

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI**

NUTRİSYONEL RİKETSDE OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİ

Yrd. Doç. Dr. Hakan DÖNERAY

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Zerrin ORBAK**

Yan Dal Uzmanlık Tezi

ERZURUM-2006

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
Onay sayfası.....	II
Teşekkür.....	III
Özet.....	IV
Abstract.....	VI
Kısaltmalar.....	VIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nutrisyonel rikets.....	3
2.1.1. D vitamini metabolizması.....	3
2.1.2. Kalsiyum regülasyonu.....	4
2.1.3. Fosfor regülasyonu.....	4
2.1.4. Nutrisyonel riketsin nedenleri.....	5
2.1.5. Riketsin fizyopatolojisi.....	6
2.1.6. Riketste klinik.....	7
2.1.7. Riketste tanı.....	9
2.1.8. Nutrisyonel riketste tedavi.....	9
2.2. Serbest radikaller.....	10
2.2.1. Nitrik oksit (NO)	11
2.2.2. Serbest radikallerin uzaklaştırılması.....	12
(Antioksidan savunma sistemleri)	
2.2.3. Oksidatif stres.....	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
4. BULGULAR.....	17
5. TARTIŞMA.....	25
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	29
7. KAYNAKLAR.....	30
8. EK-1.....	36
9. EK-2.....	37

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Kurulu, “Nutrisyonel Riketsde Oksidatif Stres Belirteçleri” başlıklı konunun Yrd. Doç. Dr. Hakan DÖNERAY’a Pediatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Yan Dal Uzmanlık Tezi olarak verilmesine ve tez yönetiminin Prof. Dr. Zerrin ORBAK tarafından yürütülmesine karar verdi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu’nun 21.10.2005 tarih ve 87 numaralı kararıyla ilgili tezin etik kurul onayı alındı ve Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı’nın 28.12.2005 tarihli kararıyla tez konusu olarak kabul edildi.

TEŞEKKÜR

Yan Dal Uzmanlık eğitimim süresince hoşgörü, emek ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında bilgi ve deneyimleri ile bana büyük katkıda bulunan tez hocam sayın Prof. Dr. Zerrin ORBAK'a, ihtisasım boyunca tüm enerjisini yetişmem için sarfeden, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bilgi ve tecrübesinden faydalandığım hocam sayın Prof. Dr. Behzat ÖZKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmanın veri toplama aşamasında destek olan tüm doktor arkadaşlarıma ve Pediatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı'ndan Hem. Gülseren DÜMLÜ ve Hülya ARDAHANLI'ya ve laboratuvar çalışmalarını büyük bir ciddiyet ve titizlik içinde yürüten, çalışmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Abdülkadir YILDIRIM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yrd. Doç. Dr. Hakan DÖNERAY

ÖZET

Organizmada normal metabolik reaksiyonlar sırasında üretilen serbest radikaller, antioksidan moleküllerle denge halindedir. Bu kritik dengenin serbest radikallerin aşırı birikimi veya antioksidanların eksikliğine bağlı olarak bozulması sonucunda oksidatif stres oluşmaktadır. İn vitro çalışmalar, oksidatif streste aktif D vitamininin tartışmalı bir role sahip olduğunu göstermektedir. Nutrisyonel rikets daha çok D vitamini eksikliği sonucunda görülen bir hastalıktır. Literatürde D vitamini eksikliğinin oksidatif stres üzerinde olan etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, nutrisyonel riketsli hastalarda D vitamini eksikliğinin oksidan ve antioksidan moleküller üzerine olan etkisini araştırmaktır.

Nutrisyonel rikets tanısı almış 20 çocuk (12 erkek, 8 kız) çalışmaya dahil edildi. Tüm hastaların antropometrik ölçümleri normal sınırlar içindeydi ve hiçbirisinin sistemik hastalık veya lokal enfeksiyona ait muayene bulgusu yoktu. Tüm hastalara parenteral olarak tek doz 300.000 IU 25(OH) D ve oral olarak 10 gün boyunca 50 mg/kg/gün dozunda kalsiyum laktat verildi. Tedaviden önce ve tedaviden bir ay sonra alınan kan örneklerinde serum total kalsiyum (Ca), fosfor (P), alkalen fosfataz (ALP), 25-hidroksivitamin D (25(OH) D), paratiroid hormon (PTH), nitrik oksit (NO), malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ölçüldü ve el bilek grafileri değerlendirildi.

Tedaviden sonra, serum total Ca, P, 25(OH) D ve NO düzeyleri anlamlı olarak arttı (sırasıyla, $p<0.001$, 0.01, 0.001 ve 0.01), buna karşılık ALP ve PTH düzeyleri anlamlı olarak azaldı (sırasıyla, $p<0.05$ ve 0.001). Serum MDA ve

GSH düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunmadı. Vitamin D'nin serum Ca ve P düzeyleri ile pozitif (sırasıyla $p<0.001$ ve 0.001) ve ALP ve PTH düzeyleri ile negatif korele olduğu bulundu (sırasıyla, $p<0.05$, ve 0.001). NO'nin serum Ca, P ve 25(OH) D düzeyleri ile pozitif (sırasıyla, $p<0.01$, 0.05 ve 0.01) ve PTH düzeyi ile negatif korele olduğu saptandı($p<0.01$).

Sonuç olarak, D vitamini eksikliği organizmada oksidatif strese yol açmamaktadır ve muhtemelen hipokalsemiye bağlı olarak NO düzeylerini azaltmaktadır.

Anahtar kelimeler: Nutrisiyonel rikets, oksidatif stres.

ABSTRACT

Free radicals generated during normal metabolic reactions in the organism are in balance with antioxidant molecules. Oxidative stress occurs when this critical balance is disrupted due to depletion of antioxidants or excess accumulation of free radicals. In vitro studies are showed that active vitamin D has a controversial role in oxidative stress. However, there is no presence any study examining effect on oxidative stress of vitamin D deficiency in the literature. The aim of this study investigates effects on the oxidant and antioxidant molecules of vitamin D deficiency in patients with the nutritional rickets.

Twenty children (12 male, 8 female) diagnosed nutritional rickets were included the study. All of them had normal anthropometric measures and no findings of systemic disease or local infection. All patients were given parenterally 300.000 IU of single dose 25(OH) D and perorally 50-mg/kg/d calcium lactate for ten days. Serum total calcium (Ca), phosphorus (P), alkaline phosphatase (ALP), 25-hydroxyvitamin D (25(OH) D), parathyroid hormone (PTH), nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) levels were measured in blood samples and hand-wrist X-rays were evaluated before and after treatment.

After treatment, serum total Ca, P, 25(OH) D, and NO levels were significantly increased ($p < 0.001$, 0.01, 0.001, and 0.01, respectively), while ALP and PTH levels were significantly decreased ($p < 0.05$, and 0.001, respectively). There was no a significant difference in serum MDA and GSH levels. Vitamin D

correlated positively with Ca and P ($p < 0.001$, and 0.001 , respectively) but negatively with ALP and PTH ($p < 0.05$, and 0.001 , respectively). NO correlated positively with Ca, P, and 25(OH) D ($p < 0.01$, 0.05 , and 0.01 , respectively) but negatively with PTH ($p < 0.01$).

In conclusion, in the vitamin D deficiency in the organism, NO level decreases, as due to probably hypocalcemia, and oxidative stress does not occur.

Key words: Nutritional rickets, oxidative stress.

KISALTMALAR

NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NO₃	: Nitrat
GSH	: Glutasyon
MDA	: Malondialdehit
25 (OH) D	: 25 Hidroksivitamin D
1,25 (OH)₂D	: 1,25 Dihidroksivitamin D

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Serbest radikaller, eşleşmemiş bir elektrona sahip ve oldukça reaktif olan atom veya moleküllerdir (1). Organizmada metabolik reaksiyonlar sırasında fizyolojik düzeyde serbest radikaller oluşmaktadır. Buna karşılık, radyasyon, sigara dumanı, hava kirliliğine neden olan kimyasal maddeler, antineoplastik ilaçlar, enfeksiyon, cerrahi operasyon ve travma gibi stresli durumlar patolojik düzeyde serbest radikal üretimine neden olurlar (2). Fizyolojik düzeydeki serbest radikaller, hücrelerin biyolojik fonksiyonları için gereklidir (3). Serbest radikallerin patolojik düzeydeki artışı ise hücrelerin yapı taşlarını olumsuz yönde etkileyerek hücre ölümüne neden olmaktadır (4). Bu yüzden serbest radikallerin organizmada optimal düzeyde tutulması gereklidir. Antioksidanlar, serbest radikallerle enzimatik veya non-enzimatik reaksiyonlara girerek patolojik düzeyde serbest radikal oluşumunu önlerler. Serbest radikallerin aşırı birikimi veya antioksidanların eksikliğine bağlı olarak kritik dengenin serbest radikaller lehine bozulması durumu “oksidatif stres” olarak adlandırılmaktadır (5).

