T.C.
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

ÇOCUK VE ADÖLESANLARDA SERUM D VİTAMİNİ BAĞLAYICI PROTEİN DÜZEYİNİN SERUM D VİTAMİNİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Arş. Gör. Dr. Sümeyra AKTEPE

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof Dr. Hakan DÖNERAY

ERZURUM-2022

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 15.04.2020 tarih ve 1/3 numaralı kararı ile "Çocuk Ve Adölesanlarda Serum D Vitamini Bağlayici Protein Düzeyinin Serum D Vitamini Üzerine Olan Etkisi" konulu tez konusunun araştırma görevlisi Dr. Sümeyra AKTEPE tarafından çalışılması uygun görülmüştür. Seçilen konu incelenmek üzere Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Başkanlığı'na gönderilmiş, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Başkanlığı'nca görüşülmüş ve etik kurulun 24.06.2021 tarih ve B.30.2.ATA.0.01.00/287 sayılı kararı ve Dahili Tıp Bilimleri Bölüm Başkanlığı'nın 23.02.2021 tarih ve 3 sayılı oturumunun 6 numaralı kararı ile tez çalışması olarak kabul edilmiş ve karar, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Başkanlığı'na iletilmiştir.

Proje, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklendi (Proje Kodu: TTU-20219636). Çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 24.06.2021 tarih ve B.30.2.ATA.0.01.00/287 sayılı kararı ile onaylandı.

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ ..... **ii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **iv**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vii**
ÖZET ..... **viii**
ABSTRACT ..... **x**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. D Vitamininin Yapısı 4
2.2. D Vitamini Kaynakları 4
2.3. D Vitamini Sentez ve Metabolizması 5
2.4.D Vitamininin Etki Mekanizması 7
2.5.D Vitamininin İşlevi 8
2.6.D Vitamininin Metabolizmasının Kontrolü 9
2.7. Çocuk ve Adolesanlarda D Vitamini 10
2.8. D Vitamini Eksikliği 11
2.9. D Vitamini Bağlayıcı Protein 15
2.10. D Vitamini Ölçüm Yöntemleri 16
2.11. Puberte, Tanner Evrelemesi 18
3. MATERYAL VE METOD **23**
4. BULGULAR **27**
5. TARTIŞMA **43**
6. SONUÇLAR **47**
KAYNAKLAR **49**

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Tıp Enstitüsü tarafından önerilen günlük kalsiyum ve D vitamini diyet düzeyi (19) 11
Tablo 2. D Vitamini düzeylerinin tanımları (19) 12
Tablo 3. Riketste evrelere göre biyokimyasal bulgular (30, 42) 15
Tablo 4. Kız çocuklarda Tanner'in puberte evrelerine göre yaş, boy ve vücut ağırlığı değerleri (ortalama±SD)..... 27
Tablo 5. Kız çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD)..... 28
Tablo 5. Kız çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD) (DEVAM) 28
Tablo 6. Kız çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum 1,25(OH)2D, östradiol ve DVBP düzeyleri [ortanca (minimum-maksimum)]..... 29
Tablo 7. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri. 29
Tablo 7. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM). 30
Tablo 7. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM). 30
Tablo 7. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM). 31
Tablo 8. Kız çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD)..... 32
Tablo 8. Kız çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD) (DEVAM). 32
Tablo 9. Kız çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum 1,25(OH)2D, östradiol ve DVBP düzeyleri [ortanca (minimum-maksimum)] 32
Tablo 10. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri. 33
Tablo 11. Erkek çocuklarda Tanner'in puberte evrelerine göre yaş, boy ve vücut ağırlığı değerleri (ortalama±SD)..... 35
Tablo 12. Erkek çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD)..... 36
Tablo 12. Erkek çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD) (DEVAM). 36
Tablo 13. Erkek çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum 1,25(OH)2D, testosteron ve DVBP düzeyleri [ortanca (minimum-maksimum)] 37
Tablo 14. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri. 37
Tablo 14. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM). 38
Tablo 14. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM). 38
Tablo 14. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM). 39

Tablo 15.Erkek çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD)..... 40
Tablo 15. Erkek çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD) (DEVAM). 40
Tablo 16. Kız çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum 1,25(OH)2D, testrosteron ve DVBP düzeyleri [ortanca (minimum-maksimum)] 40
Tablo 17. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki p anlamlılık değerleri. 41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Vitamin D2 ve Vitamin D3'ün biyokimyasal yapıları ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 2. Vitamin D3 ve inaktif yan ürünlerin sentezi..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 3. Vitamin D sentez ve metabolizması ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4. Vitamin D eksikliğine ait risk faktörleri ve ilişkili hastalıklar . Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 5. Tanner Ölçeği'ne göre kızlarda meme gelişimi ve pubik kıllanma (60) Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 6. Tanner Ölçeği'ne göre erkeklerde gelişim evreleri (61) ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 7. Kız çocuklarda DVBP düzeyi ile kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyi arasındaki negative korelasyon (r=-0,234 ve p=0,024)……34
Şekil 8. Kız çocuklarda DVBP düzeyi ile 1,25(OH)2D düzeyi arasındaki pozitif korelasyon (r=0,690 ve p=0,001)……34
Şekil 9. Erkek çocuklarda DVBP düzeyi ile 1,25(OH)2D düzeyi arasındaki pozitif korelasyon (r=-0,658 ve p=0,001)……42

KISALTMALAR DİZİNİ

CLIA : Chemiluminescent immunoassay

°C : Santigrat derece

1,25(OH)$_2$D : 1,25-dihidroksi D vitamini

25OHD : 25-hidroksi D vitamini

AAP : Amerikan Pediatri Akademisi

ALP : Alkalen fosfataz

Ca : Kalsiyum

CaSR : Kalsiyum algılayan reseptör

Cl : Klor

cm : Santimetre

C5a : Kompleman faktör 5a

DHEA : Dehidroepiandrosteron

DHEA-S : Dehidroepiandrosteron sülfat

DHT : Dihidrotestosteron

dl : Desilitre

DM : Diabetes Mellitus

DVBP : D vitamin bağlayıcı protein

DVR : D vitamin reseptörü

ECLIA : Electrochemiluminescence immunoassay

EIA : Enzim-immunoassay

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FGF-23 : Fibroblast büyüme faktörü-23

FSH : Folikül stimulan hormon

GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormon

HPG : Hipotalamo-hipofizer-gonadal

HPLC : Yüksek performansli sivi kromatografisi

I : Internasyonel

IA : Immunoassay

IU : İnternasyonel ünite

kD : Kilodalton

L : Litre

LC-MS/MS : Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi

LH : Luteinizan hormon

MAF : Makrofaj active edici faktör

mcg : Mikrogram

mcl : Mikrolitre

Mg : Magnezyum

mg : Miligram

ml : Mililitre

ng : Nanogram

pg : Pikogram

pmol : Pikomol

PTH : Parathormon

Rpm : Dakikada dönme sayısı (Revolutions Per Minute)

SD : Standart deviasyon

USA : United States of America

UVB : Ultraviyole B

TEŞEKKÜR

Atatürk Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda aldığım uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, eğitimimde büyük emeği olan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Zerrin ORBAK başta olmak üzere tüm saygıdeğer öğretim üyelerine,

Asistanlığım boyunca yaşadığım her zorlukta ve tezimin her aşamasında bana destek olan, yol gösteren, tez öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hakan DÖNERAY'a,

Tezim için vaka toplama aşamasında en büyük yardımı sağlayan Uzm. Dr. Ayşe ÖZDEN'e, tez çalışmamın biyokimyasal basamaklarında katkıları olan Doç. Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK, Doç. Dr. Alptuğ ATİLA, Öğr. Gör. Dr. Hasan CAN ve çalışma arkadaşlarına,

Beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına,

Sevgi, özveri ve fedakarlıklarıyla daima yanımda olan anneme, babama, kardeşim Merve ve eşi İsmail'e,

Asistanlık ve tez yazım sürecinin en zorlu anlarını benimle birlikte göğüsleyen hayat arkadaşım Emir'e, en büyük mutluluğum biricik oğlum Oğuz'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Sümeyra AKTEPE

ÖZET

"Çocuk ve Adölesanlarda Serum D Vitamini Bağlayıcı Protein Düzeyinin Serum D Vitamini Üzerine Olan Etkisi"

Giriş ve Amaç: Serum 25OHD düzeyi düşük iken, Ca, P, ALP, Mg ve PTH düzeylerinin normal olması çocuk ve adolesanlarda sık rastlanan bir durumdur. Pubertede seks steroidlerinin artışı D vitamini bağlayıcı protein (DVBP) sentezinde artışa yol açarak bu proteine bağlı 25OHD oranının artmasına neden olabilir. Böylece klasik yöntemler ile ölçülen serum 25OHD düzeyi hatalı olarak düşük bulunabilir. Bu çalışmanın amacı pubertenin farklı evrelerinde olan ve serum Ca, P, Mg, ALP ve PTH düzeyleri normal bulunan çocuk ve adölesanlarda DVBP'nin 25OHD üzerine olan etkisini ortaya çıkarmaktır.

Yöntem: 5-18 yaş aralığındaki sağlıklı çocuklardan, serum Ca, P, Mg, ALP ve PTH düzeyleri yaş ve cinsiyete göre normal aralıkta olan ve klasik yöntemle ölçülen serum 25OHD düzeyi < 15 ng/ml bulunan çocuklar çalışmaya dahil edildi. Çocukların puberte evresi Tanner ölçeğine göre belirlendi. Her çocuktan bir serum örneği alındı. Serum örneklerinde DVBP ve 1,25-dihidroksi D vitamini [$1,25(OH)_2D$] düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçülürken, estradiol, testosteron ve 25OHD sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) yöntemi ile ölçüldü.

Bulgular: Çalışma pubertenin farklı evrelerinde olan toplam 111 kız ve 122 erkek çocukla tamamlandı. Kız çocuklarda pubertenin ilerlemesi ile serum Ca, Mg, PTH ve $1,25(OH)_2D$ düzeylerinde anlamlı bir farklılık yoktu (p<0,05). Serum P ve kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyleri anlamlı olarak azaldı (sırasıyla p=0,001 ve p=0,001). Serum ALP, östradiol, LCMS yöntemi ile ölçülen 25OHD ve DVBP düzeyleri anlamlı olarak arttı (sırasıyla, p=0,001, p=0,001, p=0,034 ve p=0,05). Erkek çocuklarda pubertenin ilerlemesi ile serum Ca, Mg, LCMS yöntemi ile ölçülen 25OHD, $1,25(OH)_2D$ ve DVBP düzeylerinde anlamlı bir farklılık yoktu (p<0,05). Serum P ve kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyleri anlamlı olarak azaldı (sırasıyla, p=0,001 ve p=0,001). Serum ALP, testosterone ve PTH düzeyleri anlamlı olarak arttı

(sırasıyla, *p*=0,001, *p*=0,001 ve *p*=0,044). Kız ve erkek çocuklarda kemiliüminesans ve LCMS yöntemleri ile ölçülen ortalama serum 25OHD düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırasıyla, *p*=0,001 ve *p*=0,001). Kız çocuklarda DVBP düzeyi ile kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyi arasında negatif korelasyon bulundu (r=-0,234 ve *p*=0,024). Kız ve erkek çocuklarda DVBP düzeyi ile $1,25(OH)_2D$ düzeyi arasında pozitif korelasyonlar saptandı (sırasıyla, r=-0,686 ve *p*=0,001 ve r=-0,658 ve *p*=0,001).

Sonuç: Otomatize immünoassayler ile ölçülen serum 25OHD düzeyi altın standart yöntem olan LCMS ile ölçülen serum 25OHD düzeyinden daha düşüktür. Pubertede serum yüksek DVBP düzeyi, otomatize immünoassayler ile yapılan ölçümlerde serum düşük 25OHD ve yüksek $1,25(OH)_2D$ düzeyleri ile ilişkilidir. Otomatize immünoassayler ile ölçülen serum 25OHD düzeyi düşük iken, serum Ca, P, ALP, Mg ve PTH düzeylerinde beklenen değişikliklerin olmadığı durumlarda, serum 25OHD ölçümü ile ilgili teknik sorunlar akılda tutulmalıdır. Bu biyokimyasal tabloya sahip olgulara yüksek dozda D vitamini tedavisi vermekten kaçınılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: D vitamini, D vitmini bağlayıcı protein, puberte

ABSTRACT

''The Effect of Serum Vitamin D-Binding Protein Level on Serum Vitamin D in Children and Adolescents''

Introduction: Low serum 25OHD levels, but normal Ca, P, ALP, Mg and PTH levels are common in children and adolescents. The increase in sex steroids at puberty may lead to an increase in the synthesis of vitamin D binding protein (DVBP), resulting in an increase in the ratio of 25OHD bound to this protein. Thus, serum 25OHD level measured by conventional methods may be found to be falsely low. The aim of this study is to reveal the effect of DVBP on 25OHD in children and adolescents at different stages of puberty and with normal serum Ca, P, Mg, ALP and PTH levels.

Material and Method: Children aged 5-18 years, whose serum Ca, P, Mg, ALP and PTH levels were within the normal range for age and gender, and whose serum 25OHD level was <15 ng/ml measured by the classical method, were included in the study. The pubertal stage of the children was determined according to the Tanner scale. A serum sample was obtained from each child. While DVBP and 1,25-dihydroxy vitamin D [1,25(OH)2D] levels were measured in serum samples by ELISA method, estradiol, testosterone and 25OHD were measured by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method.

Results: The study was completed with a total of 111 girls and 122 boys in different stages of puberty. In girls, there was no significant difference in serum Ca, Mg, PTH and 1,25(OH)2D levels with the progression of puberty (p<0.05). Serum P and 25OHD levels measured by the chemiluminescence method were significantly decreased (p=0.001 and p=0.001, respectively). Serum ALP, estradiol, 25OHD and DVBP levels measured by LCMS method increased significantly (p=0.001, p=0.001, p=0.034 and p=0.05, respectively). In boys, there was no significant difference in serum Ca, Mg, 25OHD, $1,25(OH)_2D$ and DVBP levels measured by the LCMS method with the progression of puberty (p<0.05). Serum P and 25OHD levels measured by the chemiluminescence method were significantly decreased (p=0.001 and p=0.001,

respectively). Serum ALP, testosterone and PTH levels were significantly increased (*p*=0.001, *p*=0.001 and *p*=0.044, respectively). A statistically significant difference was found between mean serum 25OHD levels measured by chemiluminescence and LCMS methods in boys and girls (*p*=0.001 and *p*=0.001, respectively). A negative correlation was found between DVBP level and 25OHD level measured by chemiluminescence method in girls (r=-0.234 and *p*=0.024). Positive correlations were found between DVBP level and 1.25$(OH)_2$D level in girls and boys (r=-0.686 and *p*=0.001 and r=-0.658 and *p*=0.001, respectively).

Conclusion: The serum 25OHD level measured by automated immunoassays is lower than the serum 25OHD level measured by the gold standard method, LCMS. A high serum DVBP level at puberty is associated with low 25OHD and high 1,25$(OH)_2$D levels as measured by automated immunoassays. Technical problems regarding serum 25OHD measurement should be kept in mind when serum 25OHD level measured by automated immunoassays is low but there are no expected changes in serum Ca, P, ALP, Mg and PTH levels. High-dose vitamin D therapy should be avoided in cases with this biochemical picture.

Keywords: Puberty, vitamin D binding protein, vitamin D

1. GİRİŞ ve AMAÇ

D vitamini, temel olarak insan derisinde ultraviyole B (UVB) ışınları etkisi ile sentezlenen ve hormon benzeri işlevlere sahip olan steroid yapıda bir vitamindir (1). D vitamini Ca ve P metabolizmasındaki rolü ile kemik sağlığının korunmasındaki esas etmenlerden birisidir. Buna ek olarak D vitamininin iskelet dışı etkileri olduğu gösterilmiştir. Kas-sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve bağışıklık sisteminde yer alan hücresel gelişim ve normal işlevlerin devam ettirilmesinde D vitamininin önemi hem invitro hem invivo çalışmalarda ortaya konulmuştur (2).

