH)D₂ seviyeleri $1,17 \pm 0,07$ µg/L olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre Grup II'e ait serum 25(OH)D₂ düzeylerinin düşük olduğu görülmüştür. Mann-Whitney U testi ile grupların karşılaştırılması sonucu Grup I ve Grup II arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Grup I ortalama serum 3-epi-25(OH)D₃ seviyeleri $0,09 \pm 0,01$ µg/L, Grup II ortalama serum 3-epi-25(OH)D₃ seviyeleri $0,08 \pm 0,01$ µg/L olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre Grup II'e ait serum 3-epi-25(OH)D₃ düzeylerinin düşük olduğu görülmüştür. Mann-Whitney U testi ile grupların karşılaştırılması sonucu Grup I ve Grup II arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.1. Tüm gruplara ait parametrelerin ortalama $\pm$ standart hata ve p değerleri

Otizm Spektrum Bozukluğu Olan Grup (Grup I) ve Sağlıklı Kontrol Grubu(Grup II) için Ortalama $\pm$ Standart Hata ve P Değerleri			
Parametre (Birim)	Grup I (N=46)	Grup II (N=46)	P Değeri
25(OH)D ₃ (µg/L)	20,42 $\pm$ 1,21	22,63 $\pm$ 0,88	0,196
25(OH)D ₂ (µg/L)	1,24 $\pm$ 0,08	1,17 $\pm$ 0,65	0,509
3-EPI-25(OH)D ₃ (µg/L)	0,09 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,558
KALSİYUM (mg/dL)	10,06 $\pm$ 0,07	10,12 $\pm$ 0,08	0,485
KREATİNİN (mg/dL)	0,36 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,13	0,211
FOSFOR (mg/dL)	5,70 $\pm$ 0,10	5,72 $\pm$ 0,79	0,838
PTH (pg/mL)	24,38 $\pm$ 1,78	27,71 $\pm$ 2,18	0,308

* p<0,05 İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

**p<0,01 İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

Bulgular yaş ve cinsiyet farkı alınmadan ifade edilmiştir. N:örnek sayısıdır.

Grup I ortalama serum kalsiyum seviyeleri 10,06 $\pm$ 0,07 mg/dL, Grup II ortalama serum kalsiyum seviyeleri 10,12 $\pm$ 0,08 mg/dL olarak bulunmuştur. Mann-Whitney U testi ile grupların karşılaştırılması sonucu Grup I ve Grup II arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).

Grup I ortalama serum kreatinin seviyeleri 0,36 $\pm$ 0,01 mg/dL, Grup II ortalama serum kreatinin seviyeleri 0,38 $\pm$ 0,13 mg/dL olarak bulunmuştur. Mann-Whitney U testi ile grupların karşılaştırılması sonucu Grup I ve Grup II arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).

Grup I ortalama serum fosfor seviyeleri 5,65 $\pm$ 0,14 mg/dL, Grup II ortalama serum fosfor seviyeleri 5,76 $\pm$ 0,15 mg/dL olarak bulunmuştur. Paired samples T test ile grupların karşılaştırılması sonucu Grup I ve Grup II arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).

Grup I ortalama PTH seviyeleri 24,38 $\pm$ 1,78 pg/mL, Grup II ortalama PTH seviyeleri 27,71 $\pm$ 2,18 pg/mL olarak bulunmuştur. Grup II'ye ait PTH düzeyleri Grup I PTH

seviyelerine göre yüksek bulunmuştur. Mann-Whitney U testi ile grupların karşılaştırılması sonucu Grup I ve Grup II arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.2. Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği (ÇODÖ)'ne göre hasta gruplarının ortalama $\pm$ standart hata ve p değerleri

ÇODÖ'ye göre Hafif-Orta (Grup Ia) ve Ağır Derecede(Grup Ib) Otizm Spektrum Bozukluğu Olan Hastalarda Ortalama $\pm$ Standart Hata ve P Değerleri			
Parametre (Birim)	Grup Ia (N=24)	Grup Ib (N=22)	P Değeri
25(OH)D ₃ (µg/L)	22,88 $\pm$ 1,80	17,74 $\pm$ 1,42	0,021*
25(OH)D ₂ (µg/L)	1,19 $\pm$ 0,10	1,30 $\pm$ 0,12	0,660
3-EPI-25(OH)D ₃ (µg/L)	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,21	0,553
KALSİYUM (mg/dL)	10,11 $\pm$ 0,11	9,99 $\pm$ 0,10	0,391
KREATİNİN (mg/dL)	0,36 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,02	0,708
FOSFOR (mg/dL)	5,65 $\pm$ 0,14	5,76 $\pm$ 0,15	0,684
PTH (pg/mL)	24,80 $\pm$ 2,62	23,95 $\pm$ 2,44	0,965

* $p<0,05$ İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

** $p<0,01$ İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

Bulgular yaş ve cinsiyet farkı alınmadan ifade edilmiştir. N:örnek sayısıdır.

ÇODÖ'ye göre yapılan değerlendirmede Grup Ia ve Grup Ib arasında non-parametrik test uygulanmıştır. Mann-Whitney U testine göre Grup Ia ve Grup Ib arasındaki serum 25(OH)D₃ düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0,021$).

Mann-Whitney U testine göre Grup Ia ve kontrol grubu (Grup II) parametreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Grup Ib ve kontrol grubu parametreleri karşılaştırıldığında serum 25(OH)D₃ düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür ($p=0,01$).

Çizelge 4.3. Hafif-orta derecede (Grup Ia) Otizm Spektrum Bozukluğu olan hastaların ve Kontrol (Grup II) grubunun ortalama $\pm$ standart hata ve p değerleri

ÇODÖ'ye göre Hafif-Orta Derecede (Grup Ia) Otizm Spektrum Bozukluğu Olan Hastaların ve Kontrol (Grup II) Grubunun Ortalama $\pm$ Standart Hata ve P Değerleri			
Parametre (Birim)	Grup Ia (N=24)	Grup II (N=46)	P Değeri
25(OH)D ₃ (µg/L)	22,88 $\pm$ 1,80	22,63 $\pm$ 0,88	0,393
25(OH)D ₂ (µg/L)	1,19 $\pm$ 0,10	1,17 $\pm$ 0,65	0,776
3-EPI-25(OH)D ₃ (µg/L)	0,09 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,328
KALSİYUM (mg/dL)	10,11 $\pm$ 0,11	10,12 $\pm$ 0,08	0,946
KREATİNİN (mg/dL)	0,36 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,13	0,232
FOSFOR (mg/dL)	5,65 $\pm$ 0,14	5,72 $\pm$ 0,79	0,941
PTH (pg/mL)	24,80 $\pm$ 2,62	27,71 $\pm$ 2,18	0,386

* p<0,05 İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

**p<0,01 İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

Bulgular yaş ve cinsiyet farkı alınmadan ifade edilmiştir. N:örnek sayısıdır.

Çizelge 4.4. Ağır derecede (Grup Ib) Otizm Spektrum Bozukluğu olan hastaların ve Kontrol (Grup II) grubunun ortalama $\pm$ standart hata ve p değerleri

ÇODÖ'ye göre Ağır Derecede (Grup Ib) Otizm Spektrum Bozukluğu Olan Hastaların ve Kontrol (Grup II) Grubunun Ortalama $\pm$ Standart Hata ve P Değerleri			
Parametre (Birim)	Grup Ib (N=22)	Grup II (N=46)	P Değeri
25(OH)D ₃ (µg/L)	17,74 $\pm$ 1,42	22,63 $\pm$ 0,88	0,004**
25(OH)D ₂ (µg/L)	1,30 $\pm$ 0,12	1,17 $\pm$ 0,65	0,420
3-EPI-25(OH)D ₃ (µg/L)	0,10 $\pm$ 0,21	0,08 $\pm$ 0,01	0,958
KALSİYUM (mg/dL)	9,99 $\pm$ 0,10	10,12 $\pm$ 0,08	0,271
KREATİNİN (mg/dL)	0,37 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,13	0,405
FOSFOR (mg/dL)	5,76 $\pm$ 0,15	5,72 $\pm$ 0,79	0,824
PTH (pg/mL)	23,95 $\pm$ 2,44	27,71 $\pm$ 2,18	0,428

* p<0,05 İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

**p<0,01 İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

Bulgular yaş ve cinsiyet farkı alınmadan ifade edilmiştir. N:örnek sayısıdır.

Çizelge 4.5. Grup I ve Grup II parametreleri için ortalama $\pm$ standart hata, ortanca, en düşük ve en yüksek değerleri

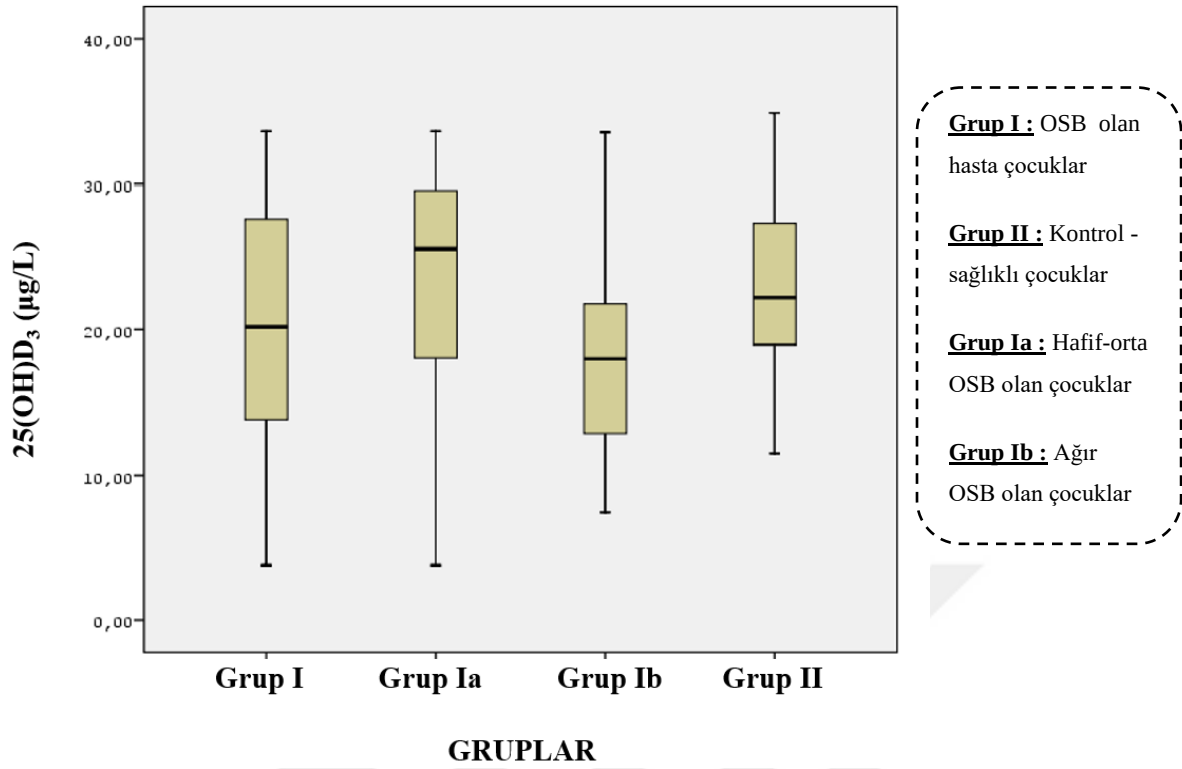
PARAMETRELER	Ortalama $\pm$ Standart Hata		Ortanca Değer		En Düşük Değer		En Yüksek Değer	
	GRUP I	GRUP II	GRUP I	GRUP II	GRUP I	GRUP II	GRUP I	GRUP II
25(OH)D ₃ (µg/L)	20,42 $\pm$ 1,21	22,63 $\pm$ 0,88	20,19	22,18	3,79	11,48	33,67	34,87
25(OH)D ₂ (µg/L)	1,24 $\pm$ 0,08	1,17 $\pm$ 0,65	1,17	1,07	0,33	0,51	2,99	2,28
3-epi-25(OH)D ₃ (µg/L)	0,09 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,08	0,07	0,01	0,01	0,47	0,21
Kalsiyum (mg/dL)	10,06 $\pm$ 0,07	10,12 $\pm$ 0,08	10,11	10,13	8,95	8,19	11,07	11,50
Kreatinin (mg/dL)	0,36 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,13	0,36	0,38	0,23	0,16	0,73	0,60
Fosfor (mg/dL)	5,70 $\pm$ 0,10	5,72 $\pm$ 0,79	5,79	5,75	3,89	4,32	6,95	6,86
PTH (pg/mL)	24,38 $\pm$ 1,78	27,71 $\pm$ 2,18	21,15	24,41	7,55	7,07	53,23	71,86

Çizelge 4.6. Grup Ia ve Grup Ib parametreleri için ortalama $\pm$ standart hata, ortanca, en düşük ve en yüksek değerleri

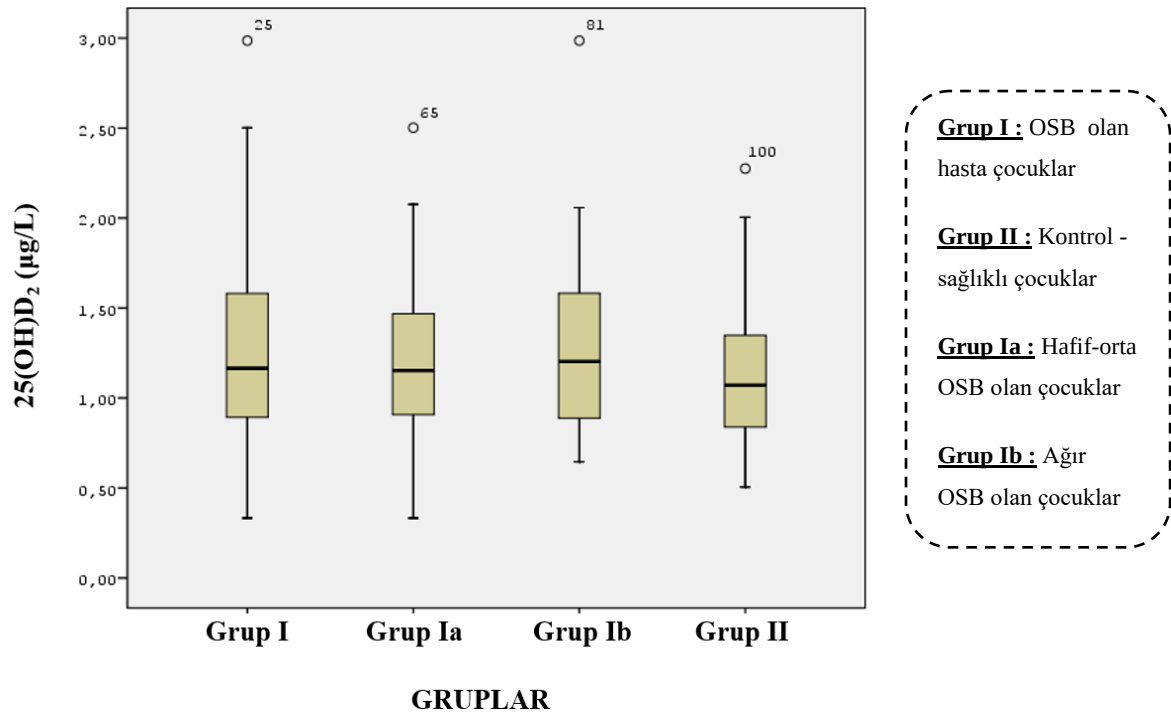
PARAMETRELER	Ortalama $\pm$ Standart Hata		Ortanca Değer		En Düşük Değer		En Yüksek Değer	
	GRUP Ia	GRUP Ib	GRUP Ia	GRUP Ib	GRUP Ia	GRUP Ib	GRUP Ia	GRUP Ib
25(OH)D ₃ (µg/L)	22,88 $\pm$ 1,80	17,74 $\pm$ 1,42	25,5	17,99	3,79	7,45	33,67	33,60
25(OH)D ₂ (µg/L)	1,19 $\pm$ 0,10	1,30 $\pm$ 0,12	1,15	1,20	0,33	0,65	2,50	2,99
3-epi-25(OH)D ₃ (µg/L)	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,21	0,08	0,07	0,02	0,01	0,18	0,47
Kalsiyum (mg/dL)	10,11 $\pm$ 0,11	9,99 $\pm$ 0,10	10,19	10,06	9,03	8,95	11,07	11,00
Kreatinin (mg/dL)	0,36 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,02	0,36	0,36	0,23	0,25	0,46	0,73
Fosfor (mg/dL)	5,65 $\pm$ 0,14	5,76 $\pm$ 0,15	5,85	5,74	3,89	4,36	6,49	6,95
PTH (pg/mL)	24,80 $\pm$ 2,62	23,95 $\pm$ 2,44	20,53	22,06	8,79	7,55	52,01	53,53

Çizelge 4.7. OSB ve kontrol grubuna ait 25(OH)D₃ düzeylerinin yüzde verileri

Konsantrasyon µg/L	OSB Grup I	Kontrol Grup II
<20	%45,7	%36,9
20-30	%41,3	%52,1
>30	%13,0	%10,9

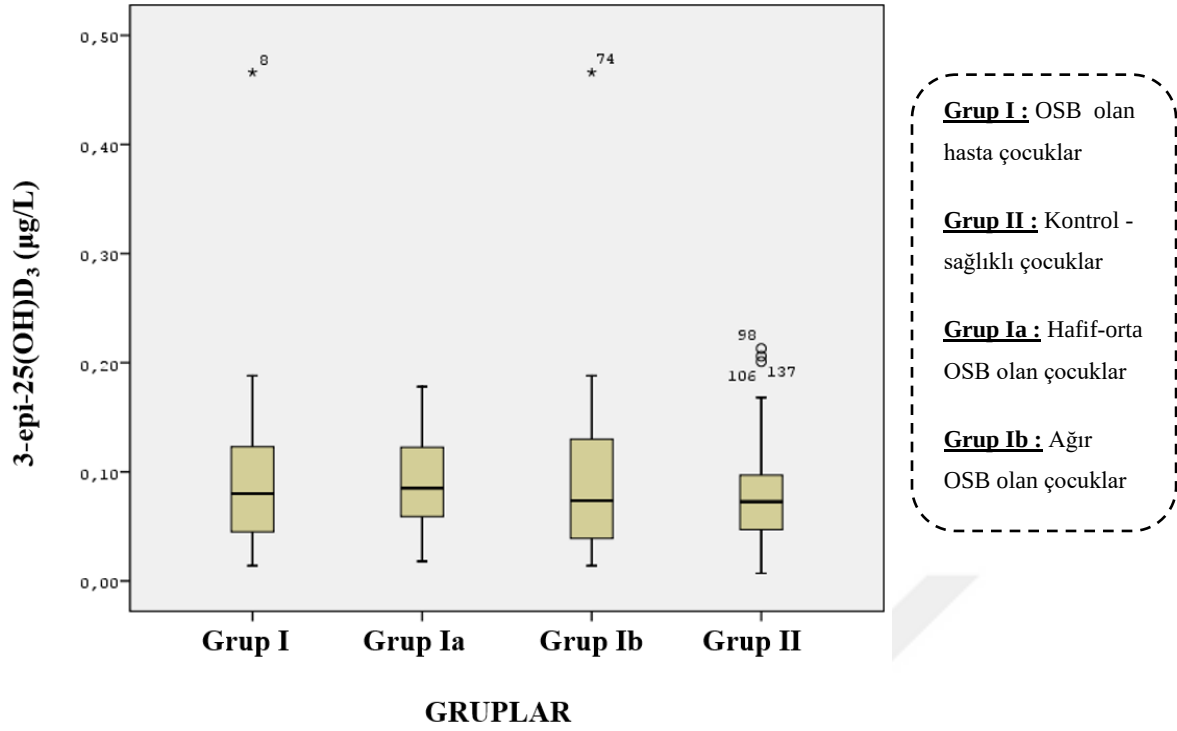


Şekil 4.1. Tüm gruplara ait serum 25(OH)D₃ değerleri için box-plot grafikleri

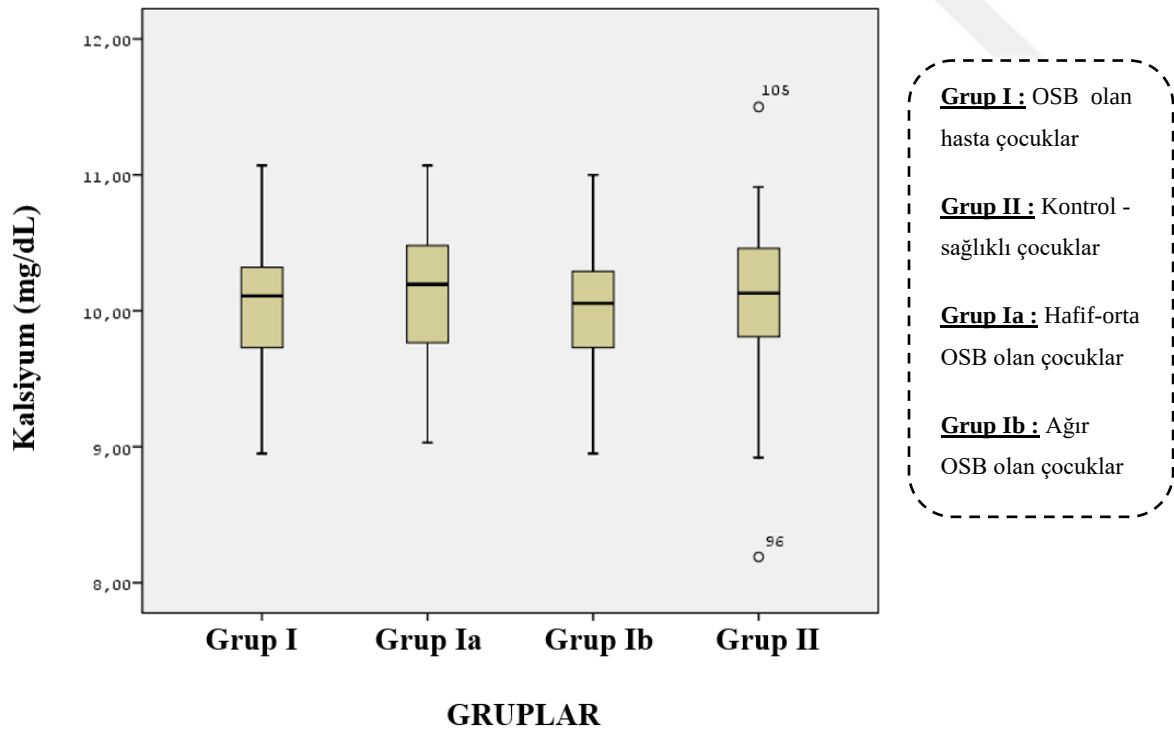


Şekil 4.2. Tüm gruplara ait serum 25(OH)D₂ değerleri için box-plot grafikleri

T : üst değer — : alt değer — : ortanca değer ○ : uç değer ★:aşırı değer

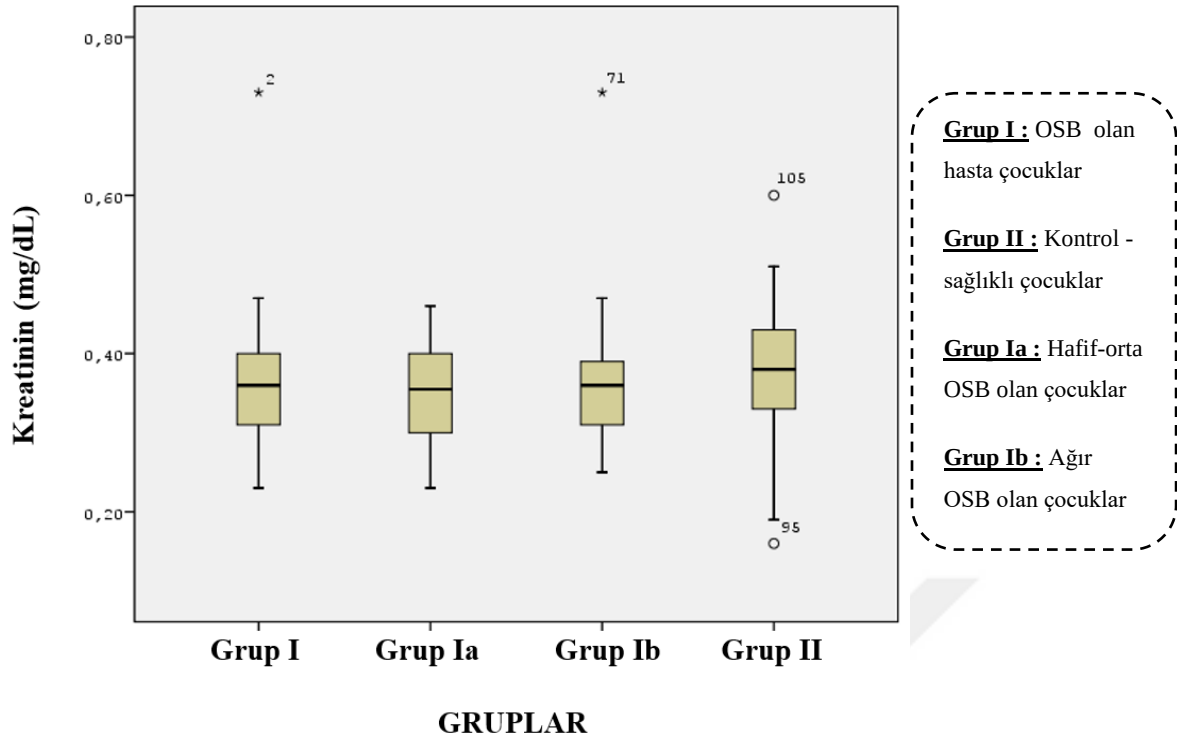


Şekil 4.3. Tüm gruplara ait serum 3-epi-25(OH)D₃ değerleri için box-plot grafikleri