Hücrelerin serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma sistemleri, protein, lipidler, fitokimyasallar, mineraller ve vitaminler gibi farklı besin öğeleri tarafından etkilenmektedir (4). Vitaminlerin çoğu, serbest radikal oluşumunu azaltarak ve antioksidanların aktivitesini artırarak oksidatif stres oluşumunu önlemektedir (4). Aktif D vitamini ile ilgili çalışmalar, D vitamininin makrofaj, mikroglia ve asositlerde bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO) üretimini azalttığını ve astrositlerde bir antioksidan olan glutatyon (GSH) düzeyini arttırdığını göstermektedir (6-8). Buna karşılık, aktif D vitamininin *Mikobakterium bovis* enfeksiyonundaki rolünü araştıran bir çalışmanın bulguları, aktif D vitaminine bağlı

fagosit içi bakteri ölümündeki artışın NO ile ilişkili bir mekanizma sonucunda meydana geldiğini düşündürmektedir (9). Bir başka çalışma insan monosit hücrelerinde aktif D vitamininin NO bağımlı bir mekanizma ile serbest bir radikal olan hidrojen peroksit üretimini arttırdığını göstermiştir (10). Belirtilen in vitro çalışmalar, aktif D vitamininin bazı hücrelerde serbest radikal üretimi üzerine olan etkisinin tartışmalı olduğunu düşündürmektedir. D vitamini eksikliği özellikle küçük çocukları ilgilendiren önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bununla birlikte literatürde D vitamini eksikliğini in vivo olarak serbest radikaller ve antioksidanlar üzerine olan etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, D vitamini eksikliğine bağlı gelişen nutrisyonel riketsli hastalarda oksidatif stres düzeyini in vivo olarak araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NUTRİSYONEL RİKETS

Rikets; kalsiyum, fosfor veya her iki elementin eksikliğine bağlı olarak kemik matriksinin azalmış mineralizasyon sürecinde gelişen bir hastalıktır (11). D vitamini, kalsiyum ve fosfatın intestinal absorpsiyonundan sorumlu olduğu için riketsin fizyopatolojisinde rol oynamaktadır. Nutrisyonel rikets terimi ile diyetle yetersiz Ca, P ve D vitamini alımı sonucu ortaya çıkan rikets tablosunu tanımlanmaktadır (11, 12).

2.1.1. D vitamini metabolizması

D vitamininin kolekalsiferol (vitamin D3) ve ergokalsiferol (vitamin D2) adlı iki kaynağı bulunmaktadır. Her iki vitamin besinlerde mevcuttur. Ayrıca kolekalsiferol, ultraviyole ışınlarının etkisi ile deride bulunan 7-dehidrokolesterol'den de sentezlenmektedir. Hem vitamin D2 hem de vitamin D3, vitamin D bağlayıcı protein vasıtasıyla karaciğere ulaşmakta ve 25-hidroksilaz enzimi ile ortak ara ürün olan 25-hidroksivitamin D (25 (OH) D) sentezlenmektedir. Bu metabolit daha sonra böbrekte bulunan 1-alfahidroksilaz enzimi sayesinde aktif D vitamini olan 1,25 dihidroksivitamin D (1,25 (OH)₂D)'ye dönüşmektedir (12). Aktif D vitamininin temel görevi intestinal kalsiyum ve fosfat absorpsiyonunu sağlayarak organizmanın kalsiyum ve fosfor dengesini korumaktır (13).

25 (OH) D'nin yarı ömrü yaklaşık olarak 20 gün olup, bu özelliği nedeniyle organizmadaki D vitamini durumunu en iyi yansıtan parametre olarak kabul edilmektedir. Çocuklarda D vitamini yeterliliği için tanımlanmış bir eşik değer bulunmamasına rağmen, serum 25 (OH) D düzeyinin 11 ng/ml'nin altında olması D vitamini yetersizliği olarak kabul edilmektedir (14).

2.1.2. Kalsiyum regülasyonu

Ekstrasellüler kalsiyum düzeyini regüle eden temel mekanizma, esas olarak duodenum ve jejunumda meydana gelen intestinal kalsiyum absorpsiyonudur. Bağırsaklardan kalsiyum Emilimi, temelde aktif transport ile meydana gelen bir olaydır ve bu mekanizma özellikle diyetle kalsiyum alımının az olduğu durumlarda daha da belirgindir. $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}$, kalsiyumun aktif transportunu uyarmakta ve eksikliğinde kalsiyumun gastrointestinal absorpsiyonu miktarsal olarak azalmaktadır (15).

Glomerüllerden filtre edilen kalsiyumun %99'u böbrek tubulusları tarafından reabsorbe edilir. Kalsiyumun idrarla atılımının başlıca düzenleyicisi paratiroid hormonu (PTH)'dur. Yetersiz kalsiyum alımı, serum kalsiyum düzeyinin düşmesine ve normal serum düzeyi 9-65 pg/ml olan PTH'nin sekresyonunda artışa neden olmaktadır. PTH, plazma kalsiyum düzeyini yükseltmek için kemik rezorpsiyonunu, kalsiyumun tubuler reabsorpsiyonunu ve böbreklerde $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}$ sentezini arttırmakta, böylece serum kalsiyum düzeyini normale döndürmektedir (11, 15).

Sonuç olarak organizmaya kalsiyum alımı, $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}$ 'nin bağırsaklar üzerine olan etkisiyle sağlanırken, vücuttan kalsiyum atılımı PTH'nin böbrekler üzerine olan etkisiyle kontrol edilmektedir. Bu hassas mekanizma sayesinde serum kalsiyumunu 8.8-10.8 mg/dl'lik dar aralıkta tutabilmektedir (15).

2.1.3. Fosfor regülasyonu

Organizmaya fosfat alımı, $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}$ 'nin regüle ettiği transsellüler yol vasıtasıyla ince bağırsaklarda oluşmaktadır. İntestinal fosfat absorpsiyonuna, $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}$ 'nin katkısı rölatif olarak azdır. Bu nedenle intestinal fosfat absorpsiyonu, kalsiyum absorpsiyonu kadar $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}$ 'ye bağımlı değildir (11, 15).

Diyetle alınan fosfat, neredeyse tama yakın bir oranda bağırsaklardan absorbe edildiği için, böbrekler fosfat dengesinin başlıca düzenleyicisidir. Plazma fosfat miktarının %90'ı glomerüller tarafından filtre edilmektedir. Filtre edilen miktarın büyük çoğunluğu proksimal tubulus tarafından reabsorbe edilir. Diyetle alınan fosfat miktarı böbrek tubulusları tarafından reabsorbe edilen fosfat miktarını belirlemektedir. Düşük plazma kalsiyum düzeyine bir cevap olarak salgılanan PTH, fosfatın tubuler reabsorbsiyonunu azaltmakta ve idrarla atılan fosfat miktarını arttırmaktadır (15).

Düşük plazma fosfat düzeyi 1-alfahidroksilaz enzimini aktive ederek 1,25 (OH)₂D düzeyini arttırmaktadır. 1,25 (OH)₂D, fosfatın intestinal absorbsiyonunu artırmakta ve böbreklerde fosfatın maksimum reabsorbsiyonu sağlamaktadır. Buna karşılık, aşırı fosfat alımı ise, ekstrasellüler kalsiyum düzeyinin azalmasına ve PTH artmış sekresyonuna neden olmaktadır (15).

Serum fosfat düzeyinin normogramları yaşa göre farklı olup, yaşamın ilk beş gününde 4.8-8.2 mg/dl, 1-3 yaşta 3.8-6.5 mg/dl, 4-11 yaşta 3.7-5.6 mg/dl ve 12-15 yaşta 2.9-5.4 mg/dl arasında değişmektedir (15).

2.1.4. Nutrisyonel riketsin nedenleri

Diyetle yetersiz kalsiyum ve fosfat alımı, D vitamini düzeyi normal olmasına rağmen, bozulmuş kemik mineralizasyonu ile karakterizedir. Kalsiyum eksikliğine bağlı rikets olguları Güney Afrika, Nijerya ve Bangladeş'ten bildirilmiştir (16, 17). Kalsiyumun intestinal absorbsiyonunu azaltan fitat, okzalat, tannat ve fosfat gibi maddeleri bol miktarda içeren gıdaların tüketilmesi, özellikle Afrika'daki rikets olgularında sorumlu tutulmuştur (18). Bağırsaklarda fosfatı bağlayan alüminyum içeren antiasitlerin kullanımı, uzun vadede riketse neden olabilmektedir. Bunlardan

başka D vitamini yetersizliği, nutrisyonel riketse neden olan önemli bir sorundur. Günlük D vitamini gereksiniminin bebekler için 400 IU/gün, 50 yaşına kadar 200 IU/gün, 51-70 yaş arası 400 IU/gün ve sonraki yaşlar için 600 IU/gün olduğu belirlenmiştir (18). Bebekler için D vitamini kaynakları; plesentadan geçen, anne sütünde bulunan ve güneş ışığı yoluyla deride sentezlenen D vitamindir. Gelişmekte olan ülkelerde yapılan çalışmalar, maternal D vitamini yetersizliğinin hala önemli bir sorun olduğunu göstermektedir (19, 20). Anne sütünün bir litresinde bulunan 12-60 IU D vitamini, bebeklerin günlük gereksinimi karşılamaktan çok uzaktır (18). Kışın uzun sürdüğü bölgelerde bebeklerin yetersiz güneş görmesi, kültürel nedenlerle çocukların ev dışına çıkarılmaması, evlerin balkonsuz olması, güneş ışınlarını engelleyen sık apartmanlı mahallelerde yaşanılması, kentsel hava kirliliğine bağlı olarak güneş ışınlarının D vitamini sentezini sağlayacak dalga boyuna ulaşamaması deri yoluyla üretilecek D vitamini sentezini engellemektedir (21). Bu nedenle yenidoğan döneminden itibaren rikets gelişimin önlemek için 400 IU/gün D vitamininin oral yolla alımı sağlanmalıdır (12).