D vitamininin bitkisel kökenli ergokalsiferol (D2 vitamin) ve hayvansal kökenli kolekalsiferol (D3 vitamin) olarak adlandırılan iki farklı formu vardır (3). Bu formlar bitkisel ve hayvansal gıdalarla vücuda alınabilir. Buna ek olarak, insan derisinde ultraviyole ışınlarının etkisi ile 7-dehidrokolekalsiferolden kolekalsiferol sentezlenir. Ergokalsiferol ve kolekalsiferol kısaca D vitamini olarak adlandırılır. Diyetle alınan D vitamini, günlük D vitamini ihtiyacının ancak % 10-20'sini karşılarken, geri kalan D vitamini ihtiyacı deride sentezlenen D vitamini ile sağlanır. D vitamininin bu formları D vitamini bağlayıcı proteine (DVBP) bağlanarak karaciğere ulaşır ve 25-hidroksilaz enzimi ile ergokalsiferolden 25-hidroksiergokalsiferol ve kolekalsiferolden 25-hidroksikolekalsiferol oluşur. Bu iki form kısaca 25-hidroksi D vitamini (25OHD) olarak adlandırılır (1, 4). Vücutta D vitamini havuzunu oluşturan esas form 25OHD'dir. Bu formun % 85'i DVBP'ye ve % 10-15'i albümine bağlı iken, % 0,03'ten daha az bir kısmı serbest (biyoyararlanılabilir) halde bulunur. 25-hidroksi D vitamininin yalnızca serbest haldeki kısmı böbrek dokusuna geçebilir ve 1-alfa hidroksilaz enzimi ile 1,25-dihidroksi D vitamini [$1,25(OH)_2D$] oluşur (2, 5). Bu form D vitamininin aktif formudur. 1,25-dihidroksi D vitamini 3-4 saatlik bir yarı ömre sahiptir ve tüm serum D vitamini düzeyinin % 1'den daha az kısmını oluşturur (1, 4).

Serum D vitamini düzeyinin doğru ölçümü için bağlı D vitaminin DVBP ve albüminden serbestlenmesi gerekir. Bu işlem LCMS ölçüm yönteminde tam olarak yapılır. Bu yüzden LCMS, D vitamini için altın standart ölçüm metodudur. Bununla birlikte, otomatik immünoassaylerde taşıyıcı proteinlerden D vitaminini ayırmak

oldukça güçtür (6-8). Bu yüzden otomatik immünoassayler ile yapılan ölçümlerde serum D vitamini düzeyi LCMS yönteminde saptanan D vitamini düzeyinden genellikle daha düşük bulunur.

Endocrine Society'nin 2016'da yayınlamış olduğu rapora göre serum 25OHD düzeyinin 12 ng/ml'nin altında olması eksiklik, 12-20 ng/ml yetersizlik, 20 ng/ml ve üzerinde olması normal olarak kabul edilir (9). D vitamini regülasyonu, temelde serum Ca ve P seviyelerine göre çalışan bir feedback mekanizma ile sağlanır. D vitamini eksikliğinde serum parathormon (PTH) ve alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri artarken serum Ca ve P düzeyleri azalır (10).

D vitamini bağlayıcı proteinin karaciğerde üretilir. Karaciğer fonksiyonlarının bozuk olduğu hastalıklarda DVBP ve albumin üretimindeki azalmaya bağlı olarak total serum D vitamini düzeyinin değişmediği, buna karşılık serbest serum D vitamini düzeyinin arttığı saptanmıştır (5). Etnik yapı, yaş, cinsiyet, gebelik ve östrojen düzeyi, obezite, karaciğer ve böbrek hastalıkları, diyabet, primer hiperparatiroidizm, inflamatuvar hastalıklar, plazma exchange ve periton diyalizi gibi işlemlerin serum DVBP ve D vitamini düzeylerini etkileyebildiği gösterilmiştir (11). Gebelikte artan östrojen düzeyi ile serum DVBP düzeyinin arttığı bulunmuştur (12, 13). Literatürde puberte dönemi boyunca kız ve erkek çocuklardaki serum DVBP düzeyini gösteren bir çalışma yoktur.

Ergenlik (puberte) süreci nörohormonal değişiklikler ile birlikte davranışsal, seksüel ve fiziksel olgunluğun kazanıldığı bir dönemdir (14). Pubertedeki çocukların sekonder seksüel karakterlerinin gelişimini izlemek üzere Tanner ölçeği kullanılır. Pubertal gelişim aşamaları kız ve erkekte Tanner ölçeğine göre beş evrede sınıflandırılır (5, 15).

Çocuk ve adölesanlarda serum 25OHD düzeyinin düşük saptanmasına ragmen, serum Ca, P, Mg, ALP ve PTH düzeylerinin yaş ve cinsiyete göre normal düzeyde bulunması klinik pratikte sık rastlanan bir durumdur. Hekimler serum düşük 25OHD düzeyini kimi zaman laboratuvar hatası olarak değerlendirip tekrarını istemekte ve benzer bir sonucun saptanması halinde yüksek doz D vitamini tedavisi

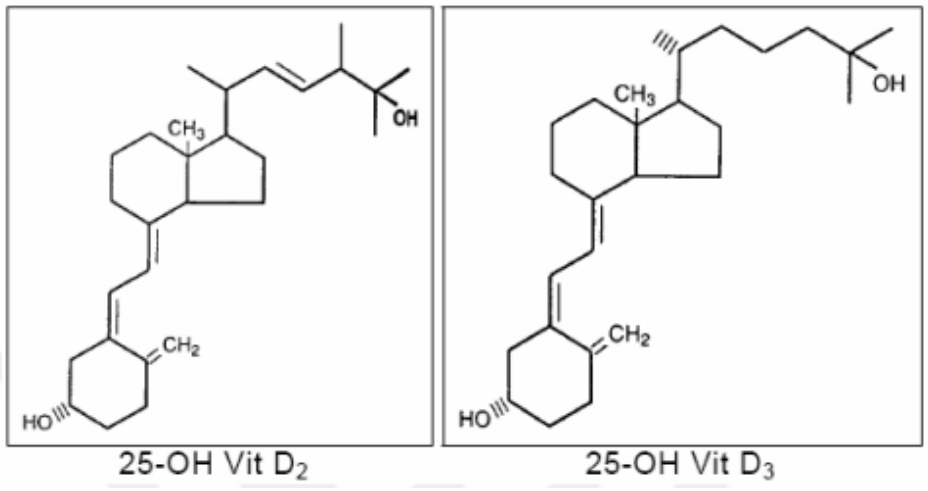
önerebilmektedir. Böyle bir yaklaşım laboratuvar maliyetinin artmasına ve gereksiz D vitamini tedavisine neden olmaktadır. Puberte döneminde artan seks steroidleri, DVBP sentezinde artışa yol açabilir. Bu durum DVBP'ye bağlanan 25OHD miktarının artmasına ve otomatik immünoassaylar ile yapılan ölçümlerde serum 25OHD düzeyinin yalancı düşüklüğüne neden olabilir.

Bu çalışmanın amacı pubertenin farklı evrelerindeki çocuk ve adölesanlarda DVBP düzeyini tespit etmek ve serum Ca, P, Mg, ALP ve PTH düzeylerinin normal olmasına ragmen, otomatik immunoassay ile serum 25OHD düzeyinin düşük ölçüldüğü olgularda DVBP'nin bu durum üzerindeki etkisini ortaya çıkarmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. D Vitamininin Yapısı

Yağda çözünen vitaminler grubunda incelenen D vitamini, hormon benzeri görevleri olan, Ca homeostazında temel rol oynayan, steroid yapıda bir vitamindir. 10 kadar farklı formu olan D vitaminleri ortak isimle kalsiferoller olarak adlandırılmaktadır. Kalsiferollerin biyolojik yönden en önemlileri ve dolaşımda bulunan temel iki formu; deride sentezlenen kolekalsiferol (D3 vitamini) ve besinlerle alınan ergokalsiferol (D2 vitamini)'dir. Şekil 1'de vitamin D3 ve vitamin D2'nin biyokimyasal yapıları gösterilmiştir. Benzer şekilde metabolize oldukları için kolekalsiferol ve ergokalsiferol ortak bir adla, D vitamini olarak anılır. D vitamininin daha az miktarda bulunan diğer üç formu ise D1 (lumisterollü ergokalsiferol), D4 (22 dihidrokalsiferol), D5 (sitokalsiferol)'dür (16, 17).



Şekil 1. Vitamin D2 ve Vitamin D3'ün biyokimyasal yapıları (18)

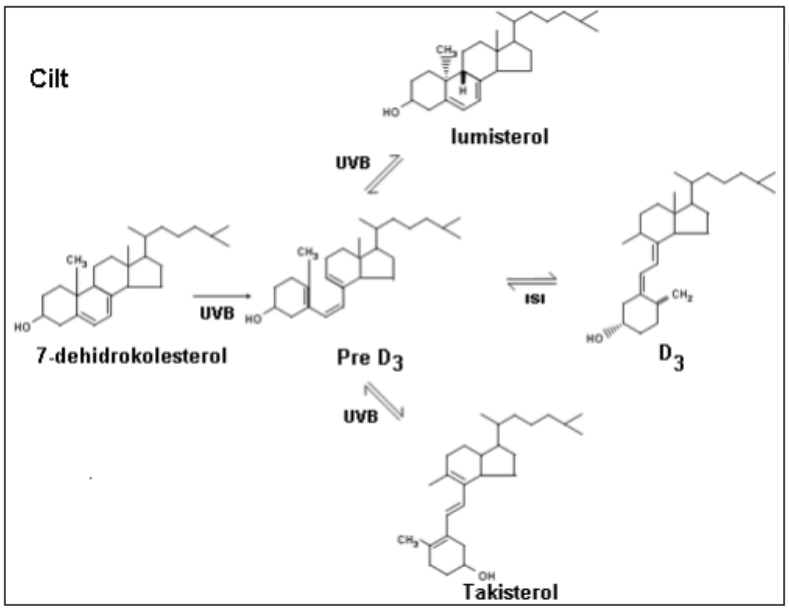
2.2. D Vitamini Kaynakları

Güneş ışığı, D vitamini sentezi için temel kaynaktır. D vitamini, % 90-95 oranında 290-315 nm dalgaboyundaki UVB ışınlarının etkisi ile ciltte sentezlenir (Şekil 1). Daha az oranda, D vitamini içeren gıdalardan (ton balığı, orkinos, sardalya, uskumru gibi yağlı balıklar, morino karaciğeri, yumurta sarısı, bazı mantar türleri, süt,

tereyağı, brokoli) diyet yolu ile elde edilir. D vitamini ısıya dayanıklı olduğundan, gıdaların pişirilmesi vitaminin teminine engel değildir (1, 19).

2.3. D Vitamini Sentez ve Metabolizması

290-315 nm dalga boyundaki UVB ışınları deriye temas ettiğinde, epidermisin stratum spinosum ve stratum basale tabakalarında bulunan, kolesterol benzeri öncü bir molekül olan 7-dehidrokolesterolden (pro-vitamin D3) 15 dakika gibi bir sürede, nonenzimatik bir fotoliz reaksiyonu ile pre-vitamin D3 sentezlenir. Organizmanın ihtiyaç durumuna göre ayarlanan ve oldukça yavaş ilerleyen bir izomerizasyon neticesinde pre-vitamin D3'ten vitamin D3 oluşur. UVB ışınlarına uzun süreli maruziyet durumunda izomerizasyon reaksiyonu ve fotolitik tepkimeler ile pre-vitamin D3'ten lumisterol ve takisterol gibi inaktif yan ürünler meydana gelir. Şekil 2'de vitamin D3'ten inaktif yan ürünlerin sentezi gösterilmiştir. Bu fizyolojik kontrol mekanizması ile canlı, vitamin D intoksikasyonundan korunmuş olur (17, 19, 20).

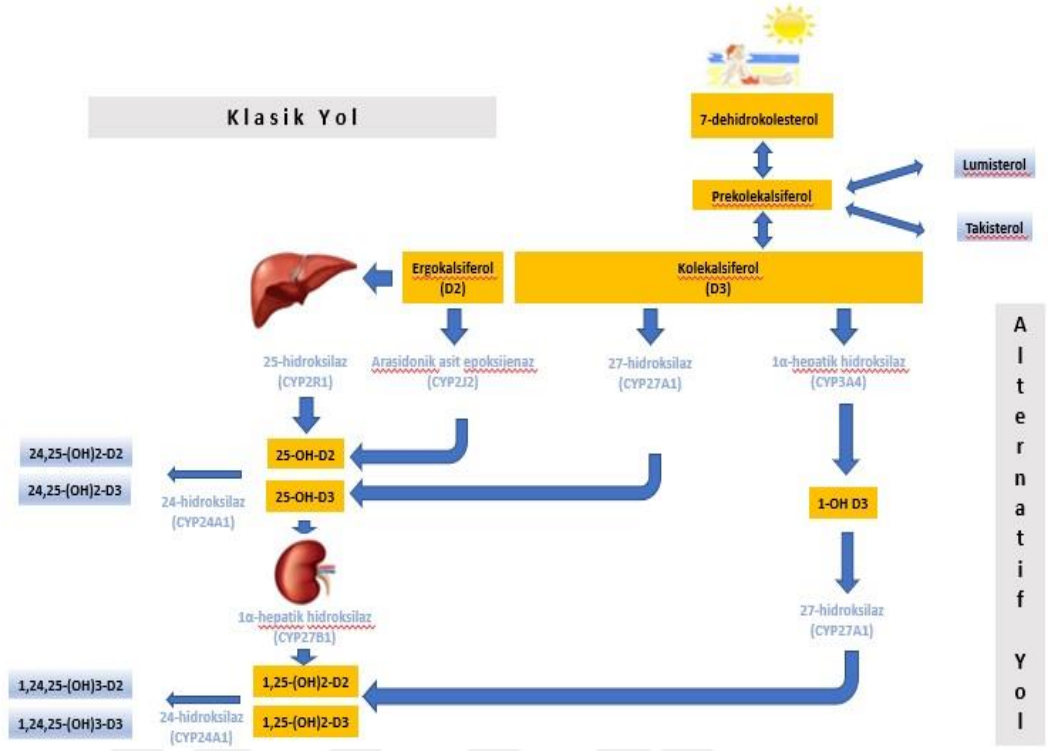


Şekil 2. Vitamin D3 ve inaktif yan ürünlerin sentezi (21)

D vitamininin dermal sentezini etkileyen pek çok faktör mevcuttur. UVB ışınlarının yeryüzüne geliş açısı (zenith açısı), enlem, mevsim, güneş ışığına maruz

kalınan saat, hava kirliliği, güneş koruyucu kullanılması, kapalı giyim tarzı D vitamini sentezini etkileyen en önemli çevresel faktörlerdir. Yaş ve ciltteki melanin pigmenti miktarı da D vitamini sentez düzeyinde etkilidir. Ciltteki pigmentasyon oranı ile D vitamini sentezi ters orantılıdır (21).

D vitamini formları nispeten hidrofobik olduklarından serumda % 85-90 oranında taşıyıcı bir protein olan DVBP ile bağlı, %10-15'i ise albumine bağlı şekilde taşınır. % 0,03'ten daha az bir kısmı ise serbest/biyoyararlanılabilir form olarak bulunur (1). Ciltte sentezlenen vitamin D3, α1 globulin yapısındaki DVBP'ye bağlanarak karaciğere taşınır. Besinlerle alınan D vitamini, ince barsaktan absorbe edildikten sonra şilomikron yapısına katılıp lenfatik dolaşıma geçer ve DVBP ile karaciğere taşınır. DVBP ile karaciğere taşınan D2 ve D3 vitamini biyolojik olarak inaktiftir. İki ayrı hidroksilasyon reaksiyonu neticesinde aktif D vitaminine çevrilirler ve böylelikle hedef dokudaki reseptörlerine bağlanabilirler. İnaktif formdaki D vitamini, ilk olarak karaciğer mikrozomlarında bulunan sitokrom P450 25 hidroksilaz enzimi ile 25OHD'ye dönüşür. Daha sonra ise başlıca renal proksimal tubulus epiteli olmak üzere pekçok dokuda bulunan 1-α hidroksilaz enzimi ile en aktif form olan $1,25(OH)_2D$'ye dönüştürülür (17,22,23). $1,25(OH)_2D$'nin yarı ömrünün 3-4 saat gibi kısa olması ve total serum D vitamini düzeyinin % 1'den daha az kısmını oluşturması sebebiyle yarı ömrü yaklaşık 15-20 gün olan ve yağ dokuda depolanabilen 25OHD, dolaşımdaki ana formu oluşturur. Vücudun total D vitamini havuzunu en iyi gösteren ve bu sebeple ölçümlerde kullanılan D vitamini formu 25OHD'dir. Vitamin D sentezi temel olarak hepatik 25-hidroksilaz enziminin feedback mekanizmayla kontrolü ile düzenlenmektedir. D vitamini intoksikasyonunda ise bu feedback inhibisyon ortadan kalkarak 25OHD düzeyi yükselmektedir (4, 24, 25). Şekil 3'de vitamin D sentez ve metabolizması gösterilmiştir.