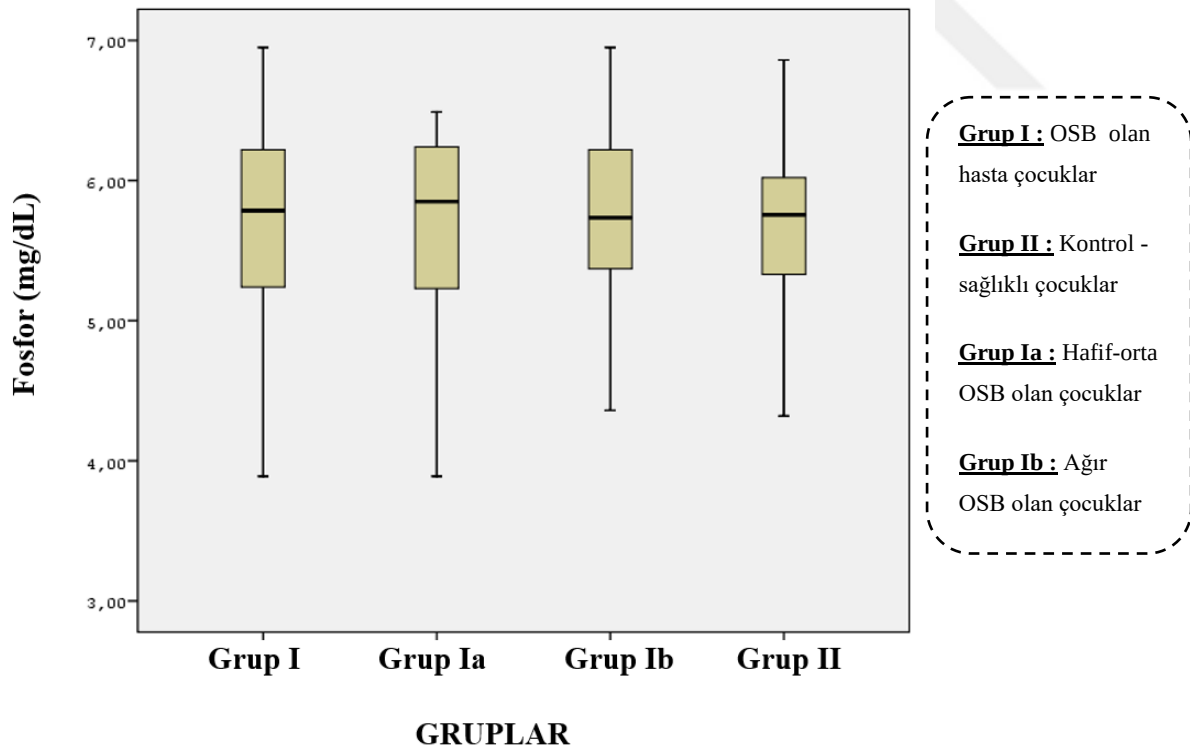


Şekil 4.4. Tüm gruplara ait serum kalsiyum değerleri için box-plot grafikleri

T : üst değer ⊥ : alt değer — : ortanca değer ○ : uç değer ★ : aşırı değer

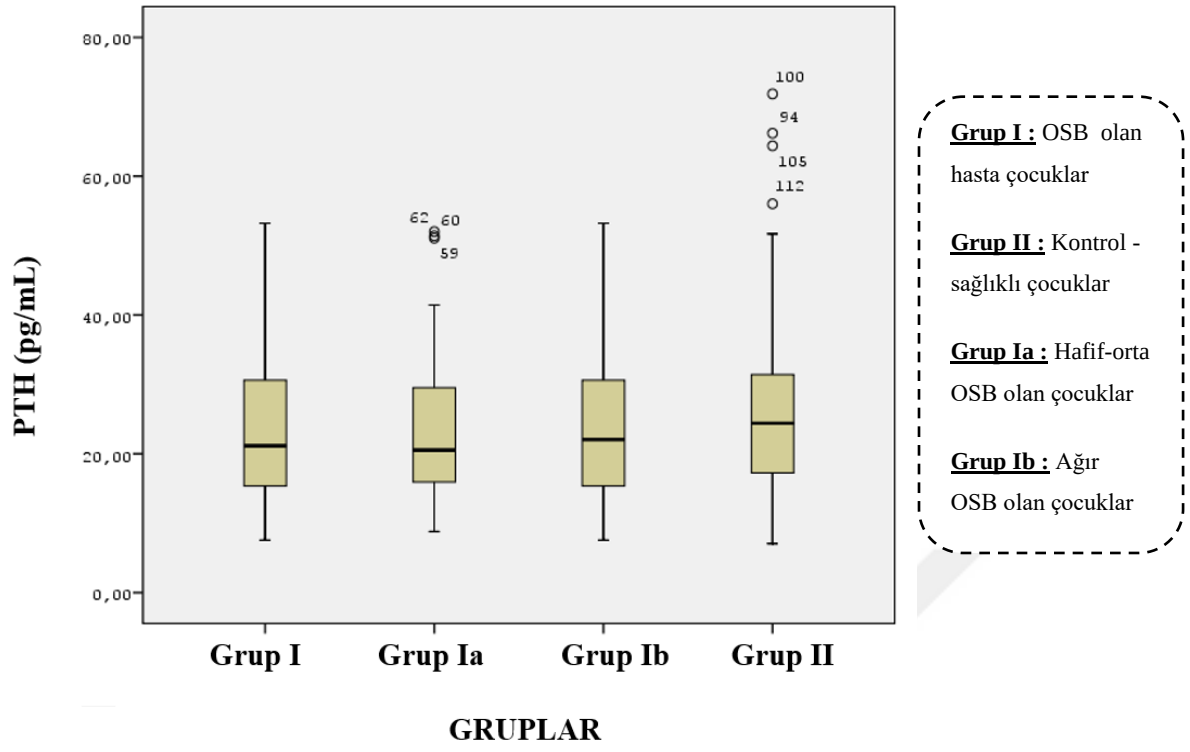


Şekil 4.5. Tüm gruplara ait serum kreatinin değerleri box-plot grafikleri



Şekil 4.6. Tüm gruplara ait serum fosfor değerleri box-plot grafikleri

T : üst değer ⊥ : alt değer — : ortanca değer ○ : uç değer ★:aşırı değer



Şekil 4.7. Tüm gruplara ait PTH değerleri için box-plot grafikleri

T : üst değer ⊥ : alt değer — : ortanca değer ○ : uç değer ★:aşırı değer

Çizelge 4.8. Grup I parametrelerine ait Spearmans rho korelasyon analiz tablosu

PARAMETRELER (Birim)		25(OH)D ₃ (µg/L)	25(OH)D ₂ (µg/L)	3-epi- 25(OH)D ₃ (µg/L)	Kalsiyum (mg/dL)	Kreatinin (mg/dL)	Fosfor (mg/dL)	PTH (pg/mL)
25(OH)D ₃ (µg/L)	r	1,000	-,171	,288	,359*	-,097	-,035	-,279
	p	.	,256	,052	,014	,520	,820	,063
25(OH)D ₂ (µg/L)	r	-,171	1,000	-,049	-,051	-,028	,036	,165
	p	,256	.	,749	,737	,854	,811	,272
3-epi- 25(OH)D ₃ (µg/L)	r	,288	-,049	1,000	-,018	-,250	-,072	-,248
	p	,052	,746	.	,905	,093	,634	,096
Kalsiyum (mg/dL)	r	,359*	-,051	-,018	1,000	-,034	,141	-,058
	p	,014	,737	,905	.	,825	,349	,703
Kreatinin (mg/dL)	r	-,097	-,028	-,250	-,034	1,000	-,382**	,116
	p	,520	,854	,093	,825	.	,009	,442
Fosfor (mg/dL)	r	-,035	,036	-,072	,141	-,382**	1,000	,128
	p	,820	,811	,634	,349	,009	.	,398
PTH (pg/mL)	r	-,279	,165	-,248	-,058	,116	,128	1,000
	p	,063	,272	,096	,703	,442	,398	.

** Güçlü korelasyon

* Zayıf korelasyon

Grup I ve Grup II parametreleri için korelasyon analizi Spearman's rho testi ile yapılmıştır. Buna göre Grup I için 25(OH)D₃ ve kalsiyum arasında pozitif korelasyon görülür iken kreatinin ve fosfor arasında negatif korelasyon bulunmuştur ($r=0,359$, $p=0,014$; $r=-0,382$, $p=0,009$). 25(OH)D₃ düzeyleri artarken kalsiyum düzeyleri de artmaktadır. Kreatinin ve fosfor düzeyleri arasında ise ters bir ilişki görülmüştür. Kreatinin düzeyi artarken, fosfor düzeyi azalmaktadır.

Çizelge 4.9. Grup II parametrelerine ait Spearmans rho korelasyon analiz tablosu

PARAMETRELER (Birim)		25(OH)D ₃ (µg/L)	25(OH)D ₂ (µg/L)	3-epi- 25(OH)D ₃ (µg/L)	Kalsiyum (mg/dL)	Kreatinin (mg/dL)	Fosfor (mg/dL)	PTH (pg/mL)
25(OH)D ₃ (µg/L)	r	1,000	-,185	,338*	,172	,128	-,137	-,266
	p	.	,219	,022	,253	,398	,363	,074
25(OH)D ₂ (µg/L)	r	-,185	1,000	-,167	-,067	-,099	-,125	-,262
	p	,219	.	,268	,658	,511	,408	,078
3-epi- 25(OH)D ₃ (µg/L)	r	,338*	,167	1,000	-,013	,128	-,010	,052
	p	,022	,268	.	,931	,397	,947	,730
Kalsiyum (mg/dL)	r	,172	-,067	-,013	1,000	,248	,379**	,046
	p	,253	,658	,931	.	,097	,009	,763
Kreatinin (mg/dL)	r	,128	-,099	,128	,248	1,000	-,109	,177
	p	,398	,511	,397	,097	.	,470	,239
Fosfor (mg/dL)	r	-,137	-,125	-,010	,379**	-,109	1,000	,051
	p	,363	,408	,947	,009	,470	.	,739
PTH (pg/mL)	r	-,266	-,262	,052	,046	,177	,051	1,000
	p	,074	,078	,730	,763	,239	,739	.

** Güçlü korelasyon

* Zayıf korelasyon

Grup II için korelasyon analizi yapıldığında 25(OH)D₃ ile 3-epi-25(OH)D₃ arasında ve fosfor ile kalsiyum arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (r=0,338, p=0,022; r=0,379, p=0,009). Buna göre, sağlıklı bireylerde 25(OH)D₃ ve 3-epi-25(OH)D₃ düzeyleri aynı yönde artış ve azalış göstermektedir. Kanda fosfor düzeyi artar iken kalsiyum düzeyleri de artmakta, fosfor düzeyleri azalır iken kalsiyum düzeyleri azalmaktadır.

Çizelge 4.10. ÇODÖ'ne göre Grup Ia parametrelerine ait pearson korelasyon tablosu

PARAMETRELER (Birim)		25(OH)D ₃ (µg/L)	25(OH)D ₂ (µg/L)	3-epi- 25(OH)D ₃ (µg/L)	Kalsiyum (mg/dL)	Kreatinin (mg/dL)	Fosfor (mg/dL)	PTH (pg/mL)
25(OH)D ₃ (µg/L)	r	1,000	-,240	-,402	-,413*	-,272	-,132	-,621**
	p	.	,259	,051	,045	,198	,537	,001
25(OH)D ₂ (µg/L)	r	-,240	1,000	-,315	,017	,148	,066	,225
	p	,259	.	,134	,936	,489	,758	,291
3-epi-25(OH)D ₃ (µg/L)	r	-,402	-,315	1,000	,283	-,228	-,034	-,446*
	p	,051	,134	.	,180	,285	,876	,029
Kalsiyum (mg/dL)	r	-,413*	,017	,283	1,000	-,089	,013	-,113
	p	,045	,936	,180	.	,679	,953	,599
Kreatinin (mg/dL)	r	-,272	,148	-,228	-,089	1,000	-,329	,261
	p	,198	,489	,285	,679	.	,116	,218
Fosfor (mg/dL)	r	-,132	,066	-,034	,013	-,329	1,000	-,055
	p	,537	,758	,876	,953	,116	.	,799
PTH (pg/mL)	r	-,621**	,225	-,446*	-,113	,261	-,055	1,000
	p	,001	,291	,029	,599	,218	,799	.

** Güçlü korelasyon

* Zayıf korelasyon

ÇODÖ'ne göre Grup Ia parametrelerine pearson korelasyon analizi uygulanmıştır. Buna göre serum 25(OH)D₃ ve kalsiyum düzeyleri arasında negatif korelasyon mevcuttur (r=0,413; p=0,045). Serum 25(OH)D₃ ve PTH düzeyleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur (r=-0,621;p=0,001). Serum 3-epi-25(OH)D₃ ve PTH düzeyleri arasında negatif korelasyon mevcuttur (r=-0,446;p=0,029).

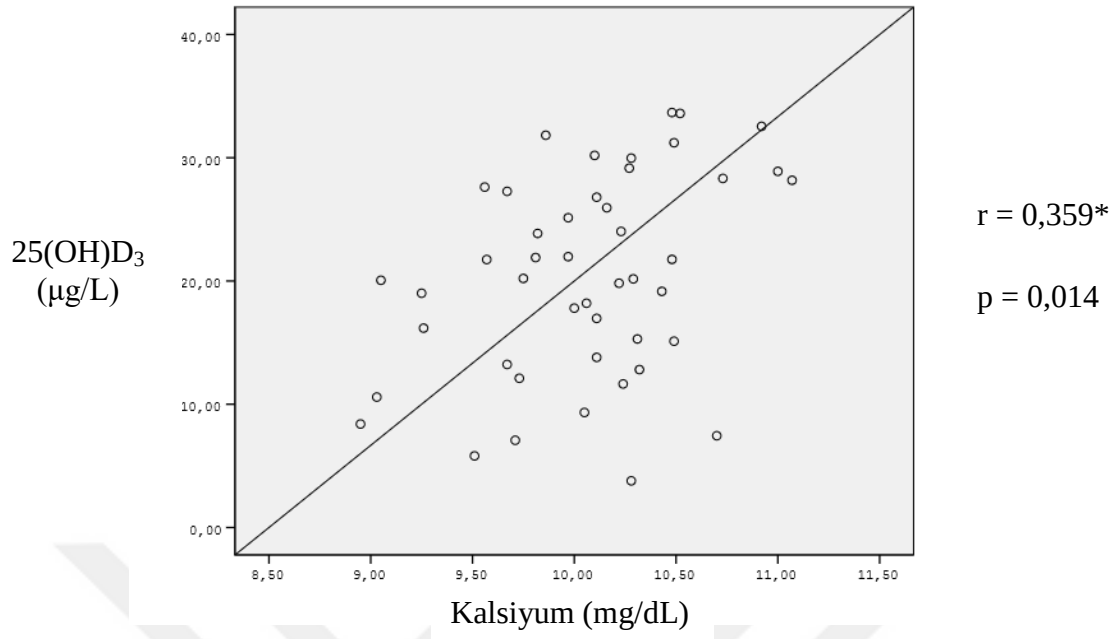
Çizelge 4.11. ÇODÖ'ne göre Grup Ib parametrelerine ait pearson korelasyonu

PARAMETRELER (Birim)		25(OH)D ₃ (µg/L)	25(OH)D ₂ (µg/L)	3-epi- 25(OH)D ₃ (µg/L)	Kalsiyum (mg/dL)	Kreatinin (mg/dL)	Fosfor (mg/dL)	PTH (pg/mL)
25(OH)D ₃ (µg/L)	r	1,000	-,071	-,001	-,290	-,018	-,066	-,049
	p	.	,752	,995	,190	,936	,770	,827
25(OH)D ₂ (µg/L)	r	-,071	1,000	-,068	-,026	-,250	,129	,047
	p	,752	.	,765	,910	,262	,567	,836
3-epi-25(OH)D ₃ (µg/L)	r	-,001	-,068	1,000	-,230	-,353	,059	-,078
	p	,995	,765	.	,303	,107	,793	,731
Kalsiyum (mg/dL)	r	-,290	-,026	-,230	1,000	-,036	,246	,041
	p	,190	,910	,303	.	,872	,270	,856
Kreatinin (mg/dL)	r	-,018	-,250	-,353	-,036	1,000	-,612**	-,028
	p	,936	,262	,107	,872	.	,002	,900
Fosfor (mg/dL)	r	-,066	,129	,059	,246	-,612**	1,000	,259
	p	,770	,567	,793	,270	,002	.	,244
PTH (pg/mL)	r	-,049	,047	-,078	,041	-,028	,259	1,000
	p	,827	,836	,731	,856	,900	,244	.

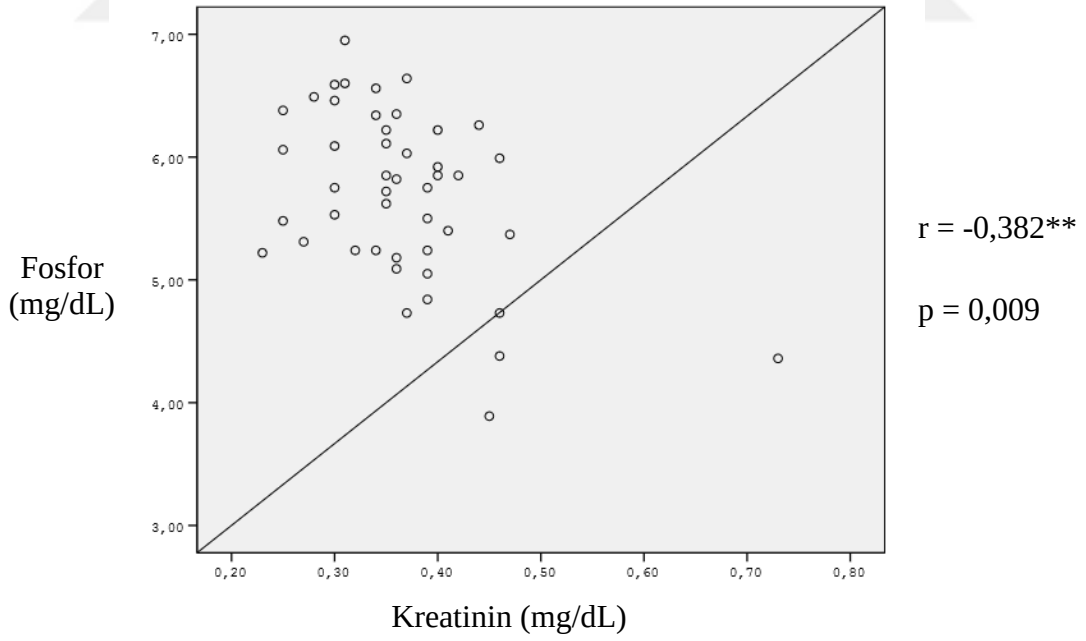
** Güçlü korelasyon

* Zayıf korelasyon

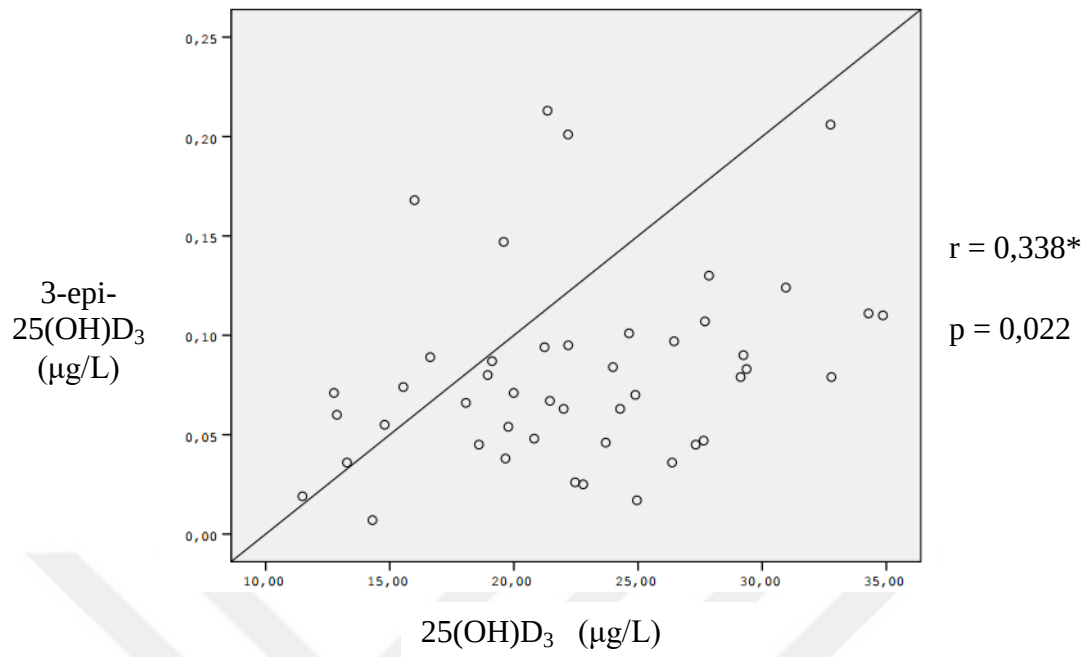
ÇODÖ'ne göre Grup Ib parametrelerine pearson korelasyon analizi uygulanmıştır. Buna göre yalnızca serum kreatinin ve fosfor düzeyleri arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur (r=-0,612; p=0,002).



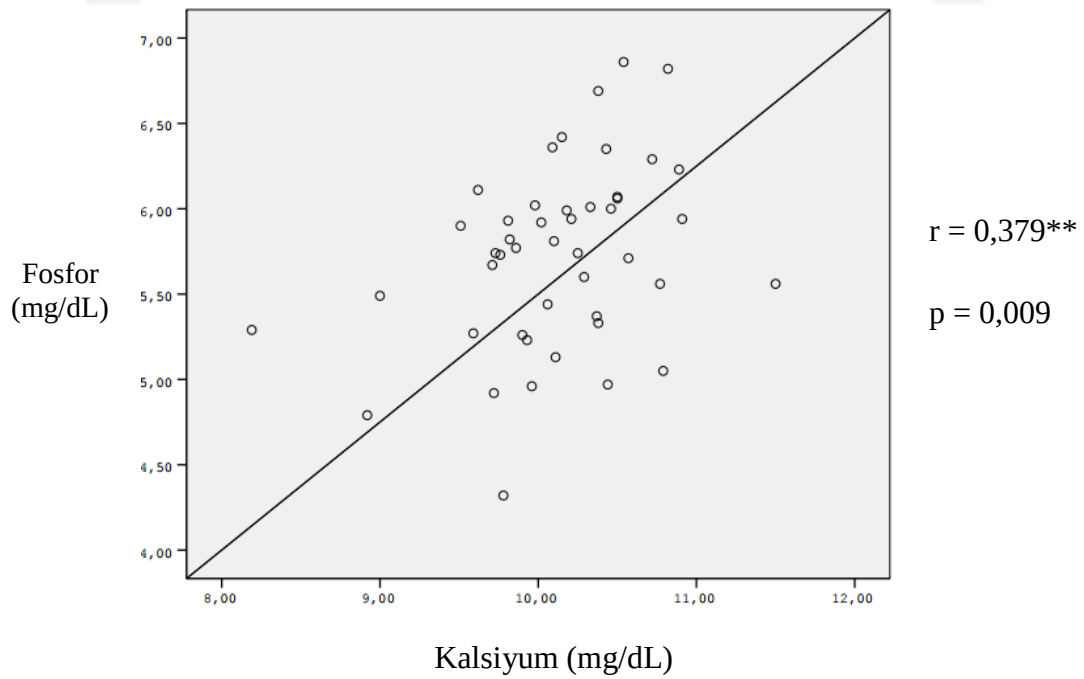
Şekil 4 8. OSB'li çocuklarda serum 25(OH)D₃ ve kalsiyum arasındaki korelasyon grafiği



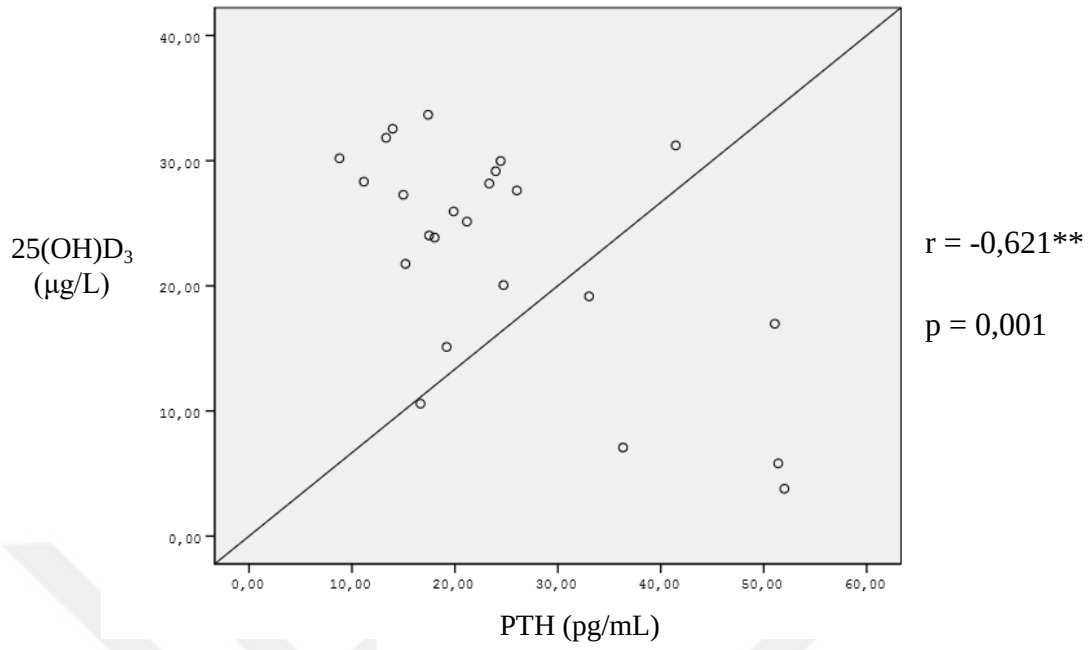
Şekil 4.9. OSB'li çocuklarda serum fosfor ve kreatinin arasındaki korelasyon grafiği



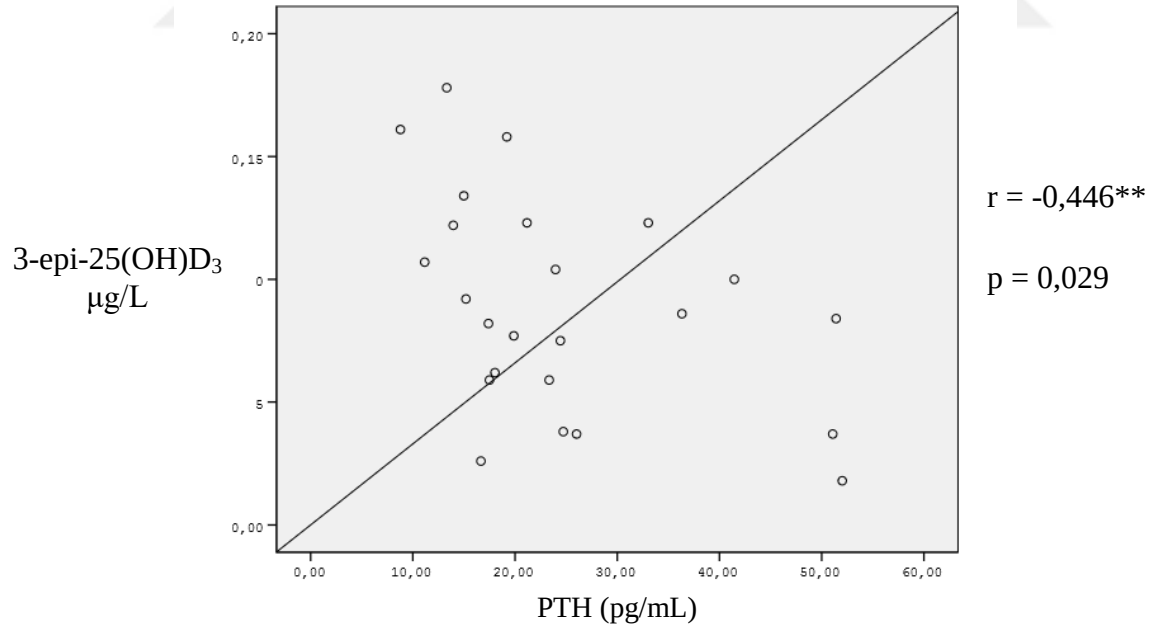
Şekil 4.10. Kontrol grubunda serum 25(OH)D₃ ve 3-epi-25(OH)D₃ düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği



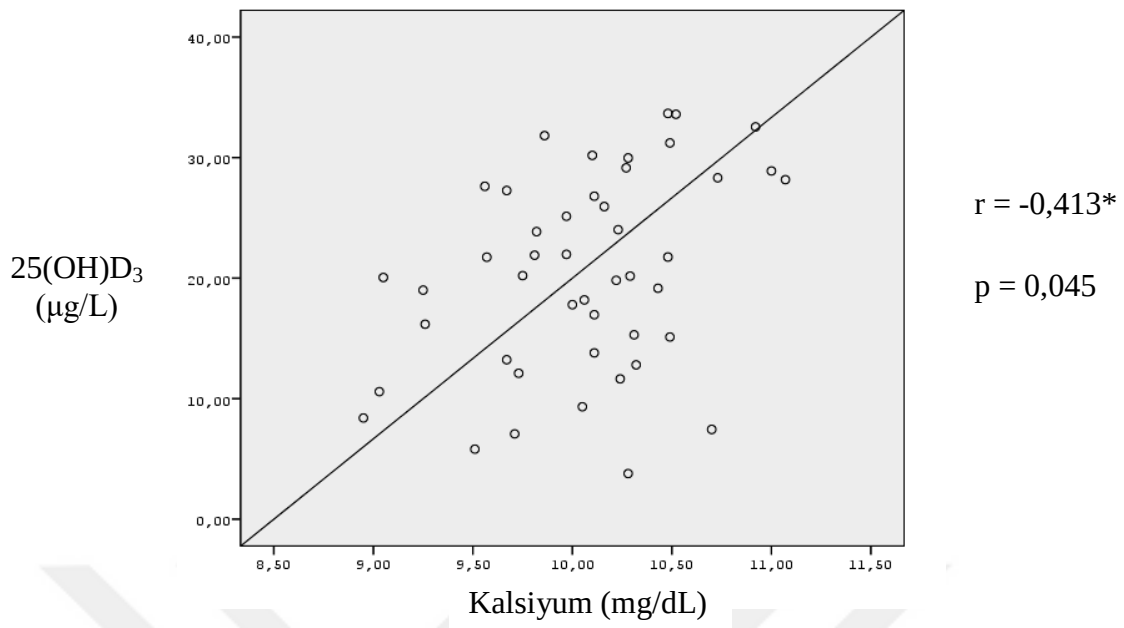
Şekil 4.11. Kontrol grubunda serum fosfor ve kalsiyum düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği



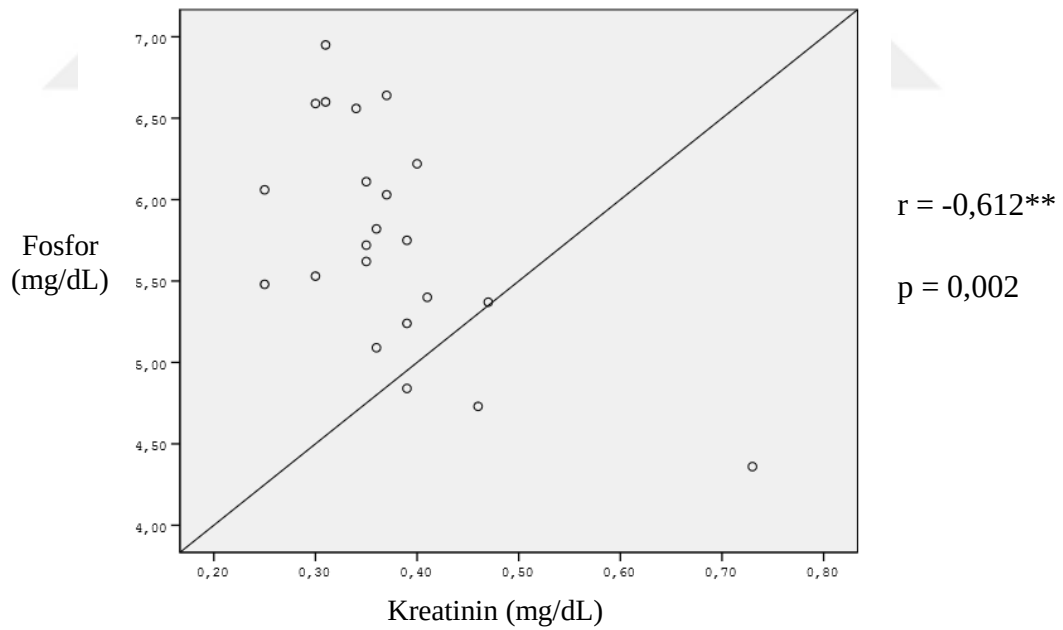
Şekil 4.12. ÇODÖ'ne göre Grup Ia serum 25(OH)D₃ ve PTH düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği



Şekil 4.13. ÇODÖ'ne göre Grup Ia serum 3-epi-25(OH)D₃ ve PTH düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği

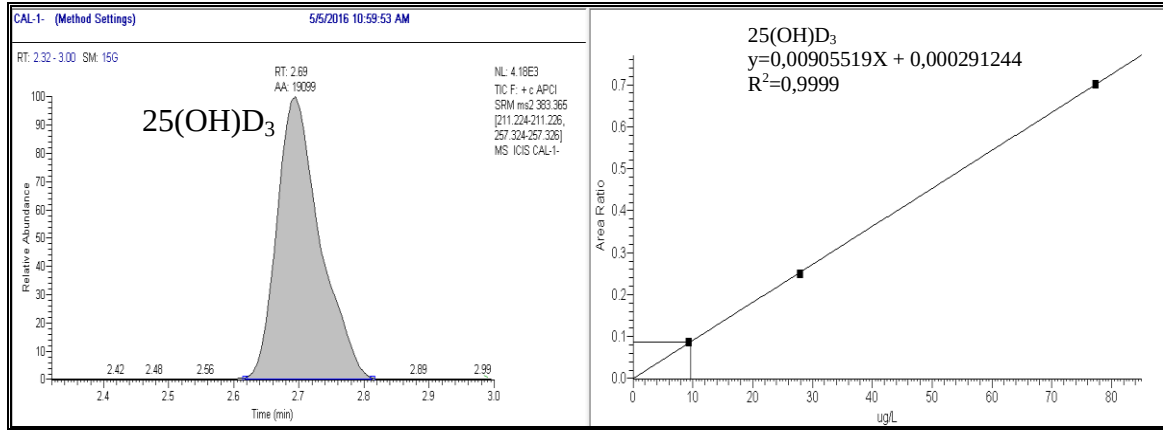


Şekil 4.14. ÇODÖ'ne göre Grup Ia serum 25(OH)D₃ ve kalsiyum arasındaki korelasyon grafiği

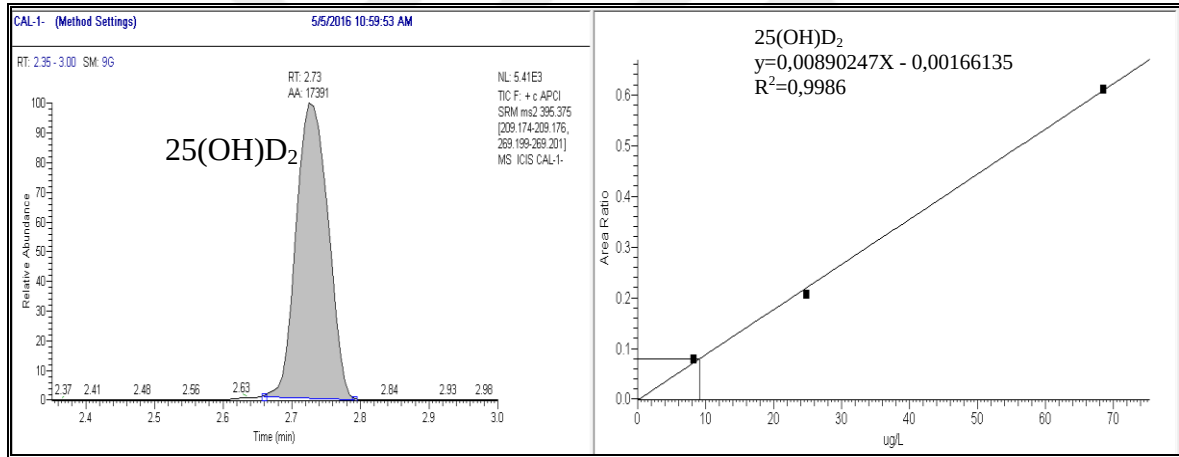


Şekil 4.15. ÇODÖ'ne Grup Ib serum fosfor ve kreatinin düzeyleri arasındaki korelasyon grafiği

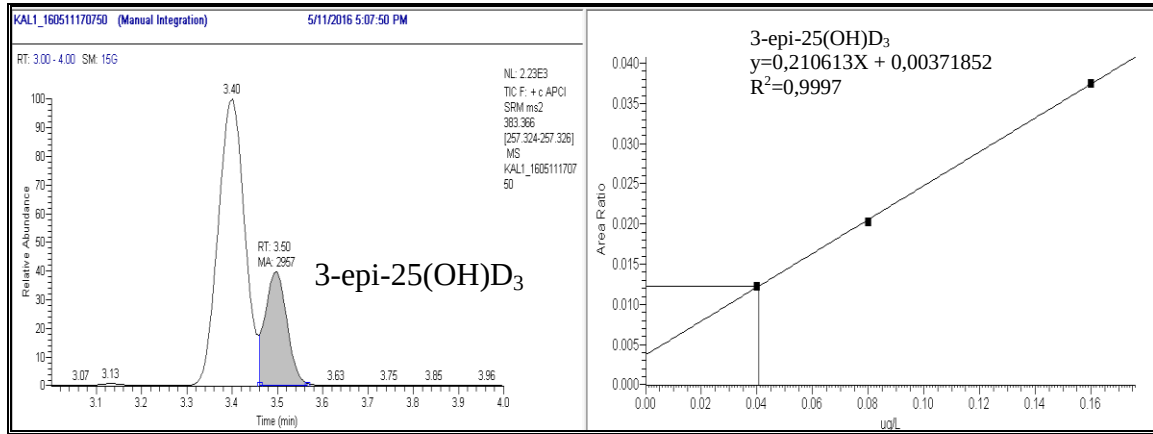
4.2. Kromatografik Bulgular



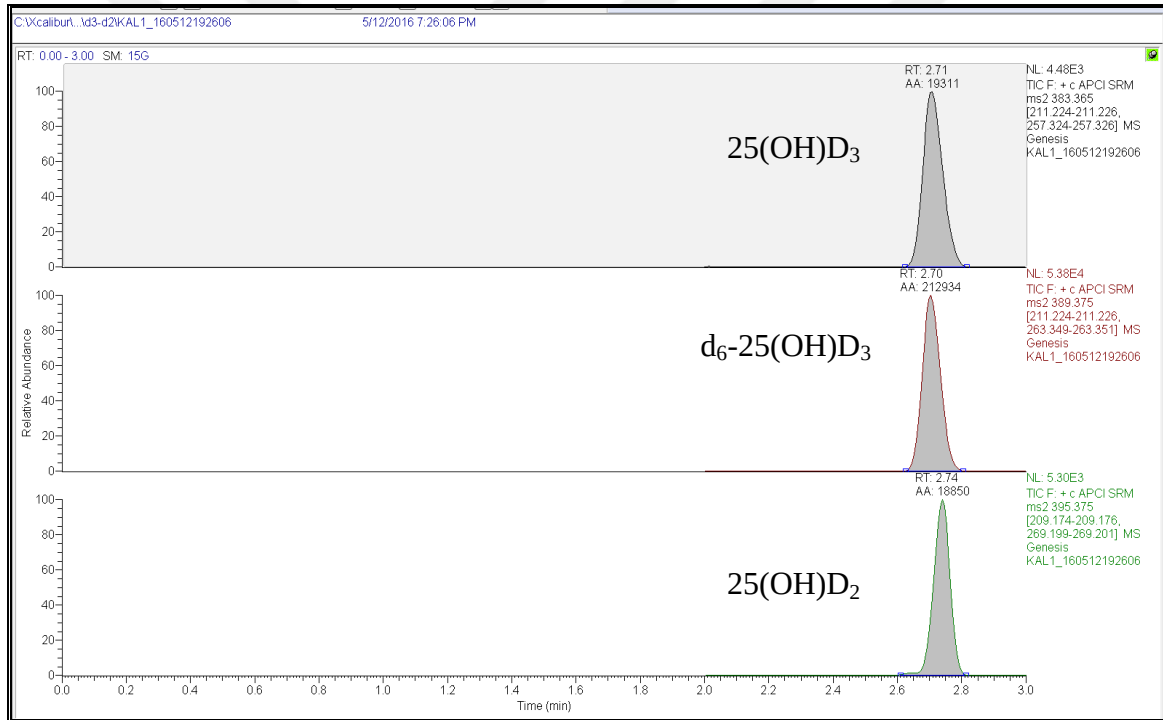
Şekil 4.16. Serum 25(OH)D₃ kromatogramı ve kalibrasyon eğrisi



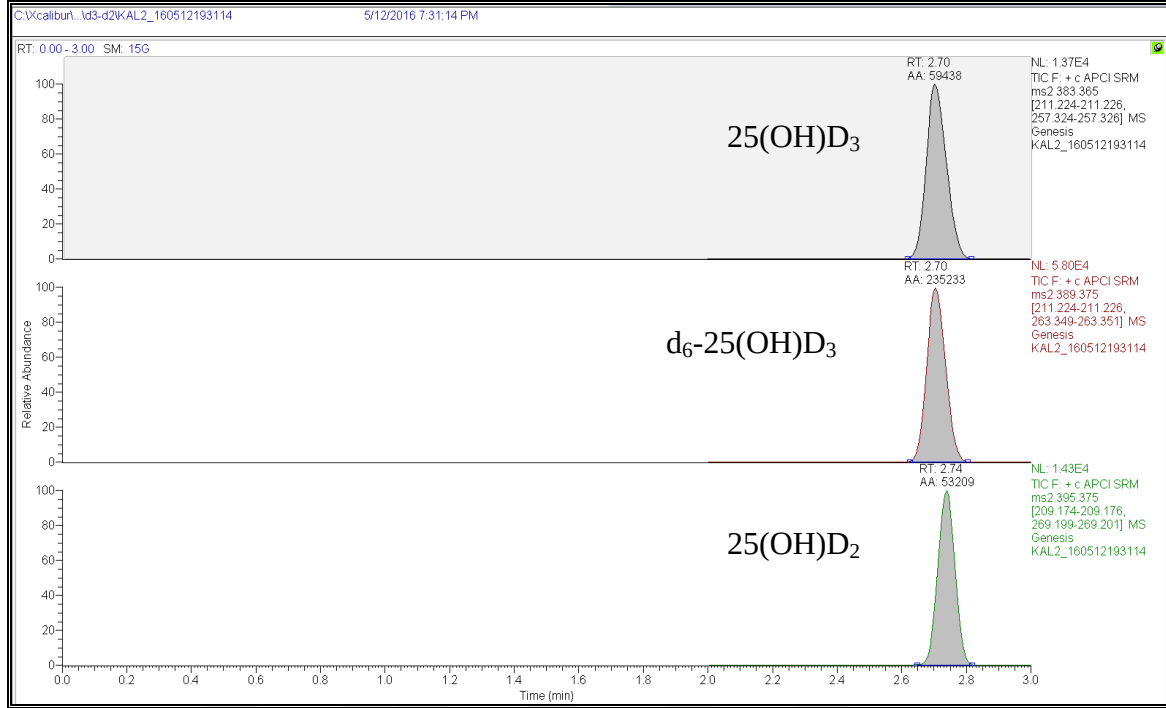
Şekil 4.17. Serum 25(OH)D₂ kromatogramı ve kalibrasyon eğrisi



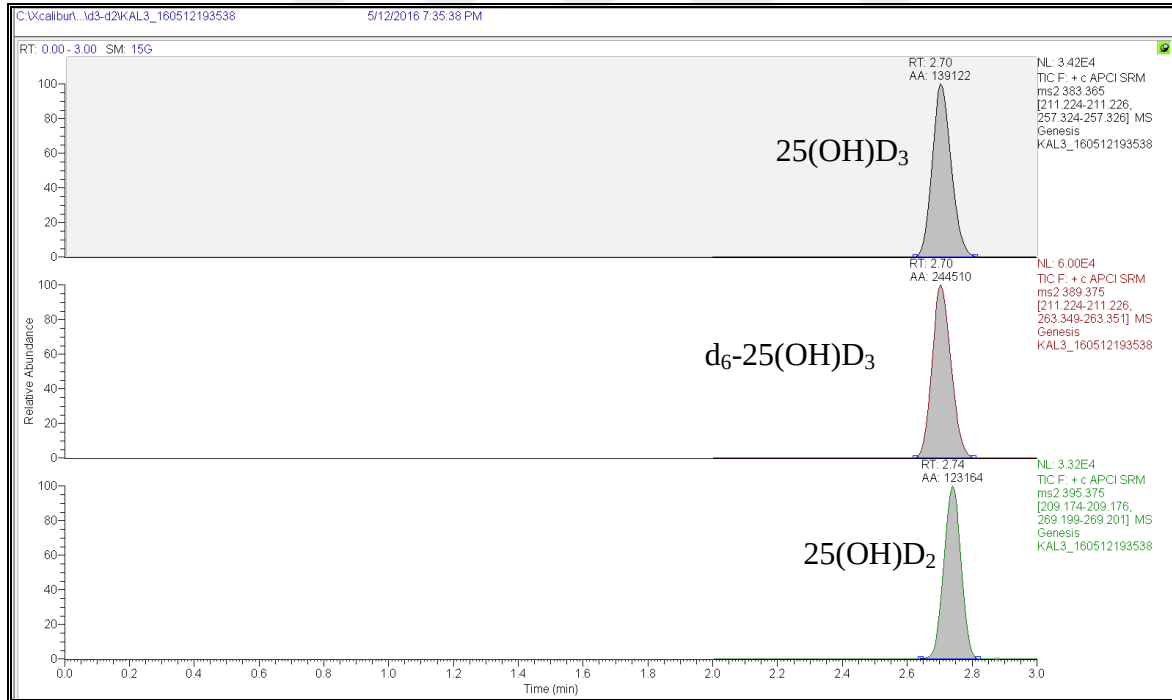
Şekil 4.18. Serum 3-epi-25(OH)D₃ kromatogramı ve kalibrasyon eğrisi



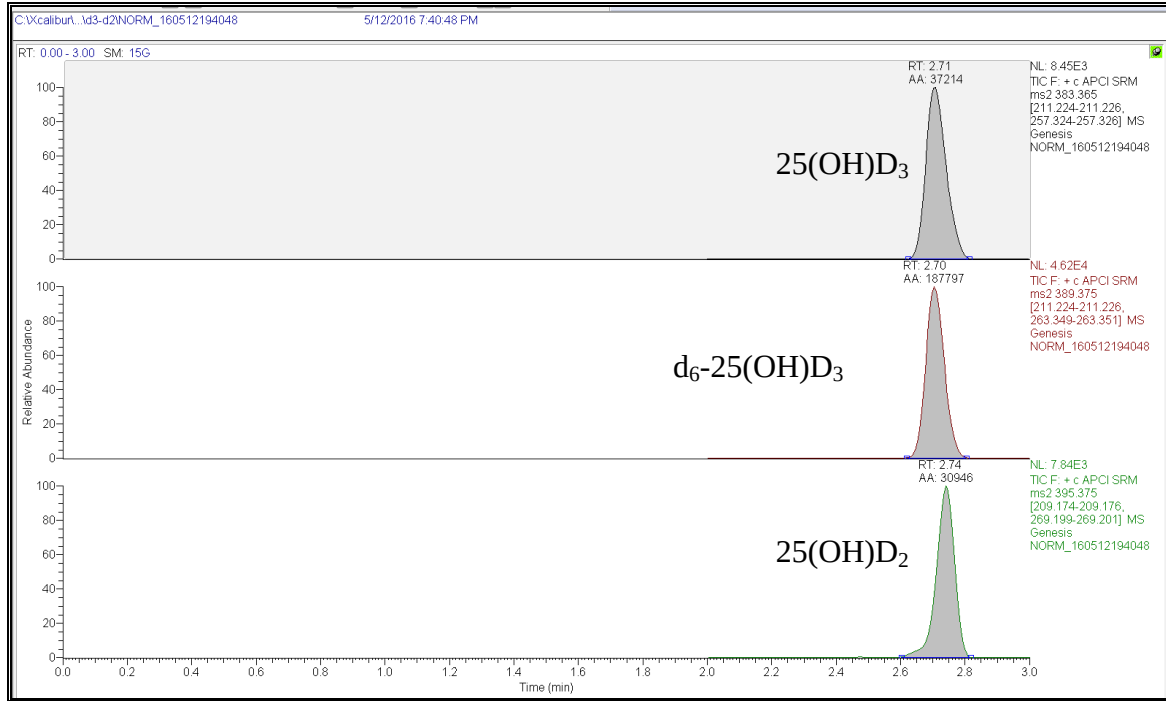
Şekil 4.19. Kalibratör 1'e ait kromatogram (25(OH)D₃-25(OH)D₂)



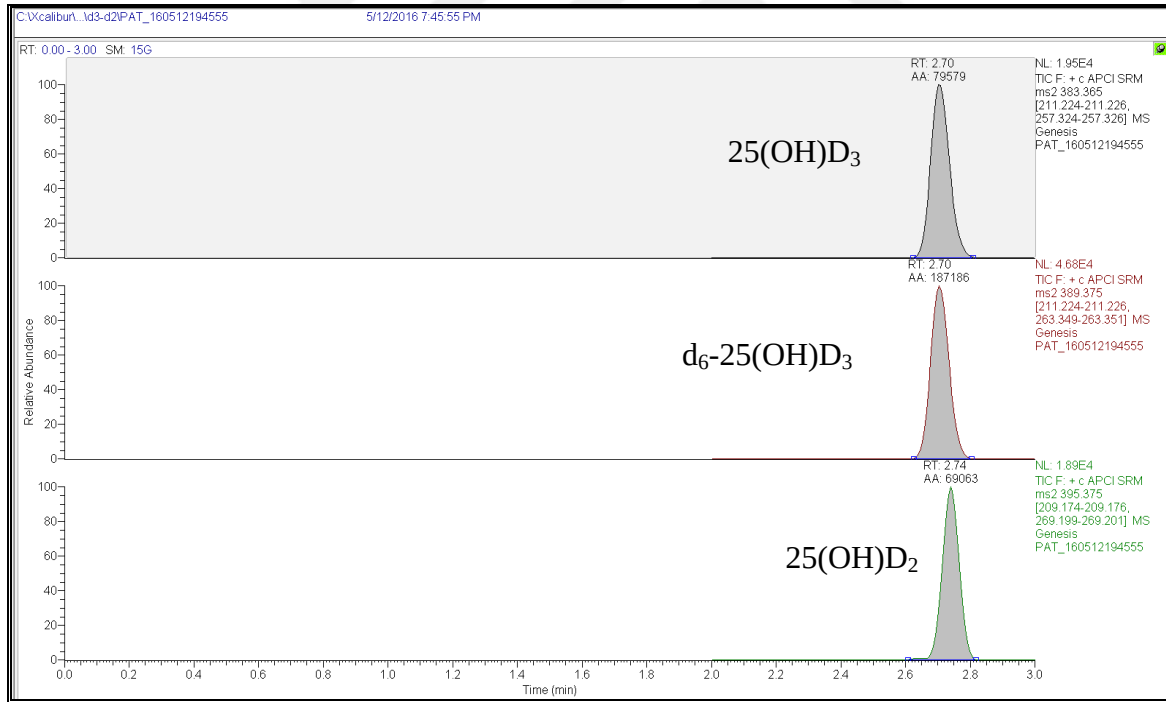
Şekil 4.20. Kalibratör 2'ye ait kromatogram (25(OH)D₃-25(OH)D₂)



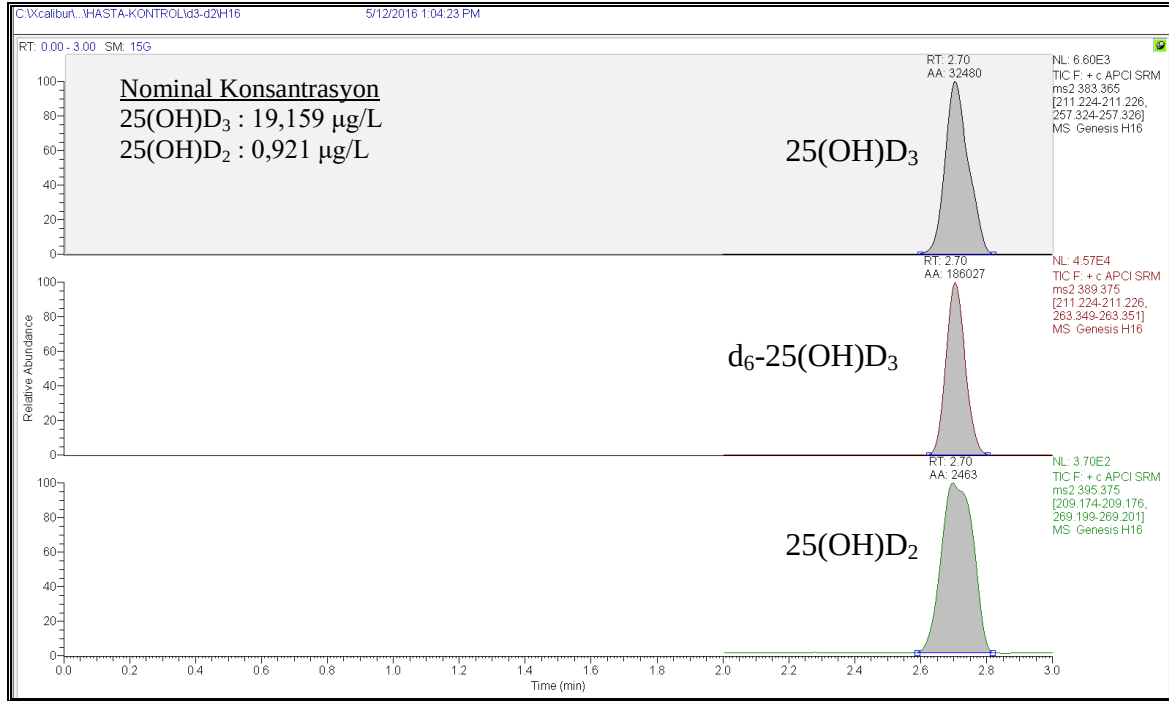
Şekil 4.21. Kalibratör 3'e ait kromatogram (25(OH)D₃-25(OH)D₂)