2.1.5. Riketsin fizyopatolojisi

Büyüme plağındaki kondrositler dinlenme, proliferasyon, matürasyon, ve hipertrofi aşamalardan geçerek terminal farklılaşmaya uğramakta ve nihayetinde mineralizasyon gerçekleşmektedir (22). Riketsin gelişim sürecinde kalsiyum yada fosfor yetersizliği nedeniyle büyüme plağındaki bu fizyolojik süreç aksamakta, büyüme plağında dizorganizasyon ve genişleme meydana gelmektedir (23, 24). Mineralizasyon sürecindeki aksaklık, hipertrofik zondaki kondrositler tarafından uygunsuz miktarda matriks proteininin yapılmasına neden olmakta, bu durum

klınikte görülen farklı iskelet deformitelerine ve laboratuvar çalışmalarında tespit edilen serum alkale fosfataz (ALP) düzeyindeki artışa yol açmaktadır (23, 24).

D vitamini eksikliğinde bağırsaklardan daha az kalsiyum absorbe edilir ve buna bağlı serum kalsiyum düzeyi azalır. Bu durum serum PTH düzeyinde artışa neden olur. PTH, kalsiyum ve fosforun kemikten serbestlenmesini sağlamakta ve serum kalsiyum düzeyini normale döndürürken, serum fosfat düzeyini azaltmaktadır. Serum kalsiyumunu normal değerlere yaklaştıran bu süreç kemik mineralizasyonunu ise olumsuz yönde etkilemektedir. Kısacası nutrisyonel rikets, D vitamini veya kalsiyum yetersizliği sonucunda organizmanın kalsiyum dengesinin intestinal emilim yerine, kemiklerden kalsiyum mobilizasyonu ile sağlandığı bir süreç sonunda gelişmektedir (25). Adolesan döneme göre özellikle erken bebeklik döneminde serum kalsiyum düşüklüğüne PTH cevabı az ve kemiklerin kalsiyum rezervi daha yetersiz olduğu için bebeklik döneminde daha sık hipokalsemik bulgular gözlenmektedir (19).

2.1.6. Rikette klinik

Riketsli hastalarda en sık başvuru nedenleri, solunum sistemi yakınmaları, ayakları üzerinde dik duramama, güçsüzlük, yürüme ve diş çıkarmada gecikme, terleme, havale geçirme ve bacaklarda eğrilik gibi şikayetlerdir (26, 27).

Tablo 1’de riketsli hastalarda tespit edilen farklı sistemlere ait klinik bulgular gösterilmektedir. Bu bulgular arasında el bileklerinde genişleme ve raşitik çıkıntıların rikets tanısı için en özgül ve duyarlı bulgu kombinasyonu olduğu belirtilmektedir (28).

Tablo 1. Riketsli hastalarda farklı sistemlere ait klinik bulgular (25, 28, 29).

1. Kas-İskelet sistemi

- a. Kraniotabes, frontal bossing ve kaput kuadratum
- b. El bileği ve diz ekleminde genişleme
- c. Göğüste raşitik çıkıntılar
- d. Harission oluşu
- e. Hipotoni
- f. Lomber lordozda veya torakal kifozda artma, O ve X bacak deformiteleri
- g. Pelvis deformitesi ve ördekvari yürüme
- h. Boy kısalığı ve büyüme geriliği
- i. Proksimal myopati
- j. Yaş ağaç kırıkları

2. Sinir sistemi

- a. Huzursuzluk, hassasiyet
- b. Tetani
- c. Nöbet
- d. Mental değişiklikler
- e. Bazal ganglia kalsifikasyonu

3. Dolaşım sistemi

- a. Uzamış QT
- b. Kardiyomyopati
- c. Kalp yetmezliği
- d. Hipotansiyon

4. Dişler

- a. Çürükler
- b. Mine defektleri
- c. Dişlerin dökülmesinde ve kalıcı dişlerin çıkmasında gecikme

5. Diğer

- a. Papil ödemi
- b. Lentiküler katarakt
- c. Eklem kontraktürü
- d. Hepatosplenomegali

2.1.7. Rikette tanı

Riketsli hastaların serum kalsiyum düzeyleri normal veya düşük olabilir, ancak serum fosfat düzeyleri neredeyse daima 4 mg/dl'den daha azdır. Serum ALP ve PTH düzeyi yükselirken, 25 (OH) D düzeyi azalmaktadır. Bu genel kurala karşın riketsli hastalar değişik biyokimyasal bulgulara sahip olabilir. Hastaların %60'ında hipokalsemi saptanmasına karşılık, tüm olgularda ALP'nin yüksek olduğu dikkat çekmektedir (30). ALP düzeyleri yorumlanırken kullanılan ölçüm yöntemi ve örneklerin çalışıldığı laboratuvara özgü normal değerler de dikkate alınmalıdır.

Riketsli hastaların el bileği ve diz grafilerinde tespit edilen klasik radyolojik bulgular; büyüme plağı bölgesinde genişleme, metafizyel sınırda düzensizlik, fırçalanma ve çanaklaşma ile genel osteopenidir (12, 25).

2.1.8. Nutrisyonel rikette tedavi

Genel olarak tedavide 2 yöntem tercih edilmektedir. İlki 4-6 hafta süreyle 1.000-10.000 IU/gün D vitamini verilmesidir. İkinci yaklaşım 300.000-600.000 IU D vitamininin tek yada bölünmüş dozlarda oral veya parenteral verilmesine dayanmaktadır (18, 19, 25). Bu tedavilerle eş zamanlı olarak 1-2 hafta süreyle 50-100 mg/kg/gün elementer kalsiyum verilmektedir. Düşük doz ve uzun süreli D vitamini tedavisinin özellikle sosyoekonomik düzeyi düşük olan bölgelerde uyum sorunlarından dolayı etkin bir tedavi sağlayamayabileceği belirtilmektedir. Tedaviden 4-6 hafta sonra çekilecek el bilek grafisinde kalsiyum çökme bandının görülmesi ile iyileşmiş rikets tanısı konulabilmektedir (12).

2.2. SERBEST RADİKALLER

Atomlar, merkezde pozitif yüklü bir çekirdek ve etrafında çekirdeğin yüküne eşit sayıdaki negatif yüklü elektronlardan meydana gelir. Elektronlar, çekirdek çevresinde orbital olarak adlandırılan farklı enerji düzeylerinde bulunurlar. Her orbitalde ikişer adet elektron eşleşmiş halde bulunmaktadır. En dış orbitalinde eş olmayan bir elektrona sahip olan molekül veya atomlar, serbest radikaller olarak adlandırılır ve sembol olarak paylaşılmamış elektronun bulunduğu atom üzerine konan bir “nokta” ile gösterilir (1, 2). Bir serbest radikal, eş olmayan elektronunu radikal olmayan bir moleküle verebilir, radikal olmayan bir molekülden elektron alabilir yada ona bağlanabilir. Bu reaksiyonlardan hangisi oluşursa oluşsun, sonuçta radikal olmayan molekül serbest bir radikale dönüşür (2).

Serbest radikaller genel olarak oldukça reaktif ve kararlı olmayan atom veya moleküllerdir. Süperoksit ($O_2^{\cdot}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($RO_2^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$) ve hidroksiperoksil ($HO_2^{\cdot}$), serbest oksijen radikallerinin örnekleridir. Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^{\cdot}$) ise serbest nitrojen radikalleridir (4). Serbest oksijen ve nitrojen radikalleri, hidrojen peroksit (H_2O_2), hipokloros asit ($HOCl$), hipobromos asit ($HOBr$) ve peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) gibi diğer reaktiflere dönüştürülebilir (4). Serbest radikaller, insan ve hayvanlarda fizyolojik ve patolojik durumlarda üretilmektedir. Fizyolojik serbest radikal üretimi, oksijenli solunum yapmanın bir bedeli olup, primer olarak mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon esnasında, elektron transport zincirinden elektronların sızıntısına bağlı olarak meydana gelmektedir. Mitokondriler dışında peroksizomlar, endoplazmik retikulum ve hücre çekirdeğinin mebranı serbest radikal üretiminin meydana geldiği diğer yerlerdir. Bunlara ek olarak, normal bir hücrenin metabolik işleyiş sürecinde de bir çok enzimatik basamakta serbest radikaller açığa çıkmaktadır. Ayrıca aktive olmuş nötrofil, monosit, makrofaj

ve eozinofillerin fagositoz işlevi esnasında da serbest radikaller oluşmaktadır (31). Sözü edilen fizyolojik serbest radikal üretimi dışında, elektromagnetik radyasyon, sigara dumanı, hava kirliliğine neden olan kimyasal maddeler, pestisitler, solventler, aromatik hidrokarbonlar, antineoplastik ilaçlar, enfeksiyon, cerrahi operasyon ve travma gibi stres oluşturan faktörler, organizmada patolojik düzeyde serbest radikal üretimine neden olmaktadır (2).