Şekil 3. Vitamin D sentez ve metabolizması (26)

2.4.D Vitamininin Etki Mekanizması

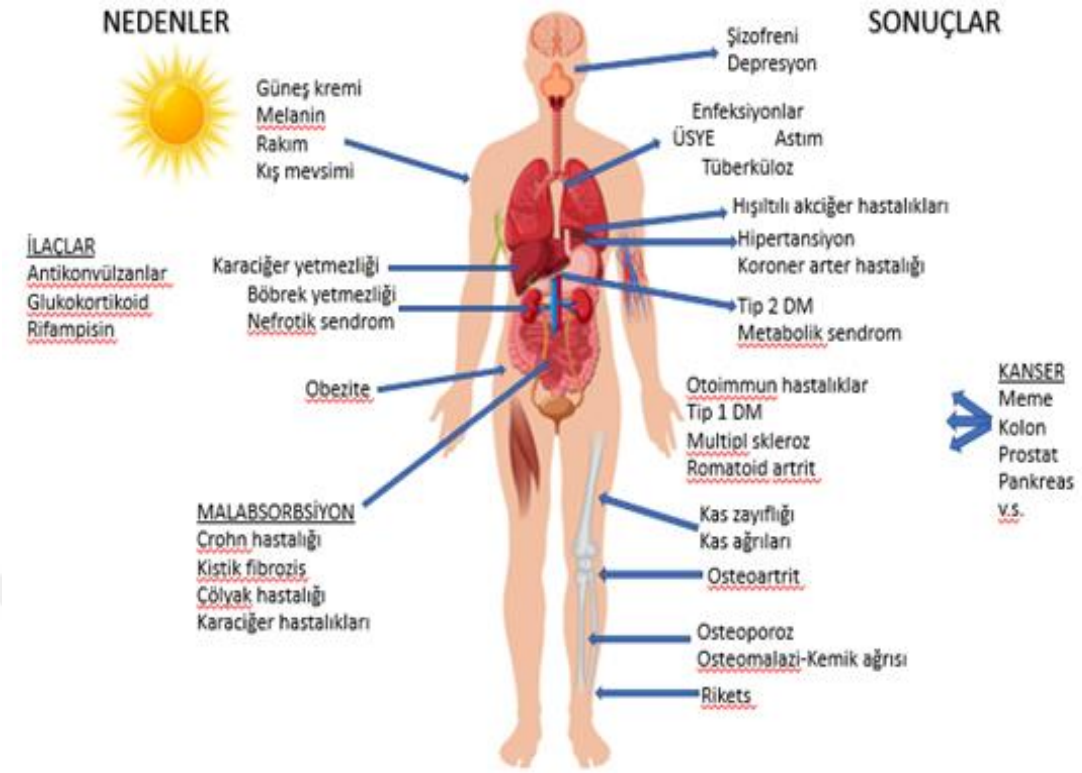
Aktif metabolit olan 1,25$(OH)_2$D, DVBP'ye bağlı şekilde hedef organ ve dokulara taşınır. Burada serbest formu vitamin D reseptörüne (DVR) bağlanarak etkisini gösterir. Aktif vitamin D'nin reseptörüne bağlanması ile VDR'de yapısal değişiklik oluşur. Sonrasında reseptör üzerinden uyarılan genomik etki veya intrasellüler sinyal iletim yolaklarının aktivasyonu neticesinde Ca, Cl gibi iyonların transportunda gerçekleşen değişiklik ile aktif vitamin D etkisini göstermiş olur. Aktive formdaki DVR, kemikte osteokalsin ve osteopontin gibi proteinlerin sentezini; barsakta ise, enterosit farklılaşmasını teşvik ederek enterositlerdeki Ca bağlayıcı protein sentezini uyarır. Yine nongenomik etki ile aktif vitamin D, pankreas, düz kaslar, monositler üzerinde de etkili olur. D vitamininin genomik etkisi ile ise, hücre proliferasyonu uyarılmakta, immun fonksiyonlarda düzenlenme olmaktadır (17, 27, 28).

2.5.D Vitamininin İşlevi

Aktif vitamin D'nin metabolizmadaki temel fonksiyonu, ince barsaktan Ca ve P emilimi ve renal Ca ve P reabsorbsiyonunu sağlayarak PTH ile birlikte vücudun Ca ve P dengesini düzenlemektir. Böylelikle kemik mineralizasyonu ve devamlılığı için gerekli serum Ca ve P seviyeleri sağlanır.

D vitamini, serum Ca düzeyini normal aralıkta tutabilmek için barsak, böbrek ve kemiklerde üç farklı mekanizmayla etkisini gösterir (29, 30). Barsaklardaki net etkisi, intestinal lümenden dolaşıma Ca ve P transportunu uyarmaktır. Kalsitriol, barsak epitel hücrelerinde bulunan ve Ca bağlayıcı protein olan kalbindinin sentezini artırarak duodenumdan Ca emilimini ve ileumdan P reabsorbsiyonunu stimüle eder (29). Kalsitriol, PTH benzeri etkiler göstererek kemik dokuda mobilizasyon ve remodellingi uyarır. Hem osteoklast hem de osteoblastları uyararak kemik dokuya Ca ve P'nin sağlıklı bir şekilde geçişini ve böylelikle kemik dokunun düzenli bir biçimde mineralizasyonunu sağlar. Osteoblastların uyarılmasıyla osteokalsin ve ALP sentezi de artar. Osteokalsin kemik dokuda Ca bağlayıcı protein olup hidroksiapatit kristallerinin oluşumunu kısıtlayarak kemikte aşırı mineralizasyonun önüne geçmiş olur. Kalsitriol böbreklerde ise Ca ve P'nin tübüler reabsorbsiyonunu artırır. Tüm bu fonksiyonlar ile kemik mineralizasyonu sağlanmış olur (27, 31).

D vitamininin iskelet sistemi dışında da pek çok fonksiyonu bulunmaktadır. Bu nonklasik etkiler hücre proliferasyon ve farklılaşmasının regülasyonu, immün fonksiyonların modülasyonu ve hormon sekresyonundaki düzenlemelerdir. Şekil 4'te de görüldüğü gibi hipertansiyon, koroner arter hastalığı, strok gibi kardiyovasküler hastalıklar; epilepsi, şizofreni, otizm, tik bozuklukları gibi nöropsikiyatrik bozukluklar; kistik fibrozis, çölyak hastalığı gibi gastroenterolojik hastalıklar; romatoid artrit, skleroderma, multipl skleroz, sistemik lupus eritematozus, diyabetes mellitus tip 1 gibi otoimmün hastalıklar; psöriasis, alopesi, vitiligo, oral lökoplaki gibi cilt hastalıkları; meme, kolon, prostat, pankreas kanseri gibi malignensiler; tüberküloz, influenza gibi enfeksiyon hastalıkları D vitamini eksikliği ile ilişkilendirilmiştir (31-33).



Şekil 4. Vitamin D eksikliğine ait risk faktörleri ve ilişkili hastalıklar (11)

2.6.D Vitamininin Metabolizmasının Kontrolü

D vitamini metabolizmasının kontrolünde kalsitriolün negatif feedback mekanizmasının yanı sıra Ca, P, Mg, PTH, sitokrom p450 enzim sistemi ve fibroblast büyüme faktörü-23 (FGF-23) düzeyleri önemli rol oynamaktadır (3, 34, 35).

25 hidroksilasyon kontrolü: Karaciğerde 25 hidroksilaz enzim aktivitesi, serum D vitamini düzeyindeki artış ile negatif korelasyon gösterir. Buna rağmen, yüksek doz D vitamini alımında bu regülasyon intoksikasyonu engellemede yetersiz kalır.

1-alfa hidroksilasyon kontrolü: Böbrekte 1-alfa hidroksilaz enzim aktivitesini kontrol eden parametreler Ca, P, PTH'dır. 1-alfa hidroksilaz enzim aktivitesi, hipokalsemi, hipofosfatemi, PTH sekresyonundaki artış ile uyarılırken; hiperkalsemi, $1,25(OH)_2D$ düzeyinde artış ve osteoblast/osteositlerden salgılanan fibroblast growth faktör 23 (FGF-23) tarafından ise süprese edilir. Prolaktin, kalsitonin ve seks steroidleri de D vitamini sentezini stimüle eder.

24 hidroksilasyon kontrolü: Ca, P, PTH serum düzeyi normal aralıkta iken 25OHD ve 1,25$(OH)_2$D renal 24-alfa hidroksilaz enzimi ile inaktif metabolitler olan 24-25 dihidroksi vitamin D ve 1,24,25 trihidroksi vitamin D'ye çevrilir. Böylelikle aktif vitamin D düzeyinin gereksiz yüksek olması engellenir (17).

Hidroksilasyon basamaklarındaki kontrol mekanizmalarına ek olarak 25OHD ve 1,25$(OH)_2$D'nin kendisi de PTH'yı baskılayabilir. Ayrıca D vitamini yüksekliğine bağlı hiperkalsemi durumunda artan iyonize Ca^{++} paratiroid hücrelerinin yüzeyindeki kalsiyum algılayıcı reseptörler (CaSR) tarafından tespit edilir. Bu tespit, PTH sekresyonunun azaltılmasına sebep olur. Hipovitaminozis D ve buna bağlı hipokalsemi durumunda ise PTH seviyesinde artış olur. Hipokalsemide artan PTH, bir yandan daha fazla 1,25$(OH)_2$D üretmek için böbreklerde 1-alfa hidroksilasyonu uyarırken diğer yandan renal tübüler Ca reabsorbsiyonunu artırıp P reabsorbsiyonunu azaltır (36, 37).

2.7. Çocuk ve Adolesanlarda D Vitamini

Bebeklerde ilk sekiz hafta 25OHD için temel kaynak, intrauterin transplasental maternal D vitamini geçişi olup annedekine benzer D vitamini düzeyleri ölçülür. Daha sonraki aylarda, nutrisyonel alım ve UVB etkisiyle deride sentez temel kaynakları oluşturur (10, 19).

İlk 12 ay bebeklerin günlük D vitamini ihtiyacı 400 IU'dir. Amerikan Pediatri Akademisi (AAP) ve Lawson Wilkins Pediatrik Endokrinoloji Derneği tarafından, hayatın ilk günlerinden itibaren günlük 400 IU D vitamini alımı önerilir. AAP'ye göre D vitamini takviyesi, bebeklerin günlük enteral alımı 1000 ml'nin üzerinde D vitamini destekli formula ile sağlanıncaya kadar devam ettirilmelidir. AAP, cilt kanseri riski sebebiyle ilk 6 ay bebeklerin doğrudan güneşe maruziyetini önermemektedir. Sonrasında ise yalnızca bebek bezi giyinik iken haftalık 30 dk, şapkasız tam giyinik iken ise haftalık 2 saat doğrudan güneş ışığına maruziyet, ilave risk faktörü taşımayan bebekler için yeterli olur. Bu maruziyetin UVB'nin yoğun olduğu 10:00-15:00 arasında olması önemlidir.

Bebekler ve ergenlik çağındaki çocuklar iskelet maturasyonundaki hızlanma sebebiyle D vitamini eksikliği için riskli gruptadır. Puberte döneminde D vitamini yetersizliği olan çocuklarda rikets ve osteomalazi vakalarında artış bildirilmiştir. Özellikle geleneksel ve dini giyim tarzı sebebiyle örtülü olan kız adolesanlarda rikets vakaları görülmektedir. Tıp Enstitüsü Komitesi'nin 2010'da yayınladığı rapordaki minimal güneş ışığı maruziyeti durumunda yaşa göre günlük D vitamini ve kalsiyum gereksinimi tablo 1'de sunulmuştur. Açık tenli çocuk ve adolesanların, kış mevsimi dışındaki mevsimlerde 10:00-15:00 saatleri arası, kollar ve yüz veya kollarla birlikte bacaklar açık iken günlük 10-15 dk doğrudan güneş ışığına maruziyeti, D vitamini sentezi için yeterlidir. Obezite ve kronik ilaç kullanımı gibi D vitamini eksikliği riski ile karşı karşıya olan çocuk ve adolesanlar için 2-4 kat, koyu tenliler için ise 6-10 kat daha fazla maruziyet gerekir (1, 3, 19).

Tablo 1. Tıp Enstitüsü tarafından önerilen günlük kalsiyum ve D vitamini diyet düzeyi (19)

	Kalsiyum (Ca)		**D Vitamini**	
YAŞ	**Önerilen Diyet Desteği (mg/gün)**	**Üst Alım Seviyesi (mg/gün)**	**Önerilen Diyet Desteği (IU/gün)**	**Üst Alım Seviyesi (IU/gün)**
0-6 ay	200	1000	400	1000
6-12 ay	260	1500	400	1500
1-3 yaş	700	2500	600	2500
4-8 yaş	1000	2500	600	3000
9-18 yaş	1300	3000	600	4000

2.8. D Vitamini Eksikliği

Çoğu çocuk ve adolesan, nutrisyonel D vitamini kaynaklarının sınırlı olması ve yetersiz güneş maruziyeti sebebiyle D vitamini eksikliği tehdidi ile karşı karşıyadır (20).

Pubertede kemik gelişiminde hızlanma olduğundan, bu dönemdeki D vitamini eksikliği durumu erişkin dönemde kemik kitlesindeki yetersizliğe ve erken osteoporoz gelişimine sebep olabilir (20, 38). Çocuklarda serum 25OHD düzeyi sınıflandırması için Global Consensus 2016'da oluşturulmuştur (19). **Tablo 2**'de APA (2008), Pediatrik Endokrinoloji Derneği (2011) ve Global Consensus (2016)'ya göre serum D vitamini düzeyinin tanımları verilmiştir.

Tablo 2. D Vitamini düzeylerinin tanımları (19)

25OHD (ng/mL)	Amerikan Pediatri Akademisi (2008)	Pediatrik Endokrinoloji Derneği (2011)	Global Consensus (2016)
Şiddetli eksiklik	<5		
Eksiklik	5-15	<20	<12
Yetersizlik	16-20	<30	12–20
Yeterlilik	21-100		>20
Yükseklik	101–150		
Toksik	>150		>100

D vitamini eksikliğinde intestinal Ca reabsorbsionu % 10-15 dolaylarında olup beraberinde maksimum P reabsorbsiyonu azalmış iken; D vitamininin yeterli olduğu durumda Ca reabsorbsiyonu % 30-80'e çıkar (30). İntestinal Ca reabsorbsiyonunun yeterli düzeyde olduğu durumda aktif hormon olan $1,25(OH)_2D$ düzeyi de yeterli olur. Organizmada yeterli $1,25(OH)_2D$ düzeyi mevcudiyetinde veya 25OHD seviyesi 20 ng/ml üzerinde olduğunda intestinal Ca ve P reabsorbsiyonu sağlanır ve böylelikle iskelet mineralizasyonu sürdürülür (3, 19). Kritik düzeyde düşük serum 25OHD ve düşük serum iyonize Ca^{++} düzeyi, organizmada PTH sekresyonunu uyarır. PTH düzeyi arttığında (sekonder hiperparatiroidizm) 1-α hidroksilaz aktive olarak $1,25(OH)_2D$ düzeyini artırır. $1,25(OH)_2D$ ve PTH'nın ortak etkisiyle, serum Ca^{++} düzeyini normal

aralıkta tutmak amacıyla osteoklastik aktivite uyarılır. Artan kemik turnoveri neticesinde kemikten Ca ve P'un mobilize edildiği bir kompanzasyon sağlanır; fakat kemik mineralizasyonunda bozulma ile tamamlanan bir süreç gerçekleşir. Diğer yandan artmış PTH düzeyi üriner Ca kaybını azaltırken P atılımını artırır (39). İşte bu kompanzatuar mekanizmalar nihayetinde serum Ca düzeyi normale getirilir; ancak nutrisyonel rikets olarak adlandırılan kemik mineralizasyon bozukluğu gelişir. Bir başka deyişle nutrisyonel riketste, düşük D vitamini veya Ca sonucu yeterli serum Ca düzeyi, barsaktan emilim yerine kemik yıkımı ile sağlanır. Organizma için fizyolojik olan durum; serum 25OHD seviyesinin PTH değerini yükseltmeyecek düzeyde olması ve beraberinde vücuda yeterli miktarda Ca alınmasıdır (30, 38).

Nutrisyonel rikets; yetersiz güneşlenme veya nutrisyonel yetersizliğe bağlı D vitamini eksikliği durumunda, büyüme plakları kapanmadan önce gerçekleşen, kondrosit farklılaşması ve apoptozunda aksama, epifiz plağında yetersiz kalsifikasyon ile birlikte genişleme ve osteoid dokuda yetersiz mineralizasyon şeklinde tanımlanabilir. İlerleyen süreçte PTH ve $1,25(OH)_2D$ gibi osteotropik hormonların öncülüğündeki kompanzasyon mekanizmaları yetersiz kalır ve serum Ca düzeyinin düşüşü engellenemez hale gelir (40).

Serum D vitamini düzeyi düşük olan çocuklarda görülen klinik ve laboratuvar bulgular, başvuru yaşı, eksikliğin süresi ve ciddiyetine bağlı olarak değişiklik gösterir. Yaşamın ilk aylarında, kemik mineral deposunun yetersizliği ve hipokalsemiye PTH yanıtının zayıflığı sebebiyle hipokalsemik semptomlar sıklıkla görülür. Adolesan ve yetişkinde ise ancak ağır D vitamini yetersizliği ve bu yetersizliğe uzun süren maruziyet durumunda hipokalsemi görülür. Etkilenime bağlı olarak hastalığın kliniği, asemptomatik hasta grubundan, çocuklarda rikets, adolesan ve yetişkinde osteomalazinin görüldüğü gruba kadar geniş bir yelpazede dağılım gösterir (41).