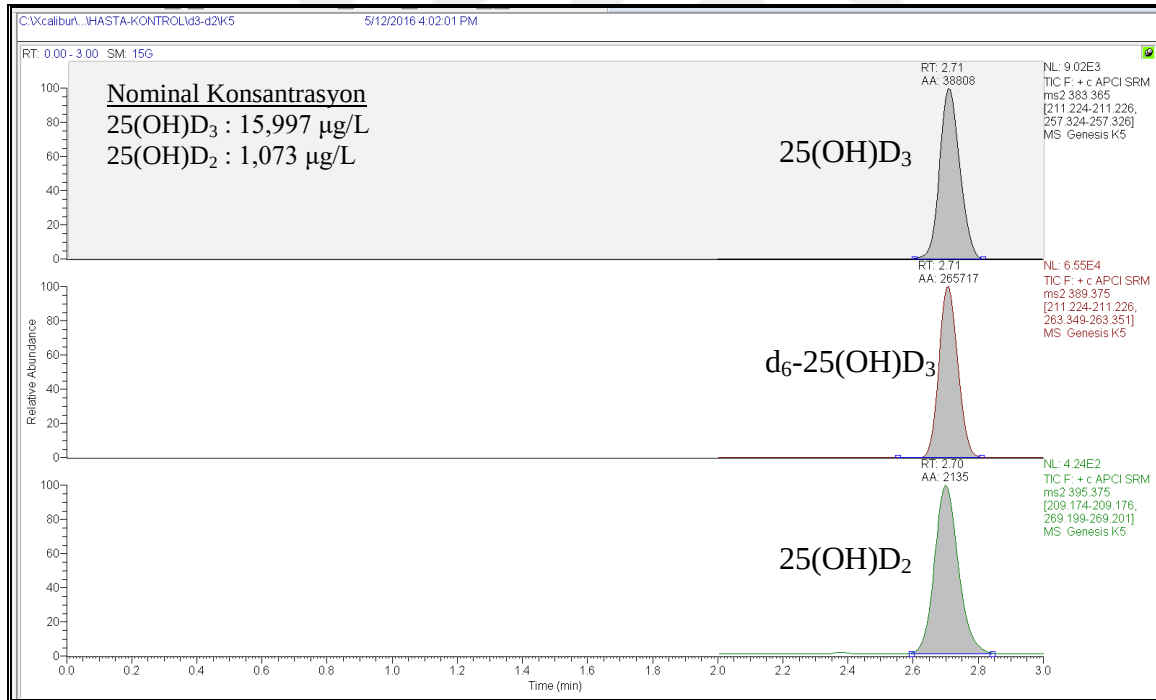
Şekil 4.22. Normal kontrol kromatogramı (25(OH)D₃-25(OH)D₂)



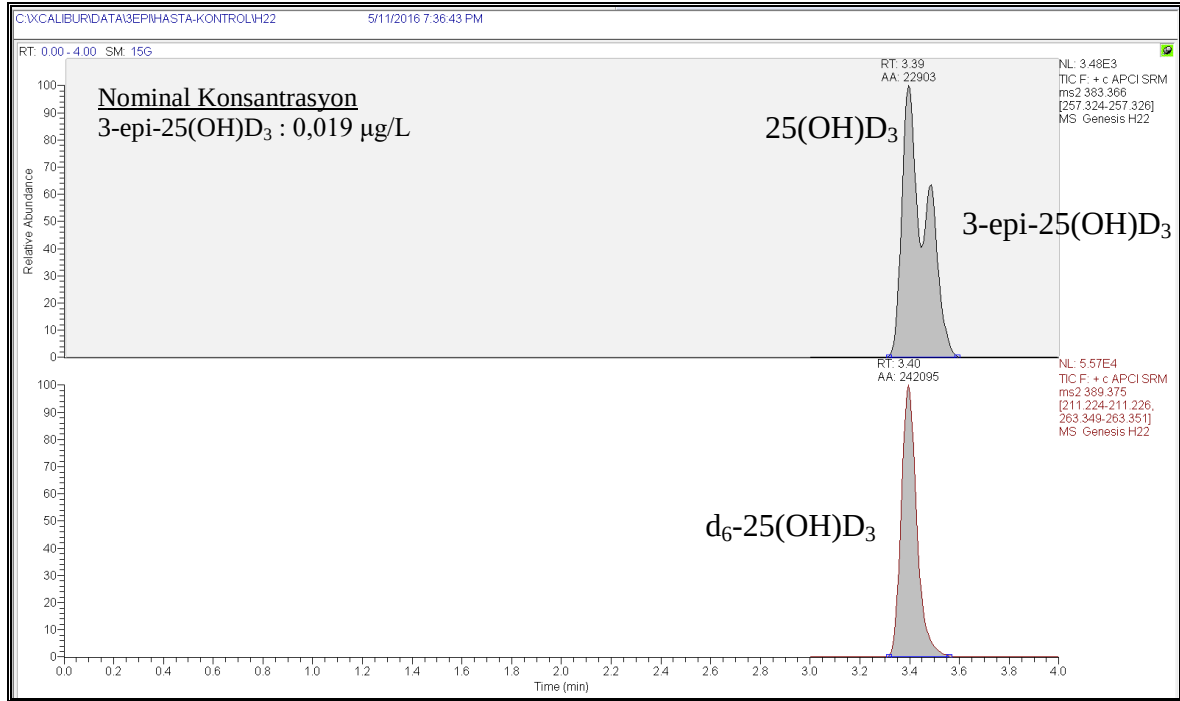
Şekil 4.23. Patolojik kontrol kromatogramı (25(OH)D₃-25(OH)D₂)



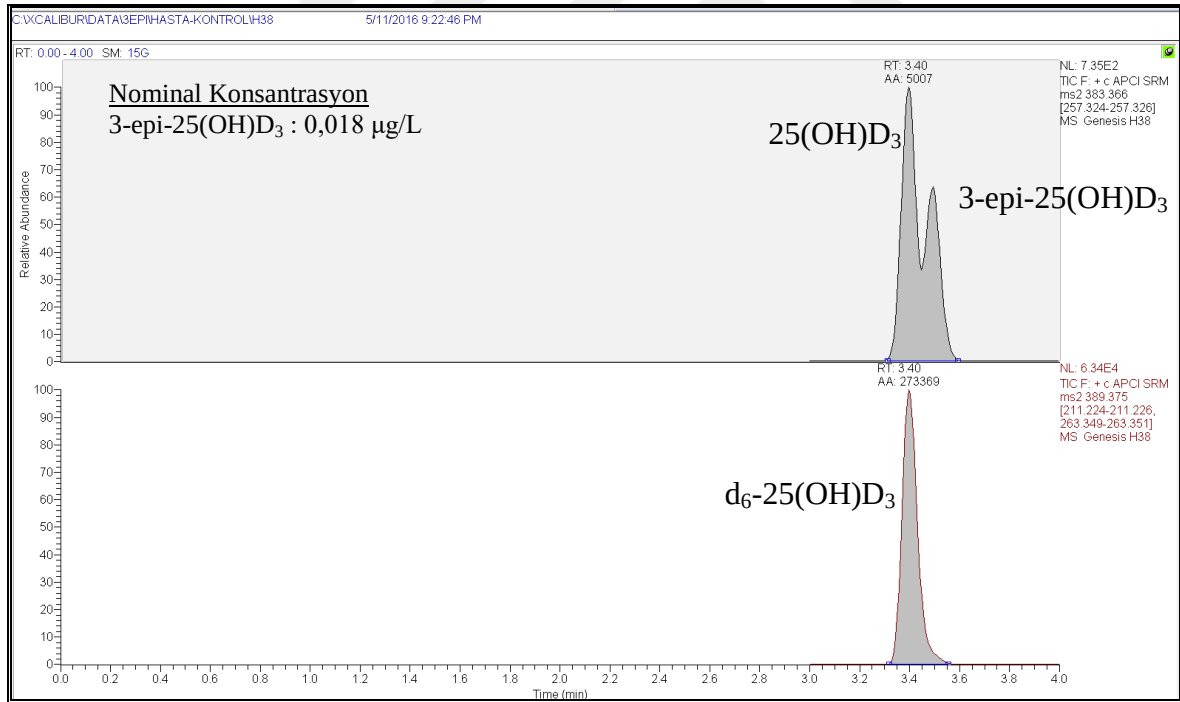
Şekil 4.24. Hasta çocuğa ait serum $25(\text{OH})\text{D}_3$ - $25(\text{OH})\text{D}_2$ kromatogramı



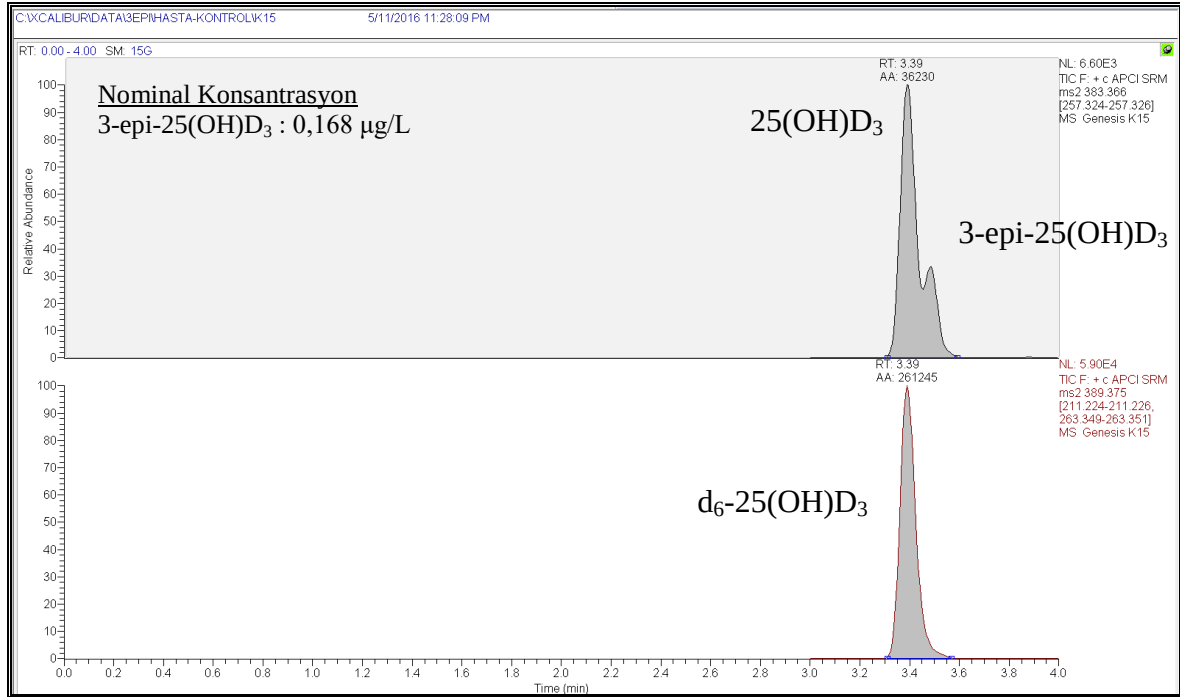
Şekil 4.25. Sağlıklı çocuğa ait serum $25(\text{OH})\text{D}_3$ - $25(\text{OH})\text{D}_2$ kromatogramı



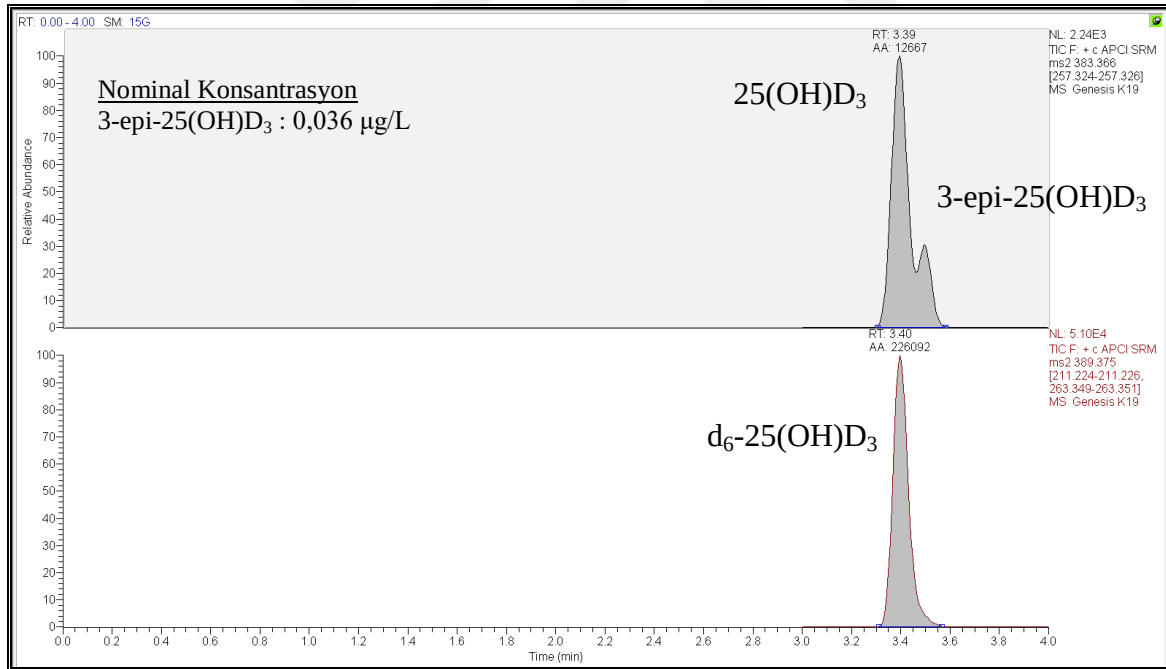
Şekil 4.26. Hasta çocuğa ait serum 3-epi-25(OH)D₃ kromatogramı



Şekil 4.27. Hasta çocuğa ait serum 3-epi-25(OH)D₃ kromatogramı



Şekil 4.28. Sağlıklı çocuğa ait serum 3-epi-25(OH)D₃ kromatogramı



Şekil 4.29. Sağlıklı çocuğa ait 3-epi-25(OH)D₃ kromatogramı



5. TARTIŞMA

Vitamin D bileşikleri, sekosteroidlerin bir grubuna ait hormon benzeri yapılardır. Hayvanlarda doğal olarak vitamin D₃, bitkilerde vitamin D₂ yapısında oluşur. Vitamin D'nin kemik sağlığı için yaşamsal öneme sahip olmasının yanı sıra diyabet, kanser, otoimmün, nörodejeneratif, mental ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çok sayıda hastalığın patogenezinde büyük bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Vitamin D'nin deride fotosentezi ve sonrasında hepatik ve renal metabolizması sonucu pikomolar düzeylerinden nanomolar düzeylerini kapsayan geniş bir aralıkta transformasyon ürünleri oluşmaktadır. Literatürlerde 50'den fazla metabolit tanımlanmıştır. Ancak kantitatif metotlar sadece birkaç metabolit için geliştirilmiştir.

Maternal vitamin D düzeyleri azaldıkça fetal beyinde kortikal kalınlıkta incelmeye neden olup ventrikülomegalinin gelişmesi sonucu postnatal evrede otizm, şizofreni, epilepsi, MS gibi santral sinir sistemi hastalıklarının oluşma riski artmaktadır [191]. 2015 yılında Abbasian ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 284 hamile kadın ve yenidoğanda vitamin D eksikliği araştırılmış annelerin kanında ve bebeklerin kordon kanındaki 25(OH)D vitamin düzeyine bakılmış ve aralarında zayıf bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir ($p=0,053$). Anne ve yenidoğanlarda vitamin D yetersizliği (20-30 ng/mL) sırasıyla %60,2 ve %48,9 çıkarken, vitamin D eksikliği (<20 ng/mL) sırasıyla %1,1 ve %2,5 bulunmuştur. Kalsiyum eksikliği (<8,5 mg/dL) oranları ise kadınlarda %33,5, yenidoğanlarda %25 olarak tespit edilmiştir [192]. Bodnar ve çalışma arkadaşlarının 2007'de yaptığı bir çalışmada 400 hamile kadın (200 siyah ırk - 200 beyaz ırk) ve yenidoğanlarda vitamin D eksikliği araştırılmıştır. Siyah ırkın %54,1'inde, beyaz ırkın %42,1'inde vitamin D yetersizliğini rapor etmişlerdir [126]. Abbasian ve arkadaşları (2015) ile Maghbolı ve arkadaşlarının (2007) araştırmalarında maternal serum vitamin D ile kalsiyum arasında kuvvetli ilişki görülmezken, Maghbooli ve Nicolaidou'nun (2006) çalışmalarında maternal ve kordon kanındaki serum vitamin D düzeyleri arasında güçlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [183, 192, 193].

VDR yoksun (knock out) farelerin, artan anksiyete, bozulmuş prepulse inhibisyonu, neofobia ve değişen yuva kurma gibi davranışsal eksiklikler sergilediği gösterilmiştir [194-196]. Ancak bu davranışsal değişiklikler, büyüme geriliği ve hipokalsemi gibi sütten kesildikten sonraki faktörler ile açıklanmaktadır [197]. Dahası işitme kaybı ve beyin

kalsifikasyonu gibi ilerleyen beyin hasarlarını bu davranışsal bozukluklarla açıklamak zordur. Keisala ve arkadaşları bu bozuklukların, VDR knock out farelerde erken yaşlanmaya sebep olduğunu savunmuşlardır [198]. Merkezi sinir sistemi üzerinde vitamin D'nin etkilerini çalışmanın daha doğrudan bir yolu, ligandların düzeyini direkt olarak değiştirmektir.

Vitamin D, beyin biyokimyasının özellikle dopamin sisteminin değişiminde gösterilmiştir. Örneğin, ratlar devamlı olarak yüksek dozda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile tedavi edildiğinde hem bazal striatal dopamin düzeyleri hem de uyarılan dopamin salınımı artmaktadır. Dahası ratlar postnatal(doğum sonrası) erken dönemde tek doz vitamin D_3 ile tedavi edildiğinde beyin kökünde sürekli artan dopamin ve kaudat putamen ve hipotalamusta dopamin metabolizmasındaki değişimler gösterilmiştir. Ayrıca vitamin D_3 'ün tek doz uygulanmasından sonra beyinkökünde değişen serotonin ve artan dopamin düzeyleri bu hayvanların yetişkin yavrularında belirgindir. Bu durum kuşaklararası etkinin mümkün olduğunu göstermektedir. Bazı bulgular, yetişkin hayvanlarda kronik vitamin D_3 yetersizliğinin değişen beyin fonksiyonlarıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Örneğin alzheimer olan yetişkin ratlar (amiloid beta 1-42'nin intraserebroventriküler enjeksiyonu ile oluşturulan) vitamin D_3 içermeyen diyetle beslendiğinde, vitamin D_3 içeren diyetle beslenenlere göre büyük oranda mekansal/uzaysal öğrenme yetersizliği göstermektedir [199].

Beyin gelişiminde vitamin D eksikliğinin etkileri, gelişimsel vitamin D eksikliği olan bir rat modeli kullanılarak geniş çapta araştırılmıştır [122, 200, 201]. Bu modelin bir özelliği vitamin D eksikliğinin gebelik dönemi ile sınırlı geçici bir yapı olmasıdır. 4 haftalık ratlarda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün tüketilmesi, diyetten vitamin D_3 çıkarılarak ve vitamin D spektrumu içeren UV ışığı verilmeyerek gerçekleştirilir. Bu işlem çiftleşme öncesine kadar (10 hafta) 6 hafta boyunca ve hamilelik sürecinde uygulanır. Gelişimsel vitamin D eksikliği olan embriyolarda vitamin D'nin yoksunluğu moleküler ve yapısal değişimler ile ilişkilendirilmektedir. Örneğin, gelişimsel vitamin D eksikliği olan embriyolarda hücrede azalan apoptozis ve artan mitoz gösterilmiştir [122, 202]. Gelişimsel vitamin D eksikliği olan yenidoğanda nörotropinler olan NGF ve GDNF ile p75^{NTR} reseptörünün düzeyleri birlikte azalmıştır. Beyin morfolojisi de değişmiştir; gelişimsel vitamin D eksikliği olan yenidoğan hayvanlarda uzun bir beyine ek olarak kortikal kalınlıkta azalma ve lateral ventrikül boyutunda artış görülmektedir. Bu özelliklerin bazıları örneğin; azalan NGF,

yetişkinliğe kadar devam etmektedir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sinyalinin progenitor hücre regülasyonunda önemli olabileceği düşünülmektedir [122]. VDR beyinde nörogenez için predominant bölge olan beyin ventriküler duvarlarında ağırlıklı olarak eksprese edilir. Son günlerde yapılan çalışmalarda, gelişimsel vitamin D eksikliğinin, beyin gelişiminin erken dönemlerinde dopamin nöron gelişimi için çok önemli faktörlerin düzeyini azalttığı gösterilmiştir [203]. Dahası değişen dopamin metabolizması ve azalan katekol-O-metil transferaz (COMT) düzeyleri (dopamin metabolizmasında önemli bir enzimdir), gelişime bağlı vitamin D eksikliği olan yenidoğan ratların önbeyinlerinde izlenmektedir [200].

Meguid ve arkadaşlarının 2010 yılında Mısır'da yapmış olduğu vaka-kontrol çalışmasında 70 OSB'li ve 42 kontrolden oluşan 2-8 yaş aralığındaki 112 çocukta $25(\text{OH})\text{D}_3$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve OSB arasındaki ilişkiye bakılmıştır. OSB'li çocuklarda vitamin D_3 konsantrasyonlarının normal gelişim (NG) gösteren çocuklara göre belirgin derecede düşük olduğu rapor edilmiştir (sırasıyla; $\text{OSB}_{\text{ort}}=28,5 \text{ ng/mL}$, $\text{NG}_{\text{ort}}=40,1 \text{ ng/mL}$) [204].

De Souza Tostes ve çalışma arkadaşları tarafından, Brezilya'da yaşayan 24 OSB'li (18 erkek, 6 kız, $\text{Yaş}_{\text{ort}}=7,4\pm2,7$) ve 24 normal gelişim gösteren çocukta $25(\text{OH})\text{D}_3$ düzeyleri HPLC ile analiz edilmiş ve OSB'li grupta $25(\text{OH})\text{D}_3$ düzeyleri belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p<0,001$). OSB'li grubun ortalama $25(\text{OH})\text{D}_3$ düzeyleri $26,48\pm3,48 \text{ ng/mL}$ iken normal gelişim gösteren kontrol grubunun ortalama $25(\text{OH})\text{D}_3$ düzeyleri $40,52\pm3,13 \text{ ng/mL}$ bulunmuştur [205].

2010 yılında Türkiye'de yaşayan 2-24 ay arasındaki 148 çocukta serum vitamin D düzeyleri incelenmiştir. Günlük 400 IU vitamin D takviyesi alan 2-6 ay arasındaki bebeklerin %27,3'ünde, 6-12 ay arasındaki bebeklerin %8,3'ünde, 12-24 ay arasındaki bebeklerin %30'unda vitamin D düzeyleri 15 ng/mL 'nin altında bulunmuştur [206].

Vitamin D, otizm ve immün sistem arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Mostafa ve Al-Ayadhi'nin 2012 yılında yapmış olduğu çalışmada 5-12 yaş arası 50 OSB'li (39 erkek, 11 kız) ve 30 sağlıklı çocukta (24 erkek, 6 kız) serum $25(\text{OH})\text{D}_3$ vitamin düzeyleri ELİSA yöntemi ile analiz edilmiştir. OSB'li çocukların vitamin D düzeylerinin sağlıklı çocuklara göre belirgin düzeyde düşük olduğu rapor edilmiştir ($p<0,001$). OSB'li grubun ortalama vitamin D seviyesi $18,5 \text{ ng/mL}$, kontrol grubunun ortalama vitamin D seviyesi $33,0 \text{ ng/mL}$ olarak bulunmuştur. Bu çalışmada serum anti-MAG otoantikör

düzeyleri de tayin edilmiş ve OSB'li bireylerde otoantikör düzeyleri yüksek bulunmuştur. Çalışmada otizmde yükselen anti-MAG düzeyleri ile düşük vitamin D düzeyleri arasındaki bağ araştırılmış ve güçlü negatif korelasyonun varlığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada ÇODÖ skorlaması ile 25(OH)D₃ arasında güçlü negatif korelasyon görülmüştür. Yaş, cinsiyet ve haftalık güneşe maruz kalma süresi arasında bir korelasyon elde edilememiştir [207].

Bener ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış olduğu çalışmada 254 otizmlili ve kontrol grubu olarak 254 sağlıklı çocuk yer almıştır. Ortalama vitamin D düzeyi otizmlili bireylerde normal değerin altında bulunmuştur. 254 otizmlili çocuğun %14,2'sinde ciddi (<10 ng/mL), %43,7'sinde orta düzeyde yetersiz (10-20 ng/mL), %37,4'ünde hafif yetersiz (20-30 ng/mL) vitamin D eksikliği ve %13,8'inde yeterli düzeyde vitamin D miktarı ölçülmüştür. İstatistiksel olarak otizmlili grup ve kontrol grubunun serum vitamin D düzeyleri karşılaştırıldığında belirgin farklılıklar görülmüştür (p = 0,023) [208].

2010 yılında Bandini ve arkadaşları tarafından, OSB'li çocuklar ve normal gelişim gösteren çocukların yeme alışkanlıkları ile ilgili bir araştırma yapılmıştır. OSB'li çocukların, normal gelişim gösteren çocuklara göre yemek yemeyi daha fazla reddettiği görülmüştür. Çalışmadaki OSB'li çocukların %41,7'si, normal çocukların %18,9'u yemek yemeyi reddetmektedir (p<0,001). Vitamin D ve yetersiz kalsiyum alımı OSB'li çocuklarda daha sık görülmüştür. Bandini ve arkadaşlarının çalışmasına katılan 48 OSB'li çocuktan 38 tanesinin (%79,2) yeterli vitamin D almadığı, 31 tanesinin (%64,6) yeterli kalsiyum alamadığı rapor edilmiştir (p<0,01, p<0,03) [133].

2014 yılında Kocovska ve çalışma arkadaşları Faroe Adaları ve Danimarka'da, Gong ve çalışma arkadaşları Çin'in Beijing şehrinde ikiz çocuklar ve ailelerinde araştırma yapmışlardır. Kocovska, OSB'li 40 birey (31 erkek/9 kız, 15-24 yaş), bu bireylerin normal gelişim gösteren ikizleri (N=62, 29 erkek kardeş/33 kız kardeş) ve ailelerinde (40 anne/37 baba) vitamin D konsantrasyonları sağlıklı grupla (28 erkek/12 kız) karşılaştırılmıştır. Serum 25(OH)D₃ ve 1,25(OH)₂D₃ düzeyleri LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak OSB'li çocukların ortalama 25(OH)D₃ düzeyleri (ort=24,8 nmol/l=9,94 µg/L), OSB'li çocukların (ort=46,1 nmol/l=18,47 µg/L) ailelerinin (ort=46,7 nmol/l=18,71 µg/L) ve kontrol grubunun(ort=37,6 nmol/l=15,06 µg/L) ortalama 25(OH)D₃ düzeylerinden belirgin derecede düşük bulunmuştur. Ayrıca erkeklerde 25(OH)D₃ düzeylerinin azalma eğilimli

olduğu rapor edilmiştir. Yaş, doğum ayı/mevsimi, IQ, OSB fenotipi ile bir korelasyon görülememiştir [209]. Gong ve çalışma arkadaşları, 48 OSB ve 48 normal gelişim gösteren çocukta serum 25(OH)D₃ düzeylerini E601 modülü (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanarak analiz etmişlerdir. OSB'li çocuklarda 25(OH)D₃ düzeyleri belirgin olarak düşük bulunmuştu ($p=0,002$). Kalsiyum, fosfat, magnezyum düzeylerinin yanı sıra yaş, cinsiyet, mevsimsel değişim, vücut kitle indeksi kontrol edildikten sonra, ÇODÖ skorlaması ile dolaşımdaki serum 25(OH)D₃ düzeyleri arasında belirgin bir negatif korelasyon görülmüştür [210].