2.2.1. Nitrik oksit (NO)

NO, NO sentaz (NOS) enzimi ile üretilir. NOS'ın üç izoenzimi tespit edilmiştir. Bunlar, nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca, ayrı bir izoenzim olarak tanımlanmamasına rağmen, mitokondri NOS (mtNOS) enzimi, dördüncü izoform gibi görünmektedir (2). nNOS ilk kez santral sinir sisteminde tanımlanmıştır. Daha sonra periferik sinir, iskelet kası, pankreasın β -adacıkları, böbrekteki makula densa ve çeşitli epitelyal hücrelerde de nNOS'ın ekspresyonu gösterilmiştir (2). eNOS, esas olarak vasküler epitel hücrelerinde bulunmaktadır. Çeşitli doku ve organlardaki eNOS aktivitesinin aslında vasküler endotel hücrelerinden kaynaklandığı kabul edilmektedir (2). iNOS aktivasyonu, makrofajlar, kondrositler, damar epitel hücreleri, düz kas ve kalp kası hücrelerinde tespit edilmiştir. nNOS ve iNOS hücre stoplazmasında, mtNOS mitokondri iç zarında ve eNOS ise hücre zarında bulunmaktadır (2).

nNOS, eNOS ve iNOS'ın aktivasyonu için kalmodulin gereklidir. nNOS ve eNOS'a kalmodulin bağlanması kalsiyuma bağımlı iken iNOS'a kalmodulin bağlanması kalsiyuma bağlı değildir (32). mtNOS'ın aktivasyonu için de mitokondrial matriks kalsiyumu gereklidir (32). Tüm NOS izoenzimleri, bir molekül

L-arjinin tüketerek, eşit miktarda NO ve L-sitrüllin üretmektedir (32). Hücrede üretilen NO, diffüzyonla komşu hücrelere veya dolaşıma geçebilmekte ve hızla ortamdan temizlenmektedir. NO'ı ortamdan uzaklaştıracak özel bir enzimatik mekanizma yoktur. Bu durum, NO'nın kalıcı veya uzun ömürlü bir bileşik olduğu anlamına gelmemektedir. Tam tersine, NO reaktif özelliği nedeniyle birçok molekül ile tepkimeye girdiğinden saniyeler ile ifade edilebilecek bir ömre sahiptir. Eritrositlere ulaşabilen NO, süratle oksihemoglobin ile tepkimeye girerek nitrat (NO_3)'a oksitlenir. Bu tepkime, NO'ı ortamdan uzaklaştıran en etkili mekanizmadır. NO_3 , NO oksidasyonunun vücuttaki en stabil son ürünüdür (2). Serum veya idrarda ölçülen NO_3 düzeyi organizmadaki NO üretimini yansıtmaktadır (33). NO'nın daha az bir bölümü, süperoksit ile reaksiyona girerek daha reaktif bir ürün olan peroksinitrit oluşabilir ancak süperoksit dismutaz enzimi ile süperoksit radikallerinin ortamdan temizlenmekte böylece NO'nın peroksinitrit'e dönüşümünü azalmaktadır. Bu mekanizmaya rağmen oluşan peroksinitrit, glutatyon peroksidaz'ın aktivasyonu ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır (2).

2.2.2.Serbest radikallerin uzaklaştırılması (Antioksidan savunma sistemleri)

Serbest radikaller, endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanların enzimatik olan veya olmayan reaksiyonları sonucunda ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Ürik asit, glutatyon (GSH), bilirubin, tioller, albümin, vitaminler ve fenoller içeren besinsel faktörler, endojen ve enzimatik olmayan antioksidanlardır. Buna karşılık, süperoksit dismutaz, GSH peroksidaz, ve katalaz ise organizmanın endojen ve enzimatik antioksidan savunma sistemini oluşturmaktadır (34).

Hücre serbest oksijen radikallerine karşı antioksidan sistemin esas komponentini GSH oluşturmaktadır (4). Bu nedenle organizmada GSH miktarının ölçümü antioksidan kapasiteyi yansıtmaktadır.

Organizmadaki GSH'ın büyük bir kısmı glutamat, sistein ve glisin'den endojen olarak sentezlenmektedir. GSH peroksidaz, fosfolipid hidroperoksit GSH peroksidaz, GSH redüktaz, gliksilaz, insülin transhidrojenaz, maleilasetoasetat izomeraz ve prostagalandin E₂ sentaz, GSH'a bağımlı enzimlerdir (34). GSH, GSH peroksidaz aktivitesi ile yükseltgenmiş GSH'a (GSSG) dönüşürken, aynı reaksiyonda H₂O₂, H₂O'ya dönüşmektedir. GSSG, NADPH'ın kullanıldığı glutatyon redüktaz aktivasyonu ile yeniden GSH oluşmaktadır GSH, H₂O₂ dışında lipid peroksit ve peroksinitrit gibi diğer reaktif oksijen radikallerini de ortamdaki uzaklaştırmaktadır (2, 34).

2.2.3. Oksidatif stres

Organizmada endojen ve ekzojen nedenlerle meydana gelen serbest radikaller ile onları ortamdaki uzaklaştıran antioksidanlar arasında kritik bir denge bulunmaktadır. Serbest radikallerinin artması ve/veya antioksidan kapasitenin azalmasına bağlı olarak, dengenin serbest radikallerin lehine bozulması durumu "oksidatif "stres" olarak ifade edilmektedir (5). Oksidatif stres varlığında serbest radikaller, hücre membranında bulunan poliansature yağ asitlerini, lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan bir dizi kimyasal reaksiyon sonucunda karbon gazlarına (etan ve pentan) ve aldehitlere parçalanmaktadır. Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonun son ürünlerinden birisidir (35). Serbest radikal artışı, MDA düzeyinin de artmasına neden olur. Bu nedenle MDA organizmadaki oksidatif stresin bir belirteci olarak kullanılmaktadır (35).

Serbest radikaller lipidlerin dışında hücrelerin protein, nükleik asit, karbonhidrat gibi yapı taşlarına ve enzimlerine etki ederler (36, 37). Böylece membran hasarı, organel fonksiyonlarının kaybı, metabolik işlevlerde azalma, genetik materyalde mutasyon ve kromozom kırıklarına neden olurlar. Bunların sonucunda ise hücre hasarı ve hücre ölümü meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalar ateroskleroz, diyabet, romatoid artrit, parkinson, katarakt ve kanser gelişimine yatkınlığın yanısıra yaşlanmanın da oksidatif süreçte ortaya çıktığını düşündürmektedir (2).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nde yürütüldü. Veri toplamada Ek 1'deki form kullanıldı. Yaşları 2-24 ay arasında olan ve yakınmaları rikets tanısını düşündüren hastaların ortalama haftalık güneşlenme zamanları ve güneş gören vücut bölgeleri, nasıl beslendikleri ve D vitamini içeren ilaç kullanımına ait öyküleri, annelerinin giyim tarzı, gebelik boyunca ortalama haftalık güneşlenme zamanları ve güneş gören vücut bölgeleri, hamilelik ve emzirme dönemleri süresince kalsiyum ve D vitamini içeren ilaç alımları kaydedildi.

Tüm hastaların ateş, solunum sayısı, kalp atım sayısı ve arteriyel kan basıncını içeren vital bulguları tespit edildi. Boy uzunluğu, vücut ağırlığı ve baş çevresini içeren antropometrik ölçümleri alındı ve sistemik muayeneleri yapıldı.

Öykülerinde yetersiz D vitamini alımı bulunan, vital bulguları ve antropometrik ölçümleri normal sınırlar içinde olan ve fizik muayenelerinde sistemik hastalık ve lokal veya sistemik infeksiyon bulgusu olmayan hastalarda serum total Ca, P, ALP, PTH ve 25 (OH) D düzeyleri ölçüldü ve el bilek grafileri çekildi. Serum ALP ve PTH düzeyleri yüksek, D vitamini düzeyleri düşük olan ve el bilek grafileri rikets ile uyumlu bulunan 20 hastaya nutrisyonel rikets tanısı konuldu (12). Oksidatif stres belirteçleri için kan ayrıldıktan sonra tüm hastalara 300.000 IU tek doz D vitamini (D vit 3 ampul®) intramusküler olarak uygulandı. 50 mg/kg/gün elementer kalsiyum ihtiva eden "kalsiyum laktat toz" küçük poşetler halinde hazırlatıldı ve dört dozda on gün süre ile oral olarak verildi. Tüm hastalar bir ay sonra kontrole çağrıldı. Vital bulguları normal olan, sistemik hastalık, lokal veya sistemik infeksiyon bulguları bulunmayan hastaların serum total Ca, P, ALP, PTH ve 25 (OH) D

düzeyleri ölçüldü ve el bilek grafileri çekildi. Serum ALP ve PTH düzeyinde azalma, D vitamini düzeyinde artma bulunan ve el bilek grafilerinde radius ve ulna distalinde kalsiyum çökme bandı saptanan 20 hasta, tedavi edilmiş olarak değerlendirildi.

Tedavi öncesi ve sonrasında tüm hastalardan venöz kan alındı. Örnekler biyokimya tüplerine konuldu. Alınan kan örnekleri tamamen pıhtılaştıktan sonra 4500 g'de 5 dakika santüfjüj edildi. 2 cc'lik serum örneği, NO ve MDA ölçümü için plastik tüplere konulurken, 1 cc'lik serum örneği %10'luk metafosforik asidin 1 cc'si ile karıştırıldı ve beş dakika oda ısısında bekletildikten sonra 4500 g'de 5 dakika santüfjüj edildi. Berrak supernatant kısım otomatik pipet yardımıyla alınarak GSH ölçümünde kullanılmak üzere plastik tüplere konuldu. Tüm serum örnekleri analiz edilinceye kadar -80 °C'de donduruldu. Analiz öncesinde, tüm örnekler bir gece -20 °C'de bekletildikten sonra +4 °C'ye konularak çözünmeleri sağlandı. Çözünen serum örneklerinde; GSH ve NO düzeyleri ticari kit kullanılarak (Cayman Chemical) KCjunior ELISA plate okuyucu yardımıyla ölçüldü ve sonuçlar standart grafik yöntemiyle hesaplandı. MDA ise Ohkawa ve arkadaşlarının (38) tarif ettiği spektrofotometrik metodla ölçüldü ve sonuçlar molar absorbtivite katsayısı kullanılarak hesaplandı ($1.52 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Serum total kalsiyum, fosfor ve alkalen fosfataz düzeyleri kalorimetrik yöntemle Olympus AU-2700 otoanalizöründe (Olympus Co., Tokyo, Japan), PTH düzeyi "IMMULITE 2000 Intact PTH, DPC" kiti kullanılarak chemiluminescence enzym immunassay yöntemi ile IMMULITE 2000 (DPC Co., USA) otoanalizöründe ölçüldü. D vitamini ise "25OH-VIT.D3-RIA-CT, BIOSOURCE" kiti kullanılarak radioimmunassay yöntemi ile gamma sayıcıda (DPC Gamma-C12, Germany) ölçüldü.