Nutrisyonel riketste klinik prezentasyon evreye bağlıdır. Subklinik rikets olarak başlayan evre-1'de hipokalsemi ve hipokalsemik semptomlar ön plandadır. Bu evrede fizik muayene bulgusu saptanamayabilir. Evre 2'de görülmeye başlayan kemik ve kıkırdak deformiteleri evre 3'te ağırlaşarak son halini alır (38). İlerlemiş rikets

vakalarında görülebilen iskelet sistemi bulguları; kemiklerde hassasiyet, kraniotabes, enamel hipoplazisi, diş çıkmasında gecikme, hızlanmış diş çürümesi, el bileği ve dizlerde genişleme, ön kolda eğrilik, ekstremite fraktürleri, frontal bossing, fontanel kapanmasında gecikme, Harrison oluğu, kifoz, raşitik rozariler, kalça deformiteleri, genu varum (o bacak) veya genu valgum (x bacak), pectus carinatus, pectus excavatus, boy kısalığı ve büyüme geriliğidir. İskelet sistemi dışı bulgular arasında; hipokalsemik tetani ve konvülzyonlar, laringospazm, stridor, hipotoni, kurbağa karnı görünümü, hepatosplenomegali, kabızlık, miyopati, raşitik pnömopati, kardiyomiyopati, sitopeniler, psödotümor serebri, mental değişiklikler yer alır (30, 41).

Klinik bulgular ile rikets tanısı düşünülen hastada öncelikli olarak görülmesi gereken parametreler, Ca, P, Mg, ALP, PTH, 25OHD'dir. Tablo 3'te görüldüğü üzere rikets, laboratuvar bulgularına göre üç evreye ayrılır (30).

Evre 1: Bu evrede 25OHD düzeyindeki yetersizliğe bağlı olarak intestinal Ca emilimi azalmıştır. Hipokalsemiye yanıt olarak PTH ilk evrede dahi artmış; fakat bu artış henüz $1,25(OH)_2D$ düzeyinde yükselmeye sebep olmamıştır. Aksayan mineralizasyon, büyüme plağında matriks proteini üretimini uyarır ve bu süreç ALP yükselmesi ile sonuçlanır. Artan PTH'ya bağlı kompanzasyon ile Ca düzeyi bu evrede normal olarak ölçülebilir.

Evre 2: Bu evrede, sekonder hiperparatiroidizmin etkisiyle $1,25(OH)_2D$ düzeyi artmıştır. Artan kemik rezorbsiyonu ve renal Ca reabsorbsiyonu sonucunda serum kalsiyum düzeyi normal aralıkta bulunabilir. Hiperparatiroidinin etkisiyle üriner P ekskresyonu artar ve hipofosfatemi belirgin hale gelir. ALP aktivitesi de artarak devam eder.

Evre 3: Bu evrede $1,25(OH)_2D$ de dahil olmak üzere D vitamini metabolitleri artık yetersizdir. $1,25(OH)_2D$ düzeyi artmış, normal veya düşük olarak bulunabilir. PTH düzeyindeki sekonder artış devam etmektedir. Görülen en şiddetli kemik rezorbsiyonuna rağmen hipokalsemi ve hipofosfatemi önlenemez. Riketsin bu ağır evresinde ALP düzeyindeki yükseklik de kaçınılmazdır (42).

Tablo 3. Riketste evrelere göre biyokimyasal bulgular (30, 42)

Rikets Evreleri	Kalsiyum	Fosfor	Magnezyum	25OHD	1,25OHD	Alkalen Fosfataz	Parathormon
Evre 1	N,↓	↓	N	↓	N	↑	↑
Evre 2	N,↓	↓	N	↓	↑	↑	↑
Evre 3	↓↓	↓	↓	↓↓	↑,N,↓	↑↑	↑↑

Not: N normal, ↓ düşük, ↑ yüksek

2.9. D Vitamini Bağlayıcı Protein

58 kD ağırlığında ve 358 aminoasit uzunluğundaki bir glikoprotein olan DVBP, dolaşımdaki aktif ve inaktif D vitamini formlarının yaklaşık % 85'ini bağlayan temel transport proteinidir. 1959 yılında Hirschfeld'in keşfettiği DVBP'nin D vitamini transportundaki rolü 1975'e kadar aydınlatılamamış ve o zamana kadar Gc-globulin (group specific component globulin) olarak isimlendirilmiştir. DVBP genetik yapısı itibari ile albümin, afamin ve α-fetoproteininin de dahil olduğu albüminoid ailesi içerisinde yer alır. Temel üretim yeri karaciğerdir. Tüm D vitamini metabolitleri DVBP'ye bağlanabilmesine rağmen DVBP'nin en yüksek afinitesi 25OHD ve $1,25(OH)_2D$ içindir (43).

Majör fonksiyonu D vitamini transportu olan DVBP'nin daha birçok biyolojik işlevi mevcuttur. DVBP, D vitamini eksikliği durumunda D vitamini ve metabolitleri için bir rezervuar fonksiyonu görmektedir. Doku hasarından sonra aktin ile bağlanan DVBP, polimerik aktin fibrillerinin oluşumunu engelleyerek aktin temizlenmesinde rol oynar. Buna ek olarak yağ asidi taşınmasında ve enflamasyon sürecinde kompleman faktör 5a (C5a) ile etkileşim oluşturarak nötrofil kemotaksisini uyarmada rol oynar. Enflamatuar süreçte deglikolizasyona uğrayan DVBP allelleri tarafından DVBP-makrofaj aktivasyon faktörü (DVBP-MAF) kompleksi oluşturulur. Bu bağlanma

makrofaj ve osteoklast aktivasyonunu uyarır. Ayrıca bu kompleks, kanser hastalarında immunsupresyonu engelleyici etkilidir.

D vitamini metabolitlerinin yaklaşık %10-15'i ise dolaşımda albümine bağlı olarak taşınır. Serbest hormon hipotezine göre, dolaşımda taşıyıcı bir protein ile bağlı şekilde bulunan hormonların sadece bağlı olmayan serbest formu biyoaktivitesini gösterebileceği hücrelere girebilir. D vitamini hormonu için de geçerli olan bu hipoteze göre, biyoyararlanılabilir D vitamini, dolaşımdaki serbest D vitamini metabolitleri ve albümine gevşek şekilde bağlı D vitamini formlarının toplamıdır.

Elektroforetik mobilitesine göre tanımlanmış 120'den fazla izoformu olan DVBP, bilinen en polimorfik proteinlerden birisidir. En yaygın olan üç varyant Gc1f (Gc1fast), Gc1s (Gc1slow) ve Gc2'dir. Bu varyantların serum düzeyleri ve 25OHD'ye olan afinitelerinde farklılıklar mevcuttur. Serum konsantrasyonuna göre yüksekten düşüğe doğru sıralama Gc1s>Gc2>Gc1f iken, 25OHD'ye olan afiniteye göre yüksekten düşüğe doğru olan sıralama Gc1f>Gc1s>Gc2'dir (43, 44).

DVBP ekspresyonu birçok biyolojik faktörden etkilenir. Gebelik, östrojen replasman tedavisi, oral kontraseptif kullanımı ve puberte ile birlikte artan östrojen DVBP sentezini indükler. DVBP, akut inflamatuar hadiselerde artan glukokortikoid ve IL-6 ile sentezi uyarılan bir pozitif akut faz reaktanıdır. Karaciğer sirozu gibi hepatik sentezin bozulduğu durumlarda ve renal klirensin arttığı çeşitli böbrek hastalıklarında DVBP düzeyi azalır. DVBP serum düzeylerinin tip 1 DM tanılı hastalarda hafif azalmış olarak ölçüldüğünü ve iyi kontrol ile bu düzeyin normal aralığa döndüğünü bildiren çalışmalar da mevcuttur. D vitamini ve metabolitlerinin ise DVBP sentezini düzenleyici etkisi yoktur (44).

2.10. D Vitamini Ölçüm Yöntemleri

D vitamini ölçümünde temel iki yöntem, immunoassay yöntemler (IA) ve kromatografik ayırma teknikleridir (45, 46).

IA, bir solüsyondaki protein veya kimyasal maddeyi tespit amacıyla ilgili maddeye özgü antikorları kullanarak, antijen antikor reaksiyonu esasına dayalı ölçüm yapan tekniktir. Laboratuvarda sık kullanılan IA türlerinden bazıları; radio-immunoassay (RIA), enzim-immunoassay (EIA), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), chemiluminescent immunoassay (CLIA), electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)'dır. IA yöntemde örnek saflaştırmasına gerek olmadığından kullanımı kolay, yaygın, ucuz ve otomatize D vitamini ölçüm yöntemidir (47). Kromatografik yöntemlere kıyasla daha az miktarda numuneyle çalıştığından ve ekstraksiyon aşaması gerektirmediğinden hızlıdır. Analitik aralığın dar olması bu tekniğin önemli dezavantajlarından biridir. Ayrıca ölçümde 25OHD dışı metabolitlerin ayrımı tam olarak sağlanamadığından, 25OHD düzeyi % 10-20 daha yüksek ölçülebilir. Bu duyarlılık problemi sebebiyle, kullanım kolaylığına rağmen altın standart teknik değildir (16, 47, 48).

Kromatografik yöntem, ayrıştırılması planlanan analizattaki bileşenlerin, haraketsiz bir alanda akan mobil bir faz yardımıyla hareket hızı farkına dayalı ayrım yapan tekniktir. Bu yöntemlerde bir ön ekstraksiyon aşaması ile 25OHD, bağlı olduğu DVBP ve albümin gibi proteinlerden ayrıştırılır. Zaman alıcı ve kompleks ön işlemler ve fazla numune miktarı gereksinimi sebebiyle IA tekniklere kıyasla bu yöntemler pratik değildir. IA yöntemler ile arasındaki temel fark ise, kromatografik yöntemlerin vitamin D2 ve vitamin D3 ayrımını yapabilmesidir. Günümüzde D vitamini ölçümünde kullanılabilen kromatografik yöntemler, 1977'de geliştirilen Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve 1980'li yıllarda geliştirilen Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)'tir (16, 48, 49).

HPLC, analiz edilen çözeltideki bileşenlerin UV ışın absorbansındaki farklılıkları temel alarak ölçüm yapan tekniktir. Bu yöntemde 25OHD ile çapraz tepkime veren D vitamini metabolitleri, uzun ve kompleks bir ekstraksiyon aşaması ile uzaklaştırılır(47). Buna rağmen interferan etkili bileşenlerin UV ışın absorbansındaki benzerlikleri test sonuçlarını etkileyebilir. İyi bir deneyim gerektirmesi, tekniğin diğer dezavantajıdır (46, 50).

LC-MS/MS yönteminde, iyonizasyon işlemi ile yüklü hale getirilen moleküller, elektromanyentik bir ünitede hareket ettirilerek kütle/yük oranına göre ayrılıp kantitatif olarak ölçülür. Bu teknikte analiz aralığı oldukça geniştir. LC-MS/MS D vitamini ölçümünde duyarlılık ve özgüllüğü en yüksek, interferans etkisi en düşük olan yöntemdir. Bu sebeple vitamin D ve metabolitlerinin ölçümünde altın standart yöntem olarak kabul edilir. LC-MS/MS yönteminin en önemli dezavantajları ise, cihaz fiyatının yüksek olması, uzun ekstraksiyon aşamaları, yüksek donanım ve deneyim gerektirmesidir. Maliyet yüksekliği sebebiyle pek çok laboratuvarda LC-MS/MS cihaz ve ekipmanı bulunmamaktadır (46, 48, 49).

2.11. Puberte, Tanner Evrelemesi

Puberte, fiziksel ve psikososyal olgunlaşmanın gerçekleştiği, çocukluktan erişkinliğe geçiş dönemidir (51, 52). Hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın olgunlaşması ile başlayan ve karmaşık nöroendokrin değişimleri içeren bu süreçte gerçekleşen önemli değişiklikler; sekonder seks karakterlerinin kazanılması, kemik maturasyonu ve boy uzamasında hızlanma, vücut yağ kitlesi dağılımında değişim ve gonadal olgunlaşma nihayetinde üreme kabiliyetinin kazanılmasıdır (51, 53, 54).

Puberte başlangıcında en önemli rol, hipotalamusun infundibular ve arkuat nükleuslarından pulsatil olarak salınan, dekapeptit yapılı bir hormon olan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH)'a aittir. Prepubertal dönemde GnRH sekresyonu düşük düzeyde olduğundan hipotalamo-hipofizer-gonadal (HPG) aks süpresedir. Puberte ile birlikte pek çok nörotransmitterin etkisiyle GnRH sekresyonu üzerindeki inhibisyon ortadan kalkar. GnRH pulsasyonlarının sıklık ve amplitüdündeki artış, ön hipofizden folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) salınımını uyarır (52, 55). Gonadotropinler olarak adlandırılan FSH ve LH, gonadlar üzerinde etkili olarak seks steroidlerinin salınımını ve gametogenezi uyarır. Kızlarda LH, overlerde teka hücrelerini uyararak östrojen sentezini stimüle eder. FSH ise kızlarda over foliküllerinin olgunlaşmasını ve komşu granüloza hücrelerinde testosteronun östrojene aromatizasyonunu uyarır. Östrojen artışı dişi cinsiyette pubertal büyüme

hamlesi, meme dokusunda büyüme, genital organlarda büyüme ve son olarak menstrüasyonun başlaması ile sonuçlanır. Erkeklerde LH, testislerde leydig hücrelerini uyararak testosteron sentezini sağlar. Erkeklerde artan testosteron 5α-redüktaz enzimi ile daha güçlü metabolit olan dihidrotestosterona (DHT) dönüştürülür. Testosteron pubertal büyüme hamlesi, genital organlarda büyüme, ses kalınlaşması, kas kitlesinde artış, erkeksi vücut yapısının kazanılması ve libidodan sorumlu iken DHT yağ ve ter bezlerinin aktivitesinde artış, sakal ve bıyık oluşumu, dış genitalyanın virilizasyonundan sorumludur. FSH ise sertoli hücreleri üzerine etki ederek spermatogenezi stimüle eder (54, 56).

HPG aks maturasyonu ile genellikle eş zamanlı şekilde adrenal bezler de olgunlaşır ve sekonder seks karakterlerinin gelişimine katkıda bulunur (57). Adrenarş olarak adlandırılan bu süreçte adrenal bezin zona retikülaris tabakasından dehidroepiandrosteron (DHEA), dehidroepiandrosteron sülfat (DHEA-S) ve androstenedion adlı adrenal androjenler sentezlenmeye başlar. Bu androjenler, kasık ve aksilla kıllarının gelişimi anlamına gelen pubarştan sorumludur (58). Pubarş çoğunlukla HPG aks maturasyonu ile çakışsa da pubertal başlangıçtan bağımsız bir şekilde gerçekleştiğinden pubertal gelişimi değerlendirmede en iyi belirteç değildir (57).

Pubertal başlangıç zamanı, ırk, cinsiyet, genetik faktörler, coğrafi etkenler, sosyokültürel durum ve beslenme gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Normal pubertal başlangıç zamanı kızlarda 8-13 yaş, erkeklerde 9-14 yaş arasındadır (52, 57). Kızlarda ortalama 2,5, erkeklerde ortalama 3,5 yılda pubertal gelişim süreci tamamlanır. Pubertenin fiziksel belirti basamaklarını izlemek için 1962'de James M. Tanner tarafından geliştirilen Tanner Ölçeği kullanılır. Tanner Ölçeği'ne göre evre 1 puberte öncesi dönem iken, evre 5 erişkin evre olarak tanımlanır (57).

Kızlarda puberte, telarş olarak adlandırılan meme tomurcuklanması ile başlar ve Tanner evre 2'ye giriş anlamına gelir. Telarşı ortalama 1,5 yıl içinde başlayan ve pubarş takip eder. İlk menstrüel siklus olarak tanımlanan menarş ise telarştan ortalama 2,5 yıl sonra görülür (52). Meme büyümesi ortalama 3-4 yılda tamamlanır.

Kızlarda pubertal büyüme pik'i Tanner evre 2-3'te gözlenir. Bu süreçte ortalama uzama hızı 8,25 cm/yıl'dır. Tüm puberte boyunca kızlarda ortalama 23-28 cm boy uzaması olur (59).

Kızlarda meme gelişimi, Tanner Ölçeği'ne göre 5 farklı evrede incelenir:

Evre 1: Meme dokusunda hiç büyüme yok.

Evre 2: Tomurcuklanma şeklinde büyüme. Meme dokusu ciltten hafif kabarıktır ve büyük bir düğmeyi andıracak şekilde görülür. Elle palpe edilebilir.

Evre 3: Tomurcuklanma şeklindeki meme dokusundan daha büyük ancak erişkin meme dokusundan daha küçük olan meme dokusudur.

Evre 4: Erişkin meme dokusudur. Areola cildi meme dokusunun cildinden daha yüksektedir. İki cilt dokusu arasında bir kot (yükselti) farkı vardır. İki doku bir kenar-sınır ile bariz olarak ayrıdır.