2011 yılında Amerika'da yapılmış bir çalışmada 5-16 yaş aralığındaki 55 OSB'li (49 erkek/6 kız) ve 44 sağlıklı çocukta (39 erkek/5 kız) plazma 25(OH)D₃ düzeyleri LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Her iki gruba ait plazma 25(OH)D₃ konsantrasyonları arasında belirgin bir farklılık görülememiştir (sırasıyla; $29,9\pm 8,4$ µg/l, $28,6\pm 8,4$ µg/l) [211].

OSB'nin ana semptomları için farmakolojik tedaviler hala yetersiz kalmaktadır. Optimal sonuç gösteren OSB'li bireylerin önemli bir kısmında, erken tanı ve tedavinin, OSB şiddeti, IQ, anlaşılır dil, taklit, motor becerileri gibi birçok faktör açısından etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak OSB gibi heterojen bir durumda, hem genetik hem de çevresel faktörler, OSB fenotipine katkıda bulunan patofizyolojisinde rol oynayabilir [212].

Tedavide vitamin D'nin etkileri bir çok otoimmün durumda ve immün disregülasyonda rapor edilmiştir. Dahası, otoimmün durumlar, OSB şiddeti ile ilgili birkaç anti-nöral otoantikorla birlikte OSB ile ilişkilendirilmiştir. 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada OSB'li çocuklarda hiperaktivite alanları, öfke nöbetleri, genel davranış gibi performansların iyileştirilmesinde vitamin/mineral takviyelerinin önemi vurgulanmıştır. Vitamin D tedavisi ve OSB'nin iyileştirilmesi arasındaki mevcut doğrudan bir bağlantı hala belirsizdir [207, 213-215].

Bugüne kadar, bebek, pediatri ve yetişkin popülasyonunda 3-epi-25(OH)D₃ ile ilgili bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Fakat çalışmalar arasındaki tutarsız bulgular nedeni ile bir uzlaşmaya varmadan önce, çeşitli toplumlar arasında 3-epi-25(OH)D₃'ün prevalansı için daha fazla araştırma yapmak gerektiği düşünülmelidir.

2006 yılında, Singh ve çalışma arkadaşları, 5-dinitrobenzoil-(R)fenilglisin kolonu kullanarak, 183 yenidoğan (<1yaş), 47 çocuk (1-18 yaş), karaciğer hastalığı olan 53 yetişkin (20-87 yaş) ve 147 sağlıklı yetişkinde (19-91 yaş) 3-epi-25(OH)D₃ ve 3-epi-25(OH)D₂'nin ayrımını yapmaya çalışmışlardır. Bu çalışmada, 1 yaşından küçük çocukların %22,7'sinde 3-epi-25(OH)D tayini gerçekleştirilebilmiştir. 1 yaşından büyüklerde C-3 epimerleri tespit edilememiştir. Araştırmacılar tayin limitini belirleyememiş ve yalnızca 1 yaşın altındaki bireylerde mevcut olup olmadığı konusunda tahminde bulunmuşlardır. 3-epi-25(OH)D'nin göreceli miktarının yaş ile birlikte azalmasından dolayı gelişmemiş karaciğerin epimer üretiminde bir rolü olabileceği varsayılmıştır [33].

2011 yılının başlarında, Stepman ve arkadaşları 6 yenidoğan ve 32 yetişkinde 3-epi-25(OH)D₃'ün sıklığını araştırmak için UPLC-MS/MS yöntemini kullanmıştır. Singh ve arkadaşlarının aksine hem yenidoğan hem de yetişkinlerde epimer formunu tespit etmişlerdir. Nispi 3-epi-25(OH)D₃ konsantrasyonları, yenidoğanların %15-41'inde ve yetişkinlerin %2,5-17'sinde tayin edilmiştir. Bu bulgu C-3 epimer ölçümünün hem pediatri hem de yetişkin popülasyonunda kabul edilmesine rağmen, depodaki örnekler kullanılarak küçük bir örneklem büyüklüğünde çalışılmıştır. Bundan dolayı, daha sonraki araştırmaların bu bulguları doğrulamak için gerekli olacağı düşünülmüştür [216].

2011 yılının ortalarında, Schleicher ve arkadaşları, Amerika kan bankalarından elde edilen 98 serum örneği ve 35 hamile kadının serum örneğinde 25(OH)D₃ ve 3-epi-25(OH)D₃ miktar tayini için UPLC-MS/MS sistemi ve pentaflorofenilpropil (PFP) kolonu kullanmışlardır. Numuneler üzerinde herhangi bir ek bilgi olmamasına rağmen, araştırmacılar, kan bağışçılarının %43'ünde, hamile kadınların %80'inde epimer tayini gerçekleştirebilmiştir. Kan bağışçılarının ortalama serum 3-epi-25(OH)D₃ miktarı 1,90 nmol/L=0,76 µg/L (0-18,9 nmol/L=0-7,57 µg/L), hamile kadınların ortalama serum 3-epi-25(OH)D₃ miktarı 3,71 nmol/L=1,49 µg/L (1,32-10,0 nmol/L=0,53-4,01 µg/L) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma ile Schleicher ve arkadaşları her iki popülasyonda da 3-epi-25(OH)D₃ ve 25(OH)D₃ arasında pozitif anlamlı bir korelasyon olduğunu göstermiştir [217].

Ouweland ve arkadaşları (2011) açıkladıkları LC-MS/MS yöntemi, 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃ için ayrı sonuçları rapor edebilme yeteneği ile birlikte, 25(OH)D'nin

belirlenmesi için diğer metodlara göre hızlı, doğru, hassas ölçümler sağlamaktadır. LC-MS/MS yöntemi ile geçerli olan radioimmünoassay test (Diasorin) iyi derecede karşılaştırılmıştır fakat son zamanlarda yeniden standardize edilen ECLIA vitamin D₃ testi (Roche) ile daha az ölçüde karşılaştırılmıştır. Bu metod ile 25(OH)D₃'ün yanlış tespit edilen yüksek analitik değerlerini önlemek için 3-epi-25(OH)D₃ yeterli derecede analit pikinden ayrılmaktadır [218]. 2011 yılının sonlarına doğru, van den Ouweland ve arkadaşları tarafından 3-epi-25(OH)D₃'in miktar tayini için bir araştırma yapılmıştır. 25(OH)D₃ düzeyleri 4,3 ve 300 nmol/L (1,72-120,19 µg/L) arasında değişen 51 yenidoğan, 74 çocuk ve 104 yetişkinden oluşan grupta, katı-faz ekstraksiyonunu takiben PFP kolonu kullanılarak kromatografik ayırma işlemi yapılmıştır. 3-epi-25(OH)D₃ tüm yenidoğan ve nın çocuklarda, yetişkinlerin ise %75'inde tespit edilmiştir. 3-epi-25(OH)D₃'ün göreceli konsantrasyonu ve 25(OH)D₃'ün mutlak konsantrasyonu arasında korelasyon gözlenmemiştir [219].

Shah ve çalışma arkadaşları 2011 yılında, 5 yetişkinde (21-41 yaş) pozitif iyon elektrosprey LC-MS/MS'te MRM modunda C18 kolonu kullanarak 3-epi-25(OH)D₃'ün miktarını tespit etmişlerdir. Bu metot ile 5 kişiden 4'ünde(%80) epimer tespit edilebilmiştir. İlginç bir şekilde, Shah ve arkadaşları aynı popülasyonda aynı metot ile vitamin D₃ izobarlarını da (1α(OH)D₃ ve 7α(OH)4-koleston-3-one) belirlemişlerdir. Bu oran total 25(OH)D konsantrasyonunun %11,8-38,7'sini içermektedir. Bu bilgi, epimer tayininin izobarik müdahalelere uğrayabileceğini göstermektedir [220].

2012 yılında Baecher ve çalışma arkadaşları tarafından, 50 yetişkinde, serum 25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 24(R),25(OH)₂D₂, 24(R),25(OH)₂D₃ ve 3-epi-25(OH)D₃ düzeylerini LC-MS/MS ve PFP analitik kolonu kullanılarak ölçülmüştür. Bu çalışmada örneklerin %78'inde önemli miktarda 3-epi-25(OH)D₃ tespit edilmiştir (2-22,5 nmol/L=0,80-9.01 µg/L). Önemli bir bulgu, 3-epi-25(OH)D₃ ve 25(OH)D₃ konsantrasyonları arasında korelasyon gözlenmiştir [221].

2016 yılında Aghajafari ve arkadaşları, 25(OH)D₃ ve 3-epi-25(OH)D₃ düzeylerinin anne ve kordon kanındaki ilişkilerini, epimerlerin vitamin D durumu üzerine etkilerini değerlendiren bir çalışma yapmıştır. Kanada'da gerçekleştirilen bu çalışmada doğumda anneden ve kordon kanından alınan plazma örneklerinde 25(OH)D₂, 25(OH)D₃ ve 3-epi-25(OH)D₃ düzeyleri LC-MS/MS kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 92

anne ve 92 kordon kanının tamamında 3-epi-25(OH)D₃ tayin edilmiştir. Anne ve kordon kanlarında 25(OH)D₃ ve 3-epi-25(OH)D₃ arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir (anne kanı: $r=0,34$, $p=0,001$ kordon kanı: $r=0,44$, $p=0,01$). Regresyon analizi, anne ve kordon kanında vitamin D takviyesi ve 3-epi-25(OH)D₃ arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir ($\beta:0,423$; %95 CI:0,173, 0,672). 3-epi-25(OH)D₃, plazma vitamin D düzeylerine dahil edilmediğinde, kadınların %38'i ve yenidoğanın %80'inde yetersiz konsantrasyona sahip olduğu ancak 3-epi-25(OH)D₃ dahil edildiğinde, yetersizlik oranı belirgin şekilde düştüğü gözlenmiştir (kadınlar:%33, yenidoğan:%73). Aghajafari ve çalışma arkadaşları bu çalışma ile yüksek dozda vitamin D takviyelerinin anne ve kordon kanındaki 3-epi-25(OH)D₃ düzeylerine katkıda bulunacağını savunmuşlardır [222].



6. SONUÇ

Son zamanlarda, vitamin D için mevcut ticari nitelikte birçok immünoanaliz yöntemlerinin doğruluğu sorguya çekilmeye başlanmıştır. Sıvı kromatografisi kütle/kütle spektrometresi (LC-MS/MS), total 25(OH)D olarak adlandırılan dolaşımdaki başlıca metabolitler olan 25-hidroksivitaminD₃ (25(OH)D₃) ve 25-hidroksivitaminD₂ (25(OH)D₂)'nin doğru olarak ayrımını ve ölçümünü kolaylaştırmak için geliştirilmiştir [220]. LC-MS/MS yöntemi 25(OH)D₃ ve 25(OH)D₂'nin doğru analizi için şuan mevcut olan en iyi tekniktir ve aynı zamanda protein bağlanma deneyleriyle ilişkili birçok problemin üstesinden gelebilecek kapasiteye sahiptir [223].

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları polikliniğine OSB şüphesi ile başvuruda bulunan, yapılan klinik muayene sonucu OSB tanısı almış 0-18 yaş aralığındaki her iki cinsiyette çocuklar bu çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak Sağlam Çocuk Polikliniği'ne başvuruda bulunmuş benzer yaş ve cinsiyette sağlıklı çocuklar çalışmaya alınmıştır. 46 OSB'li ve 46 sağlıklı çocukta serum 25(OH)D₃, 25(OH)D₂ ve 3-epi-25(OH)D₃ düzeyleri günümüzde altın standart olarak değerlendirilen LC-MS/MS yöntemi ile tayin edilmiştir. Serum kalsiyum, kreatinin ve fosfor düzeyleri spektrofotometrik yöntem ile, PTH seviyeleri kemilüminesans yöntem ile ölçülmüştür.

Son yıllarda, klinik açıdan 25(OH)D₃ ile benzer etkilerinden dolayı 3-epi-25(OH)D₃ seviyeleri önemli bir yere sahiptir. Vitamin D metabolitlerinin epimerizasyonu hem hayvanlarda hem de *in vitro* çalışmalarda öncelikli gözlenmesine rağmen, bebek, pediatri ve yetişkin popülasyonunda epimerlerin varlığı son zamanlarda tarif edilmiştir. Bu, izomerik bileşiklerin çözünme yeteneğine sahip yeni analitik tekniklerin geliştirilmesi ile büyük oranda mümkün kılınmıştır. C-3 epimerinin miktarı ve ayrımını içeren, 25(OH)D₃'ün tayini için hızlı ve karışık derivatizasyon prosedürleri içermeyen, dolayısıyla deney süresini ve varyasyonu azaltan LC-MS/MS metodu kullanılmıştır. Çalışmamızda 3-epi-25(OH)D₃ seviyelerinin tayini için özel analitik kolon kullanılarak yeni bir metod geliştirilmiştir. Bu metod ile, 3-epi-25(OH)D₃, yanlış tespit edilen yüksek 25(OH)D₃'ün analitik değerlerini önlemek için yeterli derecede analit pikinden ayrılabilir. OSB'li ve sağlıklı çocuklarda 3-epi-25(OH)D₃ düzeyleri kantitatif olarak tayin edilmiştir. Her iki grup arasında vitamin D metabolit düzeylerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm çocukların çoğunluğunda vitamin D düzeyleri yetersiz bulunmuştur.

OSB'li çocuklar kendi aralarında ÇODÖ'ye göre gruplandırıldığında ağır derecede otizmlili çocukların hafif-orta derecede otizmlili çocuklara göre daha düşük 25(OH)D₃ düzeylerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ağır derecede otizmlili grubun yetersiz vitamin D düzeyi (<20 µg/L) rapor edilmiştir (17,74 ± 1,42 µg/L).

Çalışmanın sonucuna göre, 0-18 yaş aralığındaki çocukların vitamin D düzeyleri, OSB'li çocuklarda sağlıklı çocuklara göre düşük seviyelerde bulunmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşamamıştır. Bu sonuca ek olarak, ÇODÖ'ne göre ağır derecede otizmlili grubun, hafif-orta derecede otizmlili gruba ve kontrol grubuna göre düşük serum 25(OH)D₃ düzeylerine sahip olduğu görülmüş ve istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir (p=0,021*, p=0,004**).

Otizm belirtilerinin şiddeti ve vitamin D metabolit düzeyleri arasında kesin bir ilişki olup olmadığı sorusu henüz bir cevap bulamamıştır. Vitamin D metabolit düzeylerinin OSB etiyolojisindeki yeri ile ilgili daha fazla çalışma yapılması gerektiği, gelecekteki araştırmaların sonuçları ile OSB'li hastalarda ve risk altındaki bireylerde gelişmiş tarama ile hastalığı önleme ve hastalığın tedavisini kolaylaştırabileceğini düşünmekteyiz. Yenidoğanın beyin gelişiminde vitamin D metabolitlerinin önemli bir rolü olduğunu ve *in vivo* sentezlenen vitamin D ile annenin ve yenidoğanın optimal seviyede vitamin D takviyesinin otizm risk ve şiddetini azaltabileceği, bunun yanı sıra hasta sayısının artırılması, gebelik süresince annenin vitamin D seviyelerinin doğumdan sonra da yenidoğanla birlikte takip edilmesinin otizm ve diğer nörogelişimsel hastalıklar için yol gösterebileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Van Den Ouweland, J. M., Vogeser, M. and Bacher, S., (2013), Vitamin D and metabolites measurement by tandem mass spectrometry. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 14(2), 159-84.
2. Su, Z., Slay, B. R., Carr, R. and Zhu, Y., (2013), The recognition of 25-hydroxyvitamin D2 and D3 by a new binding protein based 25-hydroxyvitamin D assay. *Clinica Chimica Acta*. 417, 62-6.
3. Koo, W. W. K. Tsang, R. C., (2005), *Calcium and Magnesium Homeostasis*. Sixth ed.: Lippincott W&W. 847-875.
4. Hollis, B. W., (2005), Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *Journal of Nutrition*. 135(2), 317-22.
5. Barragry, J. M., France, M. W., Corless, D., Gupta, S. P., Switala, S., Boucher, B. J. and Cohen, R. D., (1978), Intestinal cholecalciferol absorption in the elderly and in younger adults. *Clinical Science and Molecular Medicine*. 55(2), 213-20.
6. Halicka, H. D., Zhao, H., Li, J., Traganos, F., Studzinski, G. P. and Darzynkiewicz, Z., (2012), Attenuation of constitutive DNA damage signaling by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Aging (Albany NY)*. 4(4), 270-8.
7. Sahillioğlu, B., Serdar, M. A., Erkal, N., Erden, G., Bakır, F., Yıldırımka, M. M., Işık, S. ve Özügüz, U., (2011), 25-OH-Vitamin D Hormon için Tandem Kütle Spektrometrede Yöntem Geçerli Kılma Çalışması ve Bu Yöntemin Farklı Yöntemlerle Karşılaştırılması. *Türk Biyokimya Dergisi*. 36(1), 73-79.
8. Delvin, E., Souberbielle, J. C., Viard, J. P. and Salle, B., (2014), Role of vitamin D in acquired immune and autoimmune diseases. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 51(4), 232-47.
9. Houghton, L. A. Vieth, R., (2006), The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 84(4), 694-7.
10. Holick, M. F., (2009), Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of Epidemiology*. 19(2), 73-8.
11. Vogeser, M. Seger, C., (2010), Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*. 56(8), 1234-44.
12. Zerwekh, J. E., (2008), Blood biomarkers of vitamin D status. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 87(4), 1087-91.
13. Bailey, D., Veljkovic, K., Yazdanpanah, M. and Adeli, K., (2013), Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer. *Clinical Biochemistry*. 46(3), 190-6.

14. Dusso, A. S., Brown, A. J. and Slatopolsky, E., (2005), Vitamin D. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 289(1), F8-28.
15. Saner, G., (2010), *Beslenme Gereksinimleri*, editörler. O. Neyzi, T. Ertuğrul. İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevi.
16. Ferrier, D. R., (2014), *Biochemistry*. Sixth ed. Lippincott's Illustrated Reviews Biochemistry ed. A.H. Harvey. U.S.A.: Wolters Kluwer.
17. Jones, G., (2012), Metabolism and biomarkers of vitamin D. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 243, 7-13.
18. Kamao, M., Tatematsu, S., Hatakeyama, S., Sakaki, T., Sawada, N., Inouye, K., Ozono, K., Kubodera, N., Reddy, G. S. and Okano, T., (2004), C-3 epimerization of vitamin D3 metabolites and further metabolism of C-3 epimers: 25-hydroxyvitamin D3 is metabolized to 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 and subsequently metabolized through C-1alpha or C-24 hydroxylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(16), 15897-907.
19. Baynes, J. W.Dominiczak, H. M., (2014), *Medical Biochemistry* Fourth edition. UK/USA: Saunders Elsevier. 347.
20. Baynes, J. W.Dominiczak, H. M., (2014), *Medical Biochemistry*. Fourth edition. UK/USA: Saunders Elsevier. 343.
21. Dowsett, M., Cuzick, J., Wale, C., Howell, T., Houghton, J. and Baum, M., (2005), Retrospective analysis of time to recurrence in the ATAC trial according to hormone receptor status: an hypothesis-generating study. *Journal of Clinical Oncology*. 23(30), 7512-7.
22. Kıdır, V., (2013), D Vitamininin kardiyovasküler ve metabolik etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 4(3), 398-404.
23. Ramagopalan, S. V., Heger, A., Berlanga, A. J., Maugeri, N. J., Lincoln, M. R., Burrell, A., Handunnetthi, L., Handel, A. E., Disanto, G., Orton, S. M., Watson, C. T., Morahan, J. M., Giovannoni, G., Ponting, C. P., Ebers, G. C. and Knight, J. C., (2010), A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Research*. 20(10), 1352-60.
24. Marshall, W. J., Lapsley, M., Day, A. P. and Ayling, R. M., (2014), *Clinical Biochemistry Metabolic and Clinical Aspects*. Third edition. U.K.: Churchill Livingstone Elsevier.
25. Namir, Y., Cohen, M. J., Haviv, Y. S., Slotki, I. and Shavit, L., (2016), Vitamin D levels, vitamin D supplementation, and prognosis in patients with chronic kidney disease. *Clinical Nephrology*. 86(10), 165-74.
26. Hart, G. R., Furniss, J. L., Laurie, D. and Durham, S. K., (2006), Measurement of vitamin D status: background, clinical use, and methodologies. *Clinical Laboratory*. 52(7-8), 335-43.

27. Bikle, D. D., (2010), Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic requirements. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 21(6), 375-84.
28. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, (2010), Washington, DC: Institute of Medicine, Food and Nutrition Board National Academy Press.
29. Holick, M. F., Binkley, N. C., Bischoff-Ferrari, H. A., Gordon, C. M., Hanley, D. A., Heaney, R. P., Murad, M. H., Weaver, C. M. and Endocrine, S., (2011), Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 96(7), 1911-30.
30. Misra, M., Pacaud, D., Petryk, A., Collett-Solberg, P. F., Kappy, M., Drug and Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine, S., (2008), Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics*. 122(2), 398-417.
31. Pehlivan, I., Hatun, S., Aydogan, M., Babaoglu, K. and Gokalp, A. S., (2003), Maternal vitamin D deficiency and vitamin D supplementation in healthy infants. *The Turkish Journal of Pediatrics*. 45(4), 315-20.
32. Wagner, C. L. Greer, F. R., (2008), American Academy of Pediatrics Section on Breastfeeding; Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children and adolescents. *Pediatrics*. 122(5), 1142-52.
33. Singh, R. J., Taylor, R. L., Reddy, G. S. and Grebe, S. K., (2006), C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 91(8), 3055-61.
34. Strathmann, F. G., Sadilkova, K., Laha, T. J., LeSourd, S. E., Bornhorst, J. A., Hoofnagle, A. N. and Jack, R., (2012), 3-epi-25 hydroxyvitamin D concentrations are not correlated with age in a cohort of infants and adults. *Clinica Chimica Acta*. 413(1-2), 203-6.
35. Sekimoto, H., Siu-Caldera, M. L., Weiskopf, A., Vouros, P., Muralidharan, K. R., Okamura, W. H., Uskokovic, M. R. and Reddy, G. S., (1999), 1alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D₃: in vivo metabolite of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ in rats. *FEBS Letters*. 448(2-3), 278-82.
36. Reddy, G. S., Muralidharan, K. R., Okamura, W. H., Tserng, K. Y. and McLane, J. A., (2001), Metabolism of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and its C-3 epimer 1alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D(3) in neonatal human keratinocytes. *Steroids*. 66(3-5), 441-50.
37. Brown, A. J., Ritter, C. S., Weiskopf, A. S., Vouros, P., Sasso, G. J., Uskokovic, M. R., Wang, G. and Reddy, G. S., (2005), Isolation and identification of 1alpha-hydroxy-3-epi-vitamin D₃, a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *Journal of Cellular Biochemistry*. 96(3), 569-78.

38. Bischof, M. G., Siu-Caldera, M. L., Weiskopf, A., Vouros, P., Cross, H. S., Peterlik, M. and Reddy, G. S., (1998), Differentiation-related pathways of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol metabolism in human colon adenocarcinoma-derived Caco-2 cells: production of 1 alpha,25-dihydroxy-3-epi-cholecalciferol. *Experimental Cell Research*. 241(1), 194-201.
39. Brown, A. J., Ritter, C., Slatopolsky, E., Muralidharan, K. R., Okamura, W. H. and Reddy, G. S., (1999), 1Alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D3, a natural metabolite of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3, is a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *Journal of Cellular Biochemistry*. 73(1), 106-13.
40. Siu-Caldera, M. L., Sekimoto, H., Weiskopf, A., Vouros, P., Muralidharan, K. R., Okamura, W. H., Bishop, J., Norman, A. W., Uskokovic, M. R., Schuster, I. and Reddy, G. S., (1999), Production of 1alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D3 in two rat osteosarcoma cell lines (UMR 106 and ROS 17/2.8), existence of the C-3 epimerization pathway in ROS 17/2.8 cells in which the C-24 oxidation pathway is not expressed. *Bone*. 24(5), 457-63.
41. Rehan, V. K., Torday, J. S., Peleg, S., Gennaro, L., Vouros, P., Padbury, J., Rao, D. S. and Reddy, G. S., (2002), 1Alpha,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D3, a natural metabolite of 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3: production and biological activity studies in pulmonary alveolar type II cells. *Molecular Genetics and Metabolism*. 76(1), 46-56.
42. Muscogiuri, G., Mitri, J., Mathieu, C., Badenhoop, K., Tamer, G., Orio, F., Mezza, T., Vieth, R., Colao, A. and Pittas, A., (2014), Mechanisms in endocrinology: vitamin D as a potential contributor in endocrine health and disease. *European Journal of Endocrinology*. 171(3), 101-10.
43. Annweiler, C., Dursun, E., Feron, F., Gezen-Ak, D., Kalueff, A. V., Littlejohns, T., Llewellyn, D. J., Millet, P., Scott, T., Tucker, K. L., Yilmazer, S. and Beauchet, O., (2015), 'Vitamin D and cognition in older adults': updated international recommendations. *Journal of Internal Medicine*. 277(1), 45-57.
44. Bierschenk, L., Alexander, J., Wasserfall, C., Haller, M., Schatz, D. and Atkinson, M., (2009), Vitamin D levels in subjects with and without type 1 diabetes residing in a solar rich environment. *Diabetes Care*. 32(11), 1977-9.
45. Grant, W. B., (2016), Roles of Solar UVB and Vitamin D in Reducing Cancer Risk and Increasing Survival. *Anticancer Research*. 36(3), 1357-70.
46. Mozos, I. Marginean, O., (2015), Links between Vitamin D Deficiency and Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International*. 109275.
47. Pittas, A. G., Lau, J., Hu, F. B. and Dawson-Hughes, B., (2007), The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 92(6), 2017-29.