Verilerin istatistiksel analizi için “SPSS for Windows, 10.0” istatistik paket programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama değer±standart sapma olarak ifade edildi. Tedavi öncesi ve tedavi sonrasında elde edilen verilerin arasındaki farklılığın anlamlılık analizi için “Student’s *t* Testi” ve verilerin arasındaki korelasyon analizi için “Pearson Korelasyon Testi” kullanıldı. $p<0.05$ değerlerinin anlamlı olduğu kabul edildi (39).

4. BULGULAR

Çalışma 20 hastayla tamamlandı. Hastaların demografik özellikleri Tablo 2’de gösterildi. Hastaların ortalama yaşı 7.9 ± 3.7 aydı (2-14 ay). Güneşlendirildiği ifade edilen 2 hastanın ortalama haftalık güneşlenme süresi 10.0 ± 5.0 dakikaydı ve her iki hastanın güneşe maruz kalan vücut bölgeleri yüz ve elleri idi. Anne sütü ile birlikte formula alan bir hasta vardı ve günlük alınan mama miktarı ortalama 200 cc idi. Hastaların tedavi öncesi ve tedavi sonrası antropometrik ölçümleri arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$)

Hastaların annelerine ait demografik bulgular Tablo 3’de sunuldu. Güneşlenen annelerin haftalık ortalama güneşlenme süresi 10 ± 2.5 saat idi. Güneşe maruz kalan vücut bölgeleri tüm annelerde yalnızca yüz ve ellerdi. Gebelikte D vitamini alan anne sayısı 3 olup, ortalama alım süresi 1.0 ± 0.0 aydı ve alınan doz miktarı da 400 IU/gün idi.

Tedavi sonrası ortalama total serum Ca, P, D vitamini ve NO düzeylerinin anlamlı olarak arttığı, serum ALP ve PTH konsantrasyonlarının anlamlı olarak azaldığı, MDA ve GSH düzeylerinde ise anlamlı bir farklılığın olmadığı bulundu (Tablo 4).

D vitamini ile Ca ve P arasında anlamlı pozitif, ALP ve PTH arasında anlamlı negatif korelasyon bulundu (Tablo 5), (Şekil 1, 2, 3, 4).

NO ile Ca, P ve D vitamini arasında anlamlı pozitif, PTH ile anlamlı negatif korelasyon bulundu (Tablo 6), (Şekil 5, 6, 7, 8).

Tablo 2. Nutrisyonel riketsli hastaların demografik özellikleri

Parametreler	n	%
Cinsiyet		
Erkek	12	60
Kız	8	40
Güneşlenme		
Evet	2	10
Hayır	18	90
Beslenme		
Sadece anne sütü	12	60
Anne sütü + İnek sütü	7	35
Annesütü + formula	1	5
D vitamini alımı		
Evet	0	0
Hayır	100	100

Tablo 3. Nutrisyonel riketsli hastaların annelerine ait demografik veriler

Parametreler	n	%
Giyim tarzı		
Açık	1	5
Başörtülü	18	90
Çarşafılı	1	5
Hamilelik boyunca güneşlenme		
Evet	9	45
Hayır	11	55
Gebelikte D vitamini alımı		
Evet	3	15
Hayır	17	85
Emzirme döneminde D vitamini alımı		
Evet	0	0
Hayır	20	100

Tablo 4. Tedavi öncesi ve sonrasında serum Ca, P, ALP, PTH, D vitamini, NO, MDA ve GSH düzeyleri (ortalama $\pm$ SD) ve istatistiksel karşılaştırmaları

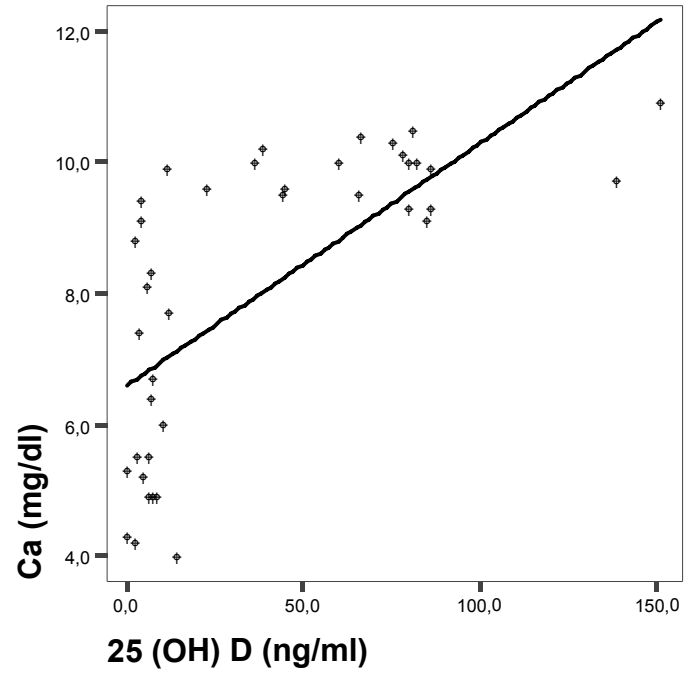
Parametreler	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	p
Ca (mg/dl)	6.2 $\pm$ 1.7	9.7 $\pm$ 0.4	0.001
P (mg/dl)	3.8 $\pm$ 1.4	5.6 $\pm$ 0.7	0.01
ALP (IU/L)	1099 $\pm$ 449	810 $\pm$ 320	0.05
PTH (pg/ml)	386 $\pm$ 213	51 $\pm$ 24	0.001
D vitamini (ng/ml)	6 $\pm$ 3.6	70 $\pm$ 33.8	0.001
NO (μ mol/L)	1.5 $\pm$ 1.8	5.21 $\pm$ 3.47	0.01
MDA (μ mol/L)	6.6 $\pm$ 2.2	7.0 $\pm$ 2.4	0.89
GHS (μ mol/L)	7.7 $\pm$ 2.6	7.5 $\pm$ 2.4	0.96

Tablo 5. D vitamini ile korelasyon gösteren parametreler

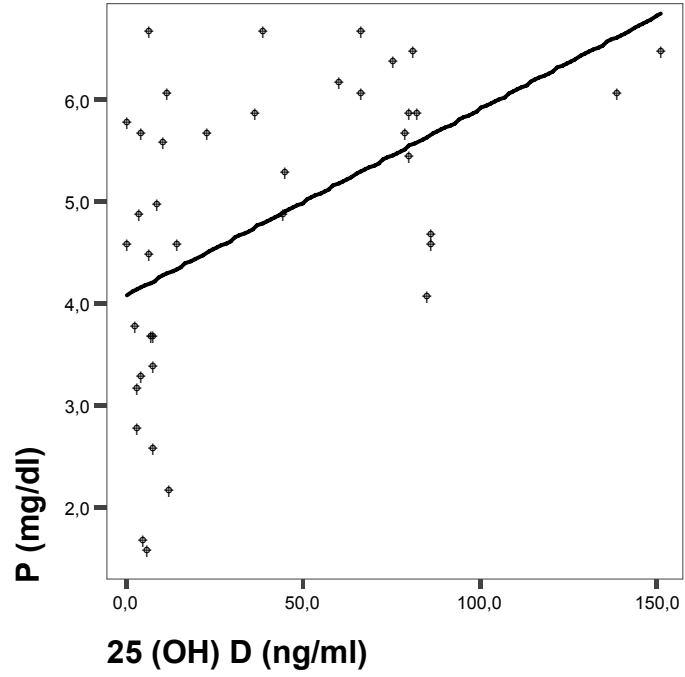
Parametreler	r	p
Ca	0.697	0.001
P	0.584	0.001
ALP	-0.342	0.05
PTH	-0.62	0.001