Evre 5: Erişkin meme dokusudur. Areola cildi ile meme dokusu cildi arasındaki kot farkı kaybolmuştur. İki doku arasında kenar-sınır hattı kaybolmuş ve birleşmiştir.

Kızlarda pubik kıllanma, Tanner Ölçeği'ne göre 5 farklı evrede incelenir:

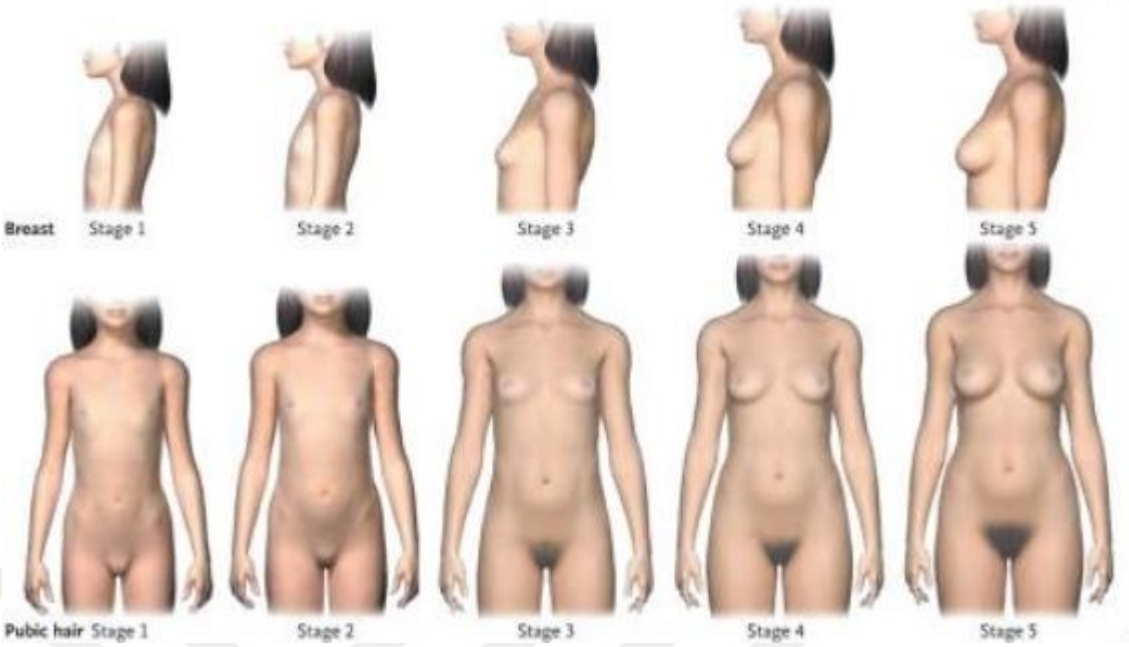
Evre 1: Pubik kıllanma yok.

Evre 2: Labialarda ince, seyrek, açık renkli kıllanma mevcuttur.

Evre 3: Mons pubise yayılan daha koyu renkli ve kıvrık kıllar mevcuttur.

Evre 4: Fazla miktarda pigmente kıvrık kıl pubik üçgene yayılmış fakat kasıklara yayılım yoktur.

Evre 5: Erişkin tipi kıllanma mevcuttur. Kıllar pubik üçgeni tam olarak doldurmuş ve kasıklara yayılmıştır (57, 60).



Şekil 5. Tanner Ölçeği'ne göre kızlarda meme gelişimi ve pubik kıllanma (60)

Erkeklerde ilk pubertal bulgu, Prader Orşidometresi ile yapılan ölçümde testis hacminin 4 ml'nin üstüne çıkması veya testis uzun çapının 2,5 cm'yi aşmasıdır. Gonadarş olarak adlandırılan bu testis büyümesi, Tanner evre-2'ye işaret eder (52). Pubertal büyüme atağı, erkeklerde Tanner evre 3'te pik seviyeye ulaşır. Bu aşamada ortalama büyüme hızı 9,5 cm/yıl iken tüm puberte süresince erkekte ortalama 26-28 cm boy uzaması olur (59). Sperm üretimi anlamına gelen spermarş ise Tanner evre 4'te ortaya çıkar.

Erkekte testis büyümesi, Tanner Ölçeği'ne göre 5 farklı evrede incelenir:

Evre 1: Testis hacmi 4 ml'nin, testis uzun çapı 2,5 cm'nin altındadır.

Evre 2: Testis hacmi 4-8 ml, testis uzun çapı 2,5-3,3 cm'dir.

Evre 3: Testis hacmi 9-12 ml, testis uzun çapı 3,4-4 cm'dir.

Evre 4: Testis hacmi 15-20 ml, testis uzun çapı 4,1-4,5 cm'dir.

Evre 5: Testis hacmi >20 ml, testis uzun çapı >4,5 cm'dir.

Erkekte pubik kıllanma, Tanner Ölçeği'ne göre 5 farklı evrede incelenir:

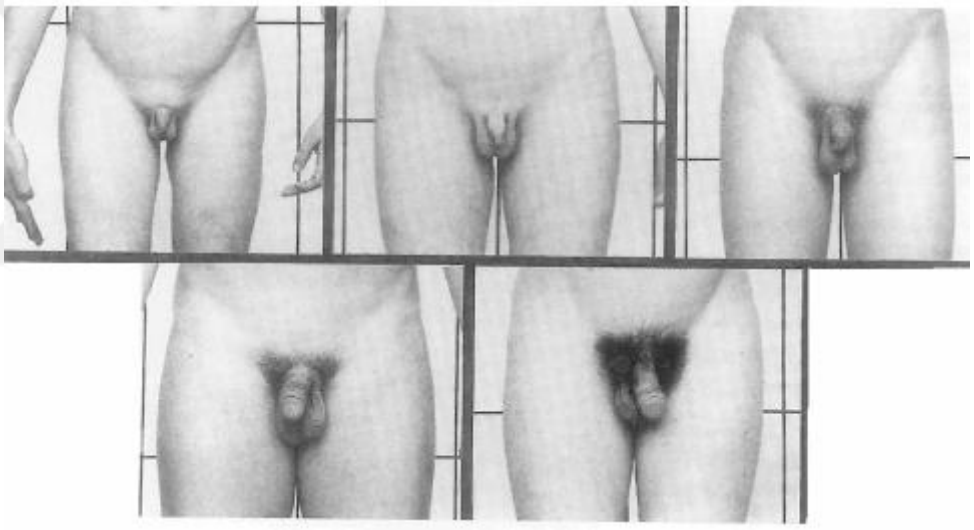
Evre 1: Pubik kıllanma yok.

Evre 2: Penis kökünde ince, seyrek, açık renkli kıllanma mevcuttur.

Evre 3: Sıklaşıp koyulaşan kıllar kıvrıklaşmaya ve pubise yayılmaya başlar.

Evre 4: Koyu renkli ve kıvrık kıllar iyice yaygınlaşmıştır; fakat uyluk ve göbeğe yayılım yoktur.

Evre 5: Erişkin tipi kıllanma mevcuttur. Kıllar uyluk iç yüzü ve göbeğe kadar yayılmıştır (57, 61).



Şekil 6. Tanner Ölçeği'ne göre erkeklerde gelişim evreleri (61)

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Ocak 2019- Şubat 2022 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi ve Erzurum Şehir Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ve Çocuk Endokrinoloji Poliklinikleri'nde yürütüldü. Çalışma için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 24.06.2021 tarih ve B.30.2.ATA.0.01.00/287 sayılı karar ile etik onay alındı. Ardından bilimsel proje hazırlandı. Çalışmamız, Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklendi (Proje Kodu: TTU-2021-9636).

3.1. Çocukların Seçimi

Çalışmaya alınan çocuklar 5-18 yaş aralığındaki sağlıklı çocuklardan seçildi. Çalışmaya katılmayı kabûl eden çocuklar ve onların ebevenylerinden öncelikle onam formu alındı. Son 6 ay içerisinde yüksek doz (stos) D vitamini tedavisi alan, kronik sistemik hastalığı olan (osteoporoz, malabsorbsiyon, granülomatöz hastalık, kronik böbrek yetersizliği, karaciğer yetersizliği, kanser, diyabet veya glukoz intoleransı, nörolojik hastalık, immun bozukluk gibi) ve yasal ebeveyni trafından onay verilemeyen çocuklar çalışmadan çıkarıldı. Dışlama kriterlerine sahip olmayan çocuklardan bir kan örneği alınarak serum Ca, P, ALP, Mg, PTH ve 25OHD düzeyleri ölçüldü. Bu ölçümler sonucunda;

Ca	8,8-10,8 mg/dl
P	5-11 yaş: 3,7-5,6 mg/dl
	12-15 yaş: 2,9-5,4 mg/dl
	16-19 yaş: 2,7-4,7 mg/dl
ALP	5-9 yaş: 145-420 U/l
	10-11 yaş: 140-560 U/l
	12-13 yaş: Kız: 105-420 U/l; Erkek: 200-295 U/l
	14-15 yaş: Kız: 70-230 U/l; Erkek: 130-525 U/l

	16-19 yaş: Kız: 50-130 U/l; Erkek: 65-260 U/l
Mg	1,5-2,3 mg/dl
PTH	10-65 pg/ml
25-OH- Vitamin D	≤ 15 ng/ml

olan çocuklar çalışmaya dahil edildi. Bu çocuklardan ikinci bir kan örneği alındı. Kan örnekleri jelli serum seperatör tüpüne (Becton-Dickinson Diagnostics, Oxford, England) konuldu. Örnekler oda sıcaklığında ortalama 30 dakika bekletilerek pıhtılaşmaları tamamlandı ve 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Alikotlanan bir miktar numune -80 °C'de dondurularak analiz gününe kadar saklandı.

Çalışmaya dahil edilen çocukların adı soyadı, cinsiyeti, doğum tarihi, idame dozunda D vitamini (400 U/gün) kullanıp kullanmadığı ve günlük ortalama güneşe doğrudan maruziyet süresi (saat/gün) kaydedildi. Kız çocuklarda giyim tarzı (örtülü/açık) ve menarş öyküsü sorgulandı. Tüm çocukların boy (cm) ve vücut ağırlığı (kg) ölçülerek kaydedildi. Boy ölçümü, ayakkabısız durumda iken duvara sabitlenmiş bir boy ölçer ile yapıldı. Vücut ağırlığı ölçümü, 100 gram hassasiyetli bir baskül ile yapıldı. Vücut ağırlığı ölçümü yapılırken, hastaların üzerinde yalnızca evde oda sıcaklığında yeterli kabul edilebilecek giysilerin (tişört, gömlek, tek kazak, tek bluz, pantolon, etek) bulunmasına izin verildi. Tüm çocukların puberte evrelemesi Tanner'in Puberte Evrelemesi'ne göre yapıldı. Tanner puberte evrelerinin her birinde en az 20 çocuk olması planlandı.

3.2. Biyokimyasal Analizler

Çocukların seçilmesinde kullanılan serum Ca, P, ALP ve Mg düzeyleri Roche Cobas c702 (Roche Diagnostics GmbH, Menheim, Germany) spektrofotometrik yöntem ile ölçülürken, 25OHD ve PTH düzeyleri Roche Cobas e801 (Roche Diagnostics GmbH, Menheim, Germany) cihazında kemiliüminesans yöntem ile ölçüldü. Bu ölçümler Atatürk Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Müdürlüğü Tıbbi Biyokimya Laboratuvarları'nda yapıldı. Ölçümlerin güvenilirliği günlük olarak kontrol edildi. Bunun için üretici firmadan sağlanan en az iki seviye kontrol materyali

kullanıldı. Laboratuvarda gün içi ve günler arası analitik varyasyonlar, (between- and within-day analytical variations) Westgard web sitesinde raporlanan within-subject biological variation (CV_I)'ların ½ si olacak şekilde uygulandı.

Dondurularak saklanan serum örnekleri analiz gününden bir gün önce +4 °C'de bekletilerek çözdürüldü. Serum DVBP ve $1,25(OH)_2D$ düzeyleri tek oturumda Atatürk Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Müdürlüğü Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında Dynex marka otomatik ELISA okuyucu cihazında (Dynex Technologies Headquarters, Chantilly, USA) üreticinin önerdiği standart protokole uygun olarak ELISA yöntemi ile ölçüldü. $1,25(OH)_2D$ ölçümü için $1,25OH_2$ Vit D Kit, SunRed Bio, Shanghai, China (katalog numarası: 201-12-1557) ve DVBP ölçümü için DVBP Kit, SunRed Bio, Shanghai, China (katalog numarası: 201-12-1403) kitleri kullanıldı. Kitlerin intra assay CV'leri < % 10 ve inter assay CV'leri ise <% 12 idi.

Serum östradiol, testosteron ve 25OHD düzeyleri Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde LCMS yöntemi ile ölçüldü. Serum östradiol ve testosteron düzeyinin LCMS yöntemi ile analizi için Jasem marka ''Steroid Hormonlar LCMS/MS Analiz Kiti'' kullanıldı. Bu kitin içerisinde serum kalibratör seti, serum kontrol seti, internal standart, reaktif-1, reaktif-2, mobil faz-A, mobil faz-B, Jasem steroid hormolar kolonu mevcuttu. Numune hazırlama aşamasında 425 mcl serum numunesi (numune&kalibrator&kontrol) cam santrifuj tüpüne aktarıldı. 25 mcl internal standart ve uzerine 450 mcl reaktif-1 eklenip 15 saniye vortekslendi. 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Çökeltinin üstünde kalan sıvı yeni bir cam tüpe aktarıldı. Çökeltiyi içeren santrifüj tüpü 2 kere 1,5 ml reaktif-2 ile yıkandı. Sıvı fazlar birleştirildikten sonra 3 dakika boyunca karıştırıldı. Daha sonra 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Çökeltinin üstünde kalan sıvıdan 2,4 ml alınıp yeni bir cam santrifuj tüpüne aktarıldı. 15 dakika azot gazı altında uçurma işlemi uygulandı. Son olarak 100 mcl reaktif-3 ile çözerek HPLC vialine aktarıldı.

Cihaz Parametreleri:

- Kolon fırını: 50 °C
- Enjeksiyon hacmi: 20 mcl
- Analiz süresi: 16 dakika

- Akış hızı: 0,4 ml/ dakika
- Ayırma metodu: Gradient metod

Serum 25OHD düzeyinin LCMS yöntemi ile analizi için Jasem marka ''25-Hidroksivitamin D2&D3, epi-Vit D3 Analiz Kiti'' kullanıldı. Bu kitin içerisinde liyofilize kalibratör seti, liyofilize kontrol seti, internal standart, reaktif-1, reaktif-2, mobil faz-B ve Jasem vitamin D HPLC kolonu mevcuttu. 200 mcl serum numunesi cam santrifuj tüpüne aktarıldı. 100 mcl reaktif-1 eklenip 5 saniye vortekslendi. 25 mcl internal standart eklendikten sonra 5 saniye vortekslendi. 975 mcl reaktif-2 eklendi ve 15 saniye vortekslendi. 3000 rpm'de 5 dakika santrifuj işlemi uygulandı. Çökeltinin üstünde kalan sıvı HPLC vialine aktarıldı.

Cihaz Parametreleri:

- Kolon fırını: 20 °C
- Enjeksiyon hacmi: 10 mcl
- Analiz süresi: 8,5 dakika
- Akış hızı: 0,7 ml/ dakika
- Ayırma metodu: Gradient metod

3.3 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 15.0 bilgisayar proğramı kullanılarak yapıldı. Öncelikle tüm verilerin dağılım analizi Shapiro-Wilk istatistik proğramı ile test edildi. Normal dağılım gösteren verilerin değeri ortalama±standart deviasyon (SD) olarak sunulurken, normal dağılım göstermeyen verilerin değeri ortanca (minimum değer-maksimum değer) olarak sunuldu. Pubertenin farklı evrelerine ait normal dağılım gösteren verilerin istatistiksel karşılaştırmaları için "Independent Sample T" testi kullanılırken, normal dağılım göstermeyen verilerin istatistiksel karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren veriler arasındaki korelasyonun tespiti için Pearson testi kullanılırken, normal dağılım göstermeyen veriler arasındaki korelasyonun tespiti için Spearman testi kullanıldı. Tüm testlerde elde edilen $p<0,05$ değerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma 111 kız ve 122 erkek çocuk ile tamamlandı. Toplam 111 kız çocuğundan 22 (%19,8)'si Tanner 1, 20 (%18)'si Tanner 2, 20 (%18)'si Tanner 3, 25 (%22,5)'i Tanner 4 ve 24 (%21,6)'ü Tanner 5 puberte evresinde idi. Kız çocuklarının farklı puberte evrelerine göre ortalama yaş, boy ve vücut ağırlığı değerleri Tablo 4'de gösterildi.