48. Saad, K., Abdel-Rahman, A. A., Elserogy, Y. M., Al-Atram, A. A., Cannell, J. J., Bjorklund, G., Abdel-Reheim, M. K., Othman, H. A., El-Houfey, A. A., Abd El-Aziz, N. H., Abd El-Baseer, K. A., Ahmed, A. E. and Ali, A. M., (2015), Vitamin D status in autism spectrum disorders and the efficacy of vitamin D supplementation in autistic children. *Nutritional Neuroscience*. 19(8), 346-351.
49. Thomson, R. L., Spedding, S. and Buckley, J. D., (2012), Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical Endocrinology (Oxford)*. 77(3), 343-50.
50. Pilz, S., Gaksch, M., O'Hartaigh, B., Tomaschitz, A. and Marz, W., (2013), The role of vitamin D deficiency in cardiovascular diseases: Where do we stand in 2013? *Archives of Toxicology*. 87(12), 2083-2103.
51. Norman, P. E. Powell, J. T., (2014), Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*. 114(2), 379-393.
52. Parikh, G., Varadinova, M., Suwandhi, P., Araki, T., Rosenwaks, Z., Poretsky, L. and Seto-Young, D., (2010), Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells. *Hormone and Metabolic Research*. 42(10), 754-7.
53. Holick, M. F., (2010), *Vitamin D solution*. NewYork: Hudson Street Press.
54. American Psychiatric Association, (2013), *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition (DSM-5)*. . Fifth edition. Wshington DC, London England.: American Psychiatric Publishing.
55. Kanner, L., (1943), Autistic Disturbances of Affective Contact. *Nervous Child: Quarterly Journal of Psychopathology, Psychotherapy, Mental Hygiene, and Guidance of the Child*: 217–50.
56. Swedo, S. E., Baird, G., Cook, E. H., Jr., Happe, F. G., Harris, J. C., Kaufmann, W. E., King, B. H., Lord, C. E., Piven, J., Rogers, S. J., Spence, S. J., Wetherby, A. and Wright, H. H., (2012), Commentary from the DSM-5 Workgroup on Neurodevelopmental Disorders. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 51(4), 347-9.
57. Durkin, M. S., Maenner, M. J., Newschaffer, C. J., Lee, L. C., Cuniff, C. M., Daniels, J. L., Kirby, R. S., Leavitt, L., Miller, L., Zahorodny, W. and Schieve, L. A., (2008), Advanced parental age and the risk of autism spectrum disorder. *American journal of epidemiology*. 168(11), 1268-76.
58. Tsai, L. Ghaziuddin, M., (2013), DSM-5 ASD Moves Forward in to the Past. *Journal of Autism and Developmental Disorders*.
59. Centers for Disease Control and Prevention, (2012). Vol. 61. Literature: MMWR Surveill Summ. 1-19.
60. Christensen, D. L., Baio, J., Braun, K. V. N., Charles, D. B., Constantino, J. N., Daniels, J., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., Kurzius-Spencer, M., Lee, L. C.,

- Pettygrove, S., Robinson, C., Schulz, E., Wells, C., Wingate, M. S., Zahorodny, W. and Yeargin-Allsopp, M., (2016), Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. 37(1), 1-8.
61. Kim, Y. S., Leventhal, B. L., Koh, Y. J., Fombonne, E., Laska, E., Lim, E. C., Cheon, K. A., Kim, S. J., Kim, Y. K., Lee, H., Song, D. H. and Grinker, R. R., (2011), Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *The American Journal of Psychiatry*. 168(9), 904-12.
 62. Fombonne, E., (2005), Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *The Journal of Clinical Psychiatry*. 66 Suppl 10: 3-8.
 63. İstatistiklerle Çocuk. 2015, *Türkiye İstatistik Kurumu*: Ankara. p. 53.
 64. Mukaddes, N. M., (2014), *Otizm Spektrum Bozuklukları Tanı ve Takip*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. s.17.
 65. Kocovska, E., Fernell, E., Billstedt, E., Minnis, H. and Gillberg, C., (2012), Vitamin D and autism: clinical review. *Research in Developmental Disabilities*. 33(5), 1541-50.
 66. Kinney, D. K., Barch, D. H., Chayka, B., Napoleon, S. and Munir, K. M., (2010), Environmental risk factors for autism: do they help cause de novo genetic mutations that contribute to the disorder? *Medical Hypotheses*. 74(1), 102-6.
 67. Colvert, E., Tick, B., McEwen, F., Stewart, C., Curran, S. R., Woodhouse, E., Gillan, N., Hallett, V., Lietz, S., Garnett, T., Ronald, A., Plomin, R., Rijsdijk, F., Happe, F. and Bolton, P., (2015), Heritability of Autism Spectrum Disorder in a UK Population-Based Twin Sample. *JAMA Psychiatry*. 72(5), 415-23.
 68. Ozonoff, S., Young, G. S., Carter, A., Messinger, D., Yirmiya, N., Zwaigenbaum, L., Bryson, S., Carver, L. J., Constantino, J. N., Dobkins, K., Hutman, T., Iverson, J. M., Landa, R., Rogers, S. J., Sigman, M. and Stone, W. L., (2011), Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics*. 128(3), 488-95.
 69. Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M. and Reichenberg, A., (2014), The familial risk of autism. *The Journal of the American Medical Association*. 311(17), 1770-7.
 70. Wu, S. Q., Ding, Y. Y., Wu, F. Q., Li, R. S., Xie, G. M., Hou, J. and Mao, P. Y., (2015), Family history of autoimmune diseases is associated with an increased risk of autism in children: A systematic review and meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 55, 322-332.
 71. Idring, S., Magnusson, C., Lundberg, M., Ek, M., Rai, D., Svensson, A. C., Dalman, C., Karlsson, H. and Lee, B. K., (2014), Parental age and the risk of autism spectrum disorders: findings from a Swedish population-based cohort. *International Journal of Epidemiology*. 43(1), 107-15.

72. Kim, Y. S. Leventhal, B. L., (2015), Genetic Epidemiology and Insights into Interactive Genetic and Environmental Effects in Autism Spectrum Disorders. *Biological Psychiatry*. 77(1), 66-74.
73. Lai, M. C., Lombardo, M. V. and Baron-Cohen, S., (2014), Autism. *Lancet*. 383(9920), 896-910.
74. Miles, J. H., (2011), Autism spectrum disorders-A genetics review. *Genetics in Medicine*. 13(4), 278-294.
75. Richards, C., Jones, C., Groves, L., Moss, J. and Oliver, C., (2015), Prevalence of autism spectrum disorder phenomenology in genetic disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Psychiatry*. 2(10), 909-16.
76. Boukhris, T., Sheehy, O., Mottron, L. and Berard, A., (2016), Antidepressant Use During Pregnancy and the Risk of Autism Spectrum Disorder in Children. *Jama Pediatrics*. 170(2), 117-124.
77. Christensen, J., Gronborg, T. K., Sorensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H. and Vestergaard, M., (2013), Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism Editorial Comment. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 68(9), 613-614.
78. Curran, E. A., Dalman, C., Kearney, P. M., Kenny, L. C., Cryan, J. F., Dinan, T. G. and Khashan, A. S., (2015), Association Between Obstetric Mode of Delivery and Autism Spectrum Disorder A Population-Based Sibling Design Study. *JAMA Psychiatry*. 72(9), 935-942.
79. Fountain, C., Zhang, Y. J., Kissin, D. M., Schieve, L. A., Jamieson, D. J., Rice, C. and Bearman, P., (2015), Association Between Assisted Reproductive Technology Conception and Autism in California, 1997-2007. *American Journal of Public Health*. 105(5), 963-971.
80. Gardener, H., Spiegelman, D. and Buka, S. L., (2011), Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics*. 128(2), 344-55.
81. Li, M., Fallin, M. D., Riley, A., Landa, R., Walker, S. O., Silverstein, M., Caruso, D., Pearson, C., Kiang, S., Dahm, J. L., Hong, X., Wang, G., Wang, M. C., Zuckerman, B. and Wang, X., (2016), The Association of Maternal Obesity and Diabetes With Autism and Other Developmental Disabilities. *Pediatrics*. 137(2), e20152206.
82. Schieve, L. A., Clayton, H. B., Durkin, M. S., Wingate, M. S. and Drews-Botsch, C., (2015), Comparison of Perinatal Risk Factors Associated with Autism Spectrum Disorder (ASD), Intellectual Disability (ID), and Co-occurring ASD and ID. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 45(8), 2361-72.
83. Weisskopf, M. G., Kioumourtoglou, M. A. and Roberts, A. L., (2015), Air Pollution and Autism Spectrum Disorders: Causal or Confounded? *Current Environmental Health Reports*. 2(4), 430-9.

84. Zerbo, O., Qian, Y., Yoshida, C., Grether, J. K., Van de Water, J. and Croen, L. A., (2015), Maternal Infection During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 45(12), 4015-25.
85. Fernell, E., Bejerot, S., Westerlund, J., Miniscalco, C., Simila, H., Eyles, D., Gillberg, C. and Humble, M. B., (2015), Autism spectrum disorder and low vitamin D at birth: a sibling control study. *Molecular Autism*. 6: 3.
86. Eyles, D. W., Burne, T. H. and McGrath, J. J., (2013), Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 34(1), 47-64.
87. Cannell, J. J. Grant, W. B., (2013), What is the role of vitamin D in autism? *Dermato-Endocrinology*. 5(1), 199-204.
88. Cannell, J. J., (2008), Autism and vitamin D. *Medical Hypotheses*. 70(4), 750-9.
89. Epstein, S. Schneider, A. E., (2005), *Drug and hormone effects on vitamin D metabolism*. . Second ed. San Diego: Elsevier, ed. D. Feldman, J.W. Pike F.H. Glorix. Vol. 2.
90. Williams, J. G., Higgins, J. P. and Brayne, C. E., (2006), Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. *Archives of Disease in Childhood*. 91(1), 8-15.
91. Croen, L. A., Grether, J. K., Hoogstrate, J. and Selvin, S., (2002), The changing prevalence of autism in California. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 32(3), 207-15.
92. Bhasin, T. K. Schendel, D., (2007), Sociodemographic risk factors for autism in a US metropolitan area. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 37(4), 667-77.
93. McGrath, J., (2010), Is it time to trial vitamin D supplements for the prevention of schizophrenia? *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 121(5), 321-4.
94. Bakare, M. O., Munir, K. M. and Kinney, D. K., (2011), Association of hypomelanotic skin disorders with autism: links to possible etiologic role of vitamin-D levels in autism? *Hypothesis (Tor)*. 9(1).
95. Dealberto, M. J., (2011), Prevalence of autism according to maternal immigrant status and ethnic origin. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 123(5), 339-48.
96. Parra, E. J., (2007), Human pigmentation variation: evolution, genetic basis, and implications for public health. *American Journal of Physical Anthropology*. Suppl 45: 85-105.
97. Barnevik-Olsson, M., Gillberg, C. and Fernell, E., (2008), Prevalence of autism in children born to Somali parents living in Sweden: a brief report. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 50(8), 598-601.

98. Barnevik-Olsson, M., Gillberg, C. and Fernell, E., (2010), Prevalence of autism in children of Somali origin living in Stockholm: brief report of an at-risk population. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 52(12), 1167-8.
99. Fernell, E., Bejerot, S., Westerlund, J., Miniscalco, C., Simila, H., Eyles, D., Gillberg, C. and Humble, M. B., (2015), Autism spectrum disorder and low vitamin D at birth: a sibling control study. *Molecular Autism*. 6: 3.
100. Saaf, M., Fernell, E., Kristiansson, F., Barnevik Olsson, M., Gustafsson, S. A. and Bagenholm, G., (2011), Severe vitamin D deficiency in pregnant women of Somali origin living in Sweden. *Acta Paediatrica*. 100(4), 612-4.
101. Dijkstra, S. H., van Beek, A., Janssen, J. W., de Vleeschouwer, L. H., Huysman, W. A. and van den Akker, E. L., (2007), High prevalence of vitamin D deficiency in newborn infants of high-risk mothers. *Archives of Disease in Childhood*. 92(9), 750-3.
102. Andersen, R., Molgaard, C., Skovgaard, L. T., Brot, C., Cashman, K. D., Jakobsen, J., Lamberg-Allardt, C. and Ovesen, L., (2008), Pakistani immigrant children and adults in Denmark have severely low vitamin D status. *European Journal of Clinical Nutrition*. 62(5), 625-34.
103. Hintzpeter, B., Scheidt-Nave, C., Muller, M. J., Schenk, L. and Mensink, G. B., (2008), Higher prevalence of vitamin D deficiency is associated with immigrant background among children and adolescents in Germany. *Journal of Nutrition*. 138(8), 1482-90.
104. Hypponen, E. Power, C., (2007), Hypovitaminosis D in British adults at age 45 y: nationwide cohort study of dietary and lifestyle predictors. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 85(3), 860-8.
105. Stevens, M. C., Fein, D. H. and Waterhouse, L. H., (2000), Season of birth effects in autism. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*. 22(3), 399-407.
106. Maimburg, R. D., Bech, B. H., Vaeth, M., Moller-Madsen, B. and Olsen, J., (2010), Neonatal jaundice, autism, and other disorders of psychological development. *Pediatrics*. 126(5), 872-8.
107. Gillberg, C., (1990), Do children with autism have March birthdays? *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 82: 152-156.
108. Hebert, K. J., Miller, L. L. and Joinson, C. J., (2010), Association of autistic spectrum disorder with season of birth and conception in a UK cohort. *Autism Research*. 3(4), 185-90.
109. Chaste, P. Leboyer, M., (2012), Autism risk factors: genes, environment and gene-environment interactions. *Dialogues in clinical neuroscience*. 14: 281-292.
110. Braunschweig, D., Krakowiak, P., Duncanson, P., Boyce, R., Hansen, R. L., Ashwood, P., Hertz-Picciotto, I., Pessah, I. N. and Van de Water, J., (2013), Autism-specific maternal autoantibodies recognize critical proteins in developing brain. *Translational Psychiatry*. 3, e277.

111. Frye, R. E., Sequeira, J. M., Quadros, E. V., James, S. J. and Rossignol, D. A., (2013), Cerebral folate receptor autoantibodies in autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*. 18(3), 369-81.
112. Gillberg, I. C., (1991), Autistic syndrome with onset at age 31 years: herpes encephalitis as a possible model for childhood autism. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 33(10), 920-4.
113. Patterson, P. H., (2011), Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends in Molecular Medicine*. 17(7), 389-94.
114. Stromland, K., Nordin, V., Miller, M., Akerstrom, B. and Gillberg, C., (1994), Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 36(4), 351-6.
115. Meador, K. J., Loring, D. W., (2013), Prenatal valproate exposure is associated with autism spectrum disorder and childhood autism. *Journal of Pediatrics*. 163(3), 924.
116. Landgren, M., Svensson, L., Stromland, K. and Andersson Gronlund, M., (2010), Prenatal alcohol exposure and neurodevelopmental disorders in children adopted from eastern Europe. *Pediatrics*. 125(5), e1178-85.
117. Cannon, M., Clarke, M. C., (2005), Risk for schizophrenia--broadening the concepts, pushing back the boundaries. *Schizophrenia Research*. 79(1), 5-13.
118. Arndt, T. L., Stodgell, C. J. and Rodier, P. M., (2005), The teratology of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 23(2-3), 189-99.
119. Stumpf, W. E., Sar, M., Clark, S. A. and DeLuca, H. F., (1982), Brain target sites for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Science*. 215(4538), 1403-5.
120. Stumpf, W. E., Privette, T. H., (1989), Light, vitamin D and psychiatry. Role of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ (solatriol) in etiology and therapy of seasonal affective disorder and other mental processes. *Psychopharmacology (Berl)*. 97(3), 285-94.
121. McGrath, J., (1999), Hypothesis: is low prenatal vitamin D a risk-modifying factor for schizophrenia? *Schizophrenia Research*. 40(3), 173-7.
122. Eyles, D., Brown, J., Mackay-Sim, A., McGrath, J. and Feron, F., (2003), Vitamin D₃ and brain development. *Neuroscience*. 118(3), 641-53.
123. Kalueff, A. V., Minasyan, A., Keisala, T., Kuuslahti, M., Miettinen, S. and Tuohimaa, P., (2006), The vitamin D neuroendocrine system as a target for novel neurotropic drugs. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 5(3), 363-71.
124. DeLuca, G. C., Kimball, S. M., Kolasinski, J., Ramagopalan, S. V. and Ebers, G. C., (2013), Review: the role of vitamin D in nervous system health and disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 39(5), 458-84.
125. Holick, M. F., (1995), Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 61(3 Suppl), 638S-645S.

126. Bodnar, L. M., Simhan, H. N., Powers, R. W., Frank, M. P., Cooperstein, E. and Roberts, J. M., (2007), High prevalence of vitamin D insufficiency in black and white pregnant women residing in the northern United States and their neonates. *Journal of Nutrition*. 137(2), 447-52.
127. Fernell, E., Barnevik-Olsson, M., Bagenholm, G., Gillberg, C., Gustafsson, S. and Saaf, M., (2010), Serum levels of 25-hydroxyvitamin D in mothers of Swedish and of Somali origin who have children with and without autism. *Acta Paediatrica*. 99(5), 743-7.
128. Raiten, D. J. Massaro, T., (1986), Perspectives on the nutritional ecology of autistic children. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 16(2), 133-43.
129. Schreck, K. A., Williams, K. and Smith, A. F., (2004), A comparison of eating behaviors between children with and without autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 34(4), 433-8.
130. Cermak, S. A., Curtin, C. and Bandini, L. G., (2010), Food selectivity and sensory sensitivity in children with autism spectrum disorders. *Journal of the American Dietetic Association*. 110(2), 238-46.
131. Dominick, K. C., Davis, N. O., Lainhart, J., Tager-Flusberg, H. and Folstein, S., (2007), Atypical behaviors in children with autism and children with a history of language impairment. *Research in Developmental Disabilities*. 28(2), 145-62.
132. Williams, P. G., Dalrymple, N. and Neal, J., (2000), Eating habits of children with autism. *Pediatric Nursing*. 26(3), 259-64.
133. Bandini, L. G., Anderson, S. E., Curtin, C., Cermak, S., Evans, E. W., Scampini, R., Maslin, M. and Must, A., (2010), Food selectivity in children with autism spectrum disorders and typically developing children. *Journal of Pediatrics*. 157(2), 259-64.
134. Christodoulou, S., Goula, T., Ververidis, A. and Drosos, G., (2013), Vitamin D and bone disease. *BioMed Research International*. 396541.
135. Holick, M. F., (2007), Medical progress: Vitamin deficiency. *The New England Journal of Medicine*. 357(3), 266-281.
136. Pardridge, W. M., Sakiyama, R. and Coty, W. A., (1985), Restricted transport of vitamin D and A derivatives through the rat blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*. 44(4), 1138-41.
137. Balabanova, S., Richter, H. P., Antoniadis, G., Homoki, J., Kremmer, N., Hanle, J. and Teller, W. M., (1984), 25-Hydroxyvitamin D, 24, 25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid. *Klinische Wochenschrift*. 62(22), 1086-90.
138. Eyles, D. W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M. and McGrath, J. J., (2005), Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 29(1), 21-30.

139. Airavaara, M., Voutilainen, M. H., Wang, Y. and Hoffer, B., (2012), Neurorestoration. *Parkinsonism & Related Disorders*. 18 Suppl 1, S143-6.
140. Brown, J., Bianco, J. I., McGrath, J. J. and Eyles, D. W., (2003), 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*. 343(2), 139-43.
141. Neveu, I., Naveilhan, P., Baudet, C., Brachet, P. and Metsis, M., (1994), 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes. *Neuroreport*. 6(1), 124-6.
142. Harms, L. R., Burne, T. H., Eyles, D. W. and McGrath, J. J., (2011), Vitamin D and the brain. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 25(4), 657-69.
143. Sigmundsdottir, H., (2011), From the bench to the clinic: New aspects on immunoregulation by vitamin D analogs. *Dermato-Endocrinology*. 3(3), 187-92.
144. Li, L., Prabhakaran, K., Zhang, X., Zhang, L., Liu, H., Borowitz, J. L. and Isom, G. E., (2008), 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 attenuates cyanide-induced neurotoxicity by inhibiting uncoupling protein-2 up-regulation. *Journal of Neuroscience Research*. 86(6), 1397-408.
145. Gerald F. Combs, J., (2012), *The Vitamins Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. Fourth edition. USA: Academic Press.
146. Harms, L. R., Cowin, G., Eyles, D. W., Kurniawan, N. D., McGrath, J. J. and Burne, T. H., (2012), Neuroanatomy and psychomimetic-induced locomotion in C57BL/6J and 129/X1SvJ mice exposed to developmental vitamin D deficiency. *Behavioural Brain Research*. 230(1), 125-31.
147. Pioggia, G., Tonacci, A., Tartarisco, G., Billeci, L., Muratori, F., Ruta, L. and Gangemi, S., (2014), Autism and lack of D3 vitamin: A systematic review. *Research in Autism Spectrum Disorders*. 8: 1685-1698.
148. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C. and Baldwin, J., (2001), Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409(6822), 860-921.
149. Musiol, I. M., Stumpf, W. E., Bidmon, H. J., Heiss, C., Mayerhofer, A. and Bartke, A., (1992), Vitamin D nuclear binding to neurons of the septal, substriatal and amygdaloid area in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*) brain. *Neuroscience*. 48(4), 841-8.
150. Prufer, K., Veenstra, T. D., Jirikowski, G. F. and Kumar, R., (1999), Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 16(2), 135-45.
151. Sutherland, M. K., Somerville, M. J., Yoong, L. K., Bergeron, C., Haussler, M. R. and McLachlan, D. R., (1992), Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with

- calbindin-28k mRNA levels. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 13(3), 239-50.
152. Cui, X., McGrath, J. J., Burne, T. H., Mackay-Sim, A. and Eyles, D. W., (2007), Maternal vitamin D depletion alters neurogenesis in the developing rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 25(4), 227-32.
 153. Stumpf, W. E., Privette, T. H., (1991), The steroid hormone of sunlight soltrial (vitamin D) as a seasonal regulator of biological activities and photoperiodic rhythms. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 39(2), 283-9.
 154. Stumpf, W. E., Sar, M., Reid, F. A., Tanaka, Y. and DeLuca, H. F., (1979), Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science*. 206(4423), 1188-90.
 155. Baas, D., Prufer, K., Ittel, M. E., Kuchler-Bopp, S., Labourdette, G., Sarlieve, L. L. and Brachet, P., (2000), Rat oligodendrocytes express the vitamin D(3) receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Glia*. 31(1), 59-68.
 156. Cornet, A., Baudet, C., Neveu, I., Baron-Van Evercooren, A., Brachet, P. and Naveilhan, P., (1998), 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the expression of VDR and NGF gene in Schwann cells in vitro. *Journal of Neuroscience Research*. 53(6), 742-6.
 157. Tague, S. E., Smith, P. G., (2011), Vitamin D receptor and enzyme expression in dorsal root ganglia of adult female rats: modulation by ovarian hormones. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 41(1), 1-12.
 158. Bernd, P., (2008), The role of neurotrophins during early development. *Gene Expression*. 14(4), 241-50.
 159. Dicou, E., (2009), Neurotrophins and neuronal migration in the developing rodent brain. *Brain Research Reviews*. 60(2), 408-17.
 160. Naveilhan, P., Neveu, I., Wion, D. and Brachet, P., (1996), 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, an inducer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neuroreport*. 7(13), 2171-5.
 161. Wang, Y., Chiang, Y. H., Su, T. P., Hayashi, T., Morales, M., Hoffer, B. J. and Lin, S. Z., (2000), Vitamin D(3) attenuates cortical infarction induced by middle cerebral arterial ligation in rats. *Neuropharmacology*. 39(5), 873-80.
 162. Chun, H. S., Yoo, M. S., DeGiorgio, L. A., Volpe, B. T., Peng, D., Baker, H., Peng, C. and Son, J. H., (2002), Marked dopaminergic cell loss subsequent to developmental, intranigral expression of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Experimental Neurology*. 173(2), 235-44.
 163. Kholodilov, N., Yarygina, O., Oo, T. F., Zhang, H., Sulzer, D., Dauer, W. and Burke, R. E., (2004), Regulation of the development of mesencephalic dopaminergic systems by the selective expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in their targets. *Journal of Neuroscience*. 24(12), 3136-46.

164. Smith, M. P., Fletcher-Turner, A., Yurek, D. M. and Cass, W. A., (2006), Calcitriol protection against dopamine loss induced by intracerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Neurochemical Research*. 31(4), 533-9.
165. Sanchez, B., Relova, J. L., Gallego, R., Ben-Batalla, I. and Perez-Fernandez, R., (2009), 1,25-Dihydroxyvitamin D3 administration to 6-hydroxydopamine-lesioned rats increases glial cell line-derived neurotrophic factor and partially restores tyrosine hydroxylase expression in substantia nigra and striatum. *Journal of Neuroscience Research*. 87(3), 723-32.
166. Neveu, I., Naveilhan, P., Jehan, F., Baudet, C., Wion, D., De Luca, H. F. and Brachet, P., (1994), 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 24(1-4), 70-6.
167. Korsching, S., Auburger, G., Heumann, R., Scott, J. and Thoenen, H., (1985), Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO Journal*. 4(6), 1389-93.
168. Naveilhan, P., Neveu, I., Baudet, C., Funakoshi, H., Wion, D., Brachet, P. and Metsis, M., (1996), 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor. *Brain Research. Molecular Brain Research*. 41(1-2), 259-68.
169. Brewer, L. D., Thibault, V., Chen, K. C., Langub, M. C., Landfield, P. W. and Porter, N. M., (2001), Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*. 21(1), 98-108.
170. Taniura, H., Ito, M., Sanada, N., Kuramoto, N., Ohno, Y., Nakamichi, N. and Yoneda, Y., (2006), Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 83(7), 1179-89.
171. Morley, R., Grover, S., Pasco, J., Nicholson, G., McGrath, J. and Vieth, R., (2002), Vitamin D in pregnant women. *Archives of Disease in Childhood*. 86: 147.
172. Looker, A. C. Gunter, E. W., (1998), Hypovitaminosis D in medical inpatients. *The New England Journal of Medicine*. 339(5), 344-346.
173. Grant, W. B. Soles, C. M., (2009), Epidemiologic evidence supporting the role of maternal vitamin D deficiency as a risk factor for the development of infantile autism. *Dermato-Endocrinology*. 1(4), 223-8.
174. Whitehouse, A. J., Holt, B. J., Serralha, M., Holt, P. G., Kusel, M. M. and Hart, P. H., (2012), Maternal serum vitamin D levels during pregnancy and offspring neurocognitive development. *Pediatrics*. 129(3), 485-93.
175. Ala-Houhala, M., Koskinen, T., Terho, A., Koivula, T. and Visakorpi, J., (1986), Maternal compared with infant vitamin D supplementation. *Archives of Disease in Childhood*. 61(12), 1159-63.

176. Barrett, H.McElduff, A., (2010), Vitamin D and pregnancy: An old problem revisited. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 24(4), 527-39.
177. Andiran, N., Yordam, N. and Ozon, A., (2002), Risk factors for vitamin D deficiency in breast-fed newborns and their mothers. *Nutrition*. 18(1), 47-50.
178. Hollis, B. W., (2007), Vitamin D requirement during pregnancy and lactation. *Journal of Bone and Mineral Research*. 22 Suppl 2: 39-44.
179. Hollis, B. W.Wagner, C. L., (2006), Vitamin D deficiency during pregnancy: an ongoing epidemic. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 84(2), 273.
180. Hollis, B. W.Wagner, C. L., (2006), Nutritional vitamin D status during pregnancy: reasons for concern. *Canadian Medical Association Journal*. 174(9), 1287-90.
181. Basile, L. A., Taylor, S. N., Wagner, C. L., Quinones, L. and Hollis, B. W., (2007), Neonatal vitamin D status at birth at latitude 32 degrees 72': evidence of deficiency. *Journal of Perinatology*. 27(9), 568-71.
182. Lee, J. M., Smith, J. R., Philipp, B. L., Chen, T. C., Mathieu, J. and Holick, M. F., (2007), Vitamin D deficiency in a healthy group of mothers and newborn infants. *Clinical Pediatrics (Phila)*. 46(1), 42-4.
183. Nicolaidou, P., Hatzistamatiou, Z., Papadopoulou, A., Kaleyias, J., Floropoulou, E., Lagona, E., Tsagris, V., Costalos, C. and Antsaklis, A., (2006), Low vitamin D status in mother-newborn pairs in Greece. *Calcified Tissue International*. 78(6), 337-42.
184. Schopler, E., Reichler, R. J., DeVellis, R. F. and Daly, K., (1980), Toward objective classification of childhood autism: Childhood Autism Rating Scale (CARS). *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 10(1), 91-103.
185. Sucuoğlu, B., Öktem, F. and Akkök, F., (1996), A study of assesment tools in children with autism. *Psychiatry Psychology Psychopharmacology*. 4: 116-121.
186. Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., Ng, K. F., Suen, M. W. and Tai, H. L., (2003), Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*. 24(1), 3-12.
187. Wu, A. H. B., (2006), *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests*. Fourth edition. 202-207.
188. Soldin, J. S., Brugnara, C. and Wong, E. C., (2005), *Pediatric Reference Intervals*. Fifth edition. 153.
189. Schlebusch, H., Liappis, N., Kalina, E. and Klein, G., (2002), High sensitive CRP and creatinine: reference intervals from infancy to childhood. . *Journal of Laboratory Medicine*. 26: 341-346.
190. Vichet, K.Catherine, S., (2010), Vitamin D toxicity? A case study. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science*. 64(2), 44-50.