Tablo 6. NO ile korelasyon gösteren parametreler

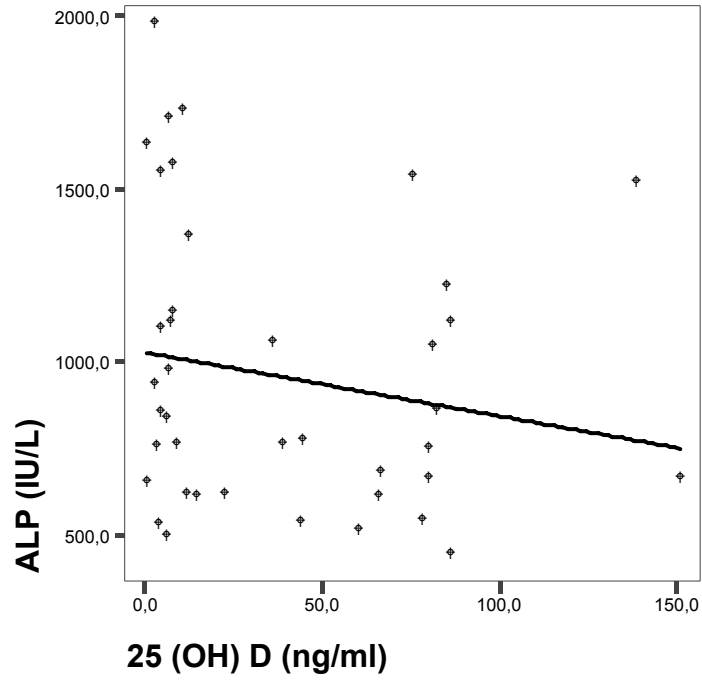
Parametreler	r	p
Ca	0.458	0.01
P	0.34	0.05
D vitamini	0.429	0.01
PTH	-0.46	0.01



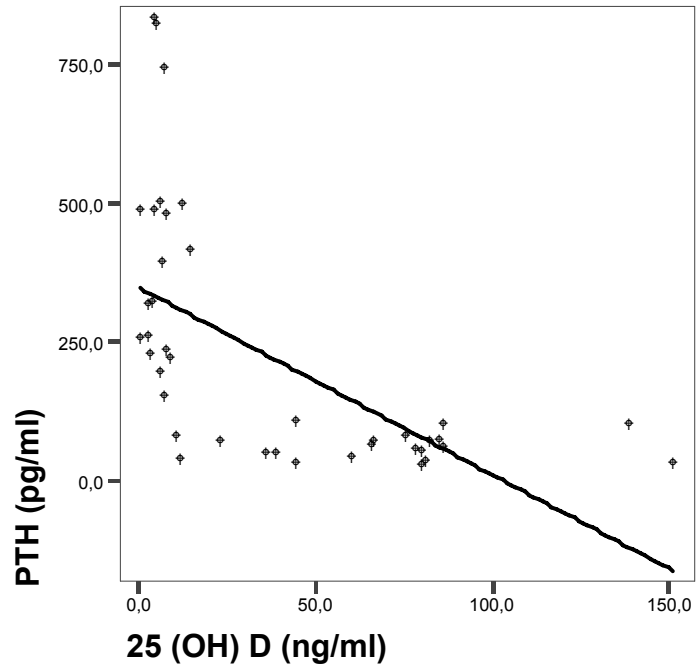
Şekil 1. 25 (OH) D ve Ca arasındaki korelasyon grafiği



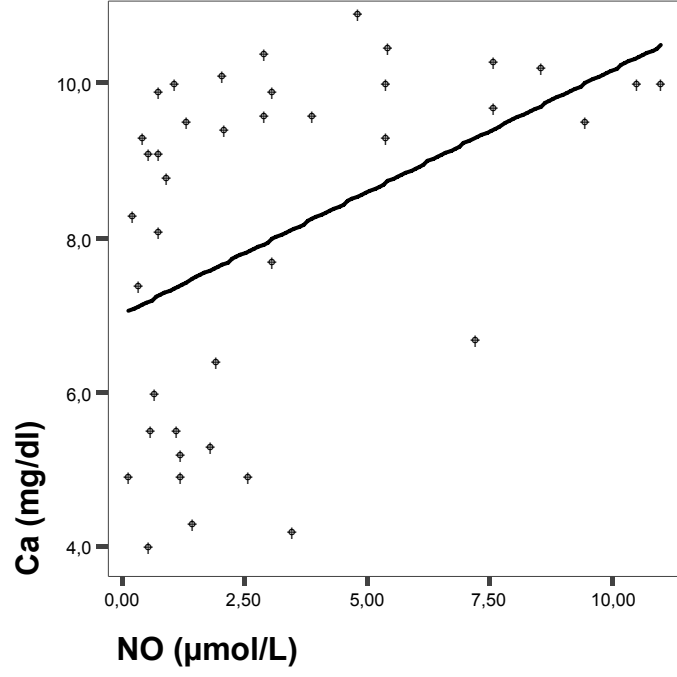
Şekil 2. 25 (OH) D ve P arasındaki korelasyon grafiği



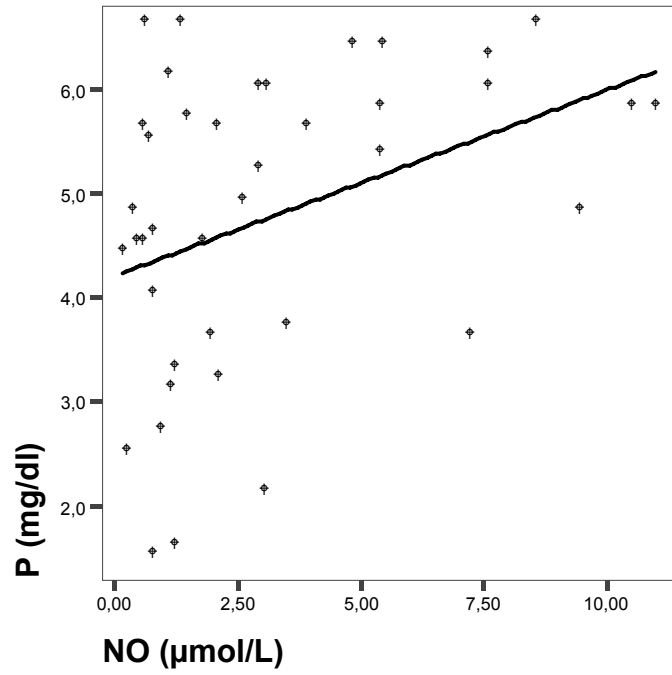
Şekil 3. 25 (OH) D ve ALP arasındaki korelasyon grafiği



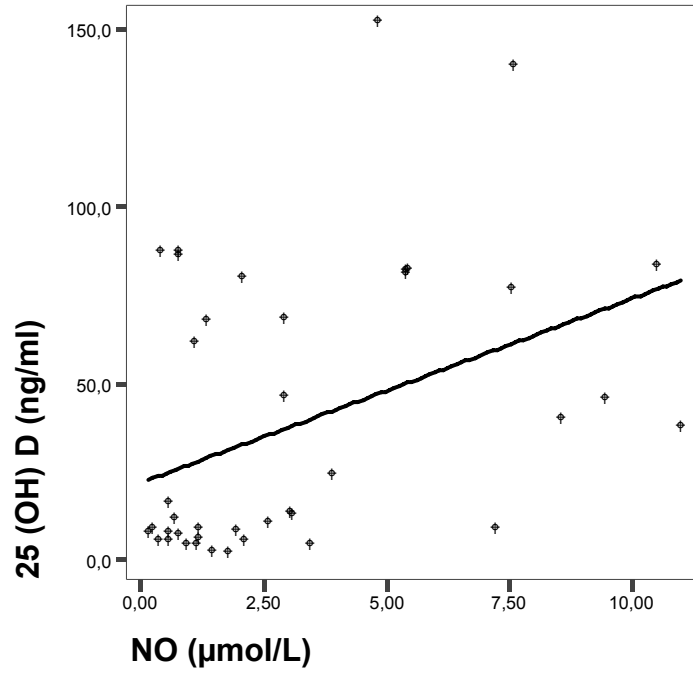
Şekil 4. 25 (OH) D ve PTH arasındaki korelasyon grafiği



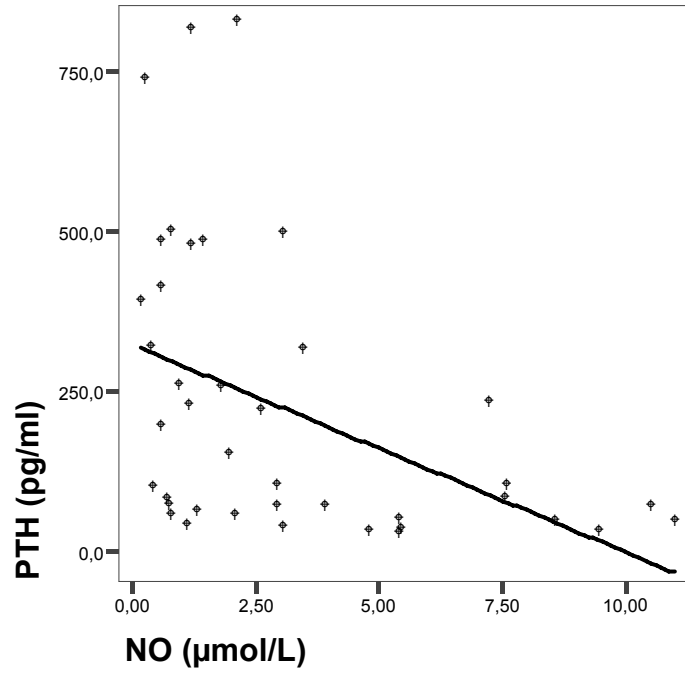
Şekil 5. NO ve Ca arasındaki korelasyon grafiği



Şekil 6. NO ve P arasındaki korelasyon grafiği



Şekil 7. NO ve 25 (OH) D arasındaki korelasyon grafiği



Şekil 8. NO ve PTH arasındaki korelasyon grafiği

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada bebeklerde D vitamini yetersizliğine neden olan bazı predispozan faktörlerin varlığı tespit edildi. Çalışmaya katılan hastaların annelerinin %95i örtülü giyim tarzını benimsemişti. 25 (OH) D'nin en önemli kaynağı deride sentezlenen D vitamini olduğu için örtülü giyim tarzının, maternal D vitamini düzeyini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (40-42). Öte yandan yapılan çalışmalar bebeklerde yeterli serum 25 (OH) D düzeyinin, annenin D vitamini düzeyine göre değiştiğini göstermektedir (43, 44). Bu kaynaklara göre örtülü giyim tarzı maternal D vitamini düzeyini olumsuz yönde etkilemekte, buna bağlı olarak bebeklerde D vitamini yetersizliği görülebilmektedir. Bu nedenle gebelere D vitamini verilmesinin yararlı olacağı düşünülebilir. Erken gebelik döneminde tespit edilen D vitamini eksikliğinde, D vitamini süplementasyonunun gebelik boyunca sürdürülmesi önerilmektedir (45). Bununla birlikte literatürde bu uygulama ile bebeklerde D vitamini eksikliğinin önlenip önlenemediğini gösteren bir çalışma yoktur. Çalışmamızda annelerin %15'i gebeliklerinde 400 IU/gün dozunda ortalama 1.0 ± 0.0 ay boyunca D vitamini kullanmışlardı. Biz, D vitamini alan annelerde süplementasyon süresinin oldukça yetersiz olduğunu düşünüyoruz.