Tablo 4. Kız çocuklarda Tanner'in puberte evrelerine göre yaş, boy ve vücut ağırlığı değerleri (ortalama±SD)

Puberte evresi	Yaş (ay)	Boy (cm)	Vücut ağırlığı (kg)
Tanner 1 (n=22)	95,55±18,63	123,60±8,51	23,70±5,05
Tanner 2 (n=20)	129,55±17,13	140,02±9,82	33,84±8,24
Tanner 3 (n=20)	139,35±15,01	145,31±8,37	36,42±8,45
Tanner 4 (n=25)	177,80±25,20	158,98±8,16	51,46±10,01
Tanner 5 (n=24)	193,82±16,62	159,92±8,51	54,47±11,11

SD: standart deviasyon

Kız çocuklarının 31 (%27,9)'i örtülü giyinme tarzına sahip iken, 80 (%72,1)'i açık giyinme tarzına sahipti. D vitamini kullanma öyküsü bu çocukların 51 (%45,9)'inde var iken, 60 (%54,1)'ında yoktu. D vitamini kullanma öyküsü olan çocuklarda D vitamini kullanımı çocukların 3 (%2,7)'ünde düzenli iken, 48 (%43,2)'inde düzensiz idi. Ortalama günlük güneşlenme süresi 90,77±82,01 dakika idi. Tanner 1 ve Tanner 2 puberte evresindeki çocukların hiçbiri adet görmüyordu. Buna karşılık, Tanner 3 puberte evresindeki 20 çocuktan 4 (%20)'ünün, Tanner 4 puberte evresindeki 25 çocuktan 23 (%92)'ünün ve Tanner 5 puberte evresindeki 24 çocuktan 23 (%95,8)'ünün adet gördüğü öğrenildi.

Kız çocuklarda yapılan biyokimyasal analizlerden elde edilen verilerin dağılımı istatistiksel olarak değerlendirildi. Serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (kemiliüminesans yöntemi) ve 25OHD (LCMS yöntemi)'ye ait verilerin normal dağılıma sahip olduğu saptanırken, $1,25(OH)_2D$, östradiol ve DVBP'ye ait verilerin

normal dağılıma sahip olmadığı saptandı. Pubertenin farklı evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (kemiliüminesans yöntemi) ve 25OHD (LCMS yöntemi)'nin ortalama±SD değerleri Tablo 5'de sunuldu.

Tablo 5. Kız çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD)

Puberte evresi	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	ALP (IU/l)	Mg (mg/dl)
Tanner 1	9,79±047	4,96±0,48	91,17±24,88	1,97±0,16
Tanner 2	9,80±0,39	4,67±0,60	132,92±77,40	1,93±0,11
Tanner 3	9,52±0,24	4,48±0,60	245,00±81,15	1,92±0,13
Tanner 4	9,53±0,28	3,70±0,48	246,55±60,64	1,92±0,20
Tanner 5	9,65±0,43	3,67±0,55	259,45±87,18	2,00±0,15

Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, SD: standart deviasyon.

Tablo 5. Kız çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD) (DEVAM)

Puberte evresi	PTH (pg/ml)	25OHD (ng/ml) (KLM)	25OHD (ng/ml) (LCMS)
Tanner 1	44,88±11,84	9,57±1,44	15,81±4,88
Tanner 2	45,71±12,12	8,34±2,36	13,40±5,36
Tanner 3	50,82±13,27	9,15±1,92	16,13±6,52
Tanner 4	45,47±14,28	7,77±2,20	12,11±5,41
Tanner 5	43,43±12,46	7,47±2,48	13,49±5,77

Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, SD: standart deviasyon.

Pubertenin farklı evrelerine göre serum $1,25(OH)_2D$, östradiol ve DVBP'nin ortanca (minimum-maksimum) değerleri Tablo 6'da sunuldu.

Tablo 6. Kız çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum 1,25(OH)2D, östradiol ve DVBP düzeyleri [ortanca (minimum-maksimum)]

Puberte evresi	$1,25(OH)_2D$ (pmol/L)	Ostradiol (ng/ml))	DVBP (mcg/ml)
Tanner 1	47,95 (2,00-324,60)	5,30 (1,40-8,50)	161,96 (66,98-351,82)
Tanner 2	52,38 (4,80-333,00)	11,30 (6,30-74,60)	222,73 (30,57-480,86)
Tanner 3	54,02 (27,10-119,20)	14,30 (6,20-81,80)	143,22 (57,64-300,32)
Tanner 4	53,07 (28,5-244,50)	24,00(11,00-127,70)	184,92 (36,44-671,80)
Tanner 5	55,28 (19,40-209,00)	22,45 (12,50-38,10)	243,08 (116,95-2509,03)

1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 7. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri.

Parametre	T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5
Ca (mg/dl)	0,917	**0,034**	**0,032**	0,296
P (mg/dl)	0,091	**0,007**	**0,001**	**0,001**
ALP (IU/l)	0,578	0,944	**0,001**	**0,001**
Mg (mg/dl)	0,372	0,281	0,418	0,466
PTH (pg/ml)	0,823	0,133	0,879	0,690
25OHD (ng/ml) (KLM)	**0,045**	0,417	**0,002**	**0,001**
25OHD (ng/ml) (LCMS)	0,144	0,858	**0,020**	0,160
$1,25(OH)_2D$ (pmol/L)	0,529	0,958	0,532	0,481
Östradiol (ng/ml)	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**
DVBP (mcg/ml)	0,525	0,443	0,813	**0,003**

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, 1,25(OH)2D: 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Tablo 7. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM).

Parametre	T2-T3	T2-T4	T2-T5
Ca (mg/dl)	**0,012**	**0,012**	0,223
P (mg/dl)	0,329	**0,001**	**0,001**
ALP (IU/l)	0,591	**0,001**	**0,001**
Mg (mg/dl)	0,777	0,945	0,081
PTH (pg/ml)	0,211	0,952	0,544
25OHD (ng/ml) (KLM)	0,242	0,410	0,247
25OHD (ng/ml) (LCMS)	0,162	0,438	0,956
1,25(OH)$_2$D (pmol/L)	0,647	0,808	0,96
Östradiol (ng/ml)	0,478	**0,009**	**0,029**
DVBP (mcg/ml)	0,191	0,794	0,114

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, 1,25(OH)2D: 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Tablo 7. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM).

Parametre	T3-T4	T3-T5
Ca (mg/dl)	0,948	0,273
P (mg/dl)	**0,001**	**0,001**
ALP (IU/l)	**0,001**	**0,001**
Mg (mg/dl)	0,881	0,059
PTH (pg/ml)	0,204	0,064
25OHD (ng/ml) (KLM)	**0,033**	**0,018**
25OHD (ng/ml) (LCMS)	**0,029**	0,166
1,25(OH)$_2$D (pmol/L)	0,570	0,695
Östradiol (ng/ml)	0,058	0,117
DVBP (mcg/ml)	0,554	**0,002**

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, 1,25(OH)2D: 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein

Tablo 7. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM).

Parametre	T4-T5
Ca (mg/dl)	0,282
P (mg/dl)	0,805
ALP (IU/l)	**0,015**
Mg (mg/dl)	0,128
PTH (pg/ml)	0,598
25OHD (ng/ml) (KLM)	0,660
25OHD (ng/ml) (LCMS)	0,397
1,25(OH)$_2$D (pmol/L)	0,666
Östradiol (ng/ml)	0,990
DVBP (mcg/ml)	0,085

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, 1,25(OH)2D: 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Pubertenin ilerleyen evreleri ile birlikte serum Ca, Mg ve PTH düzeylerinin normal sınırlar içinde kaldığı, P düzeyinin anlamlı olarak azaldığı, ALP, östradiol ve DVBP düzeylerinin anlamlı olarak arttığı, kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyinin anlamlı olarak azaldığı, LCMS yöntemi ile ölçülen 25OHD ve 1,25(OH)$_2$D düzeylerinin değişmediği saptandı. Bununla birlikte, 1,25(OH)$_2$D düzeyinin pubertenin ilerlemesi ile progresif olarak arttığı bulundu.

Tanner 2 ve Tanner 3 puberte evreleri erken puberte evresi ve Tanner 4 ve Tanner 5 puberte evreleri geç puberte evresi olarak birleştirildi. Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken ve geç puberte evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (kemiliüminesans yöntemi) ve 25OHD (LCMS yöntemi)'nin ortalama±SD değerleri Tablo 8'de gösterildi.

Tablo 8. Kız çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD)

Puberte evresi	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	ALP (IU/l)	Mg (mg/dl)
T1	9,79±047	4,96±0,48	112,04±60,66	1,97±0,16
T2-T3	9,66±0,35	4,58±0,60	246,55±60,64	1,92±0,12
T4-T5	9,59±0,36	3,68±0,51	252,23±83,45	1,96±0,18

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, SD: standart deviasyon.

Tablo 8. Kız çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD) (DEVAM).

Puberte evresi	PTH (pg/ml)	25OHD (ng/ml) (KLM)	25OHD (ng/ml) ((LCMS)
T1	44,88±11,84	9,57±1,44	15,81±4,88
T2-T3	48,27±12,81	8,74±2,16	14,80±6,07
T4-T5	44,47±13,32	7,62±2,32	12,77±5,57

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, SD: standart deviasyon.

Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken ve geç puberte evrelerine göre serum $1,25(OH)_2D$, östradiol ve DVBP'nin ortanca (minimum-maksimum) değerleri Tablo 9'da gösterildi.

Tablo 9. Kız çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum 1,25(OH)2D, östradiol ve DVBP düzeyleri [ortanca (minimum-maksimum)]

Puberte evresi	$1,25(OH)_2D$ (pmol/L)	Estradiol (ng/ml))	DVBP (mcg/ml)
T1	47,95 (2,00-324,60)	5,30 (1,40-8,50)	161,96 (66,98-351,82)
T2-T3	52,94 (4,80-333,00)	12,55 (6,20-81,80)	168,15 (30,57-480,86)
T4-T5	54,43 (19,40-244,50)	23,60 (11,00-127,70)	227,76 (36,44-2509,03)

T: Tanner, 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri Tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri.

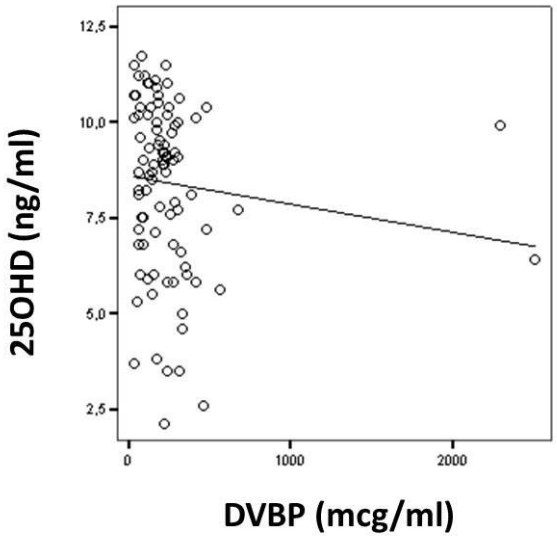
Parametre	PP-EPE	PP-GPE	EPE-GPE
Ca (mg/dl)	0,259	0,064	0,339
P (mg/dl)	**0,012**	**0,001**	**0,001**
ALP (IU/l)	0,780	**0,001**	**0,001**
Mg (mg/dl)	0,220	0,908	0,230
PTH (pg/ml)	0,310	0,903	0,177
25OHD (ng/ml) (KLM)	0,112	**0,001**	**0,022**
25OHD (ng/ml) (LCMS)	0,514	**0,034**	0,109
1,25(OH)$_2$D (pmol/L)	0,685	0,443	0,683
Östradiol (ng/ml)	**0,001**	**0,001**	**0,003**
DVBP (mcg/ml)	0,953	**0,050**	0,083

PP: pre-puberte (Tanner 1), EPE: erken puberte evresi (Tanner 2 ve Tanner 3), GPE: geç puberte evresi (Tanner 4 ve Tanner 5), Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, 1,25(OH)2D: 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

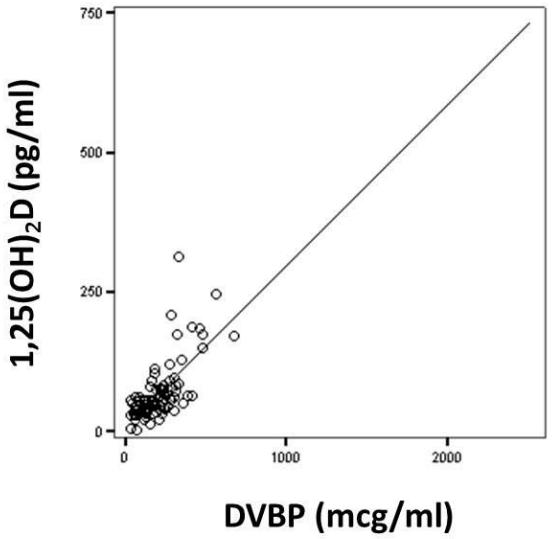
Pubertenin ilerlemesi ile birlikte serum Ca, Mg, PTH ve 1,25(OH)$_2$D düzeylerinde anlamlı bir farklılığın olmadığı, serum P ve kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı, ALP, östradiol, LCMS yöntemi ile ölçülen 25OHD ve DVBP düzeylerinin anlamlı arttığı saptandı.

Kız çocuklarda kemiliüminesans ve LCMS yöntemleri ile ölçülen ortalama serum 25OHD düzeylerinin sırasıyla 8,41±2,23 ng/dl ve 14,10±5,72 ng/dl bulundu. Değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (*p*=0,001).

Kız çocuklarda DVBP düzeyi ile kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyi arasında negatif korelasyon (r=-0,234 ve *p*=0,024) saptanırken, DVBP düzeyi ile 1,25(OH)$_2$D düzeyi arasında pozitif korelasyon (r=-0,686 ve *p*=0,001) saptandı (Şekil 7 ve Şekil 8).



Şekil 7. Kız çocuklarda DVBP düzeyi ile kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyi arasındaki negative korelasyon (r=-0,234 ve p=0,024).



Şekil 8. Kız çocuklarda DVBP düzeyi ile 1,25(OH)2D düzeyi arasındaki pozitif korelasyon (r=0,690 ve p=0,001).

Çalışmaya alınan toplam 122 erkek çocuğundan 27 (%22,1)'si Tanner 1, 31 (%25,4)'i Tanner 2, 21 (%17,2)'i Tanner 3, 21 (%17,2)'i Tanner 4 ve 22 (%18)'si Tanner 5 puberte evresinde idi. Erkek çocukların farklı puberte evrelerine göre ortalama yaş, boy ve vücut ağırlığı değerleri Tablo 11'de gösterildi.

Tablo 11. Erkek çocuklarda Tanner'in puberte evrelerine göre yaş, boy ve vücut ağırlığı değerleri (ortalama±SD)

Puberte evresi	**Yaş (ay)**	**Boy (cm)**	**Vücut ağırlığı (kg)**
Tanner 1 (n=27)	97,44±23,15	123,13±11,11	24,77±6,75
Tanner 2 (n=31)	128,29±21,03	140,90±10,68	35,05±10,21
Tanner 3 (n=21)	149,52±18,90	152,80±9,34	45,00±11,38
Tanner 4 (n=21)	186,43±18,73	168,84±9,61	58,28±12,22
Tanner 5 (n=22)	189,82±16,01	172,21±5,88	64,02±11,92

SD: standart deviasyon

D vitamini kullanma öyküsü erkek çocukların 34 (%27,9)'ünde var iken, 88 (%72,1)'inde yoktu. D vitamini kullanan çocukların tamamında D vitamini kullanımı düzensiz idi. Ortalama günlük güneşlenme süresi 113,48±107,97 dakika idi.

Erkek çocuklarda yapılan biyokimyasal analizlerden elde edilen verilerin dağılımı istatistiksel olarak değerlendirildi. Serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (kemiliüminesans yöntemi) ve 25OHD (LCMS yöntemi)'ye ait verilerin normal dağılıma sahip olduğu saptanırken, $1,25(OH)_2D$, testosteron ve DVBP'ye ait verilerin normal dağılıma sahip olmadığı saptandı. Pubertenin farklı evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (kemiliüminesans yöntemi) ve 25OHD (LCMS yöntemi)'nin ortalama±SD değerleri Tablo 12'de sunuldu.

Tablo 12. Erkek çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD)

Puberte evresi	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	ALP (IU/l)	Mg (mg/dl)
Tanner 1	9,73±0,46	4,59±0,64	150,57±57,76	1,98±0,13
Tanner 2	9,65±0,29	4,63±0,63	173,48±70,92	1,98±0,17
Tanner 3	9,72±0,39	4,98±0,51	215,0±67,82	2,03±0,18
Tanner 4	9,52±0,46	4,08±0,67	249,81±71,45	1,971±0,13
Tanner 5	9,55±0,48	4,00±0,64	314,14±129,66	2,11±0,14

Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, SD: standart deviasyon.

Tablo 12. Erkek çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD) (DEVAM).

Puberte evresi	PTH (pg/ml)	25OHD (ng/ml) (KLM)	25OHD (ng/ml) (LCMS)
Tanner 1	40,68±11,08	9,18±1,87	17,58±4,28
Tanner 2	38,84±11,70	11,01±1,78	16,77±4,94
Tanner 3	44,94±13,53	11,338±2,42	19,34±6,24
Tanner 4	48,59±11,95	10,19±3,00	17,17±4,40
Tanner 5	44,44±11,37	8,59±2,51	14,77±5,93

Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, SD: standart deviasyon.