191. Lucas, R. M., Ponsonby, A. L., Pasco, J. A. and Morley, R., (2008), Future health implications of prenatal and early-life vitamin D status. *Nutrition Reviews*. 66(12), 710-20.
192. Abbasian, M., Chaman, R., Amiri, M., Ajami, M. E., Jafari-Koshki, T., Rohani, H., Taghavi-Shahri, S. M., E., S. and Raei, M., (2015), Vitamin D Deficiency in Pregnant Women and Their Neonates *Global Journal of Health Science*. 8(9), 83-90.
193. Maghbooli, Z., Hossein-Nezhad, A., Shafaei, A. R., Karimi, F., Madani, F. S. and Larijani, B., (2007), Vitamin D status in mothers and their newborns in Iran. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 7: 1.
194. Kalueff, A. V., Lou, Y. R., Laaksi, I. and Tuohimaa, P., (2004), Increased anxiety in mice lacking vitamin D receptor gene. *Neuroreport*. 15(8), 1271-4.
195. Keisala, T., Minasyan, A., Jarvelin, U., Wang, J., Hamalainen, T., Kalueff, A. V. and Tuohimaa, P., (2007), Aberrant nest building and prolactin secretion in vitamin D receptor mutant mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 104(3-5), 269-73.
196. Minasyan, A., Keisala, T., Lou, Y. R., Kalueff, A. V. and Tuohimaa, P., (2007), Neophobia, sensory and cognitive functions, and hedonic responses in vitamin D receptor mutant mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 104(3-5), 274-80.
197. Zou, J., Minasyan, A., Keisala, T., Zhang, Y., Wang, J. H., Lou, Y. R., Kalueff, A., Pyykko, I. and Tuohimaa, P., (2008), Progressive hearing loss in mice with a mutated vitamin D receptor gene. *Audiology and Neurotology*. 13(4), 219-30.
198. Keisala, T., Minasyan, A., Lou, Y. R., Zou, J., Kalueff, A. V., Pyykko, I. and Tuohimaa, P., (2009), Premature aging in vitamin D receptor mutant mice. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 115(3-5), 91-7.
199. Taghizadeh, M., Djazayeri, A., Salami, M., Eshraghian, M. R. and Zavareh, S. A., (2011), Vitamin-D-free regimen intensifies the spatial learning deficit in Alzheimer's disease. *International Journal of Neuroscience*. 121(1), 16-24.
200. Kesby, J. P., Cui, X., O'Loan, J., McGrath, J. J., Burne, T. H. and Eyles, D. W., (2010), Developmental vitamin D deficiency alters dopamine-mediated behaviors and dopamine transporter function in adult female rats. *Psychopharmacology*. 208(1), 159-68.
201. Eyles, D. W., Feron, F., Cui, X., Kesby, J. P., Harms, L. H., Ko, P., McGrath, J. J. and Burne, T. H., (2009), Developmental vitamin D deficiency causes abnormal brain development. *Psychoneuroendocrinology*. 34 (1), 247-57.
202. Ko, P., Burkert, R., McGrath, J. and Eyles, D., (2004), Maternal vitamin D3 deprivation and the regulation of apoptosis and cell cycle during rat brain development. *Developmental Brain Research*. 153(1), 61-8.

203. Cui, X., Pelekanos, M., Burne, T. H., McGrath, J. J. and Eyles, D. W., (2010), Maternal vitamin D deficiency alters the expression of genes involved in dopamine specification in the developing rat mesencephalon. *Neuroscience Letters*. 486(3), 220-3.
204. Meguid, N. A., Hashish, A. F., Anwar, M. and Sidhom, G., (2010), Reduced serum levels of 25-hydroxy and 1,25-dihydroxy vitamin D in Egyptian children with autism. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 16(6), 641-5.
205. Tostes, M. H., Polonini, H. C., Gattaz, W. F., Raposo, N. R. and Baptista, E. B., (2012), Low serum levels of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) in children with autism. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*. 34(3), 161-3.
206. Onal, H., Adal, E., Alpaslan, S., Ersen, A. and Aydin, A., (2010), Is daily 400 IU of vitamin D supplementation appropriate for every country: a cross-sectional study. *European Journal of Nutrition*. 49(7), 395-400.
207. Mostafa, G. A. Al-Ayadhi, L. Y., (2012), Reduced serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D in children with autism: relation to autoimmunity. *Journal of Neuroinflammation*. 9: 201.
208. Bener, A., Khattab, A. O. and Al-Dabbagh, M. M., (2014), Is high prevalence of Vitamin D deficiency evidence for autism disorder?: In a highly endogamous population. *Journal of Pediatric Neurosciences*. 9(3), 227-33.
209. Kocovska, E., Andorsdottir, G., Weihe, P., Halling, J., Fernell, E., Stora, T., Biskupsto, R., Gillberg, I. C., Shea, R., Billstedt, E., Bourgeron, T., Minnis, H. and Gillberg, C., (2014), Vitamin D in the general population of young adults with autism in the faroe islands. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 44(12), 2996-3005.
210. Gong, Z. L., Luo, C. M., Wang, L., Shen, L., Wei, F., Tong, R. J. and Liu, Y., (2014), Serum 25-hydroxyvitamin D levels in Chinese children with autism spectrum disorders. *Neuroreport*. 25(1), 23-7.
211. Adams, J. B., Audhya, T., McDonough-Means, S., Rubin, R. A., Quig, D., Geis, E., Gehn, E., Loresto, M., Mitchell, J., Atwood, S., Barnhouse, S. and Lee, W., (2011), Nutritional and metabolic status of children with autism vs. neurotypical children, and the association with autism severity. *Nutrition & Metabolism (London)*. 8(1), 34.
212. Fein, D., Barton, M., Eigsti, I. M., Kelley, E., Naigles, L., Schultz, R. T., Stevens, M., Helt, M., Orinstein, A., Rosenthal, M., Troyb, E. and Tyson, K., (2013), Optimal outcome in individuals with a history of autism. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 54(2), 195-205.
213. Adams, J. B., Audhya, T., McDonough-Means, S., Rubin, R. A., Quig, D., Geis, E., Gehn, E., Loresto, M., Mitchell, J., Atwood, S., Barnhouse, S. and Lee, W., (2011), Effect of a vitamin/mineral supplement on children and adults with autism. *BMC Pediatrics*. 11: 111.

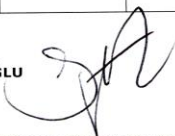
214. Steeb, H., Ramsey, J. M., Guest, P. C., Stocki, P., Cooper, J. D., Rahmoune, H., Ingudomnukul, E., Auyeung, B., Ruta, L., Baron-Cohen, S. and Bahn, S., (2014), Serum proteomic analysis identifies sex-specific differences in lipid metabolism and inflammation profiles in adults diagnosed with Asperger syndrome. *Molecular Autism*. 5(1), 4.
215. Berlanga-Taylor, A. J. Ramagopalan, S. V., (2013), Vitamin D and multiple sclerosis: what is the clinical impact? *Expert Opinion on Medical Diagnostics*. 7(3), 227-9.
216. Stepman, H. C., Vanderroost, A., Stockl, D. and Thienpont, L. M., (2011), Full-scan mass spectral evidence for 3-epi-25-hydroxyvitamin D(3) in serum of infants and adults. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 49(2), 253-6.
217. Schleicher, R. L., Encisco, S. E., Chaudhary-Webb, M., Paliakov, E., McCoy, L. F. and Pfeiffer, C. M., (2011), Isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous measurement of 25-hydroxyvitamin D2, 25-hydroxyvitamin D3 and 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 in human serum. *Clinica Chimica Acta*. 412(17-18), 1594-9.
218. Van den Ouweland, J. M., Beijers, A. M., Demacker, P. N. and van Daal, H., (2010), Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 878(15-16), 1163-8.
219. Van den Ouweland, J. M., Beijers, A. M. and van Daal, H., (2011), Fast separation of 25-hydroxyvitamin D3 from 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: variable prevalence of 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 in infants, children, and adults. *Clinical Chemistry*. 57(11), 1618-9.
220. Shah, I., James, R., Barker, J., Petroczi, A. and Naughton, D. P., (2011), Misleading measures in Vitamin D analysis: a novel LC-MS/MS assay to account for epimers and isobars. *Nutrition Journal*. 10: 46.
221. Baecher, S., Leinenbach, A., Wright, J. A., Pongratz, S., Kobold, U. and Thiele, R., (2012), Simultaneous quantification of four vitamin D metabolites in human serum using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for vitamin D profiling. *Clinical Biochemistry*. 45(16-17), 1491-6.
222. Aghajafari, F., Field, C. J., Rabi, D., Kaplan, B. J., Maggiore, J. A., O'Beirne, M., Hanley, D. A., Eliasziw, M., Dewey, D., Ross, S. and Team, A. P. S., (2016), Plasma 3-Epi-25-Hydroxycholecalciferol Can Alter the Assessment of Vitamin D Status Using the Current Reference Ranges for Pregnant Women and Their Newborns. *Journal of Nutrition*. 146(1), 70-5.
223. Roth, H. J., Schmidt-Gayk, H., Weber, H. and Niederau, C., (2008), Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference. *Annals of Clinical Biochemistry*. 45(Pt 2), 153-9.



EKLER

EK-1. Yerel Etik Kurul Onay Formu

“Otizm Spektrum Bozukluğu olan çocuklarda serum D vitamini metabolitlerinin LC-MS/MS metodu ile analitik ölçümü” isimli çalışma T.C Sağlık Bakanlığı Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul komisyonundan 14.04.2015 tarihinde onay almıştır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU					
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN ÇOCUKLARDA SERUM D VİTAMİNİ METABOLİTLERİNİN LC – MS / MS METODU İLE ANALİTİK ÖLÇÜMÜ			
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU					
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	T.C SAĞLIK BAKANLIĞI ZEKAİ TAHİR BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU			
	AÇIK ADRESİ:	T.C. Sağlık Bakanlığı Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Talatpaşa Bulvarı Samanpazarı/ANKARA			
	TELEFON	0 312 306 56 85			
	FAKS	0 312 312 50 69			
	E-POSTA	etik_kurul@yahoo.com.tr			
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU Prof. Dr. Ayşe Banu ÇAYCI SİVRİ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
Gözlemsel ilaç çalışması		☐			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐			
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐			
İlaç dışı klinik araştırma		☐			
Diger ise belirtiniz: Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLAR ARASI ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU İmza: 					
Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.					

EK-1. (devam) Yerel Etik Kurul Onay Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU							
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI			OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN ÇOCUKLARDA SERUM D VİTAMİNİ METABOLİTLERİNİN LC – MS / MS METODU İLE ANALİTİK ÖLÇÜMÜ				
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU							
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama				
	SİGORTA		☐				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		☐				
	BİYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU		☐				
	İLAN		☐				
	YILLIK BİLDİRİM		☐				
	SONUÇ RAPORU		☐				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		☐				
DİĞER:							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 27/2015		Tarih: 14.04.2015				
	Gazi Üniversitesi BAP birimi tarafından önerülen destek yazısının bir örneğinin etik kurulumuza verilmesi kaydı ile yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI			İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyisi Klinik Uygulamaları Kılavuzu Son Versiyonu				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:			Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU				
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi		Katılım	İmza
Av. Murat CANGÜL	Hukuk	Serbest Avukat	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Doç. Dr. Eyüp HORASANLI	Anesteziyoloji	Keçiören EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Doç. Dr. Fırat HARDALAÇ	Biomedikal	Gazi Üniv. Muh. Fak. Elek. Elektronik	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Yük. Muh. Fatih DULKAN	Metalurji Muh.	Sanayi Bakanlığı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. M. Ali BUMİN	Halk Sağlığı	Gazi Ünl. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Uzm. Dr. Ece GÜL İBRİŞİM	Biyokimya	Zekai Tahir Burak EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Doç. Dr. Ömer ERDEVE	Neonatoloji	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Uğur DİLMEN	Çocuk Hast. (Neonatoloji)	Zekai Tahir Burak EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. H. Zafer GÜNEY	Farmakoloji	Gazi Ünl. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Tarkan KARAKAN	Gastroenteroloji	Gazi Ünl. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Doç. Dr. Elif Gül YAPAR EYİ	Kadın Doğum Hast.	Zekai Tahir Burak EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU	Patoloji	Zekai Tahir Burak EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
*.:Toplantıda Bulunma							
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU İmza: 							
Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer aldığı her sayfaya imza atmalıdır.							

EK-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formları

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
ZEKAI TAHİR
BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

0-6 YAŞ ARALIĞINDAKİ ÇOCUK HASTALARDA YAPILACAK
“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” DA
YER ALACAK “ÇOCUKLAR” İÇİN
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ

Sevgili.....

Benim adım Dr. Hüseyin TUNCA. Senin şu andaki hastalığın olan, Otizm Spektrum Bozukluğu konusunda bir araştırma yapıyoruz. Amacımız, bu hastalığın etkili bir tedavisini bulabilmek ve senin gibi bu hastalığa sahip olan çocukların daha az canı yanarak hastanede izlenmesini sağlamaktır.

- Araştırmaya ben, Dr. Hüseyin TUNCA ve bazı başka doktorlar ve araştırmacılar katılacaklar. Eğer sen de bu araştırmaya katılmayı istersen, sana tedavin için yapılan işlemlerin dışında herhangi bir şey yapılmayacak. Sadece, tedavin sırasında zaten sende alınacak olan kanda bu araştırma yürütülecektir. Başka hiçbir işlem yapılmayacaktır.
- Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz ancak senin adın ve tahlil sonuçlarını kimseye açıklamayacağız.
- Bu araştırma hakkında anne ve babana bilgi vereceğiz ve senin de bu çalışmaya katılıp katılmaman için onlardan izin alacağız. Sen de bu konuyu anne ve/veya baban ile konuşabilirsin. Eğer katılmak istemezsen hiç kimse sana kızmaz veya küsmez. Doktorlar sana önceden olduğu gibi iyi davranacak, tedavini aynen sürdürecektir.
- Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek soruları bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim aşağıda yazıyor.
- Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan lütfen yüzlerden birini seç. Daha sonra bu formun bir kopyası sana ve ailine verilecektir.

Çocuğun adı- soyadı:

Tarih:



Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

ADI: HÜSEYİN TUNCA

GÖREVİ : ÇOCUK VE ERGEN RUH SAĞLIĞI ANABİLİM DALINDA ARAŞTIRMA
GÖREVLİSİ DOKTOR

TELEFON : 0533 680 24 01

EK-2. (devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formları

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
ZEKİ TAHER BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

**0-6 YAŞ ARALIĞINDAKİ ÇOCUK HASTALARDA YAPILACAK
“GİRİŞİMSİZ OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” DA YER ALACAK
“SAĞLIKLI ÇOCUKLAR” İÇİN
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ**

Sevgili.....

Benim adım Dr. Hüseyin TUNCA. Senin yaşlarında olup da Otizm Spektrum Bozukluğu hastalığı olan çocuklarda bir araştırma yapıyoruz. Amacımız, bu hastalığın etkili bir tedavisini bulabilmek ve bu hastalığa sahip olan çocukların daha az canı yanarak hastanede izlenmesini sağlamaktır.

- Bu araştırmayı sürdürebilmek için hasta çocukların yanı sıra onların yaşlarına yakın olan sağlıklı çocukları da araştırmaya katmamız gerekiyor.
- Araştırmaya ben, Dr. Hüseyin TUNCA, bazı başka doktorlar ve araştırmacılar katılacaklar. Eğer sen de bu araştırmaya katılmayı istersen, bu hastaneye gelme nedenine yönelik olarak yapılacak işlemlerin dışında sana herhangi bir şey yapılmayacak. Sadece, tedavin sırasında zaten senden alınacak olan kanda bu araştırma yürütülecektir.
- Başka hiçbir işlem yapılmayacaktır.
- Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz ancak senin adını ve tahlil sonuçlarını kimseye açıklamayacağız.
- Eğer bu çalışmaya katılırsan hasta çocukların daha güvenilir ve başarılı bir şekilde tanı almasına ve tedavi edilmesine katkı sağlamış olacaksın.
- Bu araştırma hakkında anne ve babana bilgi vereceğiz ve senin de bu çalışmaya katılıp katılmaman için onlardan izin alacağız. Sen de bu konuyu anne ve/veya baban ile konuşabilirsin. Eğer katılmak istemezsen hiç kimse sana kızmaz veya küsmez.
- Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek soruları bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim aşağıda yazıyor.

Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan lütfen aşağıdaki resimlerden birini seç.

Daha sonra bu formun bir kopyası sana ve ailine verilecektir.

Çocuğun adı- soyadı:

Tarih:



Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

ADI: HÜSEYİN TUNCA

GÖREVİ : ÇOCUK VE ERGEN RUH SAĞLIĞI ANABİLİM DALINDA ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ
DOKTOR

TELEFON : 0533 680 24 01

EK-2. (devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formları

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
ZEKAI TAHİR BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

**OKUL ÇAĞINDAKİ ÇOCUK HASTALARDA YAPILACAK
“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” DA YER ALACAK
“SAĞLIKLI ÇOCUKLAR” İÇİN
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ**

Sevgili.....

Benim adım Dr. Hüseyin TUNCA. Senin yaşlarında olup da Otizm Spektrum Bozukluğu hastalığı olan çocuklarda bir araştırma yapıyoruz. Amacımız, bu hastalığın etkili bir tedavisini bulabilmek ve bu hastalığa sahip olan çocukların daha az canı yanarak hastanede izlenmesini sağlamaktır.

- Bu araştırmayı sürdürebilmek için hasta çocukların yanı sıra onların yaşlarına yakın olan sağlıklı çocukları da araştırmaya katmamız gerekiyor.
- Araştırmaya ben, Dr. Hüseyin TUNCA, bazı başka doktorlar ve araştırmacılar katılacaklar. Eğer sen de bu araştırmaya katılmayı istersen, bu hastaneye gelme nedenine yönelik olarak yapılacak işlemlerin dışında sana herhangi bir şey yapılmayacak. Sadece, tedavin sırasında zaten senden alınacak olan kanda bu araştırma yürütülecektir.
- Başka hiçbir işlem yapılmayacaktır.
- Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz ancak senin adını ve tahlil sonuçlarını kimseye açıklamayacağız.
- Eğer bu çalışmaya katılırsan hasta çocukların daha güvenilir ve başarılı bir şekilde tanı almasına ve tedavi edilmesine katkı sağlamış olacaksın.
- Bu araştırma hakkında anne ve babana bilgi vereceğiz ve senin de bu çalışmaya katılıp katılmaman için onlardan izin alacağız. Sen de bu konuyu anne ve/veya baban ile konuşabilirsin. Eğer katılmak istemezsen hiç kimse sana kızmaz veya küsmez.
- Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek soruları bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim aşağıda yazıyor.

Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan lütfen aşağıdaki resimlerden birini seç.

Daha sonra bu formun bir kopyası sana ve ailene verilecektir.

Çocuğun adı- soyadı:

Tarih:

Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

ADI: HÜSEYİN TUNCA

GÖREVİ : ÇOCUK VE ERGEN RUH SAĞLIĞI ANABİLİM DALINDA ARAŞTIRMA
GÖREVLİSİ DOKTOR

TELEFON : 0533 680 24 01

EK-2. (devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formları

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
ZEKAI TAHİR BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

**OKUL ÇAĞINDAKİ ÇOCUK HASTALARDA YAPILACAK
“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” DA YER ALACAK
“ÇOCUKLAR” İÇİN
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ**

Sevgili.....

Benim adım Dr. Hüseyin TUNCA. Senin yaşlarında olup da Otizm Spektrum Bozukluğu hastalığı olan çocuklarda bir araştırma yapıyoruz. Amacımız, bu hastalığın etkili bir tedavisini bulabilmek ve bu hastalığa sahip olan çocukların daha az canı yanarak hastanede izlenmesini sağlamaktır.

- Bu araştırmayı sürdürebilmek için hasta çocukların yanı sıra onların yaşlarına yakın olan sağlıklı çocukları da araştırmaya katmamız gerekiyor.
- Araştırmaya ben, Dr. Hüseyin TUNCA, bazı başka doktorlar ve araştırmacılar katılacaklar. Eğer sen de bu araştırmaya katılmayı istersen, bu hastaneye gelme nedenine yönelik olarak yapılacak işlemlerin dışında sana herhangi bir şey yapılmayacak. Sadece, tedavin sırasında zaten senden alınacak olan kanda bu araştırma yürütülecektir.
- Başka hiçbir işlem yapılmayacaktır.
- Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz ancak senin adını ve tahlil sonuçlarını kimseye açıklamayacağız.
- Eğer bu çalışmaya katılırsan hasta çocukların daha güvenilir ve başarılı bir şekilde tanı almasına ve tedavi edilmesine katkı sağlamış olacaksın.
- Bu araştırma hakkında anne ve babana bilgi vereceğiz ve senin de bu çalışmaya katılıp katılmaman için onlardan izin alacağız. Sen de bu konuyu anne ve/veya baban ile konuşabilirsin. Eğer katılmak istemezsen hiç kimse sana kızmaz veya küsmez.
- Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek soruları bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim aşağıda yazıyor.

Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan lütfen aşağıdaki resimlerden birini seç.

Daha sonra bu formun bir kopyası sana ve ailene verilecektir.

Çocuğun adı- soyadı:

Tarih:

Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

ADI: HÜSEYİN TUNCA

GÖREVİ : ÇOCUK VE ERGEN RUH SAĞLIĞI ANABİLİM DALINDA ARAŞTIRMA
GÖREVLİSİ DOKTOR

TELEFON : 0533 680 24 01

EK-2. (devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formları

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
ZEKAI TAHİR BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

**ÇOCUK HASTALARDA YAPILACAK OLAN
“GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR”
İÇİN “EBEVEYN” BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ**

Değerli anne ve babalar;

Çocuğunuzun, kliniğimizde yapılması planlanan “**OTİZM SPEKTRUM BOZUKLUĞU OLAN ÇOCUKLARDA SERUM D VİTAMİNİ METABOLİTLERİNİN LC-MS/MS METODU İLE ANALİTİK ÖLÇÜMÜ**” isimli bir çalışmada yer alabilmesi için sizden izin istiyoruz. Çocuğunuzun bu çalışmaya davet edilmesinin nedeni onda **Otizm Spektrum Bozukluğu** hastalığının görülmüş olmasıdır. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. **Bu araştırma kapsamında çocuğunuza herhangi bir girişim yapılmayacaktır** ancak; ona ait bazı bilgiler elde etmek istediğimiz için izninizi almak amacı ile bu form hazırlanmıştır. Çocuğunuza ait bu bilgilerin, kimliği açıklanmamak kaydı ile bilimsel amaçla kullanımını onaylar iseniz bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma hakkında çocuğunuza da bilgi vereceğiz ve ondan da bu çalışmaya katılması için izin alacağız.

Çalışmanın amaçları ve dayanağı nelerdir, çocuğumdan başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Çalışmanın amacı; Otizm Spektrum Bozukluğu olan çocuğunuzda serum D vitamini metabolitlerinin düzeylerini sağlıklı kontrol grubuna göre karşılaştırarak D vitamininin hastalık üzerinde etkisini belirleyebilmek amaçlanmıştır. Biz çocuğunuzdan kan alıp serum D vitamini metabolitlerinin düzeylerini kontrol ve hasta çocuklar ile karşılaştırarak D vitamininin Otizm Spektrum Bozukluğundaki düzeylerinin önemini belirleyeceğiz. Çalışmaya sizin çocuğunuz gibi 40 gönüllü çocuk alınacak.

Çocuğum bu çalışmaya katılırsa ne yapması gerekiyor?

Bu araştırma kapsamında çocuğunuza, tedavisi için yapılan rutin işlemlerin dışında herhangi bir girişim yapılmayacaktır. Çalışma yalnızca, tedavisi sırasında zaten ondan alınacak olan kandan yürütülecektir. Çocuğunuzun bu çalışmaya bir defa vereceği kan numunesi ile katılmış olacaktır.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları var mıdır?

Çocuğunuza rutin takip ve tedavisi dışında herhangi başka bir girişim yapılmayacağı için bir risk oluşmayacağını düşünüyoruz ancak; araştırmadan dolayı göreceği olası bir zararda gerekli her türlü tıbbi girişim tarafımızdan yapılacaktır.

Çocuğumun bu çalışmada yer almasının yararları nelerdir?

Araştırmadan beklenen toplum yararı açıklanmalıdır.

Çocuğumun bu çalışmaya katılmasının maliyeti nedir? (Bu bölüm aynen korunacaktır)

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Çocuğumun kişisel bilgileri nasıl kullanılacak? (Bu bölüm aynen korunacaktır)

Çalışma doktorunuz çocuğunuz ile ilgili kişisel bilgileri, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ve çalışma sonuçları tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak

EK-2. (devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formları

çocuğunuzun kimlik bilgileri gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, çocuğunuz ile ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız vardır.

Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?

Çalışma ilacı ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI: HÜSEYİN TUNCA

GÖREVİ : ÇOCUK VE ERGEN RUH SAĞLIĞI ANABİLİM DALINDA ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ
DOKTOR

TELEFON : 0533 680 24 01

(Katılımcı çocuğun ebeveyninin beyanı)

GÜTF Çocuk ve Ergen Ruh Hastalıkları Anabilim dalında, Dr. Hüseyin Tunca tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Çocuğumun araştırmaya katılması konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer çocuğumun çalışmaya katılmasını reddedersem, bu durumun çocuğumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Çalışmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden çocuğumu araştırmadan çekebilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımızda; herhangi bir saatte, Dr. Hüseyin Tunca' yı GÜTF Çocuk ve Ergen Ruh Hastalıkları Anabilim dalında 0533 680 24 01 nolu numaradan arayabileceğimi biliyorum. (Doktor ismi, telefon ve adres bilgileri mutlaka belirtilmelidir)

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla, çocuğumun söz konusu klinik araştırmaya katılmasını gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Tarih:

Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştırmacının adı-soyadı, ünvanı

Adres: Tel:

İmza:

**AYDINLATMA ve KATILIMCININ BEYANI KESİNLİKLE BİRBİRLERİNİN DEVAMI
ŞEKLİNDE OLACAKTIR. AYRI AYRI SAYFALARDA YER ALMAYACAKTIR.**

EK-2. (devam) Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formları

T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
ZEKAI TAHİR BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

**ÇOCUKLARDA YAPILACAK OLAN
“GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” DA YER ALACAK
“SAĞLIKLI ÇOCUĞUN EBEVEYNİNE” YÖNELİK
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ**

Değerli anne ve babalar;

Benim adım Dr. Hüseyin Tunca. Sizin çocuğunuzun yaşlarında olup da Otizm Spektrum Bozukluğu hastalığı olan çocuklarda bir araştırma yapıyoruz. Bu çalışmanın amacı hasta çocuklarla sağlıklı çocuklar arasında serum D vitamini metabolitleri arasındaki farkı bularak D vitaminin hastalık üzerindeki etkisini belirleyebilmektir ve bu hastalığa sahip olan çocukların daha az canı yanarak hastanede izlenmesini sağlamaktır.