Deride sentezlenen D vitamini bebekler içinde önemli bir kaynaktır. Maternal serum 25 (OH) D düzeyi 35 ng/ml'nin altında olan bebeklerin yalnızca arabezi varken haftada 10-30 dakika ve baş açık ancak gövdeleri giyinik haldeyken haftada 30 dakika-2 saat arasında güneşlenmesinin D vitamini eksikliğini önlediği belirtilmektedir. Buna karşılık, maternal D vitamini düzeyleri normal olan bebeklerin ise arabezi varken 10 dakikadan az, giyinik olarak 30 dakika kadar güneşlenmesi gerekmektedir (46). Çalışmamızda hastaların %90'ı güneşlenmemişti. Güneşlenen

bebeklerin haftalık ortalama güneşlenme zamanı 10.0 ± 5.0 dakikaydı ve güneşe maruz kalan vücut bölgeleri yalnızca yüz ve elleri idi. Bu bulgular, hastalarımızda deri yoluyla D vitamini üretiminin rikets gelişimini önlemek için yetersiz olduğunu düşündürmektedir.

Günlük D vitamini gereksinimi bebekler için 400 IU/gün olduğu bilinmektedir (18). Buna karşılık anne sütünün bir litresinde 12-60 IU D vitamini vardır ve inek sütünün içerdiği D vitamini, bu miktardan daha da azdır (12, 18). Anne sütündeki D vitamini miktarını arttırmak için laktasyondaki annelerin 400 IU/gün D vitamini almaları önerilmişse de bu dozun infantların D vitamini düzeylerine olan katkısının sınırlı olduğu belirtilmektedir (47). Çalışmamızdaki hastaların %95'i anne sütü ve inek sütü almaktaydı, bir hasta ise sınırlı miktarda formüle alıyordu ve annelerin hiçbiri laktasyon döneminde D vitamini kullanmamışlardı.

Çalışmaya katılan hastalar, D vitamini eksikliği için yukarıda belirtilen bazı predispozan faktörlere sahip olmalarına rağmen, hiçbiri D vitamini süplementasyonu almamıştı. Tüm hastaların antropometrik ölçümleri normal olup, D vitamini eksikliğine neden olabilecek sistemik bir hastalıkları yoktu. Hastaların ortalama serum 25 (OH) D düzeyi 6 ± 3.6 ng/ml idi. Bebeklik ve çocukluk çağında D vitamini yeterliliği için tanımlanmış bir eşik değer bulunmamakla birlikte, 11 ng/ml'nin altındaki serum 25 (OH) D düzeyi, D vitamini yetersizliği olarak kabul edilmektedir (14)

Çalışmamızda D vitamini ve kalsiyum tedavisinden sonra serum 25 (OH) D, kalsiyum ve fosfor düzeylerinin anlamlı olarak arttığı, buna karşılık PTH ve ALP düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı bulundu. Serum D vitamini düzeylerinin normal sınırlara ulaştığı tüm hastalarda tespit edildi. Tüm hastaların tedavi sonrası el bilek

grafilerinde kalsiyum çökme bandı mevcuttu. Bu bulgular uygulanan tedavi ile organizmadaki D vitamini yetersizliğinin düzeldiğini göstermektedir.

Bu çalışmada serum NO ve MDA konsantrasyonu ölçülerek organizmadaki serbest radikal düzeyi ve serum GSH konsantrasyonu ölçülerek organizmanın antioksidan potansiyeli değerlendirildi. Tedavi sonrasında NO düzeyi anlamlı olarak arttı. Bir in vitro çalışma, fizyolojik konsantrasyondaki $1,25 (OH)_2D$ 'nin insan monositlerinde H_2O_2 'nin toksik etkilerini arttırdığını, kalsiyumsuz bir ortamda bu etkisinin kaybolduğunu göstermiştir (10). Bu bulgu aktif D vitamininin intrasellüler kalsiyum depolarını artırarak H_2O_2 'nin toksik etkilerini potansiyalize ettiğini düşündürmektedir. Organizmadaki NO sentezi de kalsiyum bağımlı olan nöronal, endotelial ve mitokondrial nitrik oksit sentaz (NOS) izoenzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir (2, 32). Bu yüzden intrasellüler kalsiyum eksikliği, NOS aktivitesini baskılayarak, serum NO düzeyinde azalmaya neden olabilir. Bir in vitro çalışmanın bulguları hipokalseminin intrasellüler kalsiyum düzeyinde azalmaya neden olabildiğini düşündürmektedir (48). Çalışmamızda tedavi öncesi ortalama total serum kalsiyum düzeyi 6.2 ± 1.7 mg/dl olup, biz nutrisyonel riketsli hastalarda NO sentezinin hipokalsemiye sekonder olarak azaldığını düşünüyoruz. Bu çalışmada serum NO ve total kalsiyum düzeyleri arasında bulunan pozitif korelasyon bu kanaatimizi desteklemektedir.

Çalışmamızda tedavi sonrasında serum NO düzeyinde anlamlı bir artış olmasına rağmen, serum MDA ve GSH düzeylerinde anlamlı bir farklılık yoktu. Bu durum NO'nin büyük bir bölümünün zarlardan diffüze olarak eritrositlerde hızla NO_3 metabolize olmasından kaynaklanabilir (2). Öte yandan bu bulgu, tedavi sonrasında NO düzeyindeki artışın patolojik olmadığını, NO'nin aslında organizmadaki fizyolojik düzeyine ulaştığını da düşündürmektedir. Gerçekten fizyolojik düzeydeki NO,

nöronal ileti, lökositlerin adhezyonu ve kemotaksisi, platelet agregasyonunun inhibisyonu, damar geçirgenliğinin kontrolü, vazodilatasyon, immün sistem aktivasyonu, bağırsaklar ve böbreklerin tuz ve su regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (2). NO eksikliği, başta vazospazm ve tromboz olmak üzere çok çeşitli patolojik durumlara neden olabilir (2). Bu çalışma nutrisyonel riketsli hastaların NO eksikliği ile ilişkili patolojik durumlar için risk altında olduğunu da düşündürmektedir. Biz, literatürde nutrisyonel riketsli hastalarda oksidatif stres düzeyini inceleyen bir çalışma ile karşılaşmadık. Gelecekte bu konu ile ilgili daha geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- 1.** Nutrisyonel riketsli hastalarda tedavi sonrasında Ca, P, D vitamini ve NO düzeylerinin anlamlı olarak arttığı, serum ALP ve PTH konsantrasyonlarının anlamlı olarak azaldığı, MDA ve GSH düzeylerinde ise anlamlı bir farklılığın olmadığı bulundu.
- 2.** D vitamini ile Ca ve P arasında anlamlı pozitif, ALP ve PTH arasında anlamlı negatif korelasyon saptandı.
- 3.** NO ile Ca, P ve D vitamini arasında anlamlı pozitif, PTH ile anlamlı negatif korelasyon bulundu.
- 4.** Nutrisyonel D vitamini eksikliğinin organizmada oksidatif stres oluşumuna neden olmadığı saptandı.

7. KAYNAKLAR

1. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:1-14.
2. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Ankara:Palme Yayıncılık, 2003.
3. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;108:652-659.
4. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002;18:872-879.
5. Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:995-1014.
6. Garcion E, Nataf S, Berod A, Darcy F, Brachet P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997;45:255-67.
7. Lefebvre d'Hellencourt C, Montero-Menei CN, Bernard R, Couez D. Vitamin D3 inhibits proinflammatory cytokines and nitric oxide production by the EOC13 microglial cell line. *J Neurosci Res.* 2003;71:575-82.
8. Garcion E, Sindji L, Leblondel G, Brachet P, Darcy F. 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem.* 1999;73:859-66.
9. Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Whipple DL, Horst RL. Mycobacterium bovis infection of vitamin D-deficient NOS2-/- mice. *Microb Pathog.* 2004;36:11-17.