Pubertenin farklı evrelerine göre serum $1,25(OH)_2D$, testosteron ve DVBP'nin ortanca (minimum-maksimum) değerleri Tablo 13'de sunuldu.

Tablo 13. Erkek çocuklarda pubertenin farklı evrelerine göre serum 1,25(OH)2D, testosteron ve DVBP düzeyleri [ortanca (minimum-maksimum)]

Puberte evresi	$1,25(OH)_2D$ (pmol/L)	Testosteron (ng/ml))	DVBP (mcg/ml)
Tanner 1	48,03 (12,30-204,60)	0,0 (0,00-0,07)	122,83 (59,20-318,33)
Tanner 2	59,85 (13,30-138,40)	0,03 (0,1-7,08)	139,0 (10,65-551,35)
Tanner 3	45,08 (26,80-481,0)	0,34 (0,01-3,10)	131,60 (16,04-657,93)
Tanner 4	65,61 (6,10-540,20)	3,03 (0,93-6,75)	158,06 (16,79-824,75)
Tanner 5	56,24 (10,80-246,60)	3,66 (0,63-6,36)	207,21 (30,57-1570,68)

1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri Tablo 14'de gösterildi.

Tablo 14. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri.

Parametre	T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5
Ca (mg/dl)	0,486	0,964	0,139	0,220
P (mg/dl)	0,803	**0,029**	**0,011**	**0,002**
ALP (IU/l)	0,063	**0,001**	**0,045**	**0,001**
Mg (mg/dl)	0,984	0,229	0,800	**0,002**
PTH (pg/ml)	0,543	0,237	**0,022**	0,249
25OHD (ng/ml) (KLM)	**0,001**	**0,001**	0,163	0,349
25OHD (ng/ml) (LCMS)	0,517	0,265	0,750	0,067
$1,25(OH)_2D$ (pmol/L)	0,597	0,173	0,374	0,886
Testosteron (ng/ml)	**0,001**	**0,001**	**0,001**	**0,001**
DVBP (mcg/ml)	0,722	0,915	0,943	0,161

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, 1,25(OH)2D: 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Tablo 14. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM).

Parametre	T2-T3	T2-T4	T2-T5
Ca (mg/dl)	0,501	0,213	0,365
P (mg/dl)	**0,043**	**0,004**	**0,001**
ALP (IU/l)	**0,026**	**0,001**	**0,001**
Mg (mg/dl)	0,260	0,838	**0,006**
PTH (pg/ml)	0,090	**0,005**	0,089
25OHD (ng/ml) (KLM)	0,577	0,223	**0,001**
25OHD (ng/ml) (LCMS)	0,104	0,764	0,190
1,25(OH)$_2$D (pmol/L)	0,084	0,650	0,523
Testosteron (ng/ml)	**0,001**	**0,001**	**0,001**
DVBP (mcg/ml)	0,908	0,752	**0,038**

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, 1,25(OH)2D: 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Tablo 14. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM).

Parametre	T3-T4	T3-T5
Ca (mg/dl)	0,145	0,234
P (mg/dl)	**0,001**	**0,001**
ALP (IU/l)	**0,001**	**0,001**
Mg (mg/dl)	0,189	0,139
PTH (pg/ml)	0,360	0,897
25OHD (ng/ml) (KLM)	0,181	**0,001**
25OHD (ng/ml) (LCMS)	0,200	**0,018**
1,25(OH)$_2$D (pmol/L)	**0,037**	0,361
Testosteron (ng/ml)	**0,001**	**0,001**
DVBP (mcg/ml)	0,644	0,065

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, 1,25(OH)2D: 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Tablo 14. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri (DEVAM).

Parametre	T4-T5
Ca (mg/dl)	0,810
P (mg/dl)	0,673
ALP (IU/l)	0,258
Mg (mg/dl)	**0,002**
PTH (pg/ml)	0,251
25OHD (ng/ml) (KLM)	**0,066**
25OHD (ng/ml) (LCMS)	0,142
1,25(OH)$_2$D (pmol/L)	0,361
Testosteron (ng/ml)	0,529
DVBP (mcg/ml)	0,124

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi 1,25(OH)$_2$D: 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Pubertenin ilerleyen evreleri ile birlikte serum Ca, Mg ve PTH düzeylerinin normal sınırlar içinde kaldığı, P düzeyinin anlamlı olarak azaldığı, ALP, testosteron ve DVBP düzeylerinin anlamlı olarak arttığı, kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyinin anlamlı olarak azaldığı, LCMS yöntemi ile ölçülen 25OHD ve 1,25(OH)$_2$D düzeylerinin değişmediği saptandı. Bununla birlikte, 1,25(OH)$_2$D düzeyinin pubertenin ilerlemesi ile progresif olarak arttığı bulundu.

Tanner 2 ve Tanner 3 puberte evreleri erken puberte evresi ve Tanner 4 ve Tanner 5 puberte evreleri geç puberte evresi olarak birleştirildi. Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken ve geç puberte evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (kemiliüminesans yöntemi) ve 25OHD (LCMS yöntemi)'nin ortalama±SD değerleri Tablo 15'de gösterildi.

Tablo 15. Erkek çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD)

Puberte evresi	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	ALP (IU/l)	Mg (mg/dl)
T1	9,73±0,46	4,59±0,64	162,02±64,92	1,98±0,13
T2-T3	9,68±0,34	4,77±0,60	215,0±67,82	2,00±0,17
T4-T5	9,54±0,47	4,04±0,65	275,79±103,02	2,04±0,15

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paretiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, SD: standart deviasyon.

Tablo 15. Erkek çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum Ca, P, ALP, Mg, PTH, 25OHD (KLM) ve 25OHD (LCMS) düzeyleri (ortalama±SD) (DEVAM).

Puberte evresi	PTH (pg/ml)	25OHD (ng/ml) (Eliza)	25OHD (ng/ml) ((LCMS)
T1	40,68±11,08	9,18±1,87	17,58±4,28
T2-T3	41,30±12,71	11,14±2,05	17,81±5,59
T4-T5	46,47±11,71	9,37±2,84	15,94±5,32

T: Tanner, Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paretiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, SD: standart deviasyon.

Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken ve geç puberte evrelerine göre serum $1,25(OH)_2D$, testosteron ve DVBP'nin ortanca (minimum-maksimum) değerleri Tablo 16'da gösterildi.

Tablo 16. Erkek çocuklarda Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre serum 1,25(OH)2D, testrosteron ve DVBP düzeyleri [ortanca (minimum-maksimum)]

Puberte evresi	$1,25(OH)_2D$ (pmol/L)	Testosteron (ng/ml)	DVBP(mcg/ml)
T1	48,03 (12,30-204,60)	0,0 (0,00-0,07)	122,83 (59,20-318,33)
T2-T3	56,52 (13,30-181,0)	0,06 (0,1-7,08)	133,75 (10,65-657,93)
T4-T5	59,48 (6,10-540,20)	3,47 (0,63-6,75)	168,67 (16,79-1570,68)

1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Tanner 1 (pre-puberte) puberte evresi, erken (T2-T3) ve geç (T4-T5) puberte evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki *p* anlamlılık değerleri Tablo 17'de gösterildi.

Tablo 17. Pubertenin farklı evrelerine göre biyokimyasal verilerin istatistiksel karşılaştırılmasındaki p anlamlılık değerleri.

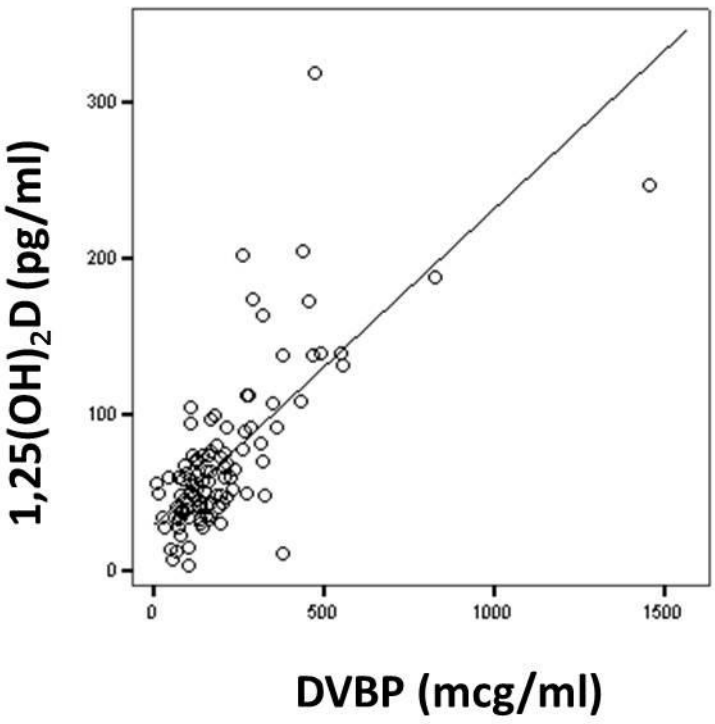
Parametre	PP-EPE	PP-GPE	EPE-GPE
Ca (mg/dl)	0,628	0,110	0,092
P (mg/dl)	0,221	**0,001**	**0,001**
ALP (IU/l)	0,070	**0,002**	**0,001**
Mg (mg/dl)	0,573	0,101	0,262
PTH (pg/ml)	0,830	**0,044**	**0,044**
25OHD (ng/ml) (KLM)	**0,001**	0,765	**0,001**
25OHD (ng/ml) (LCMS)	0,860	0,195	0,102
1,25(OH)$_2$D (pmol/L)	0,754	0,676	0,428
Testosteron (ng/ml)	**0,001**	**0,001**	**0,001**
DVBP (mcg/ml)	0,852	0,415	0,085

PP: pre-puberte (Tanner 1), EPE: erken puberte evresi (Tanner 2 ve Tanner 3), GPE: geç puberte evresi (Tanner 4 ve Tanner 5), Ca: kalsiyum, P: fosfor, ALP: alkalen fosfataz, Mg: magnezyum, PTH: paratiroid hormon, 25OHD: 25-hidroksi D vitamini, KLM: kemiliüminesans yöntemi, LCMS: likit kromotografi ve kütle spektroskopi yöntemi, 1,25(OH)2D: 1,25-dihidroksi D vitamini, DVBP: D vitamini bağlayıcı protein.

Pubertenin ilerlemesi ile birlikte serum Ca, Mg, LCMS yöntemi ile ölçülen 25OHD, 1,25(OH)$_2$D ve DVBP düzeylerinde anlamlı bir farklılığın olmadığı, serum P ve kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı, ALP, testosteron, PTH düzeylerinin anlamlı arttığı saptandı.

Erkek çocuklarda kemiliüminesans ve LCMS yöntemleri ile ölçülen ortalama serum 25OHD düzeyleri sırasıyla 10,08±2,48 ng/dl ve 17,09±5,27 ng/dl bulundu. Değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (*p*=0,001).

Erkek çocuklarda DVBP düzeyi ile 1,25(OH)$_2$D düzeyi arasında pozitif korelasyon (r=-0,658 ve *p*=0,001) saptandı (Şekil 9).



Şekil 9. Erkek çocuklarda DVBP düzeyi ile 1,25(OH)2D düzeyi arasındaki pozitif korelasyon (r=-0,658 ve p=0,001).

5. TARTIŞMA

Çocuklarda ve erişkinlerde serum D vitamini konsantrasyonu hakkında bir uzlaşı olmamasına rağmen, < 10 ng/ml'lik değerler D vitamini eksikliği, 10-20 ng/ml arasındaki değerler D vitamini yetersizliği ve 20-50 ng/ml arasındaki değerler D vitamini yeterliliği olarak kabul edilir (23, 62-66). Çalışmamıza alınan kız ve erkek çocuklarda kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen ortalama serum D vitamini düzeyi sırasıyla 8,41±2,23 ve 10,08±2,48 ng/dl idi. Bu bulguya göre kız ve erkek çocuklarda D vitamini eksikliği/yetersizliği olduğu söylenebilir. D vitamini esas olarak bağırsaklardan Ca emilimini kontrol eder. Bu yüzden D vitaminin hafif eksikliğinde bile PTH salgısı artarak serum Ca düzeyi normal sınırlarda tutulur (65). Serum PTH ile D vitamini düzeyleri arasındaki bu ilişki kullanılarak D vitamini düzeyinin gerçek durumu belirlenebilir (66-69). Başka bir deyişle yeterli serum D vitamini düzeyi, serum PTH düzeyini normal sınırlar içinde tutabilen D vitamini düzeyidir (65). D vitamini eksikliği/yetersizliği durumunun devam etmesi halinde serum Ca ve P düzeylerinde azalma ve ALP düzeyinde artma beklenen diğer biyokimyasal bulgulardır. Paratiroid hormonun salgılanabilmesi için serum Mg düzeyinin normal olması gerekir (70). Çalışmamıza alınan kız ve erkek çocuklarda serum Mg düzeyleri normal sınırlarda idi. Bu çocuklarda kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen serum D vitamini düzeyi eksiklik/yetersizlik düzeyinde olmasına rağmen, serum Ca, P, ALP ve PTH düzeylerinde beklenen değişiklikler yoktu. Bu bulgular çalışmaya alınan çocuklarda gerçek bir D vitamini eksikliğinin/yetersizliğinin olmadığını düşündürmektedir. Yani hedef doku düzeyinde D vitamini biyoaktivitesinin yeterli olduğu söylenebilir. Serbest hormon hipotezine göre proteine bağlı hormonlar rölatif olarak inaktif iken, proteine bağlı olmayan hormonlar biyolojik olarak aktiftir (71). Kan dolaşımındaki D vitamininin %85-90'ı DVBP'e ve %10-15'i albümine bağlı durumda iken, %1'inden daha azı serbest durumdadır (72, 73). Serum D vitamini düzeyinin doğru ölçümü için bağlı D vitaminin DVBP ve albüminden serbestlenmesi gerekir. Bununla birlikte, taşıyıcı proteinlerden D vitaminini ayırmak oldukça güçtür. Bu işlem için kullanılan kimyasal maddeler birçok immünolojik (immunoassay) veya protein bağlayan ölçüm yöntemleri için uygun değildir (6-8). D vitamini ölçüm yöntemlerinin değerlendirildiği bir çalışmada

serum örnekleri 51 sağlıklı bireyden, 52 gebe kadından, 50 hemodiyaliz hastasından ve 50 yoğun bakım hastasından elde edilmiştir (74). Beş otomatize immunoassay (Architect, Centaur, iSYS, Liaison, and Elecsys), bir radioimmünoassay (RIA) ve bir LCMS olmak üzere toplam 7 ölçüm yöntemi kullanılarak aynı serum örneklerinde D vitamini ölçümleri yapılmıştır. Serum DVBP düzeyi aynı serum örneklerinde ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. LCMS ölçüm yönteminin altın standart yöntem olduğu bu çalışmada Architect, Centaur, iSYS ve Liaison otomatize immunoassay yöntemleri ile elde edilen D vitamini ölçümlerinin DVBP düzeyleri ile negatif korelasyon gösterdiği ve LCMS yöntemi ile ölçülen D vitamini düzeylerinden sapmalar olduğu bulunmuştur. Bu bulgu otomatize ölçüm yöntemlerinin serumdaki DVBP'den D vitaminini ayıramadığını düşündürmektedir. Ayırma işlemindeki yetersizlik serum D vitamini düzeyinin hatalı düşük ölçümüne neden olabilir. Çalışmamıza dahil olacak çocukları belirlerken serum Ca, P, ALP, Mg ve PTH düzeylerinin normal sınırlarda olmasına dikkat edildi. Serum 25OHD düzeyleri Roche Diagnostics GmbH (Menheim, Germany) cihazında kemiliüminesans yöntemi ile ölçüldü ve serum 25OHD düzeyi < 15 ng/ml'nin altındaki çocuklar çalışmaya dahil edildi. Hem kız hem de erkek çocuklardan alınan aynı serum örneklerinde LSMS yöntemi ile ölçülen ortalama 25OHD düzeyinin kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen ortalama 25OHD düzeyinden anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu. Bu bulgu 25OHD'yi bağlı olduğu proteinlerden ayırmada Roche Diagnostics kemiliüminesans yönteminin de yetersiz olduğunu düşündürmektedir.