Bu araştırmayı sürdürebilmek ve sonuçları doğru değerlendirilebilmek için aynı yaş gruplarında sağlıklı çocuklar ile karşılaştırılmalarına gereksinim vardır.

Araştırmaya ben, Dr. Hüseyin Tunca ve bazı başka doktorlar katılacaklar. Eğer sizin çocuğunuzun da bu araştırmaya katılmasını isterseniz bu hastaneye gelme nedenine yönelik olarak yapılacak işlemlerin dışında çocuğunuza herhangi bir girişim yapılmayacaktır. Sadece, tedavisi sırasında zaten ondan alınacak olan kanda/yapılacak olan serum tetkikinde bu araştırma yürütülecektir.

Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz ancak sizin çocuğunuzun adını ve tahlil sonuçlarını kimseye açıklamayacağız.

Eğer çocuğunuzun bu çalışmaya dahil edilmesine izin verirsiniz Otizm Spektrum Bozukluğu hastalığına sahip olan akranlarının daha güvenilir ve başarılı bir şekilde tanı almasına ve tedavi edilmesine katkı sağlamış olacaksınız. Bu araştırma hakkında çocuğunuza da bilgi vereceğiz ve ondan da bu çalışmaya katılması için izin alacağız. Aklınıza şimdi gelen veya daha sonra gelecek soruları bana sorabilirsiniz. Telefon numaram ve adresim aşağıda bulunmaktadır.

Çocuğunuzun bu araştırmaya katılmasını kabul ediyorsanız lütfen aşağıya adını ve soyadını yazarak imzanızı atınız. Daha sonra bu formun bir kopyası size verilecektir.

Çocuğun adı- soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı- soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştıracının adı-soyadı, ünvanı

Adres:

Tel:

İmza:

EK-3. Sosyodemografik Veri Formu

Sosyodemografik Bilgiler			
Başvuru Tarihi:		Tlf:	
Hastanın		Hastanın Gebelik Öyküsü	
Adı:		Dğm Haftası:	Dğm Kilosu/Boy:
Yaş:	Dosya No:	Dğm Komplikasyonu/Sarılık:	
Tanı:	Tanı Yaşı:	Gebelikte Geçirilen Hastalıklar:	
Tedavi:		Gebelikte İlaç/Alkol/Madde/Sigara:	
Boynu Tutma:	Oturma:	Annenin Toplam Gravida/Parite/Abortus:	
Emekleme:	Yürüme:	Hasta Kaçınıcı Gebelikte Doğdu:	
Agulama:	İlk Kelime:	Doğum Anında Anne/Baba Yaşı:	
İki Kelime:	Kelime Sayısı:	Gebelik ve Çocuklukta İkamet Yeri (Otoyol, Fabrika),	
Primer Bakım Veren:		Kiminle Yaşar:	
Tv/Tablet/Bilgisayarda Geçirdiği Süre:			
Anne		Baba	
Ad:		Ad:	
Yaş:	Eğitim Düzeyi:	Yaş:	Eğitim Düzeyi:
Gebelik Sırasında ve Şuan ki İş:		Gebelik Sırasında ve Şuan ki İş:	
Hastalık/ Premorbid Öy/ Alkol/ Madde/ Sigara:		Hastalık/ Premorbid Öy/ Alkol/ Madde/ Sigara:	
Yakınlarının Hastalık Öy:		Yakınlarının Hastalık Öy:	
Ölçekler:		Ölçekler:	
Aile Yapısı (A-B Ayrı/Birlikte),		Sosyoekonomik Düzey:	

EK-3. (devam) Sosyodemografik Veri Formu

Hastanın Takip Formu	
Takipte Uygulanan Ölçekler	Klinik İzlem
Kardeş Öyküsü	
Kardeş Sayısı:	Hastalık
Cinsiyet, Yaş ve Eğitim Durumları:	Öyküleri:
Takipteki Lab Sonuçları	

EK-4. Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği

I. İnsanlarla İlişki

1 İnsanlarla ilişkisinde güçlükle veya anormallik kanıtı yok-Çocuğun davranışları yaşına uygun. Yapacağı şeyler anlatıldığında biraz utanma, mızımlık veya sıkıntı gözlenebilir, fakat atipik derecede değildir.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal ilişkiler-çocuk yetişkinin gözüne bakmaktan kaçınabilir, ilişkiye zorlandığında yetişkinden kaçınabilir veya mızımlık yapabilir, aşırı utangaç olabilir, tipik olarak yetişkine yanıt vermeyebilir veya aynı yaştaki çocuklardan biraz daha fazla olarak anne babaya yapışkanlık gösterebilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal ilişkiler-çocuk çoğu zaman soğuk (uzak)(yetişkinin farkında değilmiş gibi gözükür) tur. Çoğu zaman çocuğun dikkatini çekmek için ısrarcı ve zorlu çabalar gerekir. Az derecede ilişki çocukla yapılabilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Aşırı derecede anormal ilişkiler-Çocuk belirgin derecede uzak ve soğuktur veya yetişkinin yaptıkları şeylerin farkında değildir. Hemen hemen hiç yetişkine yanıt vermez veya ilişki başlatmaz. Çok ısrarcı çabalarla bile çocuğun dikkati hiçbir şekilde çekilemez.

II. Taklit

1 Uygun taklit-Çocuk beceri düzeyine uygun olan sesleri, kelimeleri ve hareketleri taklit edebilir.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal taklit-Çoğu zaman çocuk alkış veya tek cümlelik basit davranışları taklit edebilir; nadiren zorlama veya özendirme sonrası veya gecikmeli olarak taklit eder.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal taklit-Çocuk yalnızca yetişkinin büyük ısrarı ve yardımı olduğu zamanlarda taklit eder; sıklıkla yalnızca bir gecikme sonrası taklit eder.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Aşırı derecede anormal taklit-Yetişkinin özendirme, zorlama ve yardımı olsa bile, ses, kelime veya hareketleri nadiren veya hiç taklit etmezler.

III. Duygusal Tepki

1 Yaş ve duruma uygun duygusal tepkiler- Çocuk, yüz ifadesi, duruş ve tarzında bir değişikliğin görüldüğü, uygun tip ve derecede duygusal tepki gösterir.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal duygusal tepkiler-çocuk nadiren biraz uygunsuz tip ve derecede duygusal tepkiler gösterir. Tepkiler bazen çevresindeki nesne veya olaylarla ilişkisizdir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal duygusal tepkiler-çocuk belirgin şekilde uygunsuz tip ve/veya derecede duygusal tepki gösterirler. Tepkiler oldukça kaçınan veya aşırı ve durumla ilişkisiz olabilir; grimas, gülme olabilir veya belirgin duygusal tepki oluşturan nesne veya olaylar olmasa bile katı olabilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Aşırı derecede anormal duygusal tepkiler-tepkiler nadiren duruma uygundur. Çocuk belirli duygu duruma geldiğinde, duygu durumunu değiştirmek çok zordur. Ters olarak hiçbir değişiklik olmadığı zaman çok farklı duygulanımlar gösterebilir.

IV. Vücut Kullanımı

1 Yaş uygun vücut kullanımı-çocuk aynı yaştaki normal çocuklarla aynı kolaylık, çeviklik ve koordinasyonla hareket eder.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal vücut kullanımı- bazı minör tuhaflıklar olabilir, örneğin sakarlık, tekrarlayıcı davranışlar, zayıf koordinasyon veya nadiren daha olağandışı davranışların gözlenmesi.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal vücut kullanımı-Bu yaş çocuğu için açıkça tuhaf veya olağandışı davranışlar şunlar olabilir: garip parmak hareketleri, acayip parmak

EK-4. (devam) Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği

veya vücut postürü, vücudu dikleştirme veya toplama, kendine yönelik saldırganlık, sallanma, kendi etrafında dönme, parmak oynatma veya parmak uçlarında yürüme.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Orta derecede anormal vücut kullanımı-yukarıda sayılan davranışları yoğun veya sık göstermesi. Bu davranışlar engellemeye çalışma veya diğer etkinliklere çocuğu katılmasına rağmen devam edebilir.

V. Nesne Kullanımı

1 Oyuncak ve diğer nesneleri ilgilenme ve uygun kullanma-beceri düzeylerine uygun oyuncak ve diğer nesnelere uygun ilgi gösterme ve bu oyuncakları uygun tarzda kullanma.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Oyuncak ve diğer nesnelere ilgi ve kullanmada hafif derece uygunsuzluk-çocuk bir oyuncığa atipik ilgi gösterebilir veya uygunsuz çocuksu tarzda oynayabilir (örneğin, oyuncayı etrafa çarpma veya emme)

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Oyuncak ve diğer nesnelere ilgi ve kullanmada orta derece uygunsuzluk-çocuk oyuncak ve diğer nesnelere az ilgi gösterebilir veya bazı tuhaf şekilde bir oyuncak veya nesne kullanarak zaman geçirir. Oyuncanın önemsiz bir parçasına odaklanabilir, ışık saçan nesnelere hayranlık duyabilir, nesnenin bir kısmın tekrarlayıcı bir tarzda hareket ettirebilir veya bir obje ile sürekli oynayabilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Oyuncak ve diğer nesnelere ilgi ve kullanmada aşırı derece uygunsuzluk-çocuk yukarıda bahsedilen davranışları yoğunluk ve sıklık olarak daha fazla gösterir. Çocuğu bu uygunsuz etkinliklerden ayırmak güçtür.

VI. Değişikliklere Uyum Sağlama

1 Değişikliklere yaşına uygun tepki- günlük sıradanlıktan değişiklik gösterdiği zaman, çocuk büyük bir sıkıntı göstermeksizin, bu değişiklikleri kabul eder.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Değişikliklere uyumda hafif derecede anormallik-yetişkin görevleri değiştirmeye çalıştığında, çocuk aynı

aktivitesine devam edebilir veya aynı materyali kullanabilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Değişikliklere uyumda orta derecede anormallik-çocuk rutinden olan değişikliklere aktif olarak direnç gösterir veya eski etkinliğine devam etmeye çalışır. Ve onu bu etkinlikten uzaklaştırmak güçtür. Rutini değiştirdiği zaman kızgın veya mutsuz olabilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Değişikliklere uyumda aşırı derecede anormallik-çocuk değişikliklere aşırı tepki gösterir. Değişiklik için zorlandığında, aşırı kızgın veya bozulmuş işbirlikçi olur ve öfke nöbetleri gösterir.

VII. Görsel Tepki

1 Yaşına uygun görsel tepki-çocuğun görsel davranışı normaldir ve yaşına uygundur. Görme, yeni bir nesneyi araştırma şekli olarak diğer duyularla birlikte kullanılır.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal görsel tepki- çocuk nesnelere bakmayı çok daha nadiren hatırlar. Çocuk arkadaşlarından çok aynalara veya ışıklara bakmakla daha ilgili olabilir. Nadiren boşluğa bakıp durabilir veya insanların gözüne bakmaktan da kaçınabilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal görsel tepki-yaptığı şeye büyük olasılıkla bakmaktadır. Boşluğa bakıp durabilmektedir, insanların gözlerine bakmaktan kaçınmaktadır, nesnelere olağandışı açıdan bakmaktadır veya neneleri tutmak için gözlerini çok yaklaştırmaktadır.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Aşırı derecede anormal görsel tepki-çocuk belirgin derecede insanlara ve belirli nesnelere bakmaktan kaçınır ve yukarıda sayılan diğer görsel tuhaflikların ileri şekilleri gözlenebilir.

VIII. Dinleme Tepkisi

1 Yaşına uygun dinleme tepkisi-çocuğun dinleme davranışı normaldir ve yaşına uygundur. Dinleme diğer duyularla birlikte kullanılır.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

EK-4. (devam) Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği

2 Hafif derecede anormal dinleme tepkisi-tepkide kısmi eksiklikler olabilir veya belli seslere hafif aşırı tepkiler olabilir. Seslere tepkiler gecikmiş olabilir ve çocuğun dikkatini çekmek için sesleri tekrarlamak gerekebilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal dinleme tepkisi-çocuğun seslere tepkisi çeşitlidir; sıklıkla ilk bir kaç kez duyduğu seslere karşı umursamazdır; her gün duyduğu sesleri işittiğinde irkilebilir veya kulaklarını kapayabilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 İleri derecede anormal dinleme tepkisi-çocuk seslere karşı, sesin tipine bakmaksızın, aşırı tepki gösterir ve/veya hiç tepki göstermez.

IX. Tad, Koku Ve Dokunma Tepkileri Ve Kullanımı

1 Tat, koku ve dokunmayı normal kullanma ve normal tepki-çocuk yeni nesneleri yaşına uygun bir tarzda araştırır, genellikle hissederek ve bakarak. Uygun olduğunda tat ve koku kullanılabilir. Az bir ağrıya reaksiyon olduğunda çocuk rahatsızlığını ifade eder fakat aşırı tepki göstermez.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Tat, koku ve dokunmayı hafif derecede anormal kullanma ve tepki-çocuk nesneleri ağzına götürmekte ısrarcı olabilir; yenmeyen nesneleri koklayabilir veya tadabilir; hafif bir acıya normal çocuğun gösterdiği huzursuzluğu göstermeyebilir veya aşırı gösterebilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Tat, koku ve dokunmayı orta derecede anormal kullanma ve tepki-çocuk nesne ve insanlara dokunma, koklama veya tatma ile orta derecede meşgul olur. Acıya ya çok tepki veya çok çok az tepki gösterir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Tat, koku ve dokunmayı ileri derecede anormal kullanma ve tepki- çocuk nesne ve insanlara dokunma,

koklama veya tatma ile aşırı derecede meşgul olur. Acıya ya aşırı tepki veya hiç tepki göstermez.

X. Korku veya Ürkeklik

1 Normal korku veya ürkeklik-çocuğun davranışı hem durum hem de yaşıyla uygundur.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal korku veya ürkeklik-aynı yaştaki bir çocuğun benzer ortamda gösterdiği tepkiyle karşılaştırıldığında, çocuk çok az korku ve ürkekliği sık gösterir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal korku veya ürkeklik- aynı yaştaki bir çocuğun benzer ortamda gösterdiği tepkiyle karşılaştırıldığında, çocuk oldukça çok az veya çok fazla korku ve ürkekliği sık gösterir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Aşırı derecede anormal korku veya ürkeklik- aynı yaştaki bir çocuğun benzer ortamda gösterdiği tepkiyle karşılaştırıldığında, çocuk oldukça çok az veya çok fazla korku ve ürkekliği sık gösterir.

XI. Sözel İletişim

1 Yaş ve duruma uygun normal sözel iletişim

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal sözel iletişim-konuşma bütünüyle geridir. Konuşmanın çoğu anlamlıdır; bazen ekolali veya zamiri ters kullanma olabilir. Nadiren bazı tuhaf kelimeler veya jargon kullanabilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal sözel iletişim-konuşma olmayabilir. Var olduğunda, sözel iletişimde bazı anlamlı konuşma içinde jargon, ekolali veya zaminin ters kullanımı gibi tuhaf konuşması olabilir. Anlamlı konuşmadaki tuhafliklar aşırı soru sorma veya özel bir konu ile aşırı uğraşmayı da içerir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 İleri derecede anormal sözel iletişim-anlamlı konuşması olmaz. Çocuk bebens sesler, tuhaf veya hayvansı sesler, konuşmayı andıran karmaşık sesler çıkarabilir veya bazı anlaşılan kelimelerin veya cümleciklerin ısrarlı bizar kullanımı olabilir.

EK-4. (devam) Çocukluk Otizmini Derecelendirme Ölçeği

XXII. Sözel Olmayan İletişim

1 Yaş ve duruma uygun normal sözel olmayan iletişim

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal sözel olmayan iletişim kullanma-sözel olmayan iletişimin immatür

kullanımı çocuğun istediği şeye işaret eden jestlerde yalnızca belirsizlik olabilir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal sözel olmayan iletişim kullanma-çocuk gereksinim veya arzularını nonverbal olarak belirtememektedir ve diğerlerinin sözel olmayan iletişimlerini anlayamamaktadır.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 İleri derecede anormal sözel olmayan iletişim kullanma-çocuk yalnızca açık anlamı olmayan bizar veya tuhaf jestler kullanır veya başkalarının jestlerinin veya yüz ifadeleri ile ilişkili anlamların farkında değilmiş gibi gözükür.

XIII. Etkinlik Düzeyi

1 Yaşam ve şartlara uygun normal etkinlik düzeyi-çocuk benzer durumdaki aynı yaş normal çocuğa göre çok veya az etkin değildir.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal etkinlik düzeyi-çocuk hafif derecede hareketli veya biraz tembel olabilir ve çoğu zaman yavaş hareket eder. Çocuğun etkinlik düzeyi onun performansının hafif derecede etkiler.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal etkinlik düzeyi-çocuk çok aktif ve kısıtlanması güç olabilir. Sınırsız bir enerjiye sahip olabilir ve gece kolayca uyumaya gitmeyebilir. Ters olarak çocuk oldukça uyuşuk olabilir ve onu hareket ettirmek için sürekli çaba gerekir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 İleri derecede anormal etkinlik düzeyi-çocuk aşırı aktivite ya da aşırı inaktivite gösterir ve bir uçtan diğer uca kaymalar gösterebilir.

XIV. Entellektüel Yanıtın Düzeyi ve Uygunluğu

1 Normal ve pek çok alanda uygun tutarlılık gösteren zekâ: Çocuk aynı yaştaki tipik çocuklar kadar zekidir ve olağandışı zihinsel becerileri ya da problemleri yoktur.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif derecede anormal zihinsel işlevsellik: Çocuk aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değildir, yaklaşık tüm alanlarda beceriler aynı düzeyde gerilik gösterir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede anormal zihinsel işlevsellik: Çocuk genel olarak aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değildir, ancak bir ya da daha fazla alanda normale yakın işlevsellik gösterebilir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Ağır derecede anormal zihinsel işlevsellik: çocuk aynı yaştaki tipik bir çocuk kadar zeki değilken, zihinsel gelişimim bir ya da daha fazla alanında normal bir çocuktan bile daha iyi işlev gösterebilir.

XV. Genel İzlenimler

1 Otizm yok: Çocuk otizme ait belirtilerin hiçbirini göstermez.

1.5 (Bu puanlar arasında ise)

2 Hafif otizm: çocuk yalnızca az sayıda ya da yalnızca hafif derecede otizm belirtileri gösterir.

2.5 (Bu puanlar arasında ise)

3 Orta derecede otizm: çocuk belirli sayıda ya da orta derecede otizm belirtileri gösterir.

3.5 (Bu puanlar arasında ise)

4 Ağır otizm: Çocuk otizm belirtilerinden çoğunu ya da ağır derecede otizm gösterir.

15-29 Otizm yok

30-37 Hafif-Orta Derecede Otizm

38-60 Ağır Derecede Otizm

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YÜKSEL, Seher
 Uyuğu : Türkiye Cumhuriyeti
 Doğum tarihi ve yeri : 1983-Ankara
 Medeni Hali : Bekar
 Telefon : 0539 478 22 03
 e-mail : seheryuksl@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	02 / 06 / 2011
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	12 / 06 / 2006

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Aydoğdu M, Boyacı N, Yüksel S, Gürsel G, Sivri AB. “A promising marker in early diagnosis of septic acute kidney injury of critically ill patients: urine insulin like growth factor binding protein-7”. Scand J Clin Lab Invest. 2016 May 31:1-9.
2. Sezgin B, Ozmen S, Bulam H, Omeroglu S, Yuksel S, Cayci B, Peker T. “Improving fat graft survival through preconditioning of the recipient site with microneedling”. J Plast Reconstr Aesthet Surg.,2014 May; 67(5),712-20.
3. Aydoğdu M, Gürsel G, Sancak B, Yeni S, Sarı G, Taşyürek S, Türk M, Yüksel S, Senes M, Ozis TN. “The use of plasma and urine neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) and Cystatin C in early diagnosis of septic acute kidney injury in critically ill patients” Dis Markers.2013;34(4),237-46

Bildiriler

1. B. Eser, M. Çınar, **S. Yüksel**, R. Tural, A. Sepici Dinçel, “FMF hastalarında plazma kolşisin seviyeleri ile MDA düzeylerinin karşılaştırılması” Türk Biyokimya Derneği, Biyokimya Günleri.2-5 Kasım 2016, Sivas, Türkiye.
2. S. Muratoglu , A. Sepici Dincel , N. Oksuz , **S. Yüksel**, Z. Gunendi, J. Meray, A. Bilgihan, “The effect of exercises on serum Bmp-6 levels of knee osteoarthritis” The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016) 129–417. 3-8 September 2016, Kuşadası, Turkey.
3. Cayci B., Gunaydin B., **Yüksel S.**, Söylemez S., Altundarak C., “Acute effect of moderate exercise on oxidative stress in smoker and non-smoker subjects” International Symposium of Sports Medicine Programme-World Medical and Health Games 28th May- 4th June 2016, Maribor Slovenia.
4. Duygu ÖZSOY, Ayşe Banu Çaycı Sivri, **Seher Yüksel**, Durmuş Ayan, Ezgi Ilgan Yüksel, Sevim Eren Eşmedere, Elvan İşeri, Hüseyin Tunca, Nevin Şanlıer, Emine Yassıbaş “Antipsikotik ilaç kullanan çocuklarda adiponektin, IL-6 ve TNF- α ’nın obezite gelişimi üzerine etkisi” XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 November 2015, Antalya Turkey.
5. Ezgi Ilgan Yüksel, Ayşe Banu Çaycı, Durmuş Ayan, **Seher Yüksel**, Duygu Özsoy, Sevim Eşmedere Eren, Elvan İşeri, Şahnur Şener, Hüseyin Tunca, Nevin Şanlıer, Emine Yassıbaş “Leptin, Vaspın ve Chemerin’in antipsikotik ilaç kullanan çocuklarda obezite gelişimi üzerine etkisi” XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 November 2015, Antalya Turkey.
6. M.Yaman, S. Karacan, F.F. Çolakoğlu, G. İpekoğlu, F. Er, S.Gönülateş, **S.Yüksel**, B.Çaycı “The effects of isotonic drink’s intaken pre orienteering competition upon serum IL-6 & IL-1 β cytokine level” 4th International Conference on Science Culture and Sport 22-26 May 2015 Ohrid/ Makedonya.
7. Müge Aydoğdu, Nazlıhan Boyacı, **Seher Yüksel**, Gül Gürsel, Ayşe Banu Çaycı Sivri “Septik akut böbrek yetmezliği erken tanısında idrar hücre siklusu duraklama belirteçleri: TIMP-2 ve IGFBP-7’nin yeri” 11th Congress of The Turkish Society of

Medical and Surgical Intensive Care Medicine Oral Presentations, 3rd Euro-Asian Critical Care Meeting, 12-15 November 2014, Antalya Turkey.

8. I. Yetkin , D. Ayan, A. B. Caycı , **S. Yuksel** , M. Colbay “ The role of the MMP2 and MMP9 in progression of atherosclerosis with type II diabetes mellitus patients” The FEBS Journal-Volume 282 Supplement 1 July 2015 Berlin, Germany.
9. D. Ayan, B. Cayci, **S. Yuksel**, M. Colbay, I. Yetkin, H. Ozdemir, “The role of lipoprotein dependent phospholipase A2 on development of atherosclerosis in patients with type-2 diabetes mellitus”, IFCC-WorldLab 22-26 June 2014 Istanbul, Turkey.
10. B. Cayci, **S. Yuksel**, D. Ayan, I. Yetkin1, M. Colbay “The role of serum sICAM-1 and sVCAM-1 levels on development of atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus”, IFCC-WorldLab 22-26 June 2014 Istanbul, Turkey.
11. M. Şeneş, A.B.Ç. Sivri, Ö. Coşkun, S. Üçler, **S. Yüksel**, D. Yücel, “Vitamin B6, B12 and folic acid deficiency in migraine and tension type headache”, IFCC-WorldLab 22-26 June 2014 İstanbul, Turkey.
12. Ramazan Kozan, **Seher Yüksel**, Mehmet Şeneş, Ayşe Banu Sancak, Mustafa Şare, Şükrü Bozkurt “Ratlarda Uzamış Pnömooperitoneumun Renal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi” 7.Cerrahi Araştırma Kongresi, 07-09 Kasım 2013 – Ankara
13. **Seher Yüksel**, Durmuş Ayan, Banu Çaycı, İlhan Yetkin, Mehmet Çölbay “Diyabet, ateroskleroz ve serum PAI-1, MCP-1, Visfatin, Rezistin arasındaki ilişki” XXV. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3 - 6 Eylül 2013, İzmir, Türkiye.
14. Sezgın B, Ozmen S, Bulam H, Omeroglu S, **Yuksel S**, Cayci B (Sözel Bildiri: OP-165 Improving fat graft survival through preconditioning of the recipient site with microneedling, 48th Congress of the European Society for Surgical Research, 29 May-1 June 2013, Istanbul, Turkey.
15. Sezgın B, Ozmen S, Bulam H, Omeroglu S, **Yuksel S**, Cayci B (Sözel Bildiri: Improving fat graft survival through preconditioning of the recipient site with microneedling. 2nd Annual EURAPS Research Council, 22-23 May, 2013, Antalya, TURKEY

16. **Seher YÜKSEL**, Banu ÇAYCI, Durmuş AYAN, Mehmet ÇÖLBAY, İlhan YETKİN, “Tip II Diabetes Mellitus’lu hastalarda yağ dokusundan salınan adipokinlerin ateroskleroz gelişmesindeki rolü” XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2011, Adana, Türkiye.
17. Müge Aydoğdu, Gül Gürsel, Banu Sancak, Serpil Yeni, Gülçin Sarı, Seçil Taşyürek, Murat Türk, **Seher Yüksel**, Mehmet Şenes, Türkan Nadir Öziş, Ayşen Karademir, Aykut Türk, Nimet Erbasan, “Yoğun bakım hastalarında plazma ve idrar cystatin-C ve NGAL düzeylerinin septik akut böbrek hasarını tahmin etme özelliklerinin karşılaştırılması, 8. Ulusal Dahili ve Cerrahi Bilimler Yoğun Bakım Kongresi, 2011.
18. Merter Gulen, MD, Mustafa Sare, MD, Banu Sancak, MD, Mehmet Senes, MD, **Seher Yuksel**. “Effects of Carbon Dioxide Pneumoperitoneum On Renal Function in Obstructive Jaundice: An Experimental Study in a Rat Model”, SAGES 2012 Annual Meeting.

Ödül

“Tip II Diabetes Mellitus’lu hastalarda yağ dokusundan salınan adipokinlerin ateroskleroz gelişmesindeki rolü” isimli çalışmam XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi’nde ödüle değer bulunmuştur.



GAZİ GELECEKTİR..