10. Polla BS, Bonventre JV, Krane SM. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases the toxicity of hydrogen peroxide in the human monocytic line U937: the role of calcium and heat shock. *J Cell Biol.* 1988;107:373-80.
11. Root AW, Diamond FB. Disorders of calcium metabolism in the child and adolescent. In Sperling MA, (ed). *Pediatric Endocrinology.* Philadelphia:Saunders, 2002; 629-669.
12. Heird WC. Nutritional requirement. In Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds). *Textbook of Pediatrics.* Philadelphia:Saunders, 2004; 153-190.
13. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:842-856.
14. Specker BL, Ho ML, Oestreich A, Yin TA, Shui QM, Chen XC, Tsang RC. Prospective study of vitamin D supplementation and rickets in China. *J Pediatr.* 1992;120:733-739.
15. Greenbaum LA. Pathophysiology of body fluids and fluid therapy. In Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds). *Textbook of Pediatrics.* Philadelphia:Saunders, 2004; 191-252.
16. Fischer PR, Rahman A, Cimma JP, Kyaw-Myint TO, Kabir AR, Talukder K, Hassan N, Manaster BJ, Staab DB, Duxbury JM, Welch RM, Meisner CA, Haque S, Combs GF Jr. Nutritional rickets without vitamin D deficiency in Bangladesh. *J Trop Pediatr.* 1999;45:291-293.
17. Bhimma R, Pettifor JM, Coovadia HM, Moodley M, Adhikari M. Rickets in black children beyond infancy in Natal. *S Afr Med J.* 1995;85:668-672.
18. Hochberg Z, Bereket A, Davenport M, Delemarre-Van de Waal HA, De Schepper J, Levine MA, Shaw N, Schoenau E, van Coeverden SC,

- Weisman Y, Zadik Z. Consensus development for the supplementation of vitamin D in childhood and adolescence. *Horm Res.* 2002;58:39-51.
19. Shaw NJ, Pal BR. Vitamin D deficiency in UK Asian families: activating a new concern. *Arch Dis Child.* 2002;86:147-149.
20. Hasanoğlu A, Özalp İ, Özsoylu Ş. Anne ve kordon kanında 25-hidroksikolekalsiferol değerleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 1971;24:207-222.
21. Agarwal KS, Mughal MZ, Upadhyay P, Berry JL, Mawer EB, Puliye JM. The impact of atmospheric pollution on vitamin D status of infants and toddlers in Delhi, India. *Arch Dis Child.* 2002;87:111-113.
22. Poole Ar. The growth plate: cellular physiology, cartilage: assembly, and mineralisation. In Hall BK, Newmann SA, eds. *Cartilage: molecular aspects.* Boca Raton: FL:CER Press, 1991;179-212.
23. Chang W, Tu C, Pratt S, Chen TH, Shoback D. Extracellular Ca(2+)-sensing receptors modulate matrix production and mineralization in chondrogenic RCJ3.1C5.18 cells. *Endocrinology.* 2002;143:1467-1474.
24. Bergstrom WH. When you see rickets, consider calcium deficiency. *J Pediatr.* 1998;133:722-4.
25. Joiner TA, Foster C, Shope T. The many faces of vitamin D deficiency rickets. *Pediatr Rev.* 2000;21:296-302.
26. Ozkan B, Buyukavci M, Aksoy H, Tan H, Akdag R. Erzurum'da 0-3 yaş grubu çocuklarda nutrisyonel rikets sıklığı. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 1999; 42:389-396.
27. Kumandaş S, Kurtoğlu S. Çocukluk döneminde ALP enziminin değerlendirilmesi. *Yeni Tıp Dergisi.* 1992;9:68-71.

28. Thacher TD, Fischer PR, Pettifor JM. The usefulness of clinical features to identify active rickets. *Ann Trop Paediatr*. 2002;22:229-237.
29. Kreiter SR, Schwartz RP, Kirkman HN Jr, Charlton PA, Calikoglu AS, Davenport ML. Nutritional rickets in African American breast-fed infants. *J Pediatr*. 2000;137:153-157.
30. Blok BH, Grant CC, McNeil AR, Reid IR. Characteristics of children with florid vitamin D deficient rickets in the Auckland region in 1998. *N Z Med J*. 2000;113:374-376.
31. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994;344:721-744.
32. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26:190-5.
33. Wu G, Flynn NE, Flynn SP, Jolly CA, Davis PK. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *J Nutr*. 1999;129:1347-1354.
34. Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin Nutr*. 2005;24:172-183.
35. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003;189:41-54.
36. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr*. 1991;53:194S-200S.
37. Nakane T, Asayama K, Kodera K, Hayashibe H, Uchida N, Nakazawa S. Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum. *Free Radic Biol Med*. 1998;25:504-511.

38. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351-358.
39. Özdamar K. Paket programlar ile istatistiksel veri analizi. Eskişehir:Kaan Kitabevi, 2004.
40. Henriksen C, Brunvand L, Stoltenberg C, Trygg K, Haug E, Pedersen JL. Diet and vitamin D status among pregnant Pakistani women in Oslo. *Eur J Clin Nutr.* 1995;49:211-218.
41. Awumey EM, Mitra DA, Hollis BW, Kumar R, Bell NH. Vitamin D metabolism is altered in Asian Indians in the southern United States: a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:169-173.
42. Goswami R, Gupta N, Goswami D, Marwaha RK, Tandon N, Kochupillai N. Prevalence and significance of low 25-hydroxyvitamin D concentrations in healthy subjects in Delhi. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:472-475.
43. Molla AM, Al Badawi M, Hammoud MS, Molla AM, Shukkur M, Thalib L, Eliwa MS. Vitamin D status of mothers and their neonates in Kuwait. *Pediatr Int.* 2005;47:649-652.
44. Sachan A, Gupta R, Das V, Agarwal A, Awasthi PK, Bhatia V. High prevalence of vitamin D deficiency among pregnant women and their newborns in northern India. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:1060-1064.
45. Datta S, Alfaham M, Davies DP, Dunstan F, Woodhead S, Evans J, Richards B. Vitamin D deficiency in pregnant women from a non-European ethnic minority population--an interventional study. *BJOG.* 2002;109:905-908.

46. Specker BL, Valanis B, Hertzberg V, Edwards N, Tsang RC. Sunshine exposure and serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in exclusively breast-fed infants. *J Pediatr*. 1985;107:372-376.
47. Hollis BW, Wagner CL. Vitamin D requirements during lactation: high-dose maternal supplementation as therapy to prevent hypovitaminosis D for both the mother and the nursing infant. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:1752S-1758S.
48. Gascon-Barre M, Petit JL, Ethier C, Bilodeau S. Hypocalcemia modifies the intracellular calcium response to the alpha 1-adrenergic agent phenylephrine in rat hepatocytes. *Cell Calcium*. 1997;22:343-336.

EK-1

NUTRİSYONEL RİKETSDE OKSİDATİF STRES BELİRTEÇLERİ

Olgu No:

Çalışmaya alınma tarihi:

Adı-Soyadı:

Cinsiyeti: E-----K

Doğum tarihi:

Takvim yaşı:

Adresi:

Tel:

Annenin hamilelikte bir haftalık güneşlenme zamanı (saat):

Güneş gören yerler

a) Eller

b) Bacaklar

c) Kollar

d) Ayaklar

Annenin giyim tarzı

a) Açık

b) Başörtülü

c) Çarşafı

Anneye hamilelikte Ca verildi mi ? (E---H) Doz: Süre:

Anneye hamilelikte D vitamini verildi mi ? (E---H) Doz: Süre:

Anneye emzirme sırasında Ca verildi mi ? (E---H) Doz: Süre:

Anneye emzirme sırasında D vitamini verildi mi ? (E---H) Doz: Süre:

Çocuğun bir haftalık güneşlenme zamanı (saat):

Güneş gören yerleri:

a) Eller

b) Kollar

c) Bacaklar

d) Ayaklar

Anne sütü süresi:

İnek sütü başlama zamanı ve süresi:

Formüla başlama zamanı ve süresi:

Keçi sütü: E-----H

D vitamini aldı mı: E-----H

Doz:

Süre:

Başlangıçta

Tarih:

Kontrolde

Tarih:

Ateş:

Nabız:

Ateş:

Nabız:

Solunum Sayısı:

TA:

Solunum Sayısı:

TA:

VA:

Boy:

BÇ:

VA:

Boy:

BÇ:

Ca:

P:

ALP:

Ca:

P:

ALP:

25 OH D:

25 OH D:

MDA:

MDA:

NO:

NO:

GSH:

GSH:

El bilek:

El bilek:

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TEZİN ADI

Nutrisyonel Riketsde Oksidatif Stres Belirteçleri

Yrd. Doç. Dr. Hakan DÖNERAY

Yandal Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi	: 03.10.2002
Yandal Uzmanlık Eğitimini Bitirme tarihi	: 01.03.2006
Uzmanlık Sınav Tarihi	: 01.03.2006
Tez Yöneticisi	: Prof. Dr. Zerrin ORBAK

Prof. Dr. Zerrin ORBAK'ın yönetiminde Yrd. Doç. Dr. Hakan DÖNERAY'ın hazırlamış olduğu „Nutrisyonel Riketsde Oksidatif Stres Belirteçleri“ konulu tezi Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin hazırlamış olduğu tez yazım kurallarına biçimsel olarak uygundur.

Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Cahit KARAKELLEOĞLU
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Nihat OKÇU
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Behzat ÖZKAN
Jüri Üyesi	: Doç. Dr. İlyas ÇAPOĞLU

Anabilim Dalı Başkanı	: Prof. Dr. Cahit KARAKELLEOĞLU
------------------------------	--

MART 2006
ERZURUM