Etnik yapı, yaş, cinsiyet, gebelik ve östrojen düzeyi, obezite, karaciğer ve böbrek hastalıkları, diyabet, primer hiperparatiroidizm, inflamatuvar hastalıklar, plazma exchange ve periton diyalizi gibi işlemlerin serum DVBP ve D vitamini düzeylerini etkileyebildiği gösterilmiştir (11). Gebelikte artan östrojen düzeyi ile serum DVBP düzeyinin arttığı bulunmuştur (12, 13). Puberte dönemindeki çocuklarda serum DVBP düzeyinin nasıl değiştiği ve bunun serum 25OHD düzeyi üzerine olan etkisi günümüze kadar çalışılmamıştır. Biz çalışmamızda hem kız hem de erkek çocuklarda pubertenin ilerlemesi ile serum DVBP düzeyinin arttığını tespit ettik. Kız çocuklarda serum DVBP düzeyi ile kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyi

arasında negatif korelasyon bulduk. Bu bulgu pubertede artan serum DVBP'nin daha fazla 25OHD'yi bağladığını ve bunun sonucunda otomatize yöntemle ölçülen serum 25OHD düzeyinin hatalı olarak düşük ölçüldüğünü düşündürmektedir.

Puberte döneminde artan büyüme hormonu ve seks steroidleri ile kemik büyümesinin hızlandığı ve kemik kütlesinin arttığı bilinmektedir. Kemik mineralizasyonun artışında D vitamini önemli rol oynar. Çünkü bağırsaklardan Ca ve P'nin emilimi D vitamini sayesinde gerçekleşir. Bu yüzden puberte döneminde optimal kemik mineralizasyonu için yeterli D vitamini sağlanmalıdır. 25OHD böbreklerde 1-alfa-hidroksilaz enzimi sayesinde D vitamininin aktif metaboliti olan $1,25(OH)_2D$'ye çevrilir. Bu metabolit D vitaminin etkilerinden sorumludur. 25OHD bir depo metabolittir ve böbreklere ulaşması için DVBP gereklidir (75). Çalışmamızda pubertenin ilerlediğini gösteren en objektif bulgu olarak pubertenin evresi arttıkça kızlarda serum östrojen düzeyinin ve erkeklerde serum testosteron düzeyinin arttığını saptadık. Pubertenin ilerlemesi ile birlikte hem kız hem de erkek çocuklarda serum $1,25(OH)_2D$ ve DVBP düzeylerinin arttığını bulduk. Hem kız hem de erkek çocuklarda serum DVBP düzeyleri ile $1,25(OH)_2D$ düzeyleri arasında güçlü pozitif korelasyonlar tespit ettik. Buna ek olarak, bir kemik yapım belirteci olan ALP düzeyinin pubertenin ilerlemesi ile progresif olarak arttığını bulduk. Bu bulgulara göre puberte döneminde DVBP düzeyindeki artış ile birlikte böbreğe ulaşan 25OHD düzeyinin arttığı ve buna bağlı olarak serum $1,25(OH)_2D$ düzeyinin arttığı düşünülebilir. Serum $1,25(OH)_2D$ düzeyindeki artış ile birlikte kemik yapımının arttığı da söylenebilir. Çalışmamız puberte döneminde artan büyüme hormonu ve seks steroidleri ile birlikte yeterli kemik mineralizasyonunun sağlanmasında DVBP'nin önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız hem kız hem de erkek çocukların puberte döneminde serum DVBP'nin arttığını gösteren ilk çalışmadır. Puberte döneminde serum $1,25(OH)_2D$ düzeyindeki artıştan DVBP sorumlu olabilir. Serum yüksek DVBP düzeyi, otomatize immünoassayler ile yapılan ölçümlerde serum düşük 25OHD ve yüksek $1,25(OH)_2D$ düzeyleri ile ilişkilidir. Otomatize immünoassayler ile ölçülen serum 25OHD düzeyi altın standart yöntem olan LCMS ile ölçülen serum 25OHD

düzeyinden daha düşüktür. Otomatize immünoassayler ile ölçülen serum 25OHD düzeyi düşük iken, serum Ca, P, ALP, Mg ve PTH düzeylerinde beklenen değişikliklerin olmadığı durumlarda, serum 25OHD ölçümü ile ilgili teknik sorunlar akılda tutulmalıdır. Bu biyokimyasal tabloya sahip olgulara yüksek dozda D vitamini tedavisi vermekten kaçınılmalıdır.

6. SONUÇLAR

1. Kız çocuklarda pubertenin ilerlemesi ile serum Ca, Mg, PTH ve 1,25$(OH)_2$D düzeylerinde anlamlı bir farklılığın olmadığı bulundu (p<0,05).

2. Kız çocuklarda pubertenin ilerlemesi ile serum P ve kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyleri anlamlı olarak azaldığı saptandı (sırasıyla, p=0,001 ve p=0,001).

3. Kız çocuklarda pubertenin ilerlemesi ile serum ALP, östradiol, LCMS yöntemi ile ölçülen 25OHD ve DVBP düzeylerinin anlamlı olarak arttığı tespit edildi (sırasıyla, p=0,001, p=0,001, p=0,034 ve p=0,05).

4. Erkek çocuklarda pubertenin ilerlemesi ile serum Ca, Mg, LCMS yöntemi ile ölçülen 25OHD, 1,25$(OH)_2$D ve DVBP düzeylerinde anlamlı bir farklığın olmadığı bulundu (p<0,05).

5. Erkek çocuklarda pubertenin ilerlemesi ile serum P ve kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı (sırasıyla, p=0,001 ve p=0,001).

6. Erkek çocuklarda pubertenin ilerlemesi ile serum ALP, testosterone ve PTH düzeylerinin anlamlı olarak arttığı tespit edildi (sırasıyla, p=0,001, p=0,001 ve p=0,044).

7. Kız ve erkek çocuklarda kemiliüminesans ve LCMS yöntemleri ile ölçülen ortalama serum 25OHD düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı (sırasıyla, p=0,001 ve p=0,001).

8. Kız çocuklarda DVBP düzeyi ile kemiliüminesans yöntemi ile ölçülen 25OHD düzeyi arasında negative korelasyon bulundu (r=-0,234 ve p=0,024).

9. Kız ve erkek çocuklarda DVBP düzeyi ile 1,25$(OH)_2$D düzeyi arasında pozitif korelasyonlar saptandı (sırasıyla, r=-0,686 ve *p*=0,001 ve r=-0,658 ve *p*=0,001).

KAYNAKLAR

1. Holick MF. Vitamin D deficiency. New England journal of medicine. 2007;357(3):266-81.

2. Lopez-Molina M, Santillan C, Murillo M, Valls A, Bosch L, Bel J, et al. Measured free 25-hydroxyvitamin D in healthy children and relationship to total 25-hydroxyvitamin D, calculated free 25-hydroxyvitamin D and vitamin D binding protein. Clinical biochemistry. 2018;61:23-7.

3. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. Pediatrics. 2008;122(2):398-417.

4. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. The Journal of clinical endocrinology & metabolism. 2011;96(7):1911-30.

5. Tsuprykov O, Chen X, Hocher C-F, Skoblo R, Yin L, Hocher B. Why should we measure free 25 (OH) vitamin D? The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2018;180:87-104.

6. Vogeser M. Quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography tandem mass spectrometry. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010;21:565–73.

7. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. Steroids. 2010;75:477–88.

8. Beastall G, Rainbow S. Vitamin D reinvented: implications for clinical chemistry. Clin Chem. 2008;54:630–2

9. Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, et al. Global consensus recommendations on prevention and management of nutritional rickets. Hormone research in paediatrics. 2016;85(2):83-106.

10. Hatun S, Ozkan B, Orbak Z, Doneray H, Cizmecioglu F, Toprak D, et al. Vitamin D deficiency in early infancy. The Journal of nutrition. 2005;135(2):279-82.

11. Yousefzadeh P, Shapses SA, Wang X. Vitamin D binding protein impact on 25-Hydroxyvitamin D levels under different physiologic and pathologic conditions. Int J Endocrinol. 2014;2014:981581.

12. Møller UK, Streym S, Heickendorff L, Mosekilde L, Rejnmark L. Effects of 25OHD concentrations on chances of pregnancy and pregnancy outcomes: a cohort study in healthy Danish women. Eur J Clin Nutr. 2012;66:862–8.

13. Sinotte M, Diorio C, Bérubé S, Pollak M, Brisson J. Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women. Am J.Clin Nutr. 2009;89:634–40.

14. Colledge WH. GPR54 and puberty. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2004;15(9):448-53.

15. Emmanuel M, Bokor BR. Tanner Stages. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.

16. Öngen B, Kabaroğlu C, Parıldar Z. Vitamini'nin biyokimyasal ve laboratuvar değerlendirmesi. Türk klinik biyokimya dergisi. 2008;6(1):23-31.

17. Özkan B, Döneray H. vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 2011;54(2):99-119.

18. Wolpowitz D, Gilchrest BA. The vitamin D questions: how much do you need and how should you get it? Journal of the American Academy of Dermatology. 2006;54(2):301-17.

19. Chang S-W, Lee H-C. Vitamin D and health-The missing vitamin in humans. Pediatrics & Neonatology. 2019;60(3):237-44.

20. Antonucci R, Locci C, Clemente MG, Chicconi E, Antonucci L. Vitamin D deficiency in childhood: old lessons and current challenges. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. 2018;31(3):247-60.

21. Holick MF. Photobiology of vitamin D. vitamin D: Elsevier; 2018. p. 45-55.

22. Suda T, Abe E, Miyaura C, Tanaka H, Shiina Y, Kuribayashi T, et al. Receptors for 1, 25 (OH) 2D3. Vitamin D-Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism: De Gruyter; 2020. p. 57-124.

23. Wimalawansa SJ. Vitamin D in the new millennium. Current osteoporosis reports. 2012;10(1):4-15.

24. Jeon SM, Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. Exp Mol Med. 2018;50(4):1-14.

25. Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An Update on Vitamin D Metabolism. Int J Mol Sci. 2020;21(18).

26. Ozden A, Doneray H, Turkyilmaz A. Two novel CYP2R1 mutations in a family with vitamin D-dependent rickets type 1b. Endocrine. 2021;72(3):852-64.

27. Lips P. Vitamin D physiology. Progress in biophysics and molecular biology. 2006;92(1):4-8.

28. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. The American journal of clinical nutrition. 2008;87(4):1080S-6S.

29. Holick M, Krane S. Kemik ve mineral metabolizmasına giriş. İç: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (ed) Harrison İç Hastalıkları prensipleri (15 baskı) cilt.2:2192-205.

30. Hatun Ş, Bereket A, Çalıkoğlu AS, Özkan B. Günümüzde D vitamini yetersizliği ve nütrisyonel rikets. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 2003;46(3):224-41.

31. Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. Journal of cellular biochemistry. 2003;88(2):296-307.

32. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2010;95(2):471-8.

33. Özmen İ, Köse O. Vitamin D ve Deri. Turkish Journal of Dermatology/Turk Dermatoloji Dergisis. 2008;2(3).

34. Thacher TD, Clarke BL, editors. Vitamin D insufficiency. Mayo Clinic Proceedings; 2011: Elsevier.

35. Jeon S-M, Shin E-A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. Experimental & molecular medicine. 2018;50(4):1-14.

36. Khundmiri SJ, Murray RD, Lederer E. PTH and vitamin D. Comprehensive Physiology. 2011;6(2):561-601.

37. Wacker M, Holick MF. Vitamin D—effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. Nutrients. 2013;5(1):111-48.

38. Özkan B. Nutritional rickets. Journal of clinical research in pediatric endocrinology. 2010;2(4):137.

39. Chanchlani R, Nemer P, Sinha R, Nemer L, Krishnappa V, Sochett E, et al. An Overview of Rickets in Children. Kidney International Reports. 2020;5(7):980-90.

40. KÜÇÜKALİ GK, KURNAZ E, ERDEVE ŞS, AYCAN Z. Ülkemizde D Vitamini Profilaksisine Rağmen Devam Eden Bir Problem: Nutrisyonel Rikets. Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi. 2017;11(2):98-102.

41. Uday S, Högler W. Nutritional rickets & osteomalacia: A practical approach to management. The Indian Journal of Medical Research. 2020;152(4):356.

42. Kutluk G, Çetinkaya F. Rickets depend on vitamine faliure. The Medical Bulletin of Sisli Etfal Hospital.35(3):7-11.

43. Bikle DD, Schwartz J. Vitamin D binding protein, total and free vitamin D levels in different physiological and pathophysiological conditions. Frontiers in endocrinology. 2019;10:317.

44. Bouillon R, Schuit F, Antonio L, Rastinejad F. Vitamin D binding protein: a historic overview. Frontiers in endocrinology. 2020;10:910.

45. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. Annals of epidemiology. 2009;19(2):73-8.

46. Sahillioğlu B, Serdar MA, Erkal N, Erden G, Bakır F, Yıldırımkaya MM, et al. 25-OH-Vitamin D Hormon için Tandem Kütle Spektrometrede Yöntem Geçerli Kılma Çalışması ve Bu Yöntemin Farklı Yöntemlerle Karşılaştırılması. Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi. 2011;36(1).

47. USTAALİOĞLU YE, DİRİCAN M. Plazma 25-OH Vitamin D Ölçümünde HPLC, CMIA ve ECLIA Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2015;41(2):53-8.

48. Al-Zohily B, Al-Menhali A, Gariballa S, Haq A, Shah I. Epimers of vitamin D: A review. International journal of molecular sciences. 2020;21(2):470.

49. Couchman L, Moniz CF. Analytical considerations for the biochemical assessment of vitamin D status. Therapeutic advances in musculoskeletal disease. 2017;9(4):97-104.

50. Carter GD. 25-hydroxyvitamin D: a difficult analyte. Oxford University Press; 2012.

51. Gönç E. Normal puberte gelişimi ve puberte prekoks. Hacettepe Tıp Dergisi. 2009;40:164-8.

52. Breehl L, Caban O. Physiology, puberty. StatPearls [Internet]. 2020.

53. Eklioğlu BS, Atabek ME, AKYÜREK N, Sarikaya E. Endokrinoloji polikliniğine puberte bulguları ile başvuran olguların etiyolojik dağılımı ve klinik özellikleri. Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi. 2016;10(4):233-6.

54. Guidi JCA, Sapra A. Physiology, Sexual Maturity Rating. 2019.

55. Marques P, Skorupskaite K, George JT, Anderson RA. Physiology of GNRH and gonadotropin secretion. Endotext [Internet]. 2018.

56. Kaprara A, Huhtaniemi IT. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: tales of mice and men. Metabolism. 2018;86:3-17.

57. Emmanuel M, Bokor BR. Tanner stages. 2017.

58. Witchel SF, Pinto B, Burghard AC, Oberfield SE. Update on adrenarche. Current Opinion in Pediatrics. 2020;32(4):574-81.

59. Parlaz EA, Tekgül N, Karademirci E, Öngel K. Ergenlik dönemi: fiziksel büyüme, psikolojik ve sosyal gelişim süreci. Turkish Family Physician. 2012;3(2):10-6.

60. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. Archives of disease in childhood. 1969;44(235):291.

61. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. Archives of disease in childhood. 1970;45(239):13-23.

62. Doneray H, Yesilcibik RS, Laloglu E, Ingec M, Orbak Z. Serum vitamin D and vitamin D-binding protein levels in mother-neonate pairs during the lactation period. Ital J Pediatr. 2018;44:15

63. Rovner AJ, O'Brien KO. Hypovitaminosis D among healthy children in the United States: a review of the current evidence. Arch Pediatr Adolesc Med. 2008;162:513–9.

64. Esposito S, Lelii M. Vitamin D and respiratory tract infections in childhood. BMC Infect Dis. 2015;15:487

65. Saliba W, Barnett O, Rennert HS, Lavi I, Rennert G. The relationship between serum 25OHD and parathyroid hormone levels. Am J Med. 2011;124:1165–70

66. Okazaki R, Sugimoto T, Kaji H, Fujii Y, Shiraki M, Inoue D, Endo I, Okano T, Hirota T, Kurahashi I, Matsumoto T. Vitamin D insufficiency defined by serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone before and after oral vitamin D3 load in Japanese subjects. J Bone Miner Metab. 2011;29:103–10.

67. Holick MF, Siris ES, Binkley N, Beard MK, Khan A, Katzer JT, Petruschke RA, Chen E, de Papp AE. Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal north American women receiving osteoporosis therapy. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90:3215–24.

68. Carnevale V, Nieddu L, Romagnoli E, Battista C, Mascia ML, Chiodini I, EllerVainicher C, Frusciante V, Santini SA, La Porta M, Minisola S, Scillitani A. Regulation of PTH secretion by 25-hydroxyvitamin D and ionized calcium depends on vitamin D status: a study in a large cohort of healthy subjects. Bone. 2010;47:626–30.

69. Lips P, Duong T, Oleksik A, Black D, Cummings S, Cox D, Nickelsen T. A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86:1212–21.

70. Vetter T, Lohse MJ. Magnesium and the parathyroid. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2002;11:403–10.

71. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. Endocr Rev. 1989;10:232–74.

72. Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E, Haddad JG. Serum protein binding of 1,25- dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels. J Clin Endocrinol Metab. 1985;61:969–75.

73. Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and DVBP: the free hormone hypothesis revisited. J Steroid Biochem Mol Biol. 2014;144:132–7.

74. Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. Clin Chem. 2012;58:543–8.
75. Taylor SN. Vitamin D in Toddlers, Preschool Children, and Adolescents. Ann Nutr Metab. 2020;76 Suppl 2:30-41